



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월04일
 (11) 등록번호 10-1515066
 (24) 등록일자 2015년04월20일

- | | |
|---|--|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>C12N 15/85</i> (2006.01) <i>A01K 67/027</i> (2006.01)
<i>A61F 2/02</i> (2006.01) <i>C12N 5/10</i> (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0135298
(22) 출원일자 2011년12월15일
심사청구일자 2013년03월29일
(65) 공개번호 10-2013-0068062
(43) 공개일자 2013년06월25일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020080020251 A
Mol. Reprod. Dev., Vol. 77, No. 3, pp. 209-221 (2010.03.)*
Xenotransplantation, Vol. 13, No. 6, pp. 514-521 (2006.11.)*
Immunobiology, Vol. 201, No. 5, pp. 583-597 (2000.04.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌 | (73) 특허권자
한국생명공학연구원
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(72) 발명자
이정웅
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)
(74) 대리인
이원희 |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 6 항

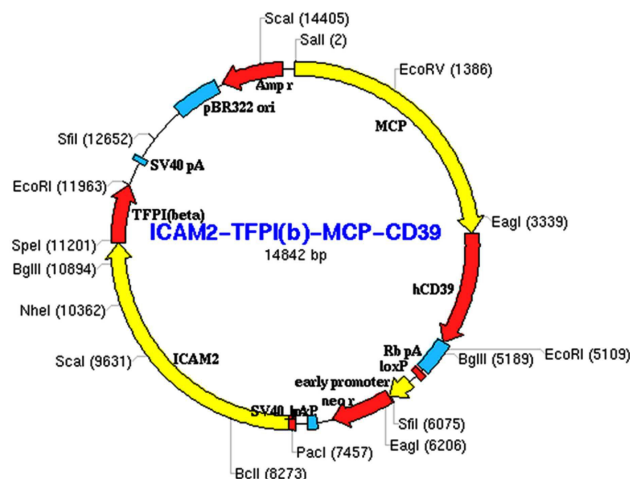
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **이종장기 이식용 혈액응고 방지를 위한 유전자 조작된 세포주 및 그의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 이종장기 이식용 혈액응고 방지를 위한 유전자 벡터가 과발현된 세포주 및 이를 제조하기 위한 방법에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 이종장기 이식시 발생하는 체액성면역거부반응인 혈전증 및 응고병증을 억제하는 단백질인 hTFPI β 및 hCD39를 안정적인 조절부위인 ICAM2 프로모터 및 MCP 프로모터에 연결하여 제작한 벡터를 형질도입한 세포주는 hTFPI β 및 hCD39를 과발현하며, 이를 체세포 핵치환한 형질전환 미니돼지는 초급성면역거부반응을 극복한 뒤에 나타나는 체액성면역거부반응의 큰 갈래인 혈전증(thrombosis)과 응고병증(coagulopathy)을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 면역거부반응이 감소된 이종장기 생산을 위한 자원으로서 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도17



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110301-061-550-001-02-00

부처명 농림수산식품부(농림부)

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 15대 아젠다 농업기술연구개발사업

연구과제명 급성혈관성 면역거부반응을 억제하는 hCD39유전자 과발현 세포주 개발

기여율 1/1

주관기관 한국생명공학연구원

연구기간 2011.01.01 ~ 2011.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

ICAM2 프로모터 및 MCP 프로모터에 각각 hTFPI β 유전자 및 hCD39 유전자가 연결된 ICAM2-hTFPI β -MCP-hCD39 벡터가 돼지 섬유아세포에 도입된 형질전환세포.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

- 1) ICAM2 프로모터 및 MCP 프로모터에 각각 hTFPI β 유전자 및 hCD39 유전자가 연결된 ICAM2-hTFPI β -MCP-hCD39 벡터를 돼지 섬유아 세포에 도입시키는 단계;
- 2) 발현 벡터가 도입된 상기 단계 1)의 형질전환 세포를 선별한 후 체세포 핵치환을 수행하는 단계; 및
- 3) 단계 2)의 핵치환된 형질전환 세포를 발달시키는 단계를 포함하는 hTFPI β 및 hCD39를 동시에 과발현하는 형질전환 돼지의 제조 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 형질전환 돼지는 미니돼지인 것을 특징으로 하는 형질전환 돼지의 제조 방법.

청구항 9

제 5항의 방법으로 제조되는 형질전환 돼지.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 형질전환 돼지는 미니돼지인 것을 특징으로 하는 형질전환 돼지.

청구항 11

제 9항의 형질전환 돼지를 사육한 후, 장기를 적출하는 단계를 포함하는 면역거부반응을 제거한 이식용 장기의 생산방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 초급성면역거부반응을 극복한 뒤에 나타나는 체액성면역거부반응의 큰 갈래인 혈전증(thrombosis)과 응고병증(coagulopathy)을 억제하는 hCD39와 hTFPI β를 과발현하는 유전자 컨스트럭트를 포함하는 벡터를 제조하고 이를 이용하여, 미니돼지의 섬유아세포에 형질전환 도입하고 hTFPI β-hCD39 과발현 세포주를 구축함으로써, 상기 세포주를 donor 세포주로 이용하여 핵치환한 미니돼지를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

의학의 발달로 기능이 저하되거나 손상된 장기를 다른 사람의 장기 이식으로 대체하는 것이 가능해 졌지만 적합한 장기 제공자를 찾는 것이 커다란 장애 요인이 되고 있으며, 이 같은 수요와 공급의 불균형으로 매년 많은 사람들이 장기를 이식받지 못해 사망하고 있다. 이러한 불균형을 해소하기 위해 여러 가지 방법들이 연구 개발되고 있으며, 인간과 생리학적으로 가까운 돼지의 장기를 이식하는 이종장기 이식 분야도 그동안 많은 연구 성과를 이루었다. 최근에는 국내외적으로 이러한 장기부족현상을 해결하기 위해 바이오 이종장기, 인공장기, 줄기세포 분화, 생체 조직공학을 이용한 조직 재생법 등의 연구가 전임상 및 임상단계에서 진행되고 있다. 이 중 바이오 이종장기이식은 부족한 장기를 무한정 공급할 수 있을 뿐 아니라 유전공학적 기법을 이용한 환자 맞춤형 형질전환장기의 생산이 가능하다는 점에서 타분야에 비해 현실적으로 장기 부족문제를 가장 빠르게 해결할 수 있는 방법이라 할 수 있다.

[0003]

이종장기의 생산을 위해 특정 유전자를 제거 또는 삽입하는 유전자 타겟팅 기술이 사용된다. 상동 재조합을 이용하여 특정 유전자가 타겟팅된 동물의 배아 줄기세포를 배반포 단계에 있는 배아에 삽입함으로써 결국 특정 유전자가 조작된 산자 생산을 가능하게 한다. 이러한 동물 배아줄기세포에 유전자 타겟팅법을 이용하면서, 많은 수의 특정 유전자 타겟팅된 마우스가 생산되었다(Brandon *et al.*, *Curr. Biol.*, 5(6): 625-634, 1995; Capecchi *et al.*, *Science*, 244(4910): 1288-1292, 1989; Thompson *et al.*, *Cell*, 56(2): 313-321, 1989; Hamanaka *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 9(3): 353-361, 2000; Thomas *et al.*, *Cell*, 51(3): 503-512, 1987; te Riele *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89(11): 5182-5187, 1992; Mansour *et al.*, *Nature*, 336(6197): 348-352, 1988; Luo *et al.*, *Oncogene*, 20(3): 320-328, 2001). 유전자 타겟팅법이 가축에 적용되면, 대량의 치료 단백질을 생산하는 동물 생체반응기(animal bioreactor) 또는 면역거부반응에 관여하는 유전자를 제거 또는 특정 위치에서 과다발현시켜 이종간 장기이식의 큰 문제인 초급성(hyperacute), 체액성 급성(acute humoral), 세포-매개성(cell-mediated) 및 만성(chronic) 거부반응과 같은 면역학적 거부반응의 극복이 가능하다.

[0004]

이종장기이식의 가장 근본적인 문제점은 면역학적 거부반응이다. 면역학적 거부반응에는 초급성면역거부반응(HAR: hyperacute rejection)과 체액성면역거부반응(AHXR: acute humoral xenograft rejection)인 항체면역과 세포-매개성 면역이 모두 관여한다. HAR은 돼지의 혈관 내피 에피토프인 Gal α 1-3 Gal β 1-4 GlcNAc(α 1,3 Gal)에 대한 인간의 자연 항체에 의해 매개되는 것으로, 돼지를 포함한 모든 동물종에 존재하는 α 1,3 Gal을 합성하는 알파-1,3-갈락토실트랜스퍼라아제(α 1,3-galactosyltransferase, α 1,3 GalT)가 사람과 일부 영장류에는 존재하지 않아서 생기는 문제이다. α 1,3 Gal은 여러 미생물들에도 존재하기 때문에 여기에 노출된 사람과 일부 영장류들은 이에 대한 자연 항체를 갖게 되고, 이 항체들이 이식된 장기의 혈관 내피에 결합하면 보체계가 활성화되어 응고 과정이 활성화되어 HAR 이라 부르는 초급성(몇 분에서 몇 시간 이내) 거부반응이 일어난다. HAR은 α 1,3 Gal에 대한 자연 항체의 제거 또는 보체의 억제 등으로 효과적으로 예방할 수 있으며, HAR이 차단되면, 이식 후 며칠 혹은 몇 주 이내에 체액성면역거부반응(AHXR)이 일어난다.

[0005]

이종 장기이식의 최적의 제공원으로는 장기의 크기 및 생리적 특징이 인간과 유사하고 다산성에 의해 장기의 대

량 공급이 가능한 미니 돼지가 고려되며 돼지 장기의 성공적인 이식은 일련의 면역거부반응(초급성, 급성 혈관성, 세포-매개성, 및 만성 면역거부반응)의 극복에 의존한다. 이러한 항체 매개성 이종이식 거부 반응을 극복하려는 시도들로는, 거부에 관련된 항체 또는 항체 생산 세포를 제거하는 방법, 세포독성 과정을 방해하는 방법, 항체 유도의 세포독성에 저항하는 이종이식장기의 작성, 이식 장기로부터 항원을 제거하는 방법과 이종이식 장기에 대한 B 세포의 관용을 유도하는 방법 등이 있다. 그 중, 면역학적 흡수법과 면역글로불린에 대한 특이 항체로 처리해서 α 1,3 Gal 특이적 자연항체를 피이식자로부터 제거하는 것과 생물학적 물질이나 사람 보체 조절단백질을 코딩하는 돼지 유래의 이식 유전자를 이용한 보체 활성화의 억제가 이식 후 수분 내에 발생하는 초급성 면역거부반응인 HAR을 예방하는데 효과적이라는 보고가 있었으며, 2002년 영국의 PPL사로부터 세계 최초로 α 1,3 GalT 유전자가 이형접합적으로(heterozygous) 제거된 체세포 복제 돼지가 생산되었다(Yifan Dai *et al.*, *Nat. Biotechnology*, 20: 251-255, 2002). 2003년에 동 회사에서 α 1,3 GalT 유전자가 동형접합적으로(homozygous) 제거된 체세포 복제에 성공함으로써 현 장기부족현상을 해결해 줄 수 있는 장기 이식용 질환 모델 동물 생산을 위한 획기적인 진보를 가져왔다(Carol J. Phelps, *Science*, 299: 411-414, 2003). 2005년 α 1,3 GalT 유전자 제거된 복제 돼지 유래의 장기는 원숭이로 이식되었으며, 그 결과 급성 면역 거부반응 없이 이식 후 2-6 개월까지 생존이 지연됨을 보고하였다(Kenji Kuwaki *et al.*, *Nature Medicine*, 11(1): 29-31, 2005). 그러나 α 1,3 GalT 유전자가 제거되었음에도 불구하고 다른 경로를 통하는 이종 항원에 의해 인체 보체 유전자들이 활성화됨으로써 장기 이식시 심각한 거부반응이 초래될 수 있음이 보고되었다(Tanemura, M. *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235: 359-364, 1997; Komoda, H. *et al.*, *Xenotransplantation*, 11: 237-246, 2004). 그러한 장애를 극복하기 위해, α 1,3 GalT 유전자 제거와 함께 인체 보체 억제 유전자를 과발현하는 복제 돼지를 생산하는 방법이 사용되었다(Yoichi Takahagi, *Molecular Reproduction and Development* 71: 331-338, 2005 Cozzi, Eb *et al.*, *Transplant Proc.*, 26: 1402-1403, 1994; Fodor, W. L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11153-11157, 1994; Adams, D. H. *et al.*, *Xenotransplantation*, 8: 36-40, 2001).

[0006]

그러나 이러한 접근법들이 HAR이 차단 후 일어나는 체액성면역거부반응(AHXR)은 예방하지 못하였다. 혈관내 혈전이 AHXR에서 장기의 기능장애에 중요한 영향을 미치는 것의 중요성이 부각되면서 그와 관련된 일부 연구에서는 항응고제 또는 항혈소판 제제를 투여하여 제한된 효과를 볼 수 있었으나, 일반적으로 혈관내 혈전을 예방하거나 이식장기의 수명을 연장하는 데는 실패하였다. 그 후, 인간 CD39 유전자의 과다발현에 의해, 이종장기이식 시 발생하는 혈전증이 억제됨이 보고되었으며(US20080003212A, Karren, M. D., *The Journal of Clinical Investigation*, 113: 1440-1446, 2004), 최근 장기 제공자에 유전자 이식을 통해 항응고인자를 발현시키는 것이 좋은 결과를 보여 주었고, 사람의 CD39유전자를 이식한 형질전환 돼지가 생산되어 장기 제공자에서의 CD39 발현이 혈관내 혈전을 막고 이식장기의 생존을 개선시킬 수 있는 가능성에 대한 실험이 진행되고 있다. 최근에는 남아있는 난관인 응고병증(coagulopathy), 세포-매개성 거부반응 등을 극복하기 위해 CD39, 외인계 응고억제제(tissue factor pathway inhibitor, TFPI), 트롬보모듈린(Thrombomodulin), CD47, 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen-E, HLA-E), UL16 결합 단백질-1(UL16 binding protein-1, ULBP-1) 등의 유전자가 최소한 하나 이상 발현되는 돼지가 연구되고 있으며, 면역관용을 유도하기 위해 혼합 키메라(mixed chimerism)나 이종 가슴샘(xenothymus)을 이식하는 방법 또한 연구되고 있다.

[0007]

이에, 초급성면역거부반응(HAR)이 극복된 미니돼지를 이종장기이식에 이용할 때 발생하는 체액성면역거부반응으로 인한 혈액응고의 문제점을 개선하기 위하여, 본 발명은 체액성면역거부반응의 큰 갈래인 혈전증(thrombosis)을 억제하는 hTFPI(TFPI-beta)와 응고병증(coagulopathy)을 억제하는 hCD39를 현재 보고된 것보다 더 안정적인 조절부위인 ICAM2 프로모터와 MCP 프로모터에 각각 연결하여, 혈관내피세포에서 두 유전자를 동시에 과발현하는 재조합 벡터를 제작하고 이를 미니돼지의 섬유아세포(fibroblast)에 형질전환 도입하여 TFPI-hCD39 과발현 세포주를 구축하여 donor 세포주로 이용하여 미니돼지에 형질전환 할 수 있으며, 이러한 형질전환 돼지를 이용하여 이종장기이식의 자원을 확보하고, 이를 통해 이종장기이식시 체액성면역거부반응을 극복할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008]

본 발명의 목적은 ICAM2 프로모터 및 MCP 프로모터에 각각 연결된 hTFPI β 및 hCD39이 조합 발현되어 혈관 내피에 부착된 형태로 혈전증을 억제시키며, 응고병증을 억제함을 특징으로 하는 ICAM2-hTFPI β -MCP-hCD39 벡터를

제공하는 것이다.

- [0009] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 hTFPI β 및 hCD39를 동시에 과발현하는 형질전환 동물의 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0011] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 제조되는 형질전환 동물을 제공하는 것이다.
- [0012] 아울러, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 형질전환 동물을 사육한 후, 장기를 적출하는 단계를 포함하는 면역거부반응을 제거한 이식용 장기의 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ICAM2 프로모터 및 MCP 프로모터에 각각 연결된 hTFPI β 및 hCD39이 조합 발현되어 혈관 내피에 부착된 형태로 혈전증을 억제시키며, 응고병증을 억제함을 특징으로 하는 ICAM2-hTFPI β-MCP-hCD39 벡터를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 hTFPI β 및 hCD39를 동시에 과발현하는 형질전환 동물의 제조 방법을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조되는 형질전환 동물을 제공한다.
- [0017] 아울러, 본 발명은 상기 형질전환 동물을 사육한 후, 장기를 적출하는 단계를 포함하는 면역거부반응을 제거한 이식용 장기의 생산방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명의 hCD39와 hTFPI-beta를 과발현하는 유전자 컨스트럭를 포함하는 벡터 및 이를 형질도입한 hTFPI-hCD39 과발현 세포주를 이용한 이종장기 이식용 형질전환 미니돼지를 생산하는 방법은 초급성면역거부반응을 극복한 뒤에 나타나는 체액성면역거부반응의 큰 갈래인 혈전증(thrombosis)과 응고병증(coagulopathy)을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 면역거부반응이 감소된 이종장기 생산을 위한 자원으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 ICAM2 프로모터를 gradient PCR로 증폭한 조건 및 증폭한 DNA를 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다;
 위: 시료 3의 PCR 조건; 및
 아래: M은 마커, 1은 62 °C로 풀림을 수행한 시료, 2는 65 °C로 풀림을 수행한 시료, 및 3은 68 °C로 풀림을 수행한 시료.
- 도 2는 TA-ICAM2 벡터를 클로닝한 후, Spe I 을 처리하여 클로닝 여부를 확인한 아가로즈 젤 사진이다.
- 도 3은 인간 TFPI β 유전자를 gradient PCR로 증폭한 조건 및 증폭한 DNA를 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다;
 위: gradient PCR 조건; 및
 아래: M은 마커, 1은 52 °C로 풀림을 수행한 시료, 2는 55 °C로 풀림을 수행한 시료, 3는 58 °C로 풀림을 수행한 시료, 및 4는 61 °C로 풀림을 수행한 시료.
- 도 4는 TA-hTFPI β 벡터를 클로닝한 후, 콜로니 PCR로 클로닝 여부를 확인한 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다.
- 도 5는 ICAM2-hTFPI β 벡터를 클로닝하기 위해, 제한효소 처리 후 단편들을 확인한 아가로즈 젤 사진이다;

1: TA-ICAM2 벡터를 *Sal*I, *Spe*I 및 *Eag*I 으로 자른 시료;

2: 백본 벡터를 *Sal*I 및 *Eco*R I 으로 자른 시료; 및

3: TA-hTFPI β 벡터를 *Spe*I 및 *Eco*R I 으로 자른 시료.

도 6은 ICAM2-hTFPI β 벡터를 클로닝한 후, *Sal*I, *Spe*I 및 *Eag*I 로 처리 후 단편들을 확인한 아가로즈 젤 사진이다.

도 7은 MCP 프로모터를 gradient PCR로 증폭한 조건 및 증폭한 DNA를 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다;

위: gradient PCR 조건; 및

아래: M은 마커, 54 로 풀림을 수행한 시료, 2는 56로 풀림을 수행한 시료, 3은 58 로 풀림을 수행한 시료, 4는 60 로 풀림을 수행한 시료, 및 5는 62 로 풀림을 수행한 시료이다.

도 8은 TA-MCP 벡터를 클로닝한 후, 초나선형(supercoiled form)을 확인하여 클로닝 여부를 확인한 아가로즈 젤 사진이다.

도 9는 PCR로 증폭한 인간 CD39 DNA 및 TA-hCD39 벡터를 0.8% 아가로즈 젤로 확인하여 사진이다;

A: 증폭한 인간 CD39 DNA; 및

B: TA 벡터에 연결한 증폭한 인간 CD39를 *Eco*R I 으로 절단하여 insert의 크기를 확인한 사진(3.8 kb는 TA 벡터 및 1.6 kb는 PCR로 증폭된 인간 CD39).

도 10은 TA-MCP 벡터 및 pCAGGS-hCD39 벡터를 제한효소로 잘라 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다;

M: 마커;

1: TA-MCP 벡터를 *Sal*I, *Xba*I 및 *Sca*I 으로 절단한 DNA 단편;

2: pCAGGS-hCD39 벡터를 *Sal*I 으로 절단한 DNA 단편;

3: pCAGGS-hCD39 벡터를 *Xba*I 으로 절단한 DNA 단편; 및

4: pCAGGS-hCD39 벡터를 *Sal*I 및 *Xba*I 으로 절단한 DNA 단편.

도 11은 MCP-hCD39 벡터를 mini-prep하여 *Sal*I 및 *Xba*I 으로 잘라 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다.

도 12는 도 10에서 선별한 lane 2의 벡터를 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다;

M: 마커;

1: MCP-hCD39 벡터; 및

2: MCP-hCD39 벡터를 *Sal*I 및 *Xba*I 으로 절단한 DNA 단편.

도 13은 ICAM2/hTFPI β 벡터 지도(map) 및 ICAM2/hTFPI β 벡터를 *Sal*I 및 *Eco*R I 으로 절단한 후 4.5 kb의 DNA 단편을 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다.

도 14는 ICAM2/hTFPI β 벡터 지도 및 ICAM2/hTFPI β 벡터를 *Sca*I, *Xba*I 및 *Eco*R I 으로 절단한 후 2.4 kb의 벡터 백본 DNA 단편을 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다.

도 15는 MCP/hCD39 벡터 지도 및 MCP/hCD39 벡터를 *Sca*I 및 *Xba*I 으로 절단한 후 8 kb의 DNA 단편을 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다.

도 16은 ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 벡터 지도 및 ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 벡터를 *Kpn*I 으로 절단한 후 6.6 kb, 4.4 kb 및 3.8 kb의 DNA 단편을 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다.

도 17은 ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 벡터 지도이다.

도 18은 ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 벡터를 여러 제한효소들로 절단하여 DNA 단편을 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다.

도 19는 ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 벡터 과발현 돼지 섬유아세포 세포주 구축을 PCR을 수행하여 0.8% 아가로즈 젤로 확인한 사진이다;

M: 마커;

P.C: 양성 대조군(일반 돼지 gDNA + ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 과발현 벡터);

N.C: 음성 대조군(일반 돼지 gDNA)

8, 10, 11, 17, 18, 26, 27, 28, 30, 49: 구축한 각각의 돼지 섬유아세포 세포주 번호;

A: 0.8 kb의 ICAM2/hTFPI β 밴드 사진; 및

B: 0.8 kb의 MCP/hCD39 밴드 사진.

도 20은 도 19의 10개의 세포주 중 5개 세포주의 염색체를 분석한 결과이다.

도 21은 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 벡터 과발현 돼지 섬유아세포 세포주 내에서 CD39 유전자의 과발현 유무를 FACS 분석 및 웨스턴 블롯으로 확인한 도이다;

Anti-hCD39: 인간 CD39 항체; 및

loading control: 베타-액틴.

도 22는 도 19의 10개의 세포주 중 5개 세포주를 체세포 핵 치환한 상실배 단계 내지 배반포 단계 사이의 배아를 PCR로 CD39 유전자의 발현 여부를 확인한 사진이다;

No. 8, No. 26, No. 27, No. 30, No. 49: 구축된 각각의 세포주를 체세포 핵 치환한 상실배 단계 내지 배반포 단계 사이 배아의 번호;

M: 마커;

P.C: 양성 대조군(일반 돼지 gDNA + ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 과발현 벡터); 및

N.C: 음성 대조군(일반 돼지 gDNA).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은 ICAM2 프로모터 및 MCP 프로모터에 각각 연결된 hTFPI β 및 hCD39이 조합 발현되어 혈관 내피에 부착된 형태로 혈전증을 억제시키며, 응고병증을 억제함을 특징으로 하는 ICAM2-hTFPI β-MCP-hCD39 벡터를 제공한다.

[0022] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 ICAM2 프로모터를 미니돼지 gDNA에서 증폭하여 TA-ICAM2 벡터를 제작하였고, 인간 유래 세포에서 hTFPI β를 증폭하여 TA-hTFPI β 벡터를 제작하였다. 상기 두 벡터를 제한효소로 절단하여 연결한 결과, ICAM2/hTFPI β 벡터가 제작되었다(도 13 벡터 지도 참조). 또한, MCP 프로모터를 미니돼지 gDNA에서 증폭하여 TA-MCP 벡터를 제작하였고, 인간 유래 세포에서 hCD39를 증폭하여 pCAGGS-hCD39 벡터를 제작하였다. 상기 두 벡터를 제한효소로 절단하여 연결한 결과, MCP/hCD39 벡터가 제작되었다(도 15 벡터 지도 참조). 상기 ICAM2/hTFPI β 벡터, MCP/hCD39 벡터 및 발현 벡터 백본을 제한효소로 절단하여 연결하였고, 그 결과, ICAM2/hTFPI β 및 MCP/hCD39를 동시에 과발현하는 ICAM2/hTFPI β-MCP-hCD39 더블 발현 벡터가 제작되었다(도 17 참조).

[0023] 따라서, 상기의 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 더블 발현 벡터는 이종 장기 이식시 면역거부반응인 혈전증(thrombosis)을 억제하는 인간 TFPI β 및 응고병증(coagulopathy)을 억제하는 인간 CD39 유전자를 과발현할 수 있으며, 더 안정적인 조절부위인 ICAM2 프로모터 및 MCP 프로모터가 연결되어 인간 TFPI β 유전자 및 인간 CD39 유전자를 안정적으로 과발현시켜 체액성면역거부반응이 감소된 이종장기 생산에 유용하게 이용될 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[0025] 상기 세포는 돼지 세포인 것이 바람직하며, 돼지 세포인 것이 더욱 바람직하고, 돼지 섬유아세포(fibroblast)인

것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

- [0026] 또한, 본 발명은
- [0027] 1) 제 1항의 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 발현 벡터를 세포에 도입시키는 단계;
- [0028] 2) 발현 벡터가 도입된 상기 단계 1)의 세포를 선별한 후 체세포 핵치환을 수행하는 단계; 및
- [0029] 3) 단계 2)의 핵치환된 세포를 발달시키는 단계를 포함하는, hTFPI β 및 hCD39를 동시에 과발현하는 형질전환 동물의 제조 방법을 제공한다.
- [0030] 상기 세포는 돼지 세포인 것이 바람직하며, 돼지 세포인 것이 더욱 바람직하고, 돼지 섬유아세포(fibroblast)인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 상기 동물은 미니돼지인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 제작한 상기의 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 더블 발현 벡터를 과발현하는 세포주를 구축하기 위하여 돼지 섬유아세포에 형질전환하였다. 형질전환한 50개의 세포주 콜로니를 확보하여 10개의 세포주를 PCR로 확인한 결과, ICAM2/hTFPI β 및 MCP/hCD39 유전자가 과발현되고 있는 세포주가 구축됨을 확인하였으며(도 19 참조), 구축된 세포주 중 5개의 세포주의 염색체를 분석하여 모든 세포주가 38개의 염색체 XX를 가진 암컷으로 정상 핵형임을 확인하였다(도 20 참조). 또한, 상기 벡터를 과발현하고 있는 세포주에서의 hCD39 단백질이 과발현되는지 FACS 분석 및 웨스턴 블롯을 통해 과발현 세포주에서 hCD39의 발현이 유도되는 것을 확인하였다(도 21 참조). 상기의 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 더블 발현 벡터를 과발현하는 세포주를 체세포 핵치환(SCNT)을 수행한 후 발달과정을 거쳐 상실배 단계 내지 배반포 단계의 배아에서도 hCD39가 발현되는 것을 PCR을 통해 확인하였다(도 22 참조).
- [0033] 따라서, 본 발명의 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 더블 발현 벡터를 과발현하는 세포주 및 이를 체세포 핵치환(SCNT)을 수행한 상실배 단계 내지 배반포 단계의 배아는 인간 TFPI β 유전자 및 인간 CD39 유전자를 안정적으로 과발현시켜 체액성면역거부반응이 감소된 이종장기 생산을 위한 형질전환 돼지(transgenic pig)의 생산에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조되는 형질전환 동물을 제공한다.
- [0035] 상기 동물은 미니돼지인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0036] 아울러, 본 발명은 형질전환 동물을 사육한 후, 장기를 적출하는 단계를 포함하는 면역거부반응을 제거한 이식용 장기의 생산방법을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 제작한 상기의 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 더블 발현 벡터를 돼지 섬유아세포에 형질전환하여 ICAM2/hTFPI β 및 MCP/hCD39 유전자가 과발현되고 있는 세포주가 구축하였으며, 구축된 세포주가 38개의 염색체를 가진 정상 핵형임을 확인하였다. 또한, 상기 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 더블 발현 벡터를 과발현하고 있는 세포주에서 hCD39 단백질이 과발현되는 것을 확인하였다. 상기의 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 더블 발현 벡터를 과발현하는 세포주를 체세포 핵치환(SCNT)을 수행한 후 발달과정을 거쳐 상실배 단계 내지 배반포 단계의 배아에서도 hCD39가 발현되는 것을 PCR을 통해 확인하여 본 발명의 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 더블 발현 벡터, 이를 과발현하는 세포주 및 이를 이용한 형질전환 동물은 인간 TFPI β 유전자 및 인간 CD39 유전자를 안정적으로 과발현시켜 체액성면역거부반응이 감소된 이종장기 생산을 할 수 있음을 알 수 있다.
- [0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0039] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0040] <실시예 1> ICAM2/hTFPI β 발현 벡터 제작 및 확인

[0041] <1-1> TA-ICAM2 벡터 제작 및 확인

[0042] 본 발명자들은 TA-ICAM2 벡터를 제작하기 위하여 미니돼지 ICAM2 프로모터를 pTOP-TA 벡터에 클로닝 하였다.

[0043] 구체적으로, 미니돼지 ICAM2 프로모터를 pTOP-TA 벡터에 클로닝 하기 위해 미니돼지 gDNA를 주형으로하여 *Sa*I 제한효소반응 베이스를 첨가한 forward 프라이머 5'-AAG TCG ACT CCA TGA AGA TGT GGG TTT GAT CCC TGA TCC TGC T-3'(서열번호 1) 및 *Spe*I 제한효소반응 베이스를 첨가한 reverse 프라이머 5'-AAA CTA GTA CCC ACG GGC TGG CAG GAA AGA GCC GAG GAC CGC C-3'(서열번호 2)를 사용해 gradient PCR을 수행하였다. PCR은 95 °C 5분 전변성(predenature), 95 °C 30초 변성(denature), 62 °C 내지 68 °C 30초 풀림(annealing), 72 °C 4분 연장(elongation), 72 °C 20분 후연장(post elongation)을 35 사이클로 pfu 중합효소를 사용하여 수행(풀림 온도에 따라 1번: 62 °C, 2번: 65 °C 및 3번: 68 °C)하였다(도 1). 세 시료의 증폭된 DNA를 확인하기 위해서 0.8% 아가로즈 젤에 전기영동 하여 증폭이 잘된 3번 시료를 선별하여(도 1), TA-cloning을 수행하기 위해 필요한 3'-adenosine tailing을 수행하기 위해 일반 Taq 중합효소를 첨가하여 72 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 제조사의 매뉴얼을 따라, 정제한 상기 ICAM2 프로모터(120 ng/ μ l) 4 μ l, 6X TOP-cloner 버퍼 1 μ l 및 Top-cloner mix 1 μ l를 첨가하여 상온에서 30분 동안 반응시켜 pTOP-TA 벡터와 ligation을 수행하였다. ligation이 완료된 벡터를 DH5 α competent cell에 형질전환하여 선별한 콜로니를 midi-prep한 후 *Spe*I 절단을 통해 클로닝이 완성된 벡터를 선별하였다(도 2). 선별된 벡터를(1,2,7 및 8) 시퀀싱(sequencing)을 통해 재차 확인하였다.

[0044] 그 결과, ICAM2 프로모터를 pTOP-TA 벡터에 클로닝한 TA-ICAM2 벡터를 제작하였다.

[0045] <1-2> TA-hTFPI β 벡터 제작 및 확인

[0046] 본 발명자들은 TA-hTFPI β 벡터를 제작하기 위하여 인간 TFPI β 를 pTOP-TA 벡터에 클로닝 하였다.

[0047] 구체적으로, 인간 TFPI β 를 증폭하기 위해 인간 유래 세포에서 mRNA를 추출해 역전사한 cDNA를 주형으로하여, *Sa*I 제한효소반응 베이스를 첨가한 forward 프라이머 5'-ACT AGT ATG ATT TAC ACA ATG AAG AAA GTA CAT G-3'(서열번호 3) 및 *Eco*RI 제한효소반응 베이스를 첨가한 reverse 프라이머 5'-GAA TTC TTA ACA TAG GCA TGA AAT GCT ATC CAA T-3'(서열번호 4)를 사용해 gradient PCR을 수행하였다. PCR은 95 °C 5분 전변성(predenature), 95 °C 30초 변성(denature), 52 °C 내지 61 °C 30초 풀림(annealing), 72 °C 1분 연장(elongation), 72 °C 20분 후연장(post elongation)을 35 사이클로 pfu 중합효소를 사용하여 수행(풀림 온도에 따라 1번: 52 °C, 2번: 55 °C, 3번: 58 °C 및 4번: 61 °C)하였다(도 3). 네 시료의 증폭된 DNA를 확인하기 위해서 0.8% 아가로즈 젤에 전기영동 하여 확인한 후(도 3), TA-클로닝을 수행하기 위해 필요한 3'-아데노신 테일링(adenosine tailing)을 수행하기 위해 4번 샘플에 일반 Taq 중합효소를 첨가하여 72 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 제조사의 매뉴얼을 따라, 상기의 증폭하여 정제한 hTFPI β (40ng/ μ l) 4 μ l, 6X TOP-cloner 버퍼 1 μ l 및 Top-cloner mix 1 μ l를 첨가 후 상온에서 30분 동안 반응시켜 pTOP-TA 벡터와 라이게이션(ligation)을 수행하였다. 라이게이션이 완료된 벡터를 DH5 α 컴피던트 세포(competent cell)에 형질전환하여 콜로니 선별(colony selection)을 수행 후 콜로니 PCR을 통해 TA-hTFPI β 클로닝 여부를 확인하였다(도 4). 콜로니 PCR로 선별한 콜로니를 미니-프렙(mini-prep)하여 시퀀싱(sequencing)을 통해 벡터 클로닝의 완성을 재차 확인하였다.

[0048] 그 결과, hTFPI β 를 pTOP-TA 벡터에 클로닝한 TA-hTFPI β 벡터를 제작하였다.

[0049] <1-3> ICAM2/hTFPI β 발현 벡터 제작 및 확인

[0050] 본 발명자들은 ICAM2/hTFPI β 벡터를 제작하기 위하여 TA-ICAM2 벡터의 ICAM2 프로모터, TA-hTFPI β 벡터의 hTFPI β 및 발현 벡터의 백분을 라이게이션 하였다.

[0051] 구체적으로, TA-ICAM2 벡터를 제한효소인 *Sa*I, *Spe*I 및 *Eag*I를 사용하여 절단(digestion)하여 아가로즈 젤에서 밴드를 확인한 후 ICAM2 프로모터 부분인 3.7 kb 크기의 밴드를 추출(extraction)하였으며(도 5의 밴드 1), TA-

hTFPI β 벡터를 제한효소인 *SpeI* 및 *EcoRI*를 사용하여 절단하여 아가로즈 겔에서 밴드를 확인한 후 hTFPI β 인 800 bp 크기의 밴드를 추출하였다(도 5의 밴드 3). 또한, 선별 마커인 엠페실린(Ampicillin) 저항 유전자, 벡터의 복제를 개시하는 PBR322 복제개시점(replication origin) 및 형질도입 세포 내에서 선별을 가능케 하는 퓨로마이신(puromycin) 저항 유전자를 가진 발현 벡터 백본(backbone)은 본 발명자들이 앞서 구축한 ICAM2/hDAF 발현 벡터의 백본 벡터를 제한효소인 *SaI*I 및 *EcoRI*를 사용하여 절단하여 아가로즈 겔에서 2.8 kb 크기의 밴드를 확인하여 이를 추출하였다(도 5의 밴드 2). 상기 세 가지 단편(fragment)인 ICAM2 프로모터, hTFPI β 및 발현 벡터 백본을 T4 ligase를 이용하여 라이게이션을 수행하였다. 클로닝 완료 후 미디-프렙(midi-prep)한 벡터를 동일 제한효소를 처리하여 세 단편이 벡터에 삽입되었음을 확인하였다(도 6).

[0052] 그 결과, ICAM2 프로모터, hTFPI β 및 발현 벡터 백본이 연결된 ICAM2/hTFPI β 벡터를 제작하였다.

[0053] <실시예 2> MCP/hCD39 발현 벡터 제작 및 확인

[0054] <2-1> TA-MCP 벡터 제작 및 확인

[0055] 본 발명자들은 TA-MCP 벡터를 제작하기 위하여 미니돼지 MCP 프로모터를 pTOP-TA 벡터에 클로닝 하였다.

[0056] 구체적으로, 미니돼지 MCP 프로모터를 pTOP-TA 벡터에 클로닝 하기 위해 미니돼지 gDNA를 주형으로하여 *SacI* 및 *SaI*I 제한효소반응 베이스를 첨가한 포워드(forward) 프라이머 5'-GAG CTC GTC GAC AGA CAG TTG TAA TTC ATT CCT TTC-3'(서열번호 5) 및 *XbaI* 제한효소반응 베이스를 첨가한 리버스(reverse) 프라이머 5'-ATA TCT AGA GAT GAG CAG GTA ACC CGA CAC CA-3'(서열번호 6)를 사용해 온도구배(gradient) PCR을 수행하였다. PCR은 95 °C 5분 전변성(predenature), 95 °C 30초 변성(denature), 50 °C 내지 62 °C 30초 풀림(annealing), 72 °C 4분 연장(elongation), 72 °C 20분 후연장(post elongation)을 35 사이클로 pfu 중합효소를 사용하여 수행(풀림 온도에 따라, 1번: 54 °C, 2번: 56 °C 및 3번: 58 °C, 4번: 60 °C 및 5번: 62 °C)하였다(도 7). 다섯 시료의 증폭된 DNA를 확인하기 위해서 0.8% 아가로즈 겔에 전기영동 하여 확인한 후(도 7), TA-클로닝을 수행하기 위해 필요한 3'-아데노신 테일링(adenosine tailing)을 수행하기 위해 5번 시료에 일반 Taq 중합효소를 첨가하여 72 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 제조사의 매뉴얼을 따라, 상기의 증폭하여 정제한 MCP 프로모터(120 ng/μl) 4 μl, 6X TOP-cloner 버퍼 1 μl 및 Top-cloner mix 1 μl를 첨가 후 상온에서 30분 동안 반응시켜 pTOP-TA 벡터와 라이게이션을 수행하였다. 라이게이션이 완료된 시료들을 0.8% 아가로즈 겔에 전기영동하여 클로닝된 벡터를 초나선형(supercoiled form)을 관찰하여 선별하였다(도 8). 선별한 벡터(시료 6 및 11)를 시퀀싱을 통해 재차 확인하였다.

[0057] 그 결과, MCP 프로모터를 pTOP-TA 벡터에 클로닝한 TA-MCP 벡터를 제작하였다.

[0058] <2-2> pCAGGS-hCD39 벡터 제작 및 확인

[0059] 본 발명자들은 pCAGGS-hCD39 벡터를 제작하기 위하여 인간 CD39를 pCAGGS 벡터에 클로닝 하였다.

[0060] 구체적으로, 인간 CD39를 증폭하기 위하여 인간 유래 세포에서 추출한 mRNA를 역전사시킨 cDNA를 주형으로하여, *XbaI* 자리를 첨가한 포워드(forward) 프라이머 5'-AT ATC TAG ACC ATG GAA GAT ACA AAG GAG TCT AAC-3'(서열번호 7) 및 *EcoRI* 자리를 첨가한 리버스(reverse) 프라이머 5'-ATA GAA TTC CTA TAC CAT ATC TTT CCA GAA ATA-3'(서열번호 8)를 사용해 PCR을 수행하였다. PCR은 95 °C 5분 전변성(predenature), 95 °C 30초 변성(denature), 58 °C 30초 풀림(annealing), 72 °C 1분 연장(elongation), 72 °C 20분 후연장(post elongation)을 35 사이클로 수행하였다. 증폭된 DNA를 확인하기 위해서 0.8% 아가로즈 겔에 전기영동 하여 확인한 후(도 9A), TA-클로닝을 수행하기 위해 필요한 3'-아데노신 테일링(adenosine tailing)을 수행하기 위해 4번 시료에 일반 Taq 중합효소를 첨가하여 72 °C에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 제조사의 매뉴얼을 따라 상기 증폭하여 정제한 인간 CD39(65 ng/μl) 4 μl, 6X TOP-cloner 버퍼 1 μl 및 Top-cloner mix 1 μl를 첨가 후 상온에서 30분 동안 반응시켜서 pTOP-TA 벡터와 라이게이션을 수행하였다. 라이게이션이 완료된 벡터를 DH5a competent cell에 형질전환하여 선별한 콜로니를 미니-프렙한 후, *EcoRI*으로 절단하여 인서트(insert)의 크기를 확인하여 클로닝된 TA-hCD39를 선별하였다(도 9B). 선별한 TA-hCD39 벡터를 제한효소 *XbaI* 및 *EcoRI*를 이용하여 pCAGGS 벡터로 클로닝하였다.

[0061] 그 결과, 인간 CD39를 pCAGGS 벡터에 삽입한 pCAGGS-hCD39 벡터를 제작하였다.

[0062] <2-3> MCP/hCD39 발현 벡터 제작 및 확인

[0063] 본 발명자들은 MCP/hCD39 벡터를 제작하기 위하여 TA-MCP 벡터의 MCP 프로모터 및 pCAGGS-hCD39 벡터를 라이게이션 하였다.

[0064] 구체적으로, TA-MCP 벡터를 제한효소인 *SaI*, *XbaI* 및 *ScaI*으로 절단하여 MCP 프로모터 부분인 3.6 kb 크기의 밴드를 아가로즈 겔에서 밴드를 확인한 후 추출(extraction)하였으며(도 10의 밴드 1), pCAGGS-hCD39 벡터를 제한효소인 *SaI* 및 *XbaI*으로 절단하여 아가로즈 겔에서 밴드를 확인한 후 5.8 kb의 밴드를 추출하였다(도 10의 밴드 4). 상기 두 개의 단편(fragment)을 T4 ligase를 이용하여 라이게이션을 수행하였다. 라이게이션이 완료된 벡터를 DH5 α 컴피턴트 세포(competent cell)에 형질전환하여 선별한 콜로니를 미니-프랩한 후 벡터를 동일 제한효소를 처리하여 두 단편이 벡터에 삽입되었음을 확인하였다(도 11). 또한, 클로닝이 된 벡터인 시료 2번을 미니-프랩한 후, 동일 제한효소를 처리하여 두 단편이 벡터에 삽입되었음을 재차 확인하였다(도 12).

[0065] 그 결과, TA-MCP 벡터의 MCP 프로모터와 pCAGGS-hCD39 벡터가 연결된 MCP/hCD39 벡터를 제작하였다.

[0066] <실시예 3> ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 더블 발현 벡터의 제작 및 확인

[0067] 본 발명자들은 ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 더블 발현 벡터를 제작하기 위하여 ICAM2/hTFPI β 벡터의 ICAM2/hTFPI β , MCP/hCD39 벡터의 MCP/hCD39 및 발현 벡터의 백본을 연결하였다.

[0068] 구체적으로, ICAM2/hTFPI β 벡터를 제한효소 *SaI* 및 *EcoRI*로 절단하여 아가로즈 겔에서 밴드를 확인한 후 ICAM2/hTFPI β 부분인 약 4.5 kb 크기의 DNA 단편을 추출(extraction)하였으며(도 13), ICAM2/hTFPI β 벡터를 제한효소 *ScaI*, *EcoRI* 및 *XbaI*로 절단하여 아가로즈 겔에서 밴드를 확인한 후 발현 벡터의 백본 부분인 약 2.4 kb 크기의 DNA 단편을 추출(extraction)하였다(도 14). 또한, MCP/hCD39 벡터를 제한효소 *ScaI* 및 *XhoI*으로 절단하여 약 8 kb 크기의 MCP/hCD39 DNA 단편을 추출하였다(도 15). 상기 세 단편을 정제하여 T4 ligase를 이용하여 라이게이션을 수행하였다. 라이게이션이 완료된 벡터를 DH5 α 컴피턴트 세포(competent cell)에 형질전환하여 선별한 콜로니를 미니-프랩한 후 초나선형이 확인된 벡터를 선별하여 제한효소 *KpnI*을 처리하였다. 제한효소로 절단된 벡터의 6.6 kb, 4.4 kb 및 3.8 kb의 DNA 세 단편을 확인함으로써 15 kb 크기의 더블(double) 발현 벡터를 확인하였다(그림 16). 추가적으로 상기에서 세 단편으로 잘린 벡터 시료 2 및 3을 미니-프랩을 수행하여 제한효소 *EcoRI*, *ScaI*, *SaI* 및 *SpeI*, *BglII* 또는 *Avr II*을 각각 처리하여 더블 발현 벡터를 재확인하였다(그림 18).

[0069] 그 결과, ICAM2/hTFPI β , MCP/hCD39 및 발현 벡터의 백본이 연결된 ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 더블 발현 벡터를 제작하였다(도 17).

[0070] <실시예 4> ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 형질전환 세포주의 제작 및 확인

[0071] <4-1> ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 형질전환 세포주의 제작 및 형질도입 확인

[0072] 본 발명자들은 ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 형질전환 세포주를 제작하기 위하여 상기 <실시예 3>에서 구축한 ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 벡터를 돼지 섬유아세포(fibroblast)에 형질전환하였다.

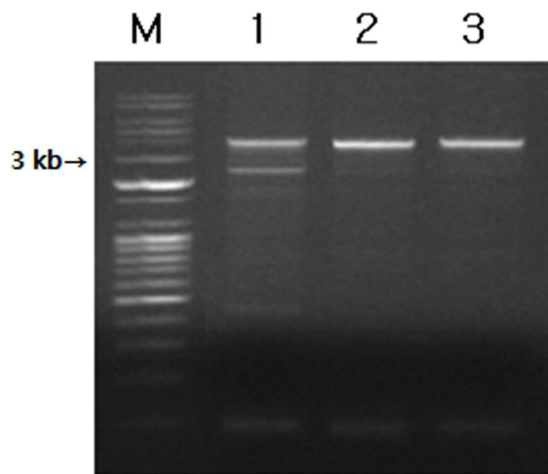
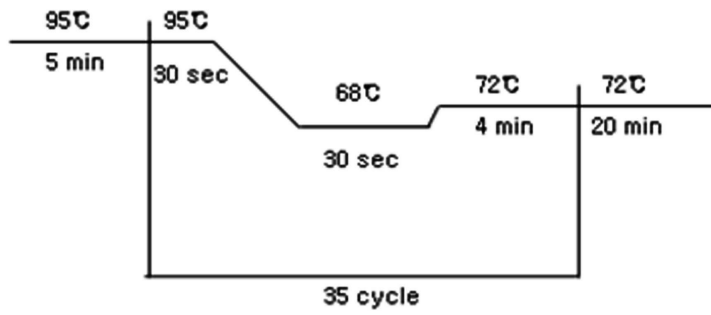
[0073] 구체적으로, ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 벡터를 돼지 섬유아세포(porcine fibroblast)에 형질전환하였으며, 형질전환한 세포주 중에 G418 선별을 통해 50개의 세포주 콜로니를 확보하였다. 선별한 50개의 돼지 섬유아 세포주 콜로니 중 10개의 세포주를 PCR로 ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 벡터의 형질도입을 아가로즈 겔로 확인한 결과, 모든 세포주에서 0.8 kb 크기의 ICAM2/hTFPI β 밴드와 0.8 kb 크기의 MCP/hCD39 밴드가 확인되었으며(도 19), 상기 세포주 중 5개 세포주의 염색체 분석결과, 모든 세포주가 38개의 염색체 XX를 가진 암컷으로 정상 핵형임을 확인하였다(도 20).

[0074] 따라서, ICAM2/hTFPI β -MCP/hCD39 벡터를 형질전환한 세포주를 확립하였으며, 이는 정상 핵형을 가짐을 알 수 있었다.

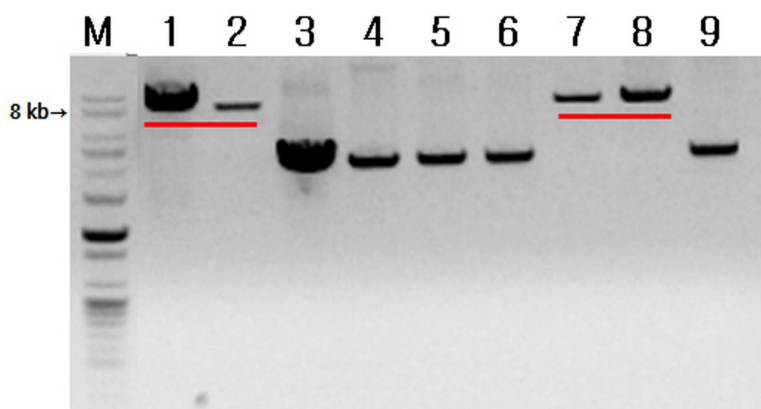
- [0075] <4-2> ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 형질전환 세포주의 hCD39의 과발현 확인
- [0076] 본 발명자들은 구축한 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 형질전환 세포주에서 hCD39의 과발현을 확인하기 위해 FACS 분석을 수행하였다.
- [0077] 구체적으로, 상기 <실시예 4-1>에서 형질전환한 돼지 섬유아 세포주를 PBS 10 ml로 2회 씻은 후 트립신-EDTA 용액 3 ml을 세포에 처리해 플레이트와 세포간의 결합단백질을 제거하였다. 세포가 플레이트로부터 떨어지기 시작하면 즉시 FBS가 포함된 성장배지 7 ml을 첨가하여 수차례 파이펫팅하여 세포를 완전히 단일세포로 분리하였다. 단일세포로 분리한 세포들을 1500 rpm으로 2 분 동안 원심분리하여 세포찌꺼기와 세포를 분리하였고 PBS 10 ml로 2회 씻은 후 1500 rpm으로 2 분 동안 원심분리하여 단일세포 펠릿을 얻었다. 5 mg/ml 농도로 PBS와 섞은 BSA용액 5 ml을 이용하여 한 시간 동안 블로킹을 수행한 후 항-CD39 항체(Abcam, USA)를 5 μl를 첨가하여 저온실(4 ℃)에서 3시간 동안 결합반응을 유도하였다. 3시간 후, 세포를 PBS 10 ml로 5회 씻어주었으며, PBS로 1:500 희석한 이차 항체-FITC 3 ml을 처리하여 저온실에서 1시간 동안 반응시키고 PBS로 씻어주었다. 대조군 역시 모든 반응을 동일하게 했으며 모든 반응이 끝난 세포는 FACS 기계(Aria V2)를 이용하여 분석을 수행하였다.
- [0078] 또한, 웨스턴 블롯으로 재확인을 수행하기 위하여, 상기 형질전환한 돼지 섬유아 세포주를 pro-prep(intron, Korea) 시약을 이용해 용해하여 4x SDS-PAGE 샘플 버퍼(bio-rad)와 섞어준 후 100 ℃에서 10분 동안 반응시켜 변성(denaturation)시켰다. 10% 페이지 젤로 100V에서 한 시간 동안 전기영동한 후 PVDF 막에 200V에서 한 시간 동안 트랜스퍼하였다. 트랜스퍼한 막에 5% 블로킹 시약(Bio-rad) 10 ml PBST를 이용하여 한 시간 동안 블로킹을 수행하였고 항-CD39 항체를 5 μl 처리하여 저온실에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 그 후, PBST로 3회 씻어주고 이차 항체-HRP를 이용하여 상온에서 한 시간 동안 반응시키고 PBST로 3회 씻은 후 LAS-1000 기계를 이용해 웨스턴 분석을 수행하였다.
- [0079] 그 결과, ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 과발현 세포주에서 hCD39의 발현이 유도되는 것을 확인하였다(도 21).
- [0080] 따라서, ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 벡터를 형질전환한 세포주에서 hCD39의 과발현이 유도되는 것을 알 수 있었다.
- [0081] <실시예 5> ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 형질전환 세포주의 체세포 핵치환 및 수정란에서의 과발현 유도 유전자 과발현 확인
- [0082] 본 발명자들은 상기 <실시예 4>에서 구축한 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 형질전환 세포주를 체세포 핵치환을 이용해 제작한 배아에서의 유전자 과발현을 확인하기 위해 PCR을 수행하였다.
- [0083] 구체적으로, 상기 <실시예 4>에서 구축한 ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 형질전환 세포주를 체세포 핵치환을 수행하기 위하여, 돼지난소에서 미성숙란을 채취해 IVM 배지에서 22시간 동안 배양 후, 호르몬-free IVM 배지에 22시간 동안 추가 배양하여 성숙시켰다. 그 후, 0.1% 히알루로니다아제(hyaluronidase)를 처리하여 난구세포를 제거하고, 성숙란 만을 선별하였다. 선별한 성숙란의 핵을 10% FBS, 7.5 mg/ml 사이토칼라신(cytochalasin) B을 추가한 HEPES buffered-TCM-199에서 유리 파이펫을 이용하여 제거하고, 형질전환세포를 주입하였다. 형질전환세포가 주입된 난자를 BTX electro-cell manipulator 2001을 이용하여 퓨전 배지(fusion medium)에서 융합시킨 후, 0.3% BSA, 7.5 mg/ml 사이토칼라신 B가 첨가된 PZM-3 배지에 2시간 동안 배양하였다. 배양한 난자 중에 융합된 난자만을 선별해 0.3% BSA가 첨가된 PZM-3 배지에서 2일 동안 배양 후, 10% FBS를 추가하여 5일 동안 추가로 배양하였다. 형질전환세포는 핵치환 3일 전에 해동하여 배양한 다음, 사용하기 바로 전에 0.025% 트립신-EDTA을 처리하여 PBS로 2번 씻은 후 사용하였다. 그 후, 상실배(morula) 단계 내지 배반포(blastocyst) 단계의 배아(embryo)를 수집해 PCR을 수행한 결과, hCD39 유전자의 발현이 확인되었다(도 22).
- [0084] 따라서, ICAM2/hTFPI β-MCP/hCD39 벡터를 형질전환한 세포주를 공여자(donor) 세포주로 이용하여 핵치환된 유전자변형 돼지(transgenic pig)를 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

도면

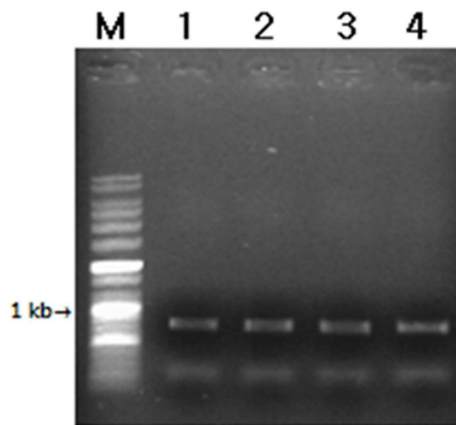
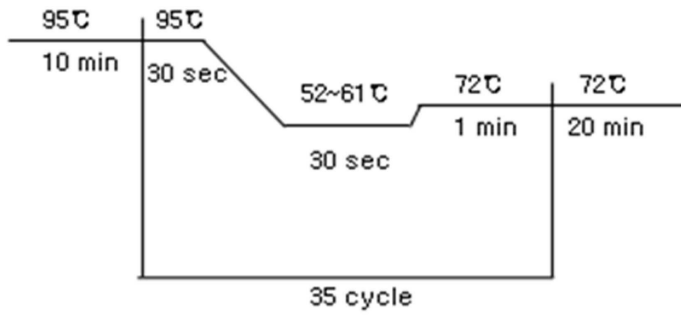
도면1



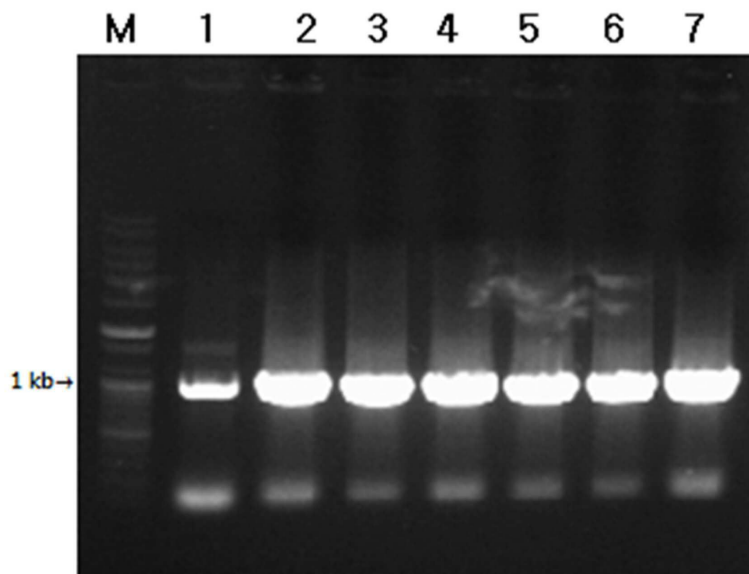
도면2



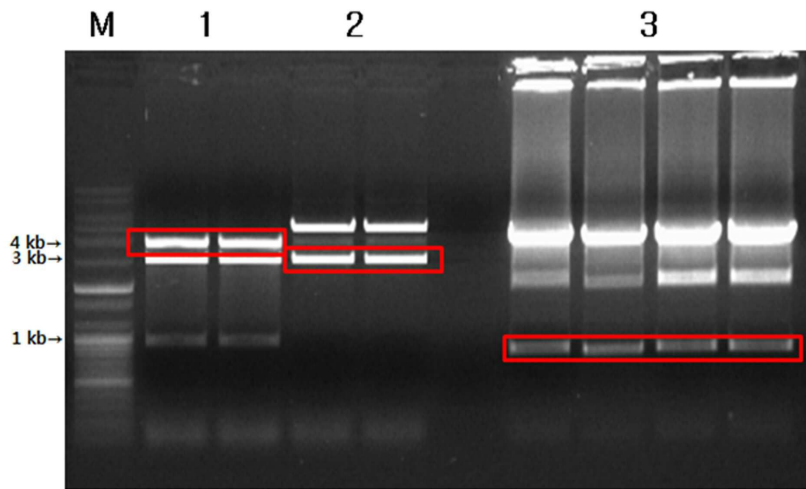
도면3



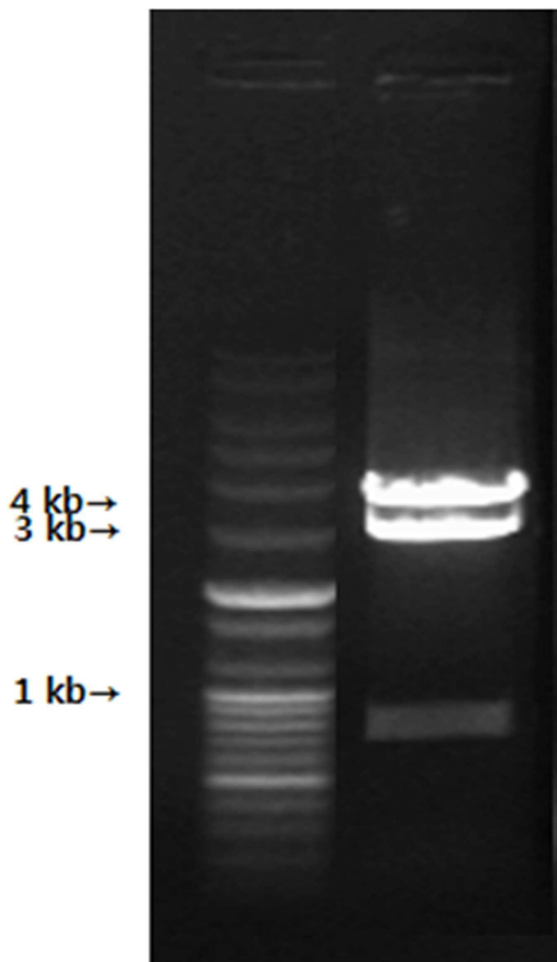
도면4



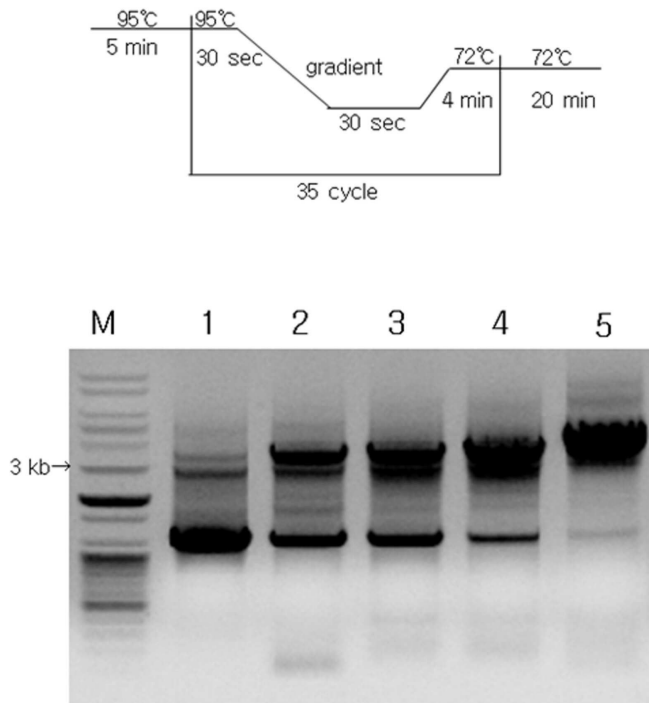
도면5



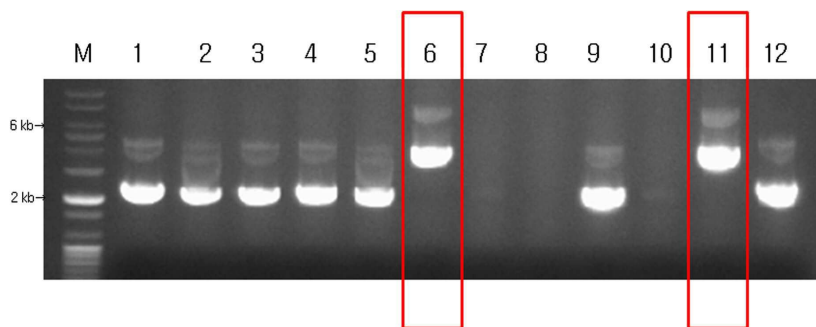
도면6



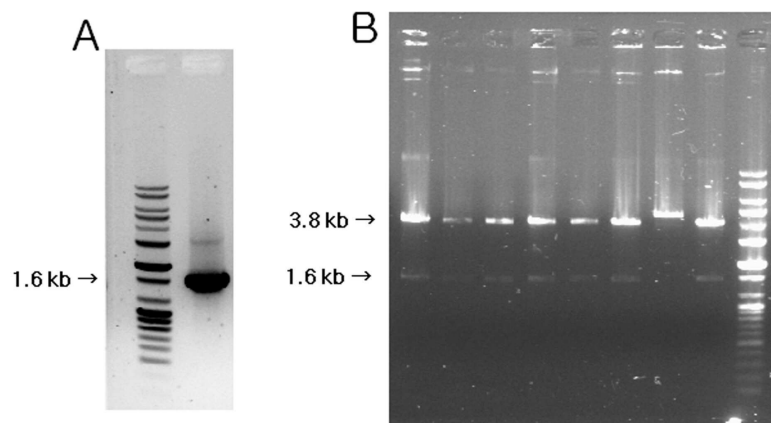
도면7



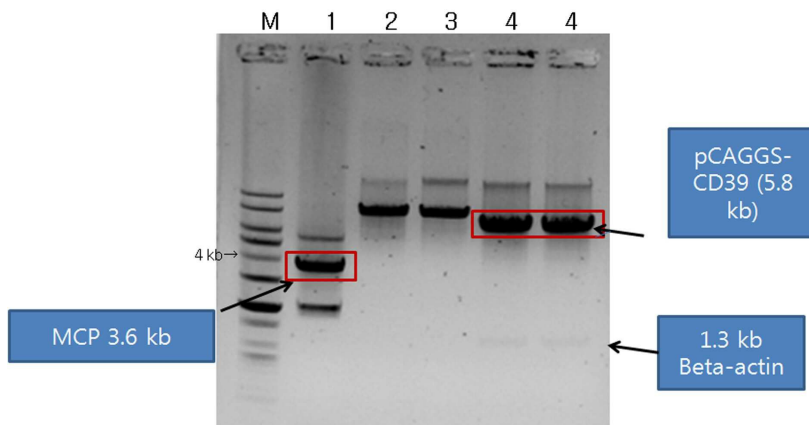
도면8



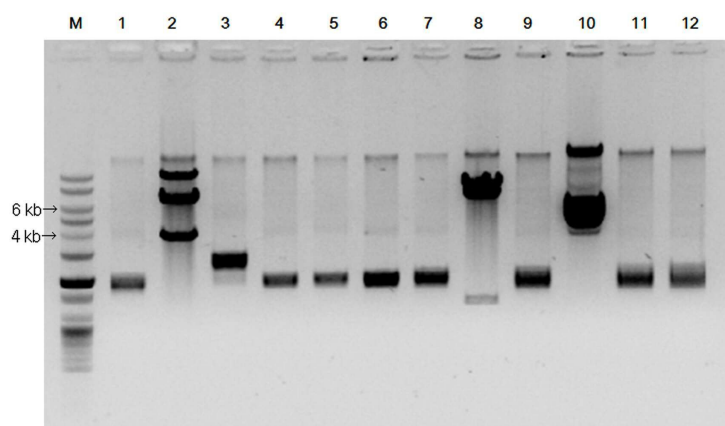
도면9



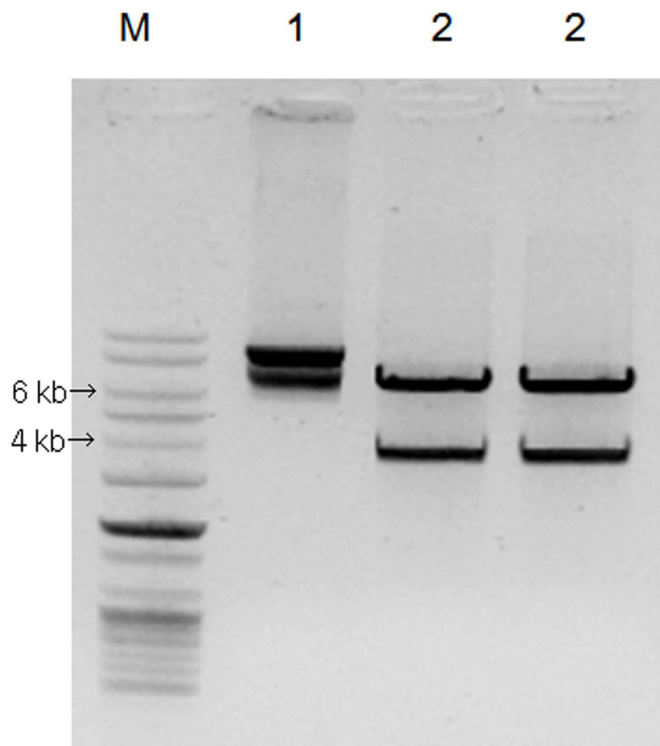
도면10



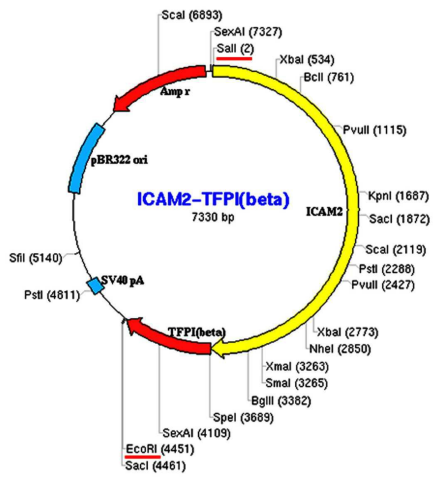
도면11



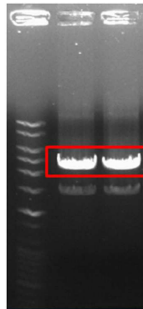
도면12



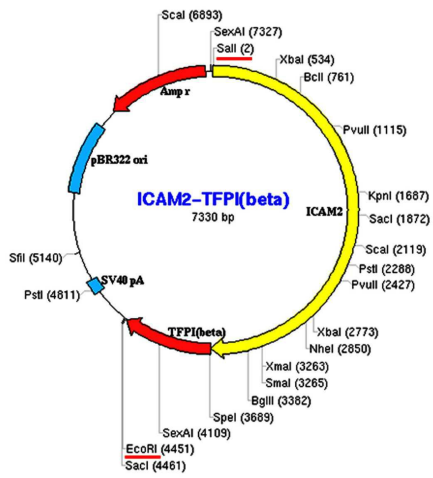
도면13



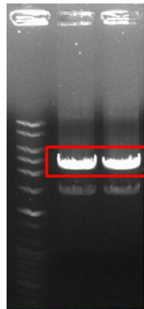
ICAM2-TFPI β
Sall, EcoRI cut



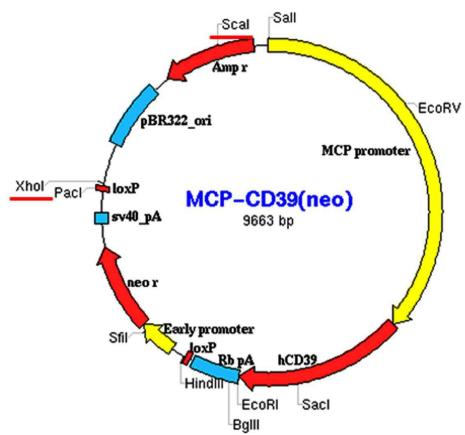
도면14



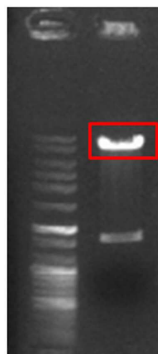
ICAM2-TFPI β
Sall, EcoRI cut



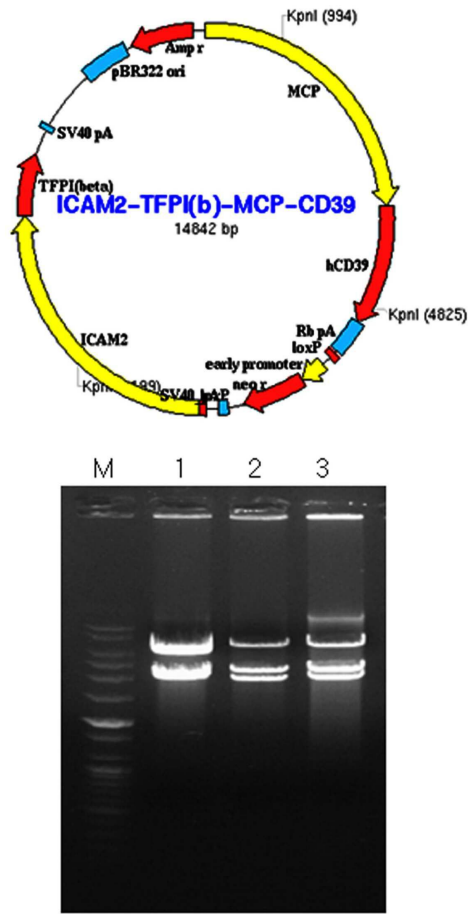
도면15



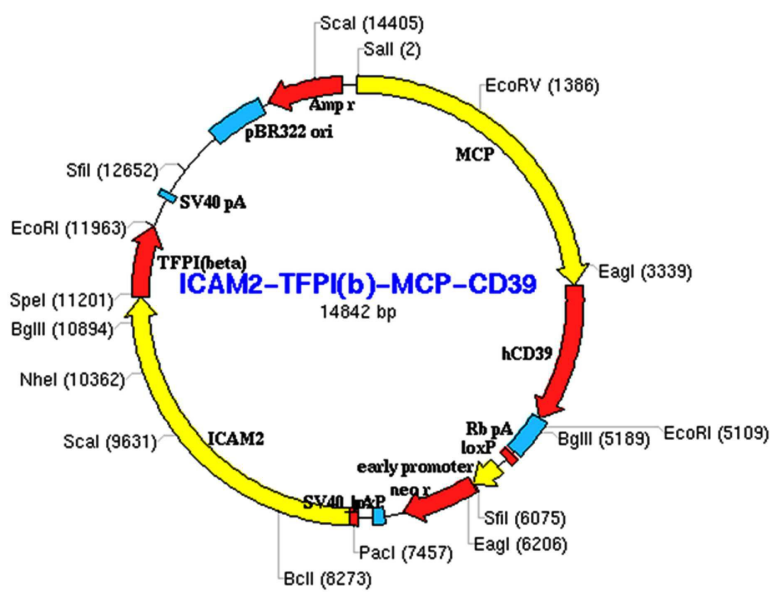
MCP-CD39
XhoI, ScaI cut



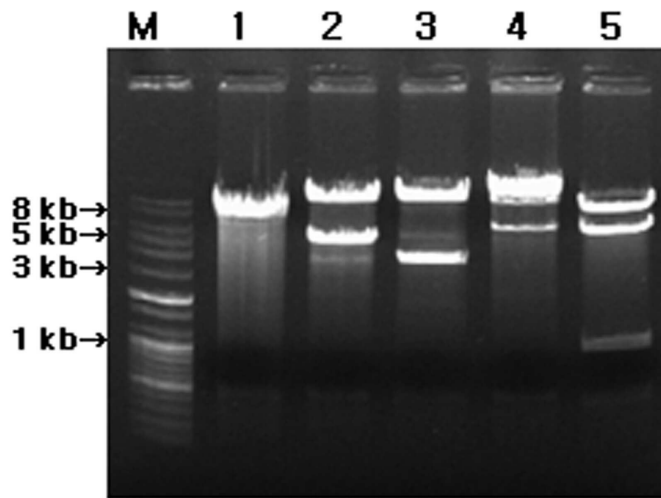
도면16



도면17



도면18



1: EcoRI cut: 8 kb, 7kb

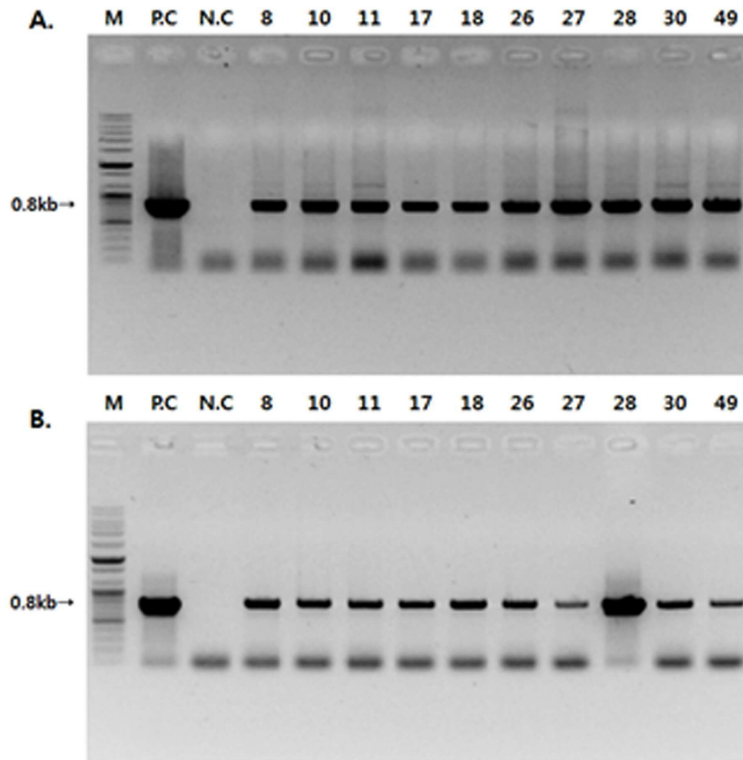
2: Scal cut: 10 kb, 4.8 kb

3: Sall,Spel cut: 11 kb, 3.7 kb

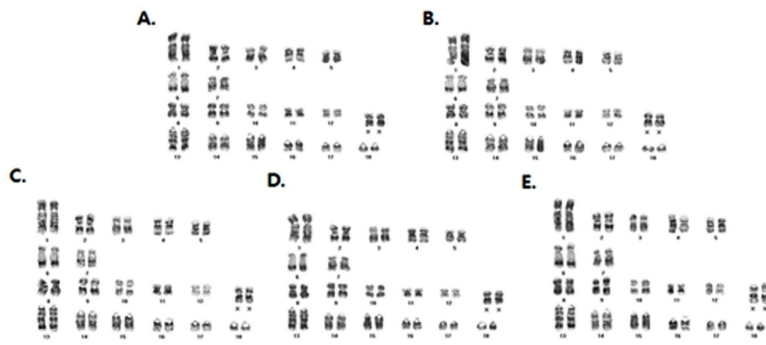
4: BglII cut: 9 kb, 5.7 kb

5: AvrII cut: 8.3 kb, 5.6 kb, 1 kb

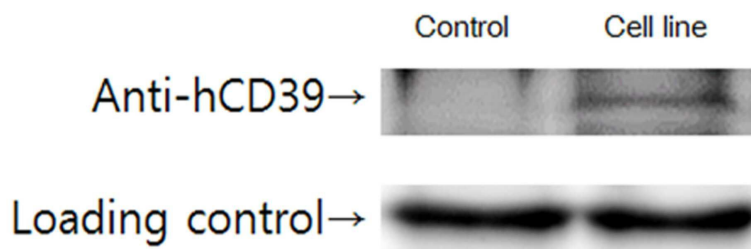
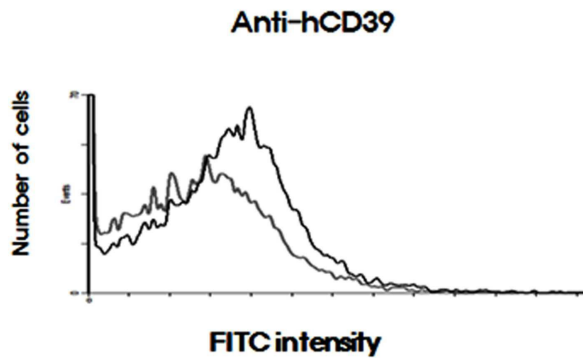
도면19



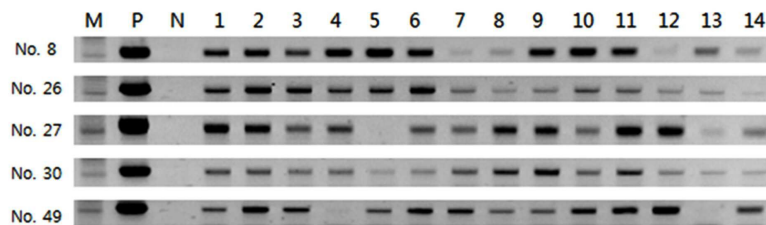
도면20



도면21



도면22



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Genetically-modified cell line for inhibiting blood coagulation
for xenotransplantation and method for preparing the same
- <130> 11P-06-44
- <160> 8
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 43
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> ICAM2 forward primer

<400> 1
aagtcgactc catgaagatg tgggtttgat ccctgatcct gct 43
<210> 2
<211> 43
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> ICAM2 reverse primer
<400> 2
aaactagtac ccacgggctg gcaggaaaga gccgaggacc gcc 43
<210> 3
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> hCD39 forward primer
<400> 3
actagtatga tttacacaat gaagaaagta catg 34
<210> 4
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> hCD39 reverse primer
<400> 4
gaattcctaa catagggcatg aaatgctatc caat 34
<210> 5
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> MCP forward primer
<400> 5
gagctcgtcg acagacagtt gtaattcatt cctttc 36
<210> 6
<211> 32
<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> MCP reverse primer
 <400> 6
 atatctagag atgagcaggt aaccgacac ca 32
 <210> 7
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCD39 forward primer
 <400>
 > 7
 atatctagac catggaagat acaaaggagt ctaac 35
 <210> 8
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> hCD39 reverse primer
 <400> 8
 atagaattcc tataccatat cttccagaa ata 33

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 5

【변경진】

CAM2-hTFPI β -MCP-hCD39 벡터

【변경후】

ICAM2-hTFPI β -MCP-hCD39 벡터

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 2

【변경진】

CAM2 프로모터

【변경후】

ICAM2 프로모터