

# 형질전환동물 제조기술



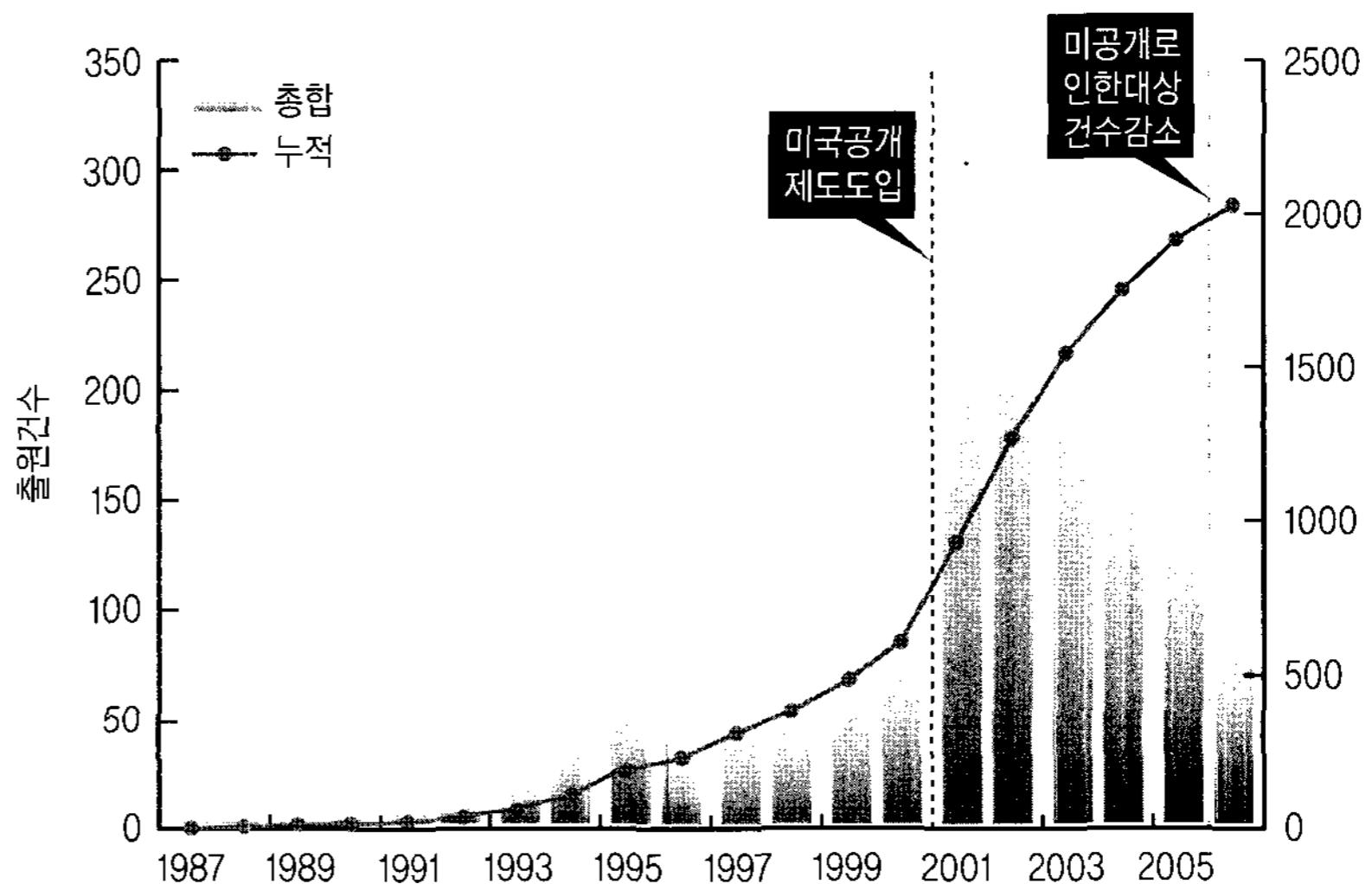
5T국제특허법률사무소  
이 처 영 박사

## 1. 형질전환동물 제조 및 응용기술의 흐름

형질전환동물 제조기술에 관한 출원은 대표적으로 유전자 전달에 의한 형질전환동물 제조를 위한 기반기술 및 형질전환동물을 이용한 응용기술로 분류할 수 있다. 형질전환동물의 제조 및 응용기술의 출원은 형질전환기술 및 동물제조기술의 개발활동이 누적되어, 미국의 주도로 2000년대 들어서 그 수가 급상승하는 양상을 보이고 있다(그림 1).

미국, 한국, 일본 및 유럽을 통틀어 가장 활발한 출원활동을 벌이는 출원인은 미국 캘리포니아대 및 존스홉킨스대를 포함한 교육기관 또는 일반 연구기관인 것으로 조사되었으며, 그 밖에 GenPharm International 및 Abgenix 등에서 보유하고 있는 기술이 기술영향력 및 시장확보력이 강한 것으로 분석되었다.

그림 1. 형질전환동물 및 바이오장기분야 특허출원현황



## 2. 형질전환동물 기반기술

형질전환기술을 포함하는 형질전환동물 기반기술은 외래 유전자를 세포에 삽입하기 위한 방법에 관한 것으로, 정자운반체, 상동재조합(homologous recombination), 인공크로모솜 벡터 및 기타 RNAi를 유전자 전달체로 이용하는 방법 및 수핵난자 또는 핵공여세포의 제조에 관한 '세포제조' 기술과 더불어, 핵이식기술 및 미세주입법 등에 관하여 주로 출원이 이

그림 2. 형질전환방법 개량기술의 분포

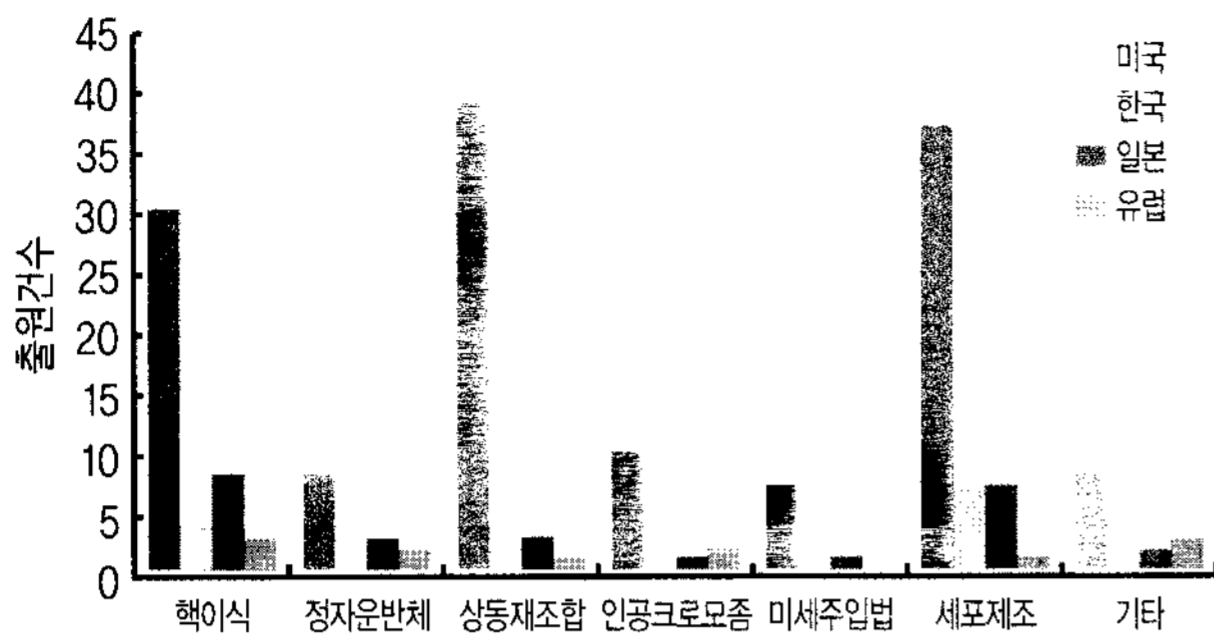
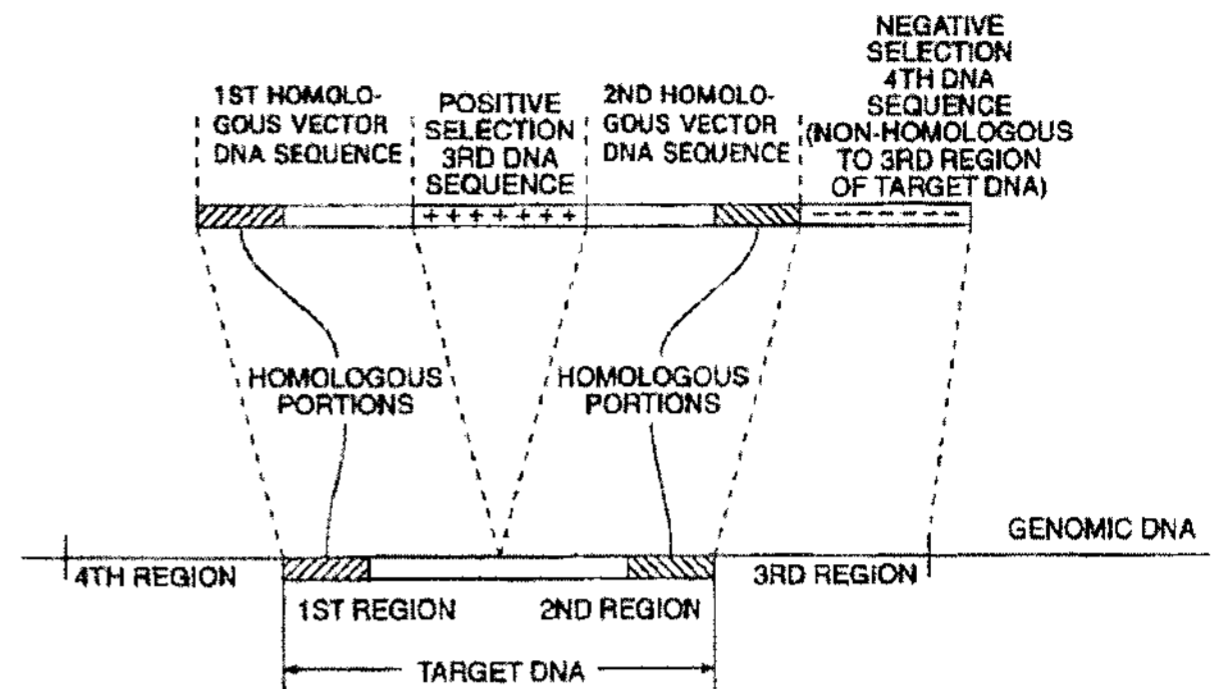


그림 3. PNS(positive-negative selection) 벡터구조



루어진 것으로 파악되었다(그림 2). 이와 더불어, 기타 형질전환 방법으로 출원된 내용은 insulator DNA, microRNA, RNAi E는 미토콘드리아 DNA에 관한 유전자 전달방법 등에 관한 것으로 조사되었다.

상기 출원은 전반적으로 미국에서 가장 활발한 것으로 조사되었으며, 한국을 포함한 미국, 일본 및 유럽에서는 핵이식 기술 및 세포제조기술에 출원이 집중된 경향을 나타내는 것으로 미루어, 형질전환동물 제조 및 이를 이용한 이익창출을 목표로 비교적 많은 연구력이 투입되어 있는 것으로 판단된다.

(1) 외래유전자 전달 및 삽입수단

외래 유전자의 전달 및 삽입 수단은 상동재조합(homologous recombination) 원리를 이용한 벡터, 인공 크로모솜 및 정자 운반체를 포함한 신규벡터 및 재조합 효소(recombinase)를 이용하는 다양한 기술이 개발되어 출원된 것으로 조사되었다.

상동재조합(homologous recombination)의 원리로 외래 유전자를 게놈 내에 삽입하는 벡터가 개발되었으며, PNS(positive-negative selection) 벡터(US1993-084741), 레트로바이러스 벡터 및 재조합 효소(recombinase)를 이용한 외래 유전자 도입방법을 이용하는 것으로 조사되었다(그림 3). 이와 더불어 트랜스포손과 같은 상동재조합이 가능한 유전자 단편 및 다음의 표1에서와 같이, 재조합 효소를 발현하는 유전자를 벡터에 외래 유전자와 함께 연결하여 게놈에 보다 용이하게 삽입되도록 개량되었다.

표 1. 재조합 효소를 이용한 형질전환기술

출원번호	US2004-790455	US2004-846700
출원일자	2004. 3. 1	2004. 5. 17
출원인	-	Carnegie Institution of Washington
요약	조류를 형질전환시키기 위하여 attP부위 및 integrase를 코딩하는 유전자를 외래유전자와 함께 삽입하여 게놈 내로 외래유전자가 삽입되도록 하는 방법	크로모솜 내에 Flp 인식부위(FRT)와 Flp recombinase를 삽입하고, 외래 유전자가 이들을 인식할 수 있도록 조작하여 외래 유전자가 특정 게놈 부위에 삽입되도록 하는 방법
청구 1항	1. A method for genetically transforming an avian cell, comprising: delivering to an avian cell having a first recombination site a nucleic acid molecule comprising a second recombination site; delivering a source of integrase activity to the avian cell; and maintaining the avian cell under conditions suitable for the integrase to mediate recombination between the first and the second recombination sites, thereby integrating the nucleic acid molecule into the nuclear genome of the avian cell.	1. A transgenic mouse comprising a Flp transgene integrated in a genome of the transgenic mouse, wherein the Flp transgene is expressed in a cell of the transgenic mouse at a level of recombinase activity sufficient to catalyze recombination between Flp-recognition sequences of the cell.
고찰	attP및 integrase를 사용한 게놈 내 외래 유전자 삽입	Flp 이용한 상동 재조합

인공크로모솜(artificial chromosome) 기술은 크로모솜의 중심체 조작기술(US1991-769558)이 출원되면서, 이를 시작으로 크로모솜 내에 선별마커 및 외래유전자 삽입부위를 포함하는 유전자 전달용 벡터로서의 인공 크로모솜(US1998-024472)이 미국 캘리포니아 대학에 의해 개발되어 출원되었다.

**표 2. 인공크로모솜에 의한 형질전환기술**

출원번호	US1996-682080	US1998-024472
출원일자	1996. 7. 15	1998. 2. 17
출원인	Chromos Molecular Systems	University of California
요약	외래 유전자를 삽입한 인공크로모솜을 제조하고 이를 형질전환동물에 제조하는데 이용하는 방법	중심체, 선별마커를 코딩하는 유전자를 포함하는 외래 유전자 삽입부위로 구성된 인공 크로모솜
청구 1항	1. A method comprising: introducing one or more DNA fragments into a cell, wherein the DNA fragment or fragments comprise a selectable marker; growing the cell under selective conditions to produce cells that have incorporated the DNA fragment or fragments into their genomic DNA; and selecting a cell that comprises a satellite artificial chromosome.	1. A method of producing a mouse expressing a selectable marker which is present on a mammalian artificial chromosome (MAC), comprising the steps of: a. introducing a MAC containing the selectable marker into an ovum cell, said ovum cell fertilized into a zygote at the time of or following said introduction of said MAC, wherein said zygote contains said MAC containing said selectable marker; b. implanting said MAC-containing zygote into a female mammal; and c. selecting a mouse produced from said zygote, wherein said mouse expresses said selectable marker.
고찰	선별마커가 외래 유전자에 포함되어 크로모솜에 삽입	선별마커가 크로모솜에 이미 포함되어 있음

정자운반체는 수정과정 중에 난자에 용이하게 정자의 핵이 전달될 수 있다는 점에서 착안되었으며, 외래 유전자를 정자에 직접 삽입하거나, 또는 정자와 외래 유전자를 혼합하여 수정 시 난자에 동반 투입되도록 하여 형질전환동물을 제조하는 방법이 출원되었다. 1999년 하와이대(University of Hawaii)에 의해 처음으로 정자운반체(US1999-371648)가 대한 출원된 이후, 미약하지만 꾸준히 기술개발이 이루어지고 있다

**표 3. 정자운반체를 이용한 형질전환기술**

출원번호	US2002-498113	US2004-569847
출원일자	2002. 12. 11	2004. 8. 6
출원인	-	-
요약	정자생성이 되지 않는 정소에 외래 유전자와 정자생성을 유도하는 유전자를 함께 트랜스팩션하여 외래유전자가 삽입된 정자를 생성하도록 하여 자연적인 수정에 의해 형질전환된 신생개체 형성을 유도하는 방법	조류의 정소세포에서 정자생성 줄기세포를 배양하는 방법으로 배양된 줄기세포에 외래 유전자를 삽입하여 정소에 삽입하여 정자로 형성시켜 이를 수정에 사용하여 신생개체 형성을 유도하는 방법
청구 1항	1. A nucleic acid construct for introducing a transgene into a mammal comprising(a) a nucleic acid of interest which is optionally operatively linked to a first promoter,(b) a spermatogenesis rescue cassette comprising a nucleic acid encoding a spermatogenesis essential factor (SEF) operatively linked to a second promoter.	1. A method for a long-term culture of avian spermatogonial stem cells, which comprises the steps of: (a) preparing an avian testis; (b) isolating a population of testicular cells from said avian testis; and (c) culturing said avian spermatogonial stem cells in said population of testicular cells on a feeder cell layer in a medium containing a cell growth factor.
고찰	정소에 직접 외래 유전자를 삽입하여 정자 생성을 유도	인위적으로 배양한 정자생성 줄기세포에 형질전환시켜 동물을 제조

(2) 미세주입법 (microinjection)

미세주입법은 마이크로 파이펫(micropipette)을 사용하여 DNA 또는 공여핵을 난자 내부로 전달하는 기술로서 미세주입법 자체의 기술은 이미 정립되어 있으며, 다만 다음과 같이 삽입하는 DNA의 종류에 따른 출원이 이루어진 것으로 조사되었다.

표 4. 미세 주입법을 이용한 동물제조기술

출원번호	US2001-919106	US2005-265523
출원일자	2001. 7. 31	2005. 11. 2
출원인	-	-
요약	성체의 섬유아세포에서 얻은 핵과 외래 유전자를 "piezo-electrically actuated" 주입법으로 수핵난자에 삽입하여 신생개체의 생성을 유도하는 방법	크로모좀 내에 Flp 인식부위(FRT)와 Flp recombinase를 삽입하고, 외래 유전자가 이들을 인식할 수 있도록 조작하여 외래 유전자가 특정 게놈 부위에 삽입되도록 하는 방법
청구 1항	1.A method for cloning an animal comprising the steps of:(a) collecting the nucleus of a fibroblast cell from an adult animal; (b) inserting at least a portion of the fibroblast cell nucleus that includes the chromosomes into an enucleated oocyte to form a renucleated oocyte; (c) allowing the renucleated oocyte to develop into an embryo; and (d) allowing the embryo to develop into a live offspring.	1. A method for obtaining a transgenic embryo, comprising the steps of: incubating a nucleic acid that is exogenous to the embryo with a membrane-disrupted sperm head or a demembranated sperm head for a period of time; co-inserting the exogenous nucleic acid and sperm head into an unfertilized oocyte to form a transgenic fertilized oocyte; and allowing the transgenic fertilized oocyte to develop into a transgenic embryo.
고찰	삽입 유전물질이 섬유아세포에서 유래	삽입 유전물질이 정자에서 유래

(3) 핵이식기술 (nuclear transfer)

핵이식 기술은 Metaphase II 단계의 핵이 제거된 수핵난자에 공여핵만을 분리하거나, 공여핵을 제공하는 세포 전체를 수핵난자의 주란강(perivitelline space)에 삽입하여 전기자극에 의해 융합시키는 기술이다. 이 때, 성체세포 또는 배아세포 등으로부터 유래된 공여핵을 사용하며, 공여핵에 따라 핵이식의 개체발생효율의 차이가 상당히 낮기 때문에 지속적으로 기술개발이 요구되는 분야이다. 그렇기 때문에, 이를 대체하기 위한 배아줄기세포의 응용, 염색체이식, 할구분리 등의 다양한 기술이 더불어 활발하게 연구되어 출원으로 이어지고 있다.

표 5. 공여핵별 핵이식 효율 비교

특징	생식세포복제	체세포복제
핵공여세포 (nuclear donor)	할구(blastomere) 또는 배아줄기세포(embryonic stem cells)	체세포(somatic cells)
형질전환의 용이성	제한적	비교적 용이
염색체 이상	일부 발생	극히 높은 빈도로 발생
개체발생효율	2% 수준	0.1 ~ 0.2%

핵이식 기술에 의해 체세포로부터 얻어진 공여핵을 사용하여 동물을 복제하는 출원이 1997년 이루어졌으며, 다음의 Roslin Insitute에 의한 출원이 최초의 복제동물인 '돌리'에 대한 기술을 포함하고 있다. 표6의 두 출원은 동물복제 기술을 공통적으로 포함하고 있으나, 공여핵 세포의 세포주기가 다른 특징이 있다.

표 6. 핵이식에 의한 동물제조기술

출원번호	US1997-802282	US1998-004606
출원일자	1997. 2. 19	1998. 1. 8
출원인	Roslin Institute	University of Massachusetts
요약	체세포에서 유래한 공여핵을 탈핵된 수핵난자와 융합 또는 이식하여 개체를 제조하는 방법	체세포에서 유래한 공여핵을 탈핵된 수핵난자와 융합 또는 이식하여 형질전환 소를 제조하는 방법
청구 1항	1. A method of reconstituting a non-human mammalian embryo, comprising a. transferring the nucleus of a quiescent diploid donor cell into a suitable enucleated recipient cell of the same species, thereby obtaining a reconstituted cell; b. activating the recipient cell before, during or after nuclear transfer; c. incubating the reconstituted cell such that an embryo develops.	1. An improved method of cloning a non-human mammal by nuclear transfer comprising the introduction of a non-human mammalian donor cell or a non-human mammalian donor cell nucleus into a non-human mammalian enucleated oocyte of the same species as the donor cell or donor cell nucleus to form a nuclear transfer (NT) unit, implantation of the NT unit into the uterus of a surrogate mother of said species, and permitting the NT unit to develop into the cloned mammal, wherein the improvement comprises using as the donor cell or donor cell nucleus a non-quiescent somatic cell or a nucleus isolated from said non-quiescent somatic cell.
고찰	핵공여세포가 Quiescent cells	핵공여세포가 Non-Quiescent cells

최초 동물복제 이후, 핵이식 기술에 있어서 핵공여 세포 및 세포 주기상태가 개체 생성의 성공여부를 결정한다는 사실을 파악하고 이를 개량하는데 연구가 진행되었으며, 이를 위해 개발 초기의 형질전환방법에 대한 기술개발에서 점차 핵공여세포 및 이식에 대한 최적 조건을 찾고자 하는 개체형성기술의 개량으로 관심의 폭이 넓어져 해당 기술에 대한 출원이 이루어지는 것으로 조사되었다(표 7).

표 7. 개체형성기술의 개량

기술요소	출원번호	대표출원인	제 목
핵공여체 제조	US2001-967868	Sangamo Biosciences	Nuclear reprogramming using IWSI and related chromatin remodeling ATPase
	US2001-758024	-	Nuclear transfer using cells cultured in serum starvation media containing apoptosis inhibitor
	US2003-690049	Macrogen	Preparation method of donor cell for nuclear transfer using electro-stimulation and membrane antigen marker and production method of clone animal
	US2005-081945	GTC Biotherapeutics	Methods of prescreening cells for nuclear transfer procedures
	US2004-909845	Roslin Institute	Unactivated oocytes as cytoplasm recipients for nuclear transfer
수핵난자 제조	KR1999-031527	황우석	체세포 복제동물의 생산을 위한 난자의 탈핵방법 Method for enucleation of oocyte for producing a clone animal using somatic cell
	KR2002-079428	(주)아비코아 생명공학연구소	X선조사를 이용한 체세포 복제수정란의 제조를 위한 수핵난자 핵 유전 물질의 불활화 방법 Method for inactivating nuclear chromosomal materials of recipient oocyte for manufacturing clone embryo form somatic cell using X-ray irradiation
핵이식체의 활성화	US1998-100167	University of Missouri	Complete oocyte activation using an oocyte-modifying agent and a reducing agent

### 3. 형질전환동물

복제동물을 제조하기 위해서 가장 보편적으로 사용되는 기술은 핵 전체를 탈핵난자에 삽입하는 핵이식 기술이며, 이 과정에서 추가로 인간에게 유용한 유전자를 삽입하여 형질전환시킬 수 있기 때문에, 형질전환동물은 복제동물을 포함한다.

핵이식 기술에서 핵공여 세포로서 체세포를 이용하여 개체를 제조하기 위한 특허가 다수 출원되어, 미국이 37건으로 1위 그리고 한국이 9건으로 2위인 것으로 조사되었으며, 반면에 일본 및 유럽은 각각 4건 및 3건으로 상기 기술에 대한 출원이 다른 국가에 비해 미비한 것으로 분석되었다.

형질전환동물로는 그림 4에 나타난 바와 같이, 돼지 및 조류의 제조가 가장 활발한 것으로 조사되었으며, 기타 동물로는 염소, 토끼, 고양이 및 멸종동물에 대한 복제기술이 포함되어 있다.

1984년 발생단계의 마우스에 인간 인터페론 유전자가 삽입된 최초의 형질전환동물인 '하버드 마우스' 제조기술이 출원된 이후, 1993년 Pharming BV사에 의해 형질전환소가 출원되었으며, 그 이후, 염소, 돼지 등의 대동물뿐만 아니라, 토끼 개 등의 형질전환동물 및 복제동물의 제조가 이어졌다(그림 5).

최초의 복제동물인 '돌리'는 Roslin Institute에 의해 제조되어 출원(US1997-802282)되었다. 돌리의 복제기술은 세포주기 상에서 분열상태가 아니고 G1기 또는 G0상태의 세포(quiescent cells)를 공여핵으로 사용하여 수핵난자와 융합시켜 수정란을 제조하여, 이를 개체생성에 이용하였으며, 이 기술로 인하여 추후 다양한 동물에 대한 복제방법이 시도되었다.

표 8에 나타난 바와 같이, 지금까지 출원된 형질전환동물 및 복제동물은 공통적으로 미세주입법 및 핵이식법을 이용하여 제조된 것으로 나타났으며, 특히 한국에서는 2000년 복제소 제조에 대한 특허를 시작으로 2005년 개복제 기술이 출원되었다.

표 8. 형질전환동물 및 복제동물의 대표 특허

출원번호	출원인	제 목	형질전환방법	제조동물
US1984-623774	Harvard College	Transgenic non-human mammals	트랜스팩션	마우스
US1993-154019	Pharming BV	Method of producing a transgenic bovine or transgenic bovine embryo	미세주입법	소
US1995-565057	Nexia Biotechnologies	Method for development of transgenic dwarf goats	미세주입법	염소
US1997-888057	University of Massachusetts	Cloning pigs using donor nuclei from non-quiescent differentiated cells	핵이식	돼지
US2003-501065	Institute National de la Recherche Agronomique	Rabbit nuclear cloning method and uses thereof	핵이식	토끼
US2003-366068	Texas A&M University	Cloning cats by nuclear transplantation	핵이식	고양이
KR2005-0067736	서울대학교	복제된 개과 동물 및 이의 생산방법 Cloned caninds and method for producing thereof	핵이식	개

그림 4. 체세포 복제에 의한 형질전환동물

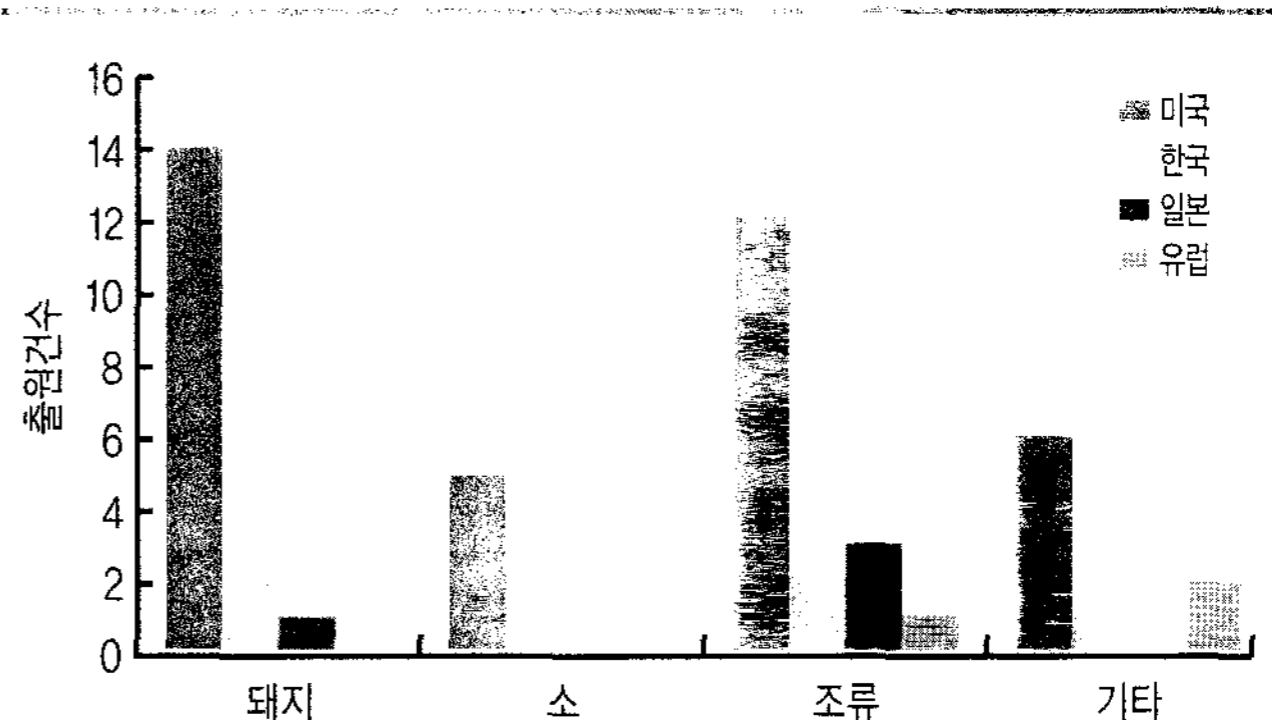
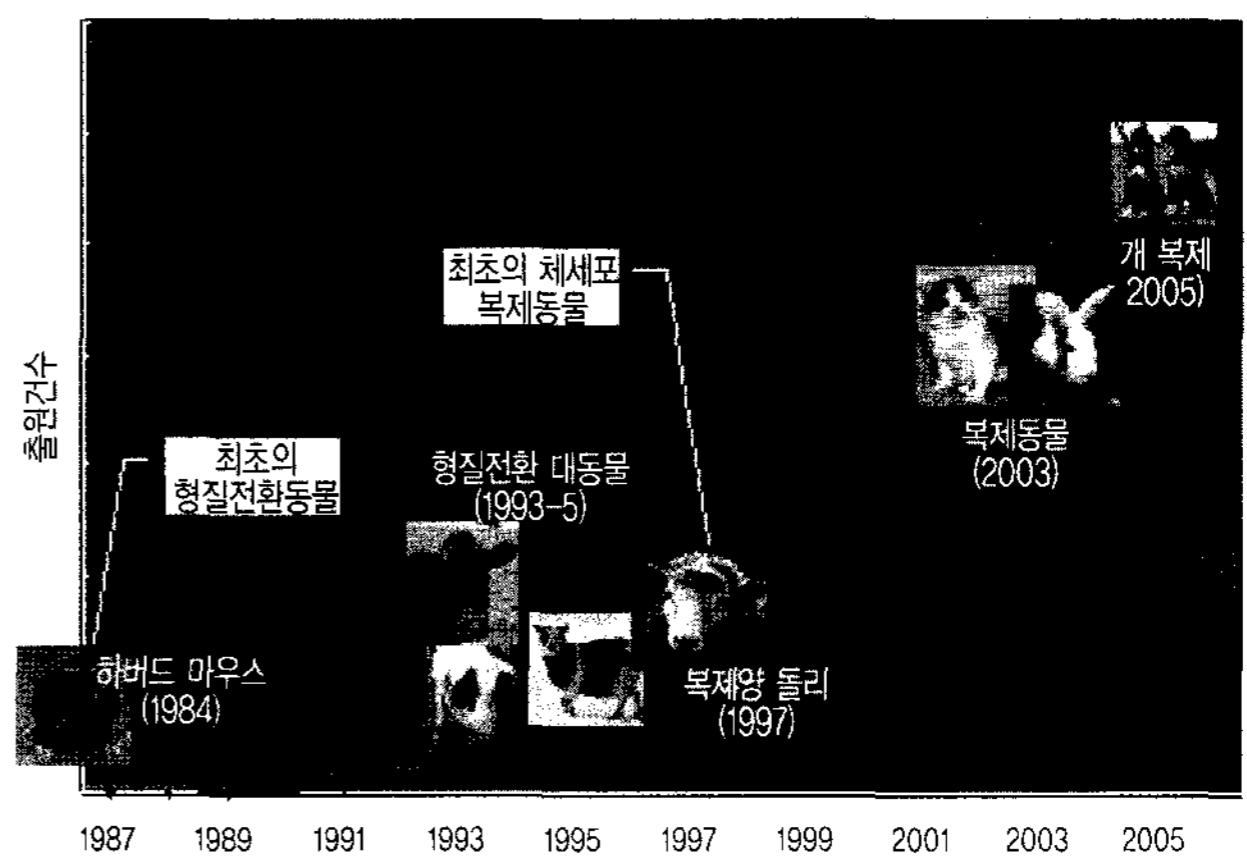


그림 5. 형질전환동물의 출현시기



1993년 접합자(zygote)를 사용하여 형질전환 소(US1993-154019)가 출원된 이후, 형질전환 소를 제조하는 방법에 있어서도 핵 이식 조건 및 복제 방법의 개량으로 방법적 개선에 관한 기술개량이 이루어지고 있다(표 9).

표 9. 형질전환 소의 제조기술

출원번호	US1994-348769	US2000-701839
출원일자	1994. 12. 2	2000. 12. 4
출원인	Infigen	Hwang, Woo-Suk
요약	핵공여세포로 배양한 CICM를 사용하여 동물을 제조	냉동보관되어 있던 소의 체세포에서 핵을 추출하여 수핵난자에 융합시킨 후 내병성 형질을 가지는 형질전환 소를 제조하는 방법
청구 1항	1. A method for producing a bovine animal, the method comprising: (a) providing a cultured bovine embryonic inner cell mass cell, wherein said inner cell mass cell has been cultured in a culture medium for a length of time sufficient for maintenance of said inner cell mass cell in an undifferentiated state; (b) establishing an embryo from a nuclear transfer process, wherein said nuclear transfer process comprises the step of inserting said cultured bovine embryonic inner cell mass cell into an enucleated bovine oocyte, and the step of activating said embryo; (c) implanting said embryo into a recipient bovine host; and (d) allowing said embryo to develop into bovine animal	1. A method of cloning a bovine comprising: (a) contacting and enucleated oocyte with a composition comprising nuclear DNA from a cryopreserved bovine somatic cell; (b) fusing the oocyte and the composition to form a cybrid; and (c) transferring the cybrid into the reproductive tract of a cow
고찰	내세포괴에서 얻어진 배아세포를 배양하여 개체발생에 이용	냉동보관된 체세포에서 공여핵 추출

마찬가지도 유사한 시기에 출원된 형질전환 돼지 제조기술은 그 이후 서로 다른 핵공여 세포를 사용하거나, 여러 개의 수핵난자를 돼지 자궁에 이식하는 등의 여러 가지 각도에서 기술개량이 이루어지고 있다(표 10).

표 10. 형질전환 돼지의 제조기술

출원번호	US1998-199138	US1998-129395
출원일자	1998. 11. 24	1998. 8. 5
출원인	Infigen	Alexion Pharmaceuticals
요약	전능성 세포(totipotent cell)을 배양하고 이를 수핵난자에 이식하여 복제돼지를 제조하는 방법	할구에 미세주입법으로 외래유전자를 삽입하여 형질전환 돼지를 제조하는 방법
청구 1항	1. A method for preparing a porcine embryo capable of developing into a live-born porcine animal, the method comprising: (a) obtaining a totipotent porcine nuclear donor cell from a cell culture; (b) forming a cybrid by translocating said totipotent porcine nuclear donor cell, or nucleus thereof, into an enucleated porcine oocyte, wherein prior to enucleation, said oocyte has been matured for between 42 and 56 hours, and before, during or after said translocation, activating said oocyte; (c) culturing said cybrid to establish said porcine embryo.	1. A method for producing a transgenic pig comprising: (a) obtaining a porcine embryo comprising at least three blastomeres; (b) introducing at least one clone of isolated nucleic acid molecules into at least one blastomere of the embryo; (c) transferring the embryo to a surrogate female pig; (d) developing the embryo into at least the fetal stage; and (e) developing the fetus into a transgenic pig
고찰	공여핵세포로 인공적으로 배양한 전능세포를 사용	미세주입법을 사용한 형질전환돼지의 제조방법에 대한 것으로 2006년 12월 31부로 권리 소멸

#### 4. 결론

1984년 최초의 형질전환동물이 출원된 이후, 현재 발전기의 기술수준을 나타내고 있는 관련 분야는 연구기관 및 대학 주도로 이루어지고 있으며, 형질전환기술 및 안정적인 복제기술에 대한 다각적 기술 개선 및 이를 바탕으로 다양한 유전자가 삽입된 동물을 이용하여 유전자의 기능규명 및 질환기전의 연구에 집중하고 있는 특징이 있는 것으로 조사되었다. 형질전환동물 및 동물복제 기술은 바이오신약의 제조 및 바이오장기의 개발 등에 응용하고자 하는 기술개발이 활발하게 이루어지고 있으며, 동물복제에 대한 윤리적인 논란의 소지는 있으나, 다양한 응용성을 특징으로 하는 분야로 인정받고 있는 것으로 분석된다. ㉞