



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월29일
(11) 등록번호 10-2736524
(24) 등록일자 2024년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/90 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/907 (2013.01)
C12N 15/8509 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7035059(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년11월03일
심사청구일자 2023년11월07일
(85) 번역문제출일자 2023년10월13일
(65) 공개번호 10-2023-0148274
(43) 공개일자 2023년10월24일
(62) 원출원 특허 10-2019-7015851
원출원일자(국제) 2017년11월03일
심사청구일자 2020년11월02일
(86) 국제출원번호 PCT/US2017/059816
(87) 국제공개번호 WO 2018/144087
국제공개일자 2018년08월09일
(30) 우선권주장
62/416,802 2016년11월03일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
미국 특허출원공개공보 US
2016/1866168(2016.6.30.)*
Sci Rep., 5:10710.doi:
10.1038/srep10710(2015.6.3.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
템플 유니버시티-오브 더 커먼웰스 시스템 오브
하이어 에듀케이션
미합중국 19122 펜실바니아, 필라델피아 브로드
스트리트 앤드 몽고메리 애비뉴
(72) 발명자
페레스-릴, 오스카, 엠.
콜롬비아, 83-51, 바랑키야, 크라 42비1
(74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 33 항

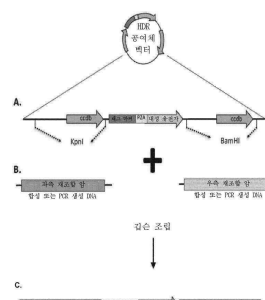
심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 세포주 개발을 위한 상동 재조합 벡터의 고속생성을 위한 DNA 플라스미드

(57) 요약

본 발명은 형질 전환 DNA를 세포에 삽입하기 위한 상동성 재조합 벡터를 제공한다. 이들 벡터는 생산 시간을 줄이고, 유전적으로 변형된 세포를 용이하게 생성하도록 한다. 본 발명에 따르면 사용자가 다수의 태그를 시험하고 상동성 재조합 벡터를 사용하여 동형 접합성의 변형된 세포주를 생성하도록 한다. 본 발명은 녹아웃 세포를 생성 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1



하거나, 녹인 유전자를 가진 세포주를 생성하거나, 임의의 표적에 대한 약물 스크리닝을 위한 세포주를 생성하거나, 형질 전환 동물을 만들기 위해 사용될 수 있거나, 유전자 요법에 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

C12N 9/22 (2013.01)

G01N 33/5044 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

핵산 분자를 포함하는 상동성 유도 수선(HDR) 공여체 벡터로서,

상기 핵산 분자는 삽입 카세트를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 삽입 카세트는 세포의 유전체 내로 삽입되는 핵산 서열을 포함하고, 상기 삽입 카세트의 측면에는 2개의 음성 선택 마커를 암호화하는 2개의 뉴클레오타이드 서열이 있고, 상기 2개의 음성 선택 마커 각각은 측면에 제한 효소 절단 부위가 있는 *tolC*, *thyA*, 및 *rpsI*로 이루어진 군으로부터 선택되는 유전자를 포함하는 것인, HDR 공여체 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 삽입 카세트는 세포 선택 마커 서열, 단백질 정제 태그, 리포터 마커 서열, 외생성 유전자의 서열, 프로모터 서열, P2A 링커 서열, 종결 서열, mRNA 안정화 서열, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 서열을 포함하는 HDR 공여체 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 삽입 카세트는 키틴 결합 단백질(CBP), 말토오스 결합 단백질(MBP), 글루타티온-S-트랜스페라아제(GST), 폴리(His), 비오틴/스트렙타비딘, V5-태그, Myc-태그, HA-태그, NE-태그, His-태그, 플래그 태그(Flag tag), 할로 태그(Halo-tag), 스냅 태그(Snap-tag), Fc-태그, Nus-태그, BCCP, 티오레독신(thioredoxin), 스눕 태그(SnooperTag), 스파이 태그(SpyTag), 이소펩 태그(Isopeptag), SBP-태그, S-태그, 아비 태그(AviTag), 칼모둘린(calmodulin)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 정제 태그를 포함하는 HDR 공여체 벡터.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 삽입 카세트는 클로람페니콜-아세틸 트랜스페라아제(CAT), β -갈락토실트랜스페라아제, 서양고추냉이 퍼옥시다아제, 루시페라아제, NanoLuc®, 알칼리 포스파타아제 및 형광 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 리포터 마커를 포함하는 HDR 공여체 벡터.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 삽입 카세트는 녹색 형광 단백질(GFP), 적색 형광 단백질(RFP), mCherry, mRuby3, mtagBFP2 및 mClover3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 형광 단백질을 포함하는 HDR 공여체 벡터.

청구항 6

제2항에 있어서, 상기 삽입 카세트는 제오신[™](Zeocin[™]) 내성 마커, 네오마이신 내성 마커, 퓨로마이신 내성 마커, 블라스티시딘 내성 마커 및 하이그로마이신 내성 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포 선택 마커 서열을 포함하는 HDR 공여체 벡터.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항에 있어서, 서열번호 1 및 서열번호 2로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는 HDR 공여체 벡터.

청구항 10

- a) 제1항의 HDR 공여체 벡터를 절단하는 단계; 및
- b) 단계 (a)의 상기 절단된 HDR 공여체 벡터의 상기 삽입 카세트를 표적 핵산 서열에 대해 상동성을 갖는 하나 이상의 핵산 서열에 연결하는 단계에 의해 생성되는 HDR 벡터로서,
- 이때 상기 삽입 카세트는 세포의 유전체 내로 삽입되는 핵산 서열을 포함하는, HDR 벡터.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 삽입 카세트는 세포 선택 마커 서열, 단백질 정제 태그, 리포터 마커 서열, 외생성 유전자의 서열, 프로모터 서열, P2A 링커 서열, 종결 서열, mRNA 안정화 서열, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 서열을 포함하는 HDR 벡터.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 삽입 카세트는 키틴 결합 단백질(CBP), 말토오스 결합 단백질(MBP), 글루타티온-S-트랜스페라아제(GST), 폴리(His), 비오틴/스트렙타비딘, V5-태그, Myc-태그, HA-태그, NE-태그, His-태그, 플래그 태그, 할로 태그, 스냅 태그, Fc-태그, Nus-태그, BCCP, 티오레독신, 스눕 태그, 스파이 태그, 이소펩 태그, SBP-태그, S-태그, 아비 태그, 칼모듈린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 단백질 정제 태그를 포함하는 HDR 벡터.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 삽입 카세트는 클로람페니콜-아세틸 트랜스페라아제(CAT), β -갈락토실트랜스페라아제, 서양고추냉이 퍼옥시다아제, 루시페라아제, NanoLuc®, 알칼리 포스파타아제 및 형광 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 리포터 마커를 포함하는 HDR 벡터.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 삽입 카세트는 녹색 형광 단백질(GFP), 적색 형광 단백질(RFP), mCherry, mRuby3, mtagBFP2 및 mClover3으로 이루어진 군으로부터 선택되는 형광 단백질을 포함하는 HDR 벡터.

청구항 15

제11항에 있어서, 상기 삽입 카세트는 제오신TM 내성 마커, 네오마이신 내성 마커, 퓨로마이신 내성 마커, 블라스티시딘 내성 마커 및 하이그로마이신 내성 마커로 이루어진 군으로부터 선택되는 세포 선택 마커 서열을 포함하는 HDR 벡터.

청구항 16

유전적으로 변형된 세포를 생성하는 방법으로서,

제10항의 HDR 벡터의 표적 핵산 서열에 상동성을 갖는 하나 이상의 핵산 서열과 내생성 염색체 표적 DNA 서열 사이의 상동성 재조합에 의해 상기 내생성 염색체 표적 DNA 서열을 포함하는 세포의 유전체 내로의 상기 HDR 벡터의 삽입 카세트의 통합이 조장되도록 상기 세포를 상기 HDR 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는, 유전적으로 변형된 세포를 생성하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 접촉은 상기 세포를 상기 HDR 벡터로 형질 감염시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 18

제16항에 있어서,

상기 세포 내에서 상기 내생성 염색체 표적 DNA 내의 특정 뉴클레오타이드 서열에서 DNA를 절단하는 엔도뉴클레아제 도메인을 포함하는 뉴클레아제를 제공하는 단계; 및

상기 뉴클레아제가 상기 세포 내에서 내생성 염색체 표적 DNA 서열 내의 뉴클레오티드 서열을 절단 또는 니킹(nicking)하도록 상기 세포 내에서 상기 내생성 염색체 표적 DNA 서열을 상기 뉴클레아제와 접촉시켜, 상기 내생성 염색체 표적 DNA 서열과 상기 HDR 벡터의 표적 핵산 서열에 상동성을 갖는 하나 이상의 핵산 서열 사이의 상동성 재조합 빈도를 향상시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제16항에 있어서, 상기 세포는 인간으로부터 유래하는 것인 방법.

청구항 20

제16항에 있어서, 상기 세포는 마우스로부터 유래하는 것인 방법.

청구항 21

제16항의 방법에 따라 제조되는 유전적으로 변형된 세포.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 세포는 녹아웃 세포(knock-out cell)인 것인 유전적으로 변형된 세포.

청구항 23

제21항에 있어서, 상기 세포는 녹인 세포(knock-in cell)인 것인 유전적으로 변형된 세포.

청구항 24

제21항에 있어서, 상기 세포는 마우스 세포인 것인 유전적으로 변형된 세포.

청구항 25

제21항에 있어서, 상기 세포는 인간 세포인 것인 유전적으로 변형된 세포.

청구항 26

목적하는 핵산이 도입되어 있는 유전적으로 변형된 비인간 동물을 생성하는 방법으로서,

상기 핵산을 도입할 필요가 있는, 내생성 염색체 표적 DNA 서열을 포함하는 일차 세포를 수득하는 단계;

제10항의 HDR 벡터의 표적 핵산 서열에 상동성을 갖는 하나 이상의 핵산 서열과 상기 내생성 염색체 표적 DNA 서열 사이의 상동성 재조합에 의해 상기 세포의 유전체 내로의 상기 HDR 벡터의 삽입 카세트의 통합이 보장되도록 상기 세포를 상기 HDR 벡터와 접촉시키는 단계; 및

상동성 재조합이 일어난 상기 일차 세포로부터 동물을 발생시키는 단계를 포함하는, 목적하는 핵산이 도입되어 있는 유전적으로 변형된 비인간 동물을 생성하는 방법.

청구항 27

제26항에 있어서,

상기 세포 내에서 상기 내생성 염색체 표적 DNA 내의 특정 뉴클레오티드 서열에서 DNA를 절단하는 엔도뉴클레아제 도메인을 포함하는 뉴클레아제를 제공하는 단계; 및

상기 뉴클레아제가 상기 일차 세포 내에서 상기 내생성 염색체 표적 DNA 서열 내의 뉴클레오티드 서열을 절단 또는 니킹하도록 상기 세포 내에서 상기 내생성 염색체 표적 DNA 서열을 상기 뉴클레아제와 접촉시켜, 상기 내생성 염색체 표적 DNA 서열과 상기 HDR 벡터의 표적 핵산 서열에 상동성을 갖는 하나 이상의 핵산 서열 사이의 상동성 재조합 빈도를 향상시키는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 동물은 포유류, 유대류, 조류, 양서류 및 어류로 이루어진 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 상기 삽입 카세트는 상동성 재조합 이후에 유전자를 파괴하는 뉴클레오티드 서열, 상동성 재조합 이후에 유전자를 치환하는 뉴클레오티드 서열, 상동성 재조합 이후에 유전자를 도입하는 뉴클레오티드 서열, 및 상동성 재조합 이후에 조절 부위를 도입하는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 방법.

청구항 30

제26항의 방법에 따라 제조되는 유전적으로 변형된 동물.

청구항 31

제10항의 HDR 벡터를 포함하는, 질병의 치료용 약학적 조성물로서,

상기 HDR 벡터의 삽입 카세트는 상동성 재조합 이후에 유전자를 파괴하는 뉴클레오티드 서열, 상동성 재조합 이후에 유전자를 치환하는 뉴클레오티드 서열, 상동성 재조합 이후에 유전자를 도입하는 뉴클레오티드 서열, 및 상동성 재조합 이후에 조절 부위를 도입하는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 유전자는 상기 질병과 연관되어 있는, 약학적 조성물.

청구항 32

화합물이 유전자 또는 단백질의 하나 이상의 활성화에 미치는 효과를 스크리닝하는 방법으로서,

하나 이상의 제21항의 세포를 상기 화합물과 접촉시키는 단계; 및

유전자 또는 단백질의 하나 이상의 활성을 평가하는 단계를 포함하는, 화합물이 유전자 또는 단백질의 하나 이상의 활성화에 미치는 효과를 스크리닝하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 복수의 제21항의 세포를 상기 화합물과 접촉시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 34

제32항의 방법에 의해 확인된 화합물을 포함하는, 질병의 치료용 약학적 조성물로서,

상기 질병의 치료에 도움이 되는 효과를 갖는 것인, 약학적 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 상기 질병은 낮은 수준의 헵 옥시게나아제 I(HO-1) 발현과 연관되어 있으며, 상기 화합물은 디설피람(disulfiram), 티오스트렙톤(thiostrepton), 트리메타디온(trimethadione), 오라노핀(auranofin), 티메로살(thimerosal), 할로판트린 염산염(halofantrine hydrochloride) 및 보리노스타트(vorinostat)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 11월 3일자로 출원된 미국 가출원 제62/416,802호에 대한 우선권을 주장하며, 이의 전문은 본원에서 참고로 포함된다.

[0003] 연방 후원 연구 또는 개발에 관한 진술

[0004] 본 발명은 미국국립보건원(NIH) 인가 번호 R03DK105267을 통해 정부 후원으로 이루어졌다. 미국 정부는 본 발명에 대해 일정한 권리를 갖는다.

배경 기술

- [0005] 살아있는 세포 내의 DNA의 특정 서열을 표적화하기 위한 효소 시스템(TALENS, 징크 핑거 엔도뉴클레아제(zinc finger endonuclease), CRISPR)에 대한 최근의 발견 및 개발로 인해 진핵생물의 유전체의 변형이 극적으로 가능하게 되었다. 이들 효소 시스템에 있어서 공통적인 특징은, 표적 DNA 서열이 인식되어 절단(cutting)되면 내생성 DNA 수선 기구가 2개의 주요 과정에 의해 이중가닥 절단(double strand break)을 수선하려고 할 것이라는 것이다: 비상동성 말단 연결(NHEJ)로 알려져 있는 제1 과정은 절단된 DNA의 2개의 말단을 오류 발생이 높은 다단계 과정을 통해 다시 연결하여서, 수선된 서열 내에는 뉴클레오타이드의 소규모 삽입 또는 결실이 남게 될 것이다. 이러한 자연적 기작은 무작위 돌연변이가 있는 단백질 번역용 해독 프레임을 변경하기 위해, 표적 유전자의 제1 엑손의 서열 내에서 NHEJ를 조장함으로써, 유전자 녹아웃(gene knockout)의 발달을 가능하게 하였다. 상동성 유도 수선(HDR)으로 알려져 있는 제2 과정은, 절단부를 수선하기 위해서 이중가닥 절단의 양 말단에 대해 상동성을 갖는 DNA의 주형을 필요로 한다. 이러한 과정은 오류가 보다 낮게 발생하며, 유전 질환의 특정 돌연변이를 수선 또는 삽입하기 위해, 또는 정제 태그 또는 형광 단백질과 같은 단백질 마커에 대한 서열을 녹인(knock-in)하기 위해 광범위하게 사용되고 있다.
- [0006] DNA의 이중가닥 절단 이후 HDR을 조장하기 위해 사용되는 공여체 주형은 크기가 다양하다. 이들은 200개 미만의 염기쌍을 갖는 단일가닥 DNA 분자(ssDNA)만큼 단순할 수 있거나, 절단된 부위의 5' 및 3' 말단용 상동성 재조합 암(recombination arm)을 포함하는 공여체 플라스미드만큼 클 수 있다. 이들 공여체 벡터는 또한 변형된 세포 클론의 단리를 용이하게 하기 위해, 내성 유전자의 발현을 위해 삽입된 단백질 마커 및 재조합 카세트의 서열을 포함한다. 이들 공여체 플라스미드의 구성은 많은 시간과 노력을 요하는 것으로 간주되며, 완료까지 수일이 걸릴 수 있는 다단계 과정이 필요로 한다. 게다가, 세포 내에서 유전체 변형이 유도되면 순수한 세포 클론의 선택은, 특정 실험실에서만 이용 가능한 고가의 장비의 사용을 세포 분류를 위해 필요로 할 수 있거나, 진핵생물 항생제에 대한 내성 카세트를 이용한 세포 선택에 의존하고, 이후 완료까지 수주가 걸릴 수 있는 과정인 단세포 희석이 수반된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 따라서, 당해 기술분야에서는 벡터 생성 과정 및 순수한 클론 세포 선택 과정을 가속화하기 위한 방법 및 조성물이 요구된다. 본 발명은 당해 기술분야에서 충족되지 않은 이러한 요구를 제시한다.

과제의 해결 수단

- [0008] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 핵산 분자를 포함하는 상동성 유도 재조합(HDR) 공여체 벡터에 관한 것으로, 핵산 분자는 음성 선택 마커를 암호화하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열 및 삽입 카세트를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 이때 삽입 카세트는 세포의 유전체에 삽입될 핵산 서열을 포함한다.
- [0009] 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트는 세포 선택 마커 서열, 단백질 정제 태그, 리포터 마커 서열, 프로모터 서열, P2A 링커 서열, 종결 서열, mRNA 안정화 서열, 리포터 마커 서열, 세포 선택 마커 서열, 외생성 유전자 또는 이들의 조합 중 하나 이상을 포함한다.
- [0010] 하나의 실시형태에서, 단백질 태그는 키틴 결합 단백질(CBP), 말토오스 결합 단백질(MBP), 글루타티온-S-트랜스페라아제(GST), 폴리(His), 비오틴/스트렙타비딘, V5-태그, Myc-태그, HA-태그, NE-태그, His-태그, 플래그 태그(Flag tag), 할로 태그(Halo-tag), 스냅 태그(Snap-tag), Fc-태그, Nus-태그, BCCP, 티오레독신(thioredoxin), 스눕 태그(SnooperTag), 스파이 태그(SpyTag), 이소셉 태그(Isopeptag), SBP-태그, S-태그, 아비 태그(AviTag), 칼모듈린 중 하나이다.
- [0011] 하나의 실시형태에서, 리포터 마커는 클로람페니콜-아세틸 트랜스페라아제(CAT), β -갈락토실트랜스페라아제, 서양고추냉이 퍼옥시다아제, 루시페라아제, NanoLuc®, 알칼리 포스파타아제 및 형광 단백질 중 하나이다. 하나의 실시형태에서, 형광 단백질은 녹색 형광 단백질(GFP), 적색 형광 단백질(RFP), mCherry, mRuby3, mtagBFP2 및 mClover3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0012] 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트는 제오신™ 내성 마커, 네오마이신 내성 마커, 퓨로마이신 내성 마커, 블라스티시딘 내성 마커 및 하이그로마이신 내성 마커 중 하나이다.

- [0013] 하나의 실시형태에서, 하나 이상의 음성 선택 마커는 *ccdb* 유전자를 포함한다. 하나의 실시형태에서, HDR 공여체 벡터는 삽입 카세트의 측면에 있는 음성 선택 마커를 암호화하는 2개의 핵산 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, HDR 공여체 벡터는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시된 바와 같은 핵산 서열을 포함한다.
- [0014] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 핵산 분자를 포함하는 HDR 벡터에 관한 것으로, 핵산 분자는 하나 이상의 재조합 암을 포함하며, 상기 재조합 암은 표적 뉴클레오타이드 서열에 대해 상동성을 갖는 뉴클레오타이드 서열, 및 삽입 카세트를 포함하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 상기 삽입 카세트는 세포의 유전체 내로 삽입되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0015] 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트는 세포 선택 마커 서열, 단백질 정제 태그, 리포터 마커 서열, 프로모터 서열, 종결 서열, mRNA 안정화 서열, 리포터 마커 서열, 세포 선택 마커 서열, 외생성 유전자 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 서열을 포함한다.
- [0016] 하나의 실시형태에서, 단백질 태그는 CBP, MBP, GST, 폴리(His), 비오틴/스트렙타비딘, V5-태그, Myc-태그, HA-태그, NE-태그, His-태그, 플래그 태그, 할로 태그, 스냅 태그, Fc-태그, Nus-태그, BCCP, 티오레독신, 스냅 태그, 스카이 태그, 이소캡 태그, SBP-태그, S-태그, 아비 태그, 칼모듈린 중 하나이다.
- [0017] 하나의 실시형태에서, 리포터 마커는 CAT, β -갈락토실트랜스페라아제, 서양고추냉이 퍼옥시다아제, 루시페라아제, NanoLuc®, 알칼리 포스파타아제 및 형광 단백질 중 하나이다. 하나의 실시형태에서, 형광 단백질은 GFP, RFP, mCherry, mRuby3, mtagBFP2 및 mClover3으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0018] 하나의 실시형태에서, 세포 선택 마커 서열은 제오신TM 내성 마커, 네오마이신 내성 마커, 퓨로마이신 내성 마커, 블라스티시딘 내성 마커 및 하이그로마이신 내성 마커 중 하나이다.
- [0019] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 유전적으로 변형된 세포를 생성하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 HDR 벡터의 하나 이상의 재조합 암과 내생성 염색체 표적 DNA 서열 사이의 상동성 재조합에 의해 상기 내생성 염색체 표적 DNA 서열을 포함하는 세포의 유전체 내로의 HDR 벡터의 삽입 카세트의 통합이 조장되도록 세포를 HDR 벡터와 접촉시키는 단계를 포함한다.
- [0020] 하나의 실시형태에서, 접촉 방법은 세포를 HDR 벡터로 형질 감염시키는 단계를 포함한다.
- [0021] 하나의 실시형태에서, 방법은 세포 내에서 내생성 염색체 표적 DNA 내의 특정 뉴클레오타이드 서열에서 DNA를 절단하는 엔도뉴클레아제 도메인을 포함하는 뉴클레아제를 제공하는 단계; 및 뉴클레아제가 세포 내에서 내생성 염색체 표적 DNA 서열 내의 뉴클레오타이드 서열을 절단 또는 니킹(nicking)하도록 세포 내에서 내생성 염색체 표적 DNA 서열을 뉴클레아제와 접촉시켜, 내생성 염색체 표적 DNA 서열과 HDR 벡터의 하나 이상의 재조합 암 사이의 상동성 재조합 빈도를 향상시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0022] 하나의 실시형태에서, 세포는 인간으로부터 유래한다. 하나의 실시형태에서, 세포는 마우스로부터 유래한다.
- [0023] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 제조되는 유전적으로 변형된 세포에 관한 것이다. 하나의 실시형태에서, 유전적으로 변형된 세포는 녹아웃 세포이다. 하나의 실시형태에서, 유전적으로 변형된 세포는 녹인 세포이다. 하나의 실시형태에서, 세포는 인간 세포이다. 하나의 실시형태에서, 세포는 마우스 세포이다.
- [0024] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 목적하는 핵산이 도입되어 있는 유전적으로 변형된 동물을 생성하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 상기 핵산을 도입할 필요가 있는, 내생성 염색체 표적 DNA 서열을 포함하는 일차 세포를 수득하는 단계; 본 발명의 HDR 벡터의 하나 이상의 재조합 암과 내생성 염색체 표적 DNA 서열 사이의 상동성 재조합에 의해 세포의 유전체 내로의 HDR 벡터의 삽입 카세트의 통합이 조장되도록 세포를 HDR 벡터와 접촉시키는 단계; 및 상동성 재조합이 일어난 상기 일차 세포로부터 동물을 발생시키는 단계를 포함한다.
- [0025] 하나의 실시형태에서, 방법은 세포 내에서 내생성 염색체 표적 DNA 내의 특정 뉴클레오타이드 서열에서 DNA를 절단하는 엔도뉴클레아제 도메인을 포함하는 뉴클레아제를 제공하는 단계; 및 뉴클레아제가 일차 세포 내에서 내생성 염색체 표적 DNA 내의 뉴클레오타이드 서열을 절단 또는 니킹하도록 세포 내에서 내생성 염색체 표적 DNA 서열을 뉴클레아제와 접촉시켜, 내생성 염색체 표적 DNA 서열과 HDR 벡터의 하나 이상의 재조합 암 사이의 상동성 재조합 빈도를 향상시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0026] 하나의 실시형태에서, 동물은 포유류, 유대류, 조류, 양서류 및 어류 중 하나이다.
- [0027] 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트는 상동성 재조합 이후에 유전자를 파괴하는 뉴클레오타이드 서열, 상동성 재조

합 이후에 유전자를 치환하는 뉴클레오티드 서열, 상동성 재조합 이후에 유전자를 도입하는 뉴클레오티드 서열, 및 상동성 재조합 이후에 조절 부위를 도입하는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0028] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 생성되는 유전적으로 변형된 동물에 관한 것이다.

[0029] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 질병을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 HDR 벡터를 질병에 걸린 개체에 도입하는 단계로서, HDR 벡터의 삽입 카세트는 상동성 재조합 이후에 유전자를 파괴하는 뉴클레오티드 서열, 상동성 재조합 이후에 유전자를 치환하는 뉴클레오티드 서열, 상동성 재조합 이후에 유전자를 도입하는 뉴클레오티드 서열, 및 상동성 재조합 이후에 조절 부위를 도입하는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 유전자는 질병과 연관되어 있다.

[0030] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 화합물이 유전자 또는 단백질의 하나 이상의 활성에 미치는 효과를 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 하나 이상의 유전적으로 변형된 세포를 화합물과 접촉시키는 단계; 및 유전자 또는 단백질의 하나 이상의 활성을 평가하는 단계를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 방법은 본 발명의 복수의 유전적으로 변형된 세포를 화합물과 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0031] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 질병을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 화합물의 효과를 스크리닝하는 방법에 의해 질병의 치료에 도움이 되는 효과를 갖는 것으로 확인된 화합물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 질병은 낮은 수준의 헵 옥시게나아제 I(HO-1) 발현과 연관이 있으며, 화합물은 디설피람(disulfiram), 티오스트렙톤(thiostrepton), 트리메타디온(trimethadione), 오라노핀(auranofin), 티메로살(thimerosal), 할로판트린 염산염(halofantrine hydrochloride) 및 보리노스타트(vorinostat) 중 하나이다.

도면의 간단한 설명

[0032] 본 발명의 바람직한 실시형태에 대한 하기 상세한 설명은 첨부된 도면과 결부시켜 해석하는 경우에 보다 잘 이해될 것이다. 본 발명을 예시할 목적으로, 도면에는 현재 바람직한 실시형태가 도시되어 있다. 그러나, 본 발명은 도면에 도시된 실시형태의 정확한 배열 및 수단에 제한되지 않는 것으로 이해될 것이다.

도 1a 내지 도 1c를 포함하는 도 1은 C-말단 표지용 HDR 벡터를 구성하기 위한 성분에 대한 도면을 보여준다. 도 1a는 HDR 공여체 벡터(또는 백본 벡터)가 먼저 *ccdB* 세포 사멸 B 유전자 제어) 카세트를 갖는 절편을 절단하기 위한 제한 효소(이 경우, KpnI 및 BamHI)로 절단된다는 것을 보여준다. 도 1b는 표적 DNA 서열에 대해 상동성을 갖는 합성 재조합 암이 설계되어 있다는 것을 보여준다. 김슨(Gibson) 조립 방법을 이용하여, 재조합 암을 절단된 백본 벡터와 혼합하고 클로닝한다. 도 1c는 HDR 벡터 산물을 보여준다.

도 2a 내지 도 2c를 포함하는 도 2는 N-말단 표지용 HDR 벡터를 구성하는데 요구되는 성분에 대한 도면을 보여준다. 도 2a는 백본 벡터가 먼저 CDDB 카세트를 갖는 절편을 절단하기 위한 제한 효소(이 경우, KpnI 및 BamHI)로 절단된다는 것을 보여준다. 도 2b는 김슨 조립 방법을 이용하여, 앞서 설계된 합성 재조합 암을 절단된 백본 벡터와 혼합하고 클로닝한다는 것을 보여준다. 도 2c는 HDR 벡터 산물을 보여준다.

도 3a 내지 도 3c를 포함하는 도 3은 내부 프로모터를 갖는 HDR 벡터를 구성하는데 요구되는 성분에 대한 도면을 보여준다. 도 3a는 내부 프로모터의 제어를 받으며 리포터 서열 및 항생제 내성 유전자를 갖는 HDR 공여체 벡터가 먼저 CDDB 카세트를 갖는 절편을 절단하기 위한 제한 효소(이 경우, KpnI 및 BamHI)로 절단된다는 것을 보여준다. 도 3b는 표적 DNA 서열에 대해 상동성을 갖는 합성 재조합 암이 설계되어 있다는 것을 보여준다. 김슨 조립 방법을 이용하여, 재조합 암을 절단된 백본 벡터와 혼합하고 클로닝한다. 도 3c는 HDR 벡터 산물을 보여준다.

도 4a 및 도 4b를 포함하는 도 4는 상동성 재조합을 용이하게 함으로써 내생성 단백질을 표지하는데 사용될 수 있는 단백질 태그의 예에 대한 도면을 보여준다. 도 4a는 표적 유전자의 C-말단 부위에 표지 태그를 삽입하기 위한 예시적인 구조체를 보여준다. 도 4b는 표적 유전자의 N-말단 부위에 표지 태그를 삽입하기 위한 예시적인 구조체를 보여준다.

도 5는 상동성 재조합 벡터의 개발 및 변형된 세포주의 선택을 위한 프로토콜을 보여준다.

도 6은 mRuby3으로 태깅되고 제오신TM(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 선택되는 내생성 히스톤 3을 갖는 세포주의 대표적인 이미지를 보여준다.

도 7은 mClover3으로 태깅되고 퓨로마이신(5 μ M)으로 선택되는 내생성 베타 튜블린을 갖는 세포주의 대표적인 이미지를 보여준다.

도 8은 복합 표지를 갖는 세포주를 보여준다. 내생성 히스톤 3은 mRuby3으로 태깅되고, 베타 튜블린은 mClover3로 태깅된다. 세포는 제오신™과 퓨로마이신의 혼합물로 선택된다.

도 9a 내지 도 9c를 포함하는 도 9는 3중 표지로 현상된 세포주의 대표적인 이미지를 보여준다. 도 9a는 mRuby3으로 태깅된 내생성 히스톤 3을 보여준다. 도 9b는 mTagBFP2로 태깅된 ATP5B를 보여준다. 도 9c는 mClover3으로 태깅된 베타 튜블린을 보여준다. 세포는 제오신™, 퓨로마이신과 블라스티시딘의 혼합물로 선택된다.

도 10은 NanoLuc® 루시페라아제로 태깅된 헴 옥시게나아제 I(HO-1)로 현상된 세포주를 보여준다. HEK293T 세포주는 NanoLuc® 루시페라아제로 태깅된 HO-1의 내생성 유전자에 의해 변형되었다. HO-1 단백질의 발현에서의 변화는 HO-1 발현의 공지된 활성화인에 의한 자극 이후에 측정되었다.

도 11은 HO-1 발현의 강력한 유도인자를 확인한 것을 증명한 실험 결과를 보여준다. HO-1 NanoLuc® HEK293T 세포주는 산화 또는 항산화 능력을 갖는 84개의 화합물의 라이브러리로서 처리한지 16시간 이후에 HO-1의 발현에서의 변화를 평가하는데 사용되었다.

도 12는 HO-1의 발현을 활성화하는 FDA 승인 약물을 확인한 것을 증명한 실험 결과를 보여준다. HO-1 NanoLuc® HEK293T 세포주는 1,200개의 FDA 승인 화합물의 라이브러리로서 처리한지 16시간 이후에 HO-1의 발현에서의 변화를 평가하는데 사용되었다. 7개의 화합물은 HO-1의 발현을 1.5배 이상 증가시킬 수 있었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 한 유전자의 하나 이상의 대립유전자의 발현을 감소시키기 위한 방법 및 시약을 제공한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명은 한 유전자의 하나 이상의 대립유전자를 표지하기 위한 방법 및 시약을 제공한다.
- [0034] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 외생성 서열에 상응하는 폴리뉴클레오타이드의 영역을 표적화하는 방법에 사용하기 위한 DNA 분자를 제공한다. 하나의 실시형태에서, DNA 분자는 예비 재조합 벡터 또는 HDR 공여체 벡터이다. 하나의 실시형태에서, DNA 분자는 재조합 벡터 또는 HDR 벡터이다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 HDR 공여체 벡터는 삽입 카세트를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 본 발명의 HDR 벡터는 HDR 공여체 벡터를 절단하고 HDR 공여체 벡터의 삽입 카세트를 표적 핵산 서열에 대해 상동성을 갖는 하나 이상의 핵산 서열에 연결함으로써 생성된다.
- [0035] 하나의 실시형태에서, HDR 공여체 벡터는 CCDB 카세트 및 삽입 카세트 중 하나 이상을 포함한다. 하나의 실시형태에서, HDR 공여체 벡터는 제1 제한 효소에 의해 절단되는 제한 효소 절단 부위가 측면에 있는 제1 CCDB 카세트, 삽입 카세트, 및 제2 제한 효소에 의해 절단되는 제한 효소 절단 부위가 측면에 있는 제2 CCDB 카세트를 포함한다. 하나의 실시형태에서, CCDB 카세트는 CcdB 독소를 암호화하는 *ccdB* 유전자를 포함한다.
- [0036] 하나의 실시형태에서, HDR 공여체 벡터의 삽입 카세트는 태그를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 링커 서열 및 항생제 내성 유전자 중 하나 이상을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 링커 서열은 P2A 서열이다. 하나의 실시형태에서, 태그, 링커 서열 및 항생제 내성 유전자를 포함하는 HDR 공여체 벡터의 예시적인 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 1로 표시된다.
- [0037] 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트는 태그를 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 프로모터 서열 및 항생제 내성 유전자 중 하나 이상을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 프로모터는 EF-1 알파 프로모터이다. 하나의 실시형태에서, 태그, 프로모터 서열 및 항생제 내성 유전자를 포함하는 HDR 공여체 벡터의 예시적인 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 2로 표시된다.
- [0038] 하나의 실시형태에서, HDR 벡터는 표적 핵산 서열에 대해 상동성을 갖는 하나 이상의 핵산 서열 또는 재조합 암에 HDR 공여체 벡터의 삽입 카세트를 연결함으로써 생성된다. 하나의 실시형태에서, HDR 벡터는 2개의 표적 핵산 서열에 대해 상동성을 갖는 2개의 영역 또는 2개의 재조합 암을 포함한다. 하나의 실시형태에서, HDR 벡터는 2개의 재조합 암이 측면에 있는 삽입 카세트를 포함한다.
- [0039] 하나의 실시형태에서, HDR 벡터는 외생성 서열에 상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 제1 영역, 삽입 카세트, 및 외생성 서열에 상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 제2 영역을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 제

조합 벡터(또는 HDR 벡터)는 외생성 서열에 상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 제1 영역, 태그를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 링커 서열, 항생제 내성용 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 외생성 서열에 상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 갖는 제2 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 프로모터를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 벡터는 조건부로 제어되는 프로모터를 포함한다.

[0040] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 세포 내에서 유전자 또는 유전자 산물을 태깅하기 위한 방법을 제공하며, 이때 상기 방법은 (a) HDR 벡터를 세포 내로 도입하는 단계로서, HDR 벡터가 유전자의 엑손 서열에 상응하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단계, 및 (b) HDR 벡터에서 유래한 삽입 카세트가 유전체 내에 통합되어 있는 세포를 선택하는 단계를 포함한다.

[0041] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 세포 내에서 유전자를 녹다운(knock-down) 또는 녹아웃시키기 위한 방법을 제공하며, 이때 상기 방법은 (a) HDR 벡터를 세포 내로 도입하는 단계로서, HDR 벡터가 유전자의 프로모터 또는 엑손 서열에 상응하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단계, 및 (b) HDR 벡터에서 유래한 삽입 카세트가 유전체 내에 통합되어 있는 세포를 선택하는 단계를 포함한다.

[0042] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 세포 내에서 복수의 유전자 또는 유전자 산물을 태깅하기 위한 방법을 제공하며, 이때 상기 방법은 (a) 복수의 HDR 벡터를 세포 내로 도입하는 단계로서, 각각의 HDR 벡터가 유전자의 엑손 서열에 상응하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드 서열 및 독특한 삽입 카세트를 포함하는 단계, (b) HDR 벡터에서 유래한 복수의 삽입 카세트가 유전체 내에 통합되어 있는 세포를 선택하는 단계를 포함한다.

[0043] 다른 실시형태에서, 본 발명은 세포 라이브러리를 생성하는 방법을 제공하며, 이때 상기 방법은 (a) 복수의 HDR 벡터를 복수의 세포 내로 도입하는 단계로서, HDR 벡터는 각각 유전자의 프로모터 또는 엑손 서열에 상응하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단계; 및 (b) HDR 벡터가 유전체 내에 통합되어 있는 세포를 선택하는 단계를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 세포 라이브러리는 태깅된 세포 라이브러리이다. 하나의 실시형태에서, 라이브러리는 녹다운된 세포 라이브러리이다. 하나의 실시형태에서, 라이브러리는 녹아웃된 세포 라이브러리이다.

[0044] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 생성되는 세포를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 세포는 포유류 세포이며, 이는 인간 세포일 수 있다. 특정한 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 HDR 벡터의 통합된 삽입 카세트를 포함하는 세포를 포함한다. 또한 본 발명은 본 발명의 세포의 라이브러리, 어레이(array) 및 수집물(collection)을 제공한다.

[0045] 다른 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 생성된 동물을 제공한다. 특정한 실시형태에서, 동물은 포유류이고, 하나의 실시형태에서는 동물은 마우스이다.

[0046] 하나의 실시형태에서, HDR 벡터의 폴리뉴클레오타이드 서열은 유전자의 일부에 상응한다. 하나의 실시형태에서, 유전자는 리포터 유전자이다. 다른 실시형태에서, 유전자는 질병 또는 질환과 연관되어 있다.

[0047] 본 발명의 특정한 실시형태에서, HDR 벡터의 통합된 삽입 카세트는 재조합 이후에 유전자에 대해 프레임 내 5' 또는 3'에 위치하여, 표적 유전자 또는 단백질을 태깅하는 역할을 한다. 본 발명의 특정한 실시형태에서, HDR 벡터의 통합된 삽입 카세트는 재조합 이후에 유전자의 전사된 영역에 위치하여, 표적 유전자 또는 단백질을 녹다운 또는 녹아웃시키는 역할을 한다.

[0048] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 세포는 파괴된 유전자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 유전자는 HDR 벡터의 통합된 삽입 카세트에 의해 파괴된다. 특정한 실시형태에서, 삽입 카세트는 프로모터를 추가로 포함하고, 하나의 실시형태에서는 프로모터는 유도성 프로모터이다. 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트는 세포의 유전체 내에 통합된다.

[0049] 하나의 실시형태에서, 세포는 재조합 이후에 통합된 삽입 카세트를 갖는 유전자의 단일 대립유전자를 포함한다. 대안적인 실시형태에서, 세포는 재조합 이후에 통합된 삽입 카세트를 갖는 유전자의 대립유전자 둘 모두를 포함한다. 본 발명은 본 발명의 세포의 수집물을 추가로 제공하며, 이때 각각의 세포는 서로 다른 파괴된 유전자를 포함한다.

[0050] 정의

[0051] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 흔히 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 설명된 방법 및 재료와 유사하거나 동일한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있을지라도 바람직한 방법 및

재료가 개시되어 있다.

- [0052] 본원에서 사용되는 바와 같이, 하기 용어 각각은 본 단락에서 이와 연관된 의미를 갖는다.
- [0053] "하나" 및 "일"이란 관사는 상기 관사의 하나 또는 하나 초과(즉, 적어도 하나)의 문법 대상을 지칭하기 위해 사용된다. 예를 들어, "일 성분"은 하나의 성분 또는 하나 초과의 성분을 의미한다.
- [0054] 양, 시간의 기간 등과 같은 측정 가능한 값을 지칭하는 경우에 본원에서 사용되는 바와 같은 "약"이란 용어는 명시된 값으로부터 $\pm 20\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, $\pm 1\%$ 또는 $\pm 0.1\%$ 의 변화를 포함한다는 것을 의미하는데, 이는 이 같은 변화가 개시된 방법을 실시하는데 적절하기 때문이다.
- [0055] 대립유전자: "대립유전자"는 유전자의 단일 복사물이며, 한 쌍의 유전자 또는 유전자의 일련의 복사물 또는 변이체 형태 중 하나일 수 있다.
- [0056] 대립유전자성(allelic): "대립유전자성"이란 용어는 특정 유전자의 하나 이상의 복사물 또는 형태가 존재한다는 것을 의미한다. 따라서, 유전자가 하나 이상의 대립유전자를 갖는 경우에 이는 대립유전자성인 것으로 간주된다.
- [0057] 본원에서 사용되는 바와 같이, "어레이"는 체계적인 방식 또는 일부 소정의 방식으로 배열될 수 있는 대상의 통합 수집물이다. 예를 들어, "어레이"는 용기의 통합 수집물 또는 웰(well)의 통합 수집물일 수 있다. 즉, "어레이"는 다른 부분과 함께 하나의 유닛으로서 형성되는 대상의 수집물일 수 있다. 또한 "어레이"는 물질의 통합 수집물이 체계적인 방식으로 배열되어 있는 표면일 수 있다.
- [0058] "세포의 어레이"는 체계적인 방식으로 배열되어 있는 세포의 수집물이다. 예를 들어, "세포의 어레이" 또는 "세포 어레이"는 용기 또는 웰의 통합 수집물 내에 포함된, 유전자가 파괴된 세포 유형 또는 세포의 비무작위 배열을 나타낸다.
- [0059] 본 발명의 "세포"는 숙주 세포, 표적 세포, 건강한 세포, 돌연변이된 세포, 질병 또는 질환 특징을 갖는 세포("질병 세포"), 형질 전환된 세포 또는 변형된 세포일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 본 설명에서 "세포"는 이 같은 세포의 배양물을 나타낼 수도 있다. 변형된 세포는 이의 유전체 내에 통합된 "구조체" 또는 통합된 "외생성 절편"을 포함하는 세포일 수 있다. 이 같은 세포는 "녹아웃"으로 간주될 수 있다. 변형된 세포는 발현이 생물학적 인자 또는 이 같은 인자의 그룹에 의해 조절되는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 이와 관련하여, 변형된 세포는 조절 가능한 유전자를 포함하는 세포일 수 있다.
- [0060] "클론"은 단일 선조 세포에서 유래하는, 동일한 유전체를 갖는 다수의 세포이다. 따라서 하나의 기원 세포로부터 유사분열에 의해 생성되는 일군의 유전적으로 동일한 세포는 "클론"이다. 본 발명에 따르면, 클론은 적어도 하나의 배양된 세포, 바람직하게는 냉동되지 않은 세포, 또는 복수의 이 같은 세포를 나타내며, 각각은 하나의 세포에 대한 이의 혈통을 따른다.
- [0061] "구조체"란 용어는 선형 또는 원형 형태로 존재할 수 있는 클로닝 벡터 또는 플라스미드와 같은 인공적으로 조립된 폴리뉴클레오타이드 분자를 나타낸다. 전형적으로, 구조체는 특별히 관심 있는 유전자, 유전자 단편 또는 폴리뉴클레오타이드 서열과 같은 요소를 포함할 것이며, 여기서 상기 요소는 구조체 내에서 세포 선택 마커, 리포터 마커, 적절한 제어 서열, 프로모터, 종결 서열, 스플라이스 수용체 부위(splice acceptor site), 스플라이스 공여체 부위 및 제한 엔도뉴클레아제 인식 서열과 같은 기타 요소와 나란히 놓여 있다. 예를 들어, 구조체는 "HDR 공여체 벡터" 또는 "HDR 벡터"일 수 있다. 구조체 또는 이의 일부는 세포의 유전체, 또는 시험관 내에서 제조된 세포 유전체의 체제 내에 통합될 수 있다. "파괴된"은 내생성 유전자 산물의 발현을 억제한다는 것을 의미한다. 하나의 실시형태에서, 유전자의 대립유전자는 대립유전자의 뉴클레오타이드 서열의 임의의 일부가 구조체를 포포함하는 경우에 "파괴"된 것이다. 따라서, 세포 유전체에 자연적으로 존재하는 뉴클레오타이드 서열은 전자의 서열의 5' 말단과 3' 말단 사이에 다른 뉴클레오타이드 서열을 통합시킴으로써 "파괴"될 수 있다. 세포 유전체 내의 유전자를 파괴하는 뉴클레오타이드 서열은 상기 서열이 존재한다면, 함께 폴리펩티드를 암호화하는 영역에 의해 측면에 위치 할 수 있다. 예를 들어, 구조체에 의한 유전자의 파괴는 세포 내에서 유전자 산물의 비발현을 초래하거나, 부분적으로 또는 완전히 비기능적인 유전자 산물 또는 변경된 유전자 산물의 발현을 초래할 수 있다.
- [0062] 구조체 내의 폴리뉴클레오타이드 서열의 5' 말단이 구조체 내의 제2 폴리뉴클레오타이드 서열의 3' 말단 다음에 위치하는 경우에, 구조체 내의 폴리뉴클레오타이드 서열은 구조체 내의 제2 폴리뉴클레오타이드 서열에 대해 하류 또는 3' 위치에 있는 것으로 간주된다.
- [0063] 뉴클레오타이드 서열이 자연적으로 세포 유전체의 일부가 아니거나, 세포의 유전체 내로 고의적으로 삽입되는 경

우에, 세포에 대해 "외생성"이다. 뉴클레오티드 서열은 인간의 개입 또는 자동화 수단에 의해, 세포 유전체 내로 고의적으로 삽입될 수 있다.

[0064] 구조체의 서열 또는 이의 일부와 같은 외생성 뉴클레오티드 서열은 "외생성 절편"으로서 지칭될 수 있다. 외생성 절편은 항생제 내성 유전자와 같은 온전한 구조체 내에 존재하는 기능 요소를 포함할 수 있다.

[0065] "유전자"는 유전자의 엑손 및 인트론뿐만 아니라 인핸서, 프로모터 및 전사 종결 서열(예를 들어, 폴리아데닐화 서열)과 같은 기타 비코딩 및 조절 서열을 포함한다. 본 설명에서 사용되는 바와 같이, 유전자는 인간의 개입 또는 자동화에 의해 그 내부에 삽입되는 임의의 구조체를 포함하지 않는다. 유전자는 본질적으로 대립유전자성일 수 있다.

[0066] 세포의 "유전체"는 미토콘드리아 또는 식물 세포의 경우에 염색체와 같은 세포의 기타 세포기관 내의 DNA 함량을 포함하여, 세포의 염색체 내의 총 DNA 함량을 포함한다.

[0067] 세포의 "유전체 서열"은 세포의 유전체 DNA 단편의 뉴클레오티드 서열을 지칭한다.

[0068] 적절한 숙주 세포는 효모와 같은 비포유류 진핵세포일 수 있거나, 바람직하게는 박테리아와 같은 원핵세포일 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 대장균(*E. coli*) 균주일 수 있다.

[0069] "상동성 재조합"이란 용어는 유전체 또는 DNA 체제의 표적 대립유전자와 같은 표적 서열을 가진 구조체 내의 핵산 서열 간의 서열 상동성에 기반한 DNA 재조합 과정을 지칭한다. 따라서, 구조체 내에 존재하는 핵산 서열은 세포 유전체 내에 위치하는 표적 서열과 동일하거나 상동성이 높다. 즉, 이들은 세포 유전체 내에 위치하는 표적 서열에 대해 60% 이상, 바람직하게는 70% 이상, 매우 바람직하게는 80% 이상, 가장 바람직하게는 90% 이상의 서열 동일성을 갖는다. 특정한 실시형태에서, 상동성 재조합 벡터는 세포 유전체 내에 위치하는 표적 서열에 대해 95% 내지 98%의 서열 동일성을 갖는다.

[0070] "통합(된)"이란 단어는 다른 부분과 함께 하나의 유닛으로 형성된다는 것을 의미한다. 따라서, 웰 또는 용기와 같은 요소의 수집물에 "통합"이란 성격을 적용하면, 어떤 소정의 방식으로 배열되는 상호 관련된 요소의 의도적인 축적을 나타낸다. 예를 들어, "통합된" 복수의 요소는 어레이의 일부 요소를 지칭할 수 있지만, 반드시 모든 요소를 지칭하는 것은 아니다. "통합"은 또한 본 발명의 어레이의 웰 또는 용기 내의 내용물을 설명하기 위해 사용될 수 있다.

[0071] "단리된"은 순수한 상태 또는 유리된 상태로 수득하도록 다른 물질과 분리한다는 것을 의미한다. 따라서, "단리된 폴리뉴클레오티드"는 세포의 유전체 또는 유전체 DNA 체제와 같은 기타 핵산으로부터 분리되거나 기타 세포 조성물로부터 분리되어 있던 폴리뉴클레오티드이다.

[0072] "녹다운"은 하나 이상의 표적 유전자 또는 대립유전자의 발현에서의 감소를 유발한다는 것을 의미한다. 녹다운은 다양한 "녹다운 시약" 또는 "녹다운 분자" 중 임의의 것에 의해 달성될 수 있으며, 이들 용어는 상호 교환 가능하게 사용된다. "녹다운 시약"으로는, 예를 들어 안티센스 RNA, 리보자임 및 dsRNA를 들 수 있다. "녹다운 세포"는 녹다운 시약을 포함하는 세포를 지칭하고, "녹다운 동물"은 녹다운 시약을 포함하는 동물을 지칭한다. 유사하게, "녹다운 식물"은 녹다운 시약을 포함하는 식물을 지칭한다.

[0073] "녹아웃"은 유전자 조작에 의해 유전체로부터 파괴된 유전자의 특정 단일 유전자 또는 대립유전자(들)를 갖는다는 것을 의미한다. 따라서, "단일 대립유전자 녹아웃 세포"는 유전자의 단일 대립유전자가 파괴되어 이의 유전자 산물이 발현되지 않는 세포를 지칭한다. 유사하게, 형질 전환 "녹아웃 마우스" 또는 기타 형질 전환 동물은 파괴된 유전자 또는 대립유전자를 포함하는 세포를 포함하는 것이다.

[0074] 본 설명에서, "라이브러리"는 2개 이상의 구성요소의 통합 수집물을 나타낸다. 구성요소는 라이브러리의 "필수 부분"을 의미한다. 라이브러리의 구성요소는 세포 또는 핵산일 수 있다. 예를 들어, 세포 라이브러리 이외에도 라이브러리는 구조체, 폴리뉴클레오티드 또는 RNA 분자의 수집물을 포함할 수 있다. 라이브러리는 선택된 약물 또는 화합물의 수집물을 포함할 수 있다. 라이브러리는 하나의 용기 내에 물리적으로 존재하는 "풀링(pooling)된" 구성요소의 통합 수집물을 포함할 수 있다. 대안적으로, 라이브러리는 서로에 대해 독립적으로 저장되는, 본 발명의 방법에 의해 생성되는 구성요소의 통합 수집물일 수 있다.

[0075] "마커 서열"은 세포 선택 마커 서열 및 리포터 마커 서열 중 하나를 지칭한다. 선택 마커 서열은 선택 마커를 암호화하고, 숙주 세포 선택 마커 또는 표적 세포 선택 마커일 수 있다. 리포터 마커 서열은 리포터 마커를 암호화한다.

- [0076] "자연적으로 발생하는"이란 용어는 이와 같이 묘사된 대상이 자연에서 발견될 수 있으며 인간의 개입에 의해 변형되지 않았다는 사실을 나타낸다. 따라서, 뉴클레오타이드 서열은 자연에 존재하고 인간의 개입에 의해 변형되지 않은 경우에 "자연적으로 발생한다". 폴리뉴클레오타이드가 자연적으로 발생하는 경우, 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열은 또한 "자연적으로 발생한다". 마찬가지로, 세포의 유전체가 "자연적으로 발생하는" 경우, 유전체의 뉴클레오타이드 서열은 "자연적으로 발생한다".
- [0077] "핵산"은 DNA 및 RNA 분자를 지칭한다. 따라서 벡터, 플라스미드, 구조체, 폴리뉴클레오타이드, mRNA 또는 cDNA는 모두 핵산의 예이다.
- [0078] 폴리뉴클레오타이드는 세포 유전체와 같은 기타 핵산으로부터 폴리뉴클레오타이드를 물리적으로 분리하기 위한 단계를 수행함으로써, 핵산 주형으로부터 "수득"될 수 있다. 대안적으로, 폴리뉴클레오타이드는 폴리뉴클레오타이드의 특정 복사물을 생성하기 위해 PCR 반응을 수행함으로써 "수득"될 수 있다. 나아가, 폴리뉴클레오타이드는 데이터 베이스에서 이용 가능한 바와 같은 뉴클레오타이드 서열 정보를 이용하여, 폴리뉴클레오타이드를 설계하고 화학적으로 합성함으로써 "수득"될 수 있다.
- [0079] "작동 가능하게 연결된"이란 용어는 유전 요소를 의도된 방식으로 작용하도록 하는 관계로 유전 요소를 병치(juxtaposition)한다는 것을 지칭한다. 이 같은 요소로는, 예를 들어 프로모터, 조절 서열, 관심 폴리뉴클레오타이드 및 종결 서열을 들 수 있으며, 이들은 "작동 가능하게 연결되는" 경우에 의도된 바와 같이 작용을 한다. "작동 가능하게 연결된" 요소는 또한 서로에 대해 "프레임 내"에 있다.
- [0080] 복제 기원: 이는 복제가 개시되는 DNA의 서열을 지칭한다.
- [0081] 폴리뉴클레오타이드 라이브러리: 폴리뉴클레오타이드 라이브러리는 적어도 2개의 폴리뉴클레오타이드의 통합 수집물이다.
- [0082] "무작위 삽입"이란 용어는 핵산이 유전체 또는 DNA 제제의 불특정 영역 내에 통합되는 과정을 지칭한다.
- [0083] "조절 가능한 유전자"는, 전사가 변형되거나, 얻어진 mRNA 전사체가 분해되어 유전자 또는 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 대로 전사하지 않아, 완전한 단백질을 생성하지 않는 상태의 유전자 또는 폴리뉴클레오타이드 서열이다. 조절 가능한 유전자는 mRNA가 온전할지라도 숙주 세포 효소에 의해 번역되지 않는 유전자일 수 있다. 일반적으로, 조절 가능한 유전자는 특정 시기 또는 특정 조건 하에 이의 발현을 허용하는 유전자이다. 예를 들어, 조절 가능한 유전자는 유도성 프로모터에 의해 구동되는 유전자이다.
- [0084] "삽입 카세트"는 삽입 구조체가 통합되어 있는 형질 전환된 세포의 태깅, 선택 또는 둘 모두를 용이하게 하는 기능 요소를 포함하는 구조체이다. 이 같은 요소는 "마커 서열" 및 "항생제 내성 유전자" 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. "삽입 카세트"는 유전자의 어떠한 부분 내로도 통합되도록 설계될 수 있다. 이와 관련하여, "삽입 카세트"는 표적 유전자의 하류로 프레임 내에 통합하도록 설계될 수 있다. 대안적으로, "삽입 카세트"는 유전자의 코딩 서열에 통합하여, 상기 유전자를 파괴하도록 설계될 수 있다.
- [0085] 구조체 내의 폴리뉴클레오타이드 서열의 3' 말단이 구조체 내의 제2 폴리뉴클레오타이드 서열의 5' 말단 앞에 위치하는 경우에, 구조체 내의 폴리뉴클레오타이드 서열은 구조체 내의 제2 폴리뉴클레오타이드 서열에 대해 상류 또는 5' 위치에 있는 것으로 간주된다.
- [0086] 범위: 본 개시내용 전반에 걸쳐 본 발명의 다양한 양태는 범위 형식으로 제공될 수 있다. 범위 형식의 설명은 단순히 편의 및 간결성을 위한 것이며, 본 발명의 범주에 대한 융통성 없는 제한(inflexible limitation)으로서 해석되지 않는 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 범위에 대한 설명은 이러한 범위 내의 개별 수치뿐만 아니라 모든 가능한 하위 범위를 구체적으로 개시하는 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 1 내지 6과 같은 범위에 대한 설명은 이러한 범위 내의 개별 숫자(예를 들어, 1, 2, 2.7, 3, 4, 5, 5.3 및 6)뿐만 아니라 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 4, 2 내지 6, 3 내지 6 등과 같은 하위 범위를 구체적으로 개시하는 것으로서 간주되어야 한다. 이는 상기 범위의 크기와는 무관하게 적용된다.
- [0087] 상세한 설명
- [0088] 본 발명은, 세포 내에서 외생성 유전자의 발현에 대해 태깅, 조정, 돌연변이, "녹아웃(knock out)" 또는 그 외에 파괴되거나, "녹인(knock in)"될 수 있는 유전자에 의한 재료 및 방법에 관한 것이다. 본 발명은 어떠한 태그 및 어떠한 선택 항생제라도 용이하게 수용할 수 있는 모델식 백본인 HDR 공여체 벡터에 관한 것이다. 태그 및 선택 마커를 표적화하고, 이를 표적 세포의 유전체 내로 재조합하는 HDR 벡터를 형성하기 위해, 재조합 암과 함께 본 발명의 HDR 공여체 벡터가 사용된다. 따라서, 본 발명은 또한 하나 이상의 태깅 또는 불활성화된 유전

자 대립유전자를 포함하는 세포를 생성하기 위해, HDR 벡터를 이용하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법을 이용하여, 생성된 세포는 이들 세포 내에서 태깅, 불활성화 또는 발현되는 유전자의 치료 또는 진단 효용성을 평가하는데 가치가 있다.

[0089] 조성물

[0090] 하나의 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 사용하기 위한 벡터에 관한 것이다. 다른 실시형태에서, 본 발명은 하나 이상의 유전자 대립유전자가 본 발명의 방법을 이용하여 태깅, 불활성화 또는 발현되어 있는 세포에 관한 것이다.

[0091] HDR 공여체 벡터

[0092] 본 발명의 HDR 공여체 벡터는 삽입 카세트를 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트는 리포터 마커 또는 태깅된 유전자의 인식을 위한 마커를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트는 태깅된 유전자의 정제를 위한 마커를 포함한다.

[0093] 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트는 적어도 하나의 음성 선택 마커 카세트의 하류에 있다. 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트는 적어도 하나의 음성 선택 마커 카세트의 상류에 있다. 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트 측면에는 2개의 음성 선택 마커 카세트가 있다. 하나의 실시형태에서, 음성 선택 마커 카세트는 독소 유전자, 또는 독성 산물의 발현을 위한 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 독소 유전자는 *ccdB*이다. 하나의 실시형태에서, *ccdB* 유전자를 포함하는 음성 선택 카세트는 CCDB 카세트이다. 하나의 실시형태에서, 음성 선택 카세트 측면에는 절단 부위가 있다. 하나의 실시형태에서, 절단 부위는 제한 효소 절단 부위이다.

[0094] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 HDR 공여체 벡터는 재조합 암의 클로닝을 가속화하여, HDR 벡터를 형성하기 위한 2개의 음성 선택 카세트를 포함한다. 하나의 실시형태에서, HDR 공여체 벡터는 제1 음성 선택 카세트, 삽입 카세트 및 제2 음성 선택 카세트를 5'에서 3'의 순서로 포함한다. 예시적인 실시형태에서, HDR 공여체 벡터는 제1 CCDB 카세트, 삽입 카세트 및 제2 CCDB 카세트를 5'에서 3'의 순서로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 각각의 음성 선택 카세트 측면에는 절단 부위가 있다. 하나의 실시형태에서, 절단 부위는 제한 효소 절단 부위이다. 하나의 실시형태에서, 2개의 음성 선택 카세트 측면에는 동일한 제한 효소 절단 부위가 있다.

[0095] 예시적인 실시형태에서, 삽입 카세트는 리포터 마커 및 세포 선택 마커를 5'에서 3'의 순서로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 리포터 마커 및 세포 선택 마커는 P2A 융합 서열을 이용하여 연결된다.

[0096] 하나의 실시형태에서, HDR 공여체 벡터는 복제 기원, 세포 선택 마커 서열, mRNA 안정화 서열, 외생성 유전자의 서열, 종결 서열, 내부 리보솜 진입 서열(IRES), 프로모터 서열, 번역 개시 서열, 리코비나아제(recombinase) 인식 부위 및 기타 기능 요소의 조합을 포함할 수 있다.

[0097] 리포터 마커는 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 폴리펩티드를 포함하는 분자이며, 이때 세포 내에서의 이의 발현은 세포에 검출 가능한 형질을 부여한다. 다양한 실시형태에서, 리포터 마커로는 클로람페니콜-아세틸 트랜스페라아제(CAT), β -갈락토실트랜스페라아제, 서양고추냉이 퍼옥시다아제, 루시페라아제, NanoLuc®, 알칼리 포스파타아제 및 형광 단백질을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않으며, 이때 상기 형광 단백질로는 녹색 형광 단백질(예를 들어, GFP, TagGFP, T-Sapphire, Azami Green, Emerald, mWasabi, mClover3), 적색 형광 단백질(예를 들어, mRFP1, JRed, HcRed1, AsRed2, AQ143, mCherry, mRuby3, mPlum), 황색 형광 단백질(예를 들어, EYFP, mBanana, mCitrine, PhiYFP, TagYFP, Topaz, Venus), 오렌지색 형광 단백질(예를 들어, DsRed, Tomato, Kusabira Orange, mOrange, mTangerine, TagRFP), 청록색 형광 단백질(예를 들어, CFP, mTFP1, Cerulean, CyPet, AmCyan1), 청색 형광 단백질(예를 들어, Azurite, mtagBFP2, EBFP, EBFP2, Y66H), 근적외선 형광 단백질(예를 들어, iRFP670, iRFP682, iRFP702, iRFP713 및 iRFP720), 적외선 형광 단백질(예를 들어, IFP1.4) 및 광활성 형광 단백질(예를 들어, Kaede, Eos, IrisFP, PS-CFP)을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0098] 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트는, 예를 들어 표적 단백질의 확인 및/또는 정제를 용이하게 하기 위해 태그를 포함할 수 있다. 본 발명의 방법에 사용하기 위한 태그로는 키틴 결합 단백질(CBP), 말토오스 결합 단백질(MBP), 글루타티온-S-트랜스페라아제(GST), 폴리(His), 비오틴/스트렙타비딘, V5-태그, Myc-태그, HA-태그, NE-태그, His-태그, 플래그 태그, 할로 태그, 스냅 태그, Fc-태그, Nus-태그, BCCP, 티오레독신, 스눅 태그, 스파이 태그, 이소캡 태그, SBP-태그, S-태그, 아비 태그, 칼모듈린, 또는 단백질을 태깅하는 방법에 사용하기에 적절한 서열의 임의의 조합을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 표적 단백질 및 연관 태그는 폴리펩티드를 정제하기 위해, 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법을 이용해 표적 세포 또는 표적 세포 배양 배지로부터 정제될 수 있다. 이 같은 방법의 예로는 염 분획법(salt fractionation), 고압 액체 크로마토그래피, 항체 칼럼 크

로마토그래피, 친화도 태그 칼럼 크로마토그래피 및 아크릴아미드 겔 전기영동을 들 수 있다. 이 같은 방법은 당해 기술분야에 잘 알려져 있다.

[0099] 선택 마커 서열은 삽입 카세트가 적절히 삽입되어 있지 않은 표적 세포를 제거하기 위해 사용될 수 있거나, HDR 벡터로 적절히 형질 감염되어 있지 않은 숙주 세포를 제거하기 위해 사용될 수 있다. 선택 마커 서열은 양성 선택 마커 리포터 마커 또는 음성 선택 마커일 수 있다. 양성 선택 마커는 마커의 유전자 산물이 발현되는 세포에 대한 선택을 가능하게 한다. 이는 일반적으로 양성 선택 마커의 발현을 위해 세포를 살해하거나 도태시키는 선택을 하는 적절한 약제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 적절한 양성 및 음성 선택 마커에 대해서는 미국 특허 제5,464,764호의 표 I을 참고한다.

[0100] 또한 선택 마커의 예로는 항생제와 같은 화합물에 내성을 부여하는 단백질, 선택된 기질 상에서 성장하는 능력을 부여하는 단백질, 발광과 같은 검출 가능한 신호를 생성하는 단백질, 촉매 RNA 및 안티센스 RNA를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 제오신TM 내성 마커, 블라스티시딘 내성 마커, 네오마이신 내성(neo) 마커 (문헌[Southern & Berg, J. Mol. Appl. Genet. 1: 327~41 (1982)]), 퓨로마이신(puro) 내성 마커; 하이그로마이신 내성(hyg) 마커(문헌[Te Riele et al., Nature 348: 649~651 (1990)]), 티미딘 키나아제(tk), 하이포크산틴 포스포리보실트랜스페라아제(hprt), 및 MAX(마이코페놀산, 아데닌 및 크산틴) 배지 상에서의 성장을 가능하게 하는 박테리아 구아닌/크산틴 포스포리보실트랜스페라아제(gpt)를 포함하는 매우 다양한 이 같은 마커가 알려져 있으며, 이용 가능하다. 문헌[Song et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 84: 6820~6824 (1987)]을 참고한다. 기타 선택 마커로는 히스티디놀-테하이드로게나아제, 클로람페니콜-아세틸 트랜스페라아제(CAT), 디하이드로폴레이트 리덕타아제(DHFR), β -갈락토실트랜스페라아제 및 형광 단백질(예를 들어, GFP)을 들 수 있다.

[0101] 형광 단백질의 발현은 형광 활성화 세포 분류기(FACS)를 이용하여 검출될 수 있다. 또한 β -갈락토실트랜스페라아제의 발현은 β -갈락토시다아제에 대한 적절한 기질로 살아있는 세포를 염색하는 것과 결부된 FACS에 의해 분류될 수 있다. 또한 선택 마커는, 정상적으로는 마우스 배아 줄기세포, 소형 돼지 배아 줄기세포 및 마우스, 돼지 및 인간 조형 줄기세포에 의해 발현되지 않는 인테그린(integrin)과 같은 세포-기질 부착 분자일 수 있다. 표적 세포 선택 마커는 포유류 기원일 수 있으며, 티미딘 키나아제, 아미노글리코사이드 포스포트랜스페라아제, 아스파라긴 합성효소, 아데노신 데아미나아제 또는 메탈로티오닌일 수 있다. 세포 선택 마커는 G418, 하이그로마이신 및 퓨로마이신에 대해 각각 내성을 부여하는 네오마이신 포스포트랜스페라아제, 하이그로마이신 포스포트랜스페라아제 또는 퓨로마이신 포스포트랜스페라아제일 수도 있다.

[0102] 적절한 원핵성 및/또는 박테리아성 선택 마커로는 카나마이신, 테트라사이클린 및 암피실린과 같은 항생제에 내성을 제공하는 단백질을 들 수 있다. 하나의 실시형태에서, 박테리아성 선택 마커로는 원핵 숙주 세포 및 포유류 표적 세포 둘 모두에 대해 선택 가능한 형질을 부여할 수 있는 단백질을 들 수 있다.

[0103] 음성 선택 마커는 마커의 유전자 산물이 발현되는 세포를 도태시키는 선택을 가능하게 한다. 일부 실시형태에서, 적절한 약제가 존재하면 "음성 선택 마커"를 발현하는 세포가 살해되거나, 선택에서 도태된다. 대안적으로, 음성 선택 마커 발현만으로도 상기 세포는 살해되거나 선택에서 도태된다.

[0104] 이 같은 음성 선택 마커로는 세포 내에서의 발현 시에 세포의 음성 선택을 허용하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 들 수 있다. 적절한 음성 선택 마커의 예로는 (i) 뉴클레오사이드 유사체인 아시클로비르(acyclovir), 간시클로비르(gancyclovir) 및 5-플루오로요도아미노-우라실(FIAU) 중 임의의 것의 존재 하에 음성 선택을 위한 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나아제 (HSV-TK) 마커, (ii) 디프테리아 독소, 파상풍 독소, 콜레라 독소 및 백일해 독소와 같은 다양한 독소 단백질, (iii) 6-티오구아닌의 존재 하에 음성 선택을 위한 히포크산틴-구아닌 포스포리보실 트랜스페라아제(HPRT), (iv) bc12-결합 단백질(BAX)과 같은 세포자멸 또는 프로그래밍된 세포 사멸의 활성인자, (v) 대장균의 시티딘 데아미나아제(codA) 유전자, 및 (vi) 포스포티딜 콜린 포스포리파아제 D가 있다. 하나의 실시형태에서, 음성 선택 마커는 숙주 유전자형의 변형(예를 들어, *ccdB*, *tolC*, *thyA*, *rpsL* 및 티미딘 키나아제)을 요구한다.

[0105] 본 발명에 따르면, 선택 마커는 대개 세포 선택이 수행되는 세포의 유형에 따라 선택된다. 예를 들어, 이는 진핵성(예를 들어, 효모), 원핵성(예를 들어, 박테리아성) 또는 바이러스성일 수 있다. 이 같은 실시형태에서, 선택 마커 서열은 해당 세포 유형에 적절한 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0106] 다른 실시형태에서, 하나 이상의 선택 마커가 사용된다. 이 같은 실시형태에서, 선택 마커는 적어도 하나의 선택 마커가 하나 이상의 표적 또는 숙주 세포에 적합한 곳에 도입될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 숙주 세포

선택 마커 서열 및 표적 세포 선택 마커 서열은 동일한 개방 해독 프레임 내에 있고, 단일 단백질로서 발현된다. 예를 들어, 숙주 세포 및 표적 세포 선택 마커 서열은 원핵세포 및 진핵세포 둘 모두에 있어서 블라스티시딘에 대한 내성을 부여하는 블라스티시딘 S 테아미나아제와 같은 동일한 단백질을 암호화할 수 있다. 숙주 세포 및 표적 세포 마커 서열은 또한 융합 단백질로서 발현될 수 있다. 다른 실시형태에서, 숙주 세포 및 표적 세포 선택 마커 서열은 별도의 단백질로서 발현될 수 있다.

[0107] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 삽입 카세트에 의해 암호화된 내생성 유전자, 선택 가능한 마커 또는 리포터의 발현은 유전체 내로의 카세트의 통합 이후에 내생성 프로모터로부터 구동될 수 있다. 대안적이거나 부가적으로, 마커 또는 리포터의 발현은 마커 또는 리포터 서열과 함께 유전체 내로 통합되는, HDR 벡터의 삽입 카세트 내에 포함된 프로모터로부터 구동될 수 있다. 특정한 실시형태에서, 이러한 프로모터는 마커 또는 리포터 유전자에 대해 높은 수준의 필수적인 발현을 구동하며, 그 결과 HDR 이벤트(event)를 경험하였던 세포의 선택 또는 확인이 용이하다. 이 같은 프로모터의 일례로는 EF-1 알파 프로모터가 있다. 기타 실시형태에서, 프로모터는 유도성일 수 있으며, 특정 조건이 충족되는 경우에만 발현을 구동한다.

[0108] 프로모터는 숙주 또는 표적 세포의 유형 또는 외생성 유전자의 목적하는 발현 수준에 기초하여 선택될 수 있다. 적절한 프로모터로는 유비퀴틴 프로모터, 단순 헤르페스 티미딘 키나아제 프로모터, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터/인핸서, EF-1 알파 프로모터, SV40 프로모터, β -액틴 프로모터, 면역 글로불린 프로모터, 조절 가능한 프로모터(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터), 아데노바이러스 후기 프로모터 및 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 또한 프로모터 서열은 조직-특이적 전사를 제공하기 위해 선택될 수 있다.

[0109] 특정한 실시형태에서, IRES 서열은 하류 유전자의 번역을 개선하기 위해 삽입 카세트 내에 포함될 수 있다. 하나의 실시형태에서, IRES는 외생성 유전자의 서열, 표적 세포 선택 마커 서열 또는 리포터 마커 서열의 번역을 개선시킬 수 있다. IRES 부위는 삽입 카세트 내에 위치할 수 있고, 면역 글로불린 중쇄 결합 단백질의 내부 리보솜 결합 부위와 같은 포유류 내부 리보솜 진입 부위일 수 있다. 하나의 실시형태에서, IRES 서열은 뇌심근염(encephalomyocarditis) 바이러스, 폴리오바이러스, 피코나바이러스, 피코나-연관 바이러스 및 간염 A 및 C로부터 선택된다. 적절한 IRES 서열의 예는 미국 특허 제4,937,190호, 유럽 특허 출원 제585983호 및 PCT 출원 제W09611211호, 제W09601324호 및 제W09424301호에서 각각 찾아볼 수 있다.

[0110] 하나의 실시형태에서, HDR 공여체 벡터는 소위 "코자크(Kozak) 서열"(문헌[Kozak, J. Cell Biol. 108: 229~41 (1989)]) 또는 "샤인-달가노(Shine-Dalgarno)" 서열과 같은 번역 개시 서열 또는 인핸서를 포함한다. 이들 서열은 삽입 카세트 내에서 IRES 부위에 대해 3'이면서 내생성 유전자의 서열, 리포터 마커 서열 또는 선택 마커 서열에 대해서는 5'에 위치할 수 있다.

[0111] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 삽입 카세트는 하나 이상의 mRNA 안정화 서열을 포함한다. mRNA 안정화 서열은 해독 프레임이 유지되도록 서열에 융합되어 있고 표적 유전자를 암호화하는 mRNA 분자의 반감기를 변경할 수 있다. 하나의 실시형태에서, mRNA 안정화 서열은 연결된 mRNA의 반감기를 증가시키는 폴리뉴클레오티드 서열이다. 하나의 실시형태에서, mRNA 안정화 서열은 연결된 mRNA의 반감기를 감소시키는 폴리뉴클레오티드 서열이다. 하나의 실시형태에서, mRNA 안정화 서열은 세포질 내에서 효소 분해로부터 mRNA 분자를 보호하는 폴리(A) 테일(poly(A) tail)이다. 하나의 실시형태에서, mRNA 안정화 서열은 MALAT1 3' 안정화 서열이다.

[0112] 하나의 실시형태에서, HDR 공여체 벡터는 전사 종결 서열을 포함한다. 전형적인 전사 종결 서열로는 폴리아데닐화 부위(폴리(A) 부위)를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 폴리(A) 부위는 SV40 폴리(A) 부위이다. 이들 서열은 삽입 카세트 내에서 내생성 유전자의 서열, 리포터 마커 서열 또는 선택 마커 서열에 대해 3'에 위치할 수 있다.

[0113] 하나의 실시형태에서, HDR 공여체 벡터는, 내생성 유전자의 서열, 리포터 마커 서열 또는 선택 마커 서열이 폴리펩티드를 암호화하는 경우에 이들 서열의 번역이 정지 코돈(들)에서 종결되도록 이들 서열의 3' 말단에 있는 하나 이상의 해독 프레임 내에 하나 이상의 종결/정지 코돈(들)을 포함한다.

[0114] 리콤비나아제 인식 부위는 DNA 서열의 삽입, 역위(inversion) 또는 치환을 위해 사용될 수 있거나, 역위, 결실 및 전좌(translocation)와 같은 염색체 재배열을 유발하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 삽입 벡터 내의 2개의 리콤비나아제 인식 부위는 리콤비나아제와 접촉할 때, 이들 2개의 리콤비나아제 인식 부위 사이의 서열의 제거 또는 치환을 허용하도록 동일한 배향일 수 있다. 2개의 리콤비나아제 인식 부위는 또한 리콤비나아제와 접촉할 때, 이들 2개의 부위 사이의 서열이 역위되도록 반대 배향으로 포함될 수도 있다. 이 같은 역위는 삽입 카

세트 또는 이의 일부의 기능을 조절하기 위해 사용될 수 있다. 따라서 구조체의 배향을 바꾸면 구조체의 효과를 켜거나 끌 수 있다. 예를 들어, 2개의 리코비나아제 인식 부위는 선택 마커 서열 측면에 있을 수 있으며, 이는 선택 마커 서열의 제거 또는 불활성화를 허용한다. 적절한 리코비나아제 인식 부위의 예로는 flp 및 cre 리코비나아제에 의해 각각 인식될 수 있는 frt 부위 및 lox 부위를 들 수 있다.

[0115] 하나의 실시형태에서, HDR 공여체 벡터는 적절한 숙주 세포에서 DNA 합성을 개시할 수 있는 복제 기원을 포함한다. 바람직하게는, 복제 기원은 숙주 세포의 유형에 기초하여 선택된다. 예를 들어, 이는 진핵성(예를 들어, 효모) 또는 원핵성(예를 들어, 박테리아성)일 수 있으며, 적절한 바이러스성 복제 기원이 사용될 수 있다. 바람직하게는, 복제 기원은 숙주 세포에서 DNA 합성을 개시할 수 있지만, 표적 세포에서는 기능을 하지 못한다.

[0116] 상기 기능 요소 모두는 적절한 HDR 공여체 벡터를 생성하기 위해 임의의 조합으로 사용될 수 있다.

[0117] HDR 벡터

[0118] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 HDR 벡터는 하나의 말단 또는 두 말단 모두에 내생성 핵산 서열(들)이 측면에 있는 삽입 카세트를 포함한다. 내생성 핵산 서열(들)은 HDR 벡터 서열이 목적하는 DNA 서열과 재조합되도록 한다. 재조합 이벤트에 의해 표적 DNA 내로 삽입 카세트의 핵산 서열이 통합되게 된다. 하나의 실시형태에서, 표적 DNA는 표적 세포의 유전체 DNA이며, 따라서 삽입 카세트는 표적 세포의 유전체 내로 통합된다.

[0119] 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트를 포함하는 핵산 서열은 표적 세포의 유전체 영역에 대해 상동성을 갖는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 서열, 또는 재조합 암으로부터 하류에 있다. 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트는 적어도 하나의 재조합 암으로부터 상류에 있다. 하나의 실시형태에서, 삽입 카세트의 측면에는 2개의 재조합 암이 있다.

[0120] 하나의 예시적인 실시형태에서, HDR 벡터는 제1 재조합 암, 삽입 카세트 및 제2 재조합 암을 5'에서 3'의 순서로 포함하고, 삽입 카세트는 리포터 마커 서열 및 세포 선택 마커 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 리포터 마커 서열 및 세포 선택 마커 서열은 P2A 융합 서열을 암호화하는 핵산 서열과 연결된다. 따라서, 하나의 실시형태에서 HDR 벡터는 제1 재조합 암, 리포터 마커 서열, P2A 융합 서열, 세포 선택 마커 서열 및 제2 재조합 암을 5'에서 3'의 순서로 포함한다. 이 같은 실시형태는, 예를 들어 내생성 유전자의 C-말단에 마커 또는 태그를 삽입하기 위해 사용될 수 있다.

[0121] 다른 예시적인 실시형태에서, HDR 벡터는 제1 재조합 암, 삽입 카세트 및 제2 재조합 암을 5'에서 3'의 순서로 포함하고, 삽입 카세트는 세포 선택 마커 서열 및 리포터 마커 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 세포 선택 마커 서열 및 리포터 마커 서열은 P2A 융합 서열을 암호화하는 핵산 서열과 연결된다. 따라서, 하나의 실시형태에서 HDR 벡터는 제1 재조합 암, 세포 선택 마커 서열, P2A 융합 서열, 리포터 마커 서열 및 제2 재조합 암을 5'에서 3'의 순서로 포함한다. 이 같은 실시형태는, 예를 들어 내생성 유전자의 N-말단에 마커 또는 태그를 삽입하기 위해 사용될 수 있다.

[0122] 또 다른 예시적인 실시형태에서, HDR 벡터는 제1 재조합 암, 삽입 카세트 및 제2 재조합 암을 5'에서 3'의 순서로 포함하고, 삽입 카세트는 리포터 마커 서열, 프로모터 서열 및 세포 선택 마커 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 리포터 마커 서열 및 세포 선택 마커 서열은 프로모터 서열을 암호화하는 핵산 서열과 연결된다. 따라서, 하나의 실시형태에서 HDR 벡터는 제1 재조합 암, 리포터 마커 서열, 프로모터 서열, 세포 선택 마커 서열 및 제2 재조합 암을 5'에서 3'의 순서로 포함한다.

[0123] 다양한 실시형태에서, HDR 벡터의 삽입 카세트는, 상기에서 상세하게 설명한 바와 같이, 외생성 유전자의 서열, 리포터 마커 서열, 세포 선택 마커 서열, mRNA 안정화 서열, 종결 서열, IRES, 프로모터 서열, 번역 개시 서열, 리코비나아제 인식 부위 및 기타 기능 요소의 임의의 조합을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0124] 다양한 실시형태에서, 재조합 암은 적어도 약 25 bp, 적어도 25 bp 내지 50 bp, 적어도 50 bp 내지 100 bp, 적어도 100 bp 내지 300 bp, 적어도 300 bp 내지 1,000 bp, 적어도 1,000 bp 내지 2,000 bp, 적어도 2,000 bp 내지 5,000 bp, 적어도 5,000 bp 내지 7,000 bp, 또는 7,000 bp 이상일 수 있다. 다양한 실시형태에서, 재조합 암은 표적 핵산 서열에 대해 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 하나의 실시형태에서, 표적 핵산 서열은 유전체 DNA 서열이다. 본 발명은 재조합 암이 표적화하는 유전체 위치와 관련하여 제한되지 않는다. 즉, 재조합 암은 엑손 서열, 인트론 서열, 유전자간 서열, 3' UTR 서열, 5' UTR 서열, 프로모터 서열, 염색체 서열 또는 염색체의 서열(extrachromosomal sequence)에 대해 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 98% 이상 또는 100%의 서열 동일성을

가질 수 있다.

[0125] 하나의 실시형태에서, HDR 벡터는 삽입 카세트의 측면에 있는 2개의 재조합 암을 갖는다. 하나의 실시형태에서, 2개의 재조합 암은 서로에 대해 인접한 서열을 표적화할 수 있다. 2개의 재조합 암에 의해 표적화되는 유전체 서열은 삽입 카세트의 통합 이전에, 표적 세포의 유전체 내에서 비연속성 또는 연속성일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 2개의 뉴클레오티드 서열은, 하나의 뉴클레오티드 서열의 3' 말단이 어떠한 뉴클레오티드 잔기의 개입도 없이, 기타 뉴클레오티드 서열의 5' 말단에 공유 결합되는 경우에 연속성이다. 하나의 실시형태에서, 2개의 재조합 암은 10 kb 미만, 9 kb 미만, 8 kb 미만, 7 kb 미만, 6 kb 미만, 5 kb 미만, 4 kb 미만, 3 kb 미만, 2 kb 미만 또는 1 kb 미만으로 이격되어 있는 유전체 서열을 표적화한다. 하나의 실시형태에서, 2개의 재조합 암은 10 kb 이상, 9 kb 이상, 8 kb 이상, 7 kb 이상, 6 kb 이상, 5 kb 이상, 4 kb 이상, 3 kb 이상, 2 kb 이상 또는 1 kb 이상으로 이격되어 있는 유전체 서열을 표적화한다.

[0126] HDR 벡터는 다양한 방식으로 제조될 수 있다. 예를 들어, 제1 및 제2 재조합 암은 인간 또는 기타 종에 대한 이용 가능한 유전체 데이터베이스 또는 유전자 발현 데이터베이스로부터 획득될 수 있다. 당해 기술분야에서 인지되는 바와 같은 방법을 이용하여, 2개의 서열을 제한 효소 절단 부위를 포함하도록 설계된 프라이머로 증폭하고, 제한 효소로 절단한 후, 절단된 HDR 공여체 벡터에 연결한다. 하나의 실시형태에서, 2개의 재조합 암을 절단된 HDR 공여체 벡터와 연결하여 김슨 조립 방법(문헌[Gibson *et al.*, Nat Methods, 2009, 6: 343~345])을 이용하여 HDR 벡터를 생성한다. 하나의 실시형태에서, 김슨 조립 방법을 이용하여 생성된 HDR 벡터는 선형이며, 선형화된 산물은 (1) 제1 재조합 암; (2) 리포터 마커, 선택 마커 또는 이들의 조합을 갖는 삽입 카세트; 및 (3) 제2 재조합 암을 포함한다. 이러한 선형화된 산물은 본 발명의 바람직한 HDR 벡터이다.

[0127] 세포

[0128] 본 발명의 HDR 벡터는 임의의 유형의 표적 세포의 유전체 내에서 유전자를 태깅, 녹인 또는 녹아웃하기 위해 사용될 수 있다. HDR 벡터는, 전기천공, 바이러스 감염, 레트로트랜스포지션(retrotransposition), 미세주사, 리포펙션(lipofection), 리포솜 매개 형질 감염, 인산칼슘 침전, DEAE-텍스트란 및 탄도 또는 "유전자건(gene gun)" 침투를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 당해 기술분야에 인지되는 바와 같은 임의의 방법에 의해 표적 세포 내로 도입될 수 있다.

[0129] 특별한 화학 물질 또는 구조체는 재조합 수준을 증가시키고, 따라서 삽입 카세트의 통합을 조장하기 위해 제공될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 이 같은 구조체는 HDR 벡터의 하나 이상의 재조합 암의 표적 서열에 또는 표적 서열 부근에 닉(nick; 이중가닥 DNA 분자의 하나의 가닥의 절단) 또는 절단부(이중가닥 DNA 분자의 2개의 가닥 모두 절단)를 제공할 수 있다. 따라서, 하나의 실시형태에서 본 발명의 HDR 벡터는 TALENS, 징크 핑거 엔도뉴클레아제, CRISPR를 암호화하는 하나 이상의 구조체, 또는 HDR 벡터의 하나 이상의 재조합 암의 표적 서열 부근에 닉 또는 절단부를 생성하는 다른 방법과 함께 제공될 수 있다.

[0130] 하나의 실시형태에서, 표적 세포는 원핵세포이다. 하나의 실시형태에서, 표적 세포는 진핵세포이다. 하나의 실시형태에서, 표적 세포는 쥐 또는 인간 세포와 같은 포유류 세포이다. 표적 세포는 체세포 또는 생식세포일 수 있다. 생식세포는 쥐 배아 줄기세포를 포함하여 배아 줄기세포(ES 세포)와 같은 줄기세포일 수 있다. 표적 세포는 신경세포와 같은 비분열 세포일 수 있거나, 대안적으로 표적 세포는 특정 배양 조건 하에 시험관 내에서 증식할 수 있다.

[0131] 표적 세포는 시판 중인 포유류 세포주로부터 선택될 수 있다. 표적 세포는 개체로부터 단리된 일차 세포일 수 있다. 표적 세포는, 생물학적 또는 생화학적 검정을 이용하여 확인될 수 있는 비정상적인 표현형을 갖는 세포를 포함하여 임의의 유형의 질병 세포일 수 있다. 예를 들어, 질병 세포는 종양 세포일 수 있다.

[0132] 하나의 실시형태에서, HDR 벡터의 삽입 서열 내의 리포터 서열은 표적 세포의 유전체 DNA 내의 적어도 하나의 유전자의 적어도 하나의 대립유전자로부터 하류에 프레임 내에 통합되며, 그 결과 유전자를 태깅하는 역할을 한다. 구조체의 삽입에 의해 태깅되는 단일 유전자를 갖는 세포는 1회 태깅된다. 다수의 구조체의 삽입에 의해 태깅되는 다수의 유전자를 갖는 세포는 수회 태깅된다. 하나의 실시형태에서, 본 발명은 1회 또는 수회 태깅된 세포의 라이브러리에 관한 것이다.

[0133] 라이브러리

[0134] 본원에서 제공되는 정보에 기초하여, 수 많은 폴리뉴클레오티드 및 세포 라이브러리가 생성될 수 있다. 이들 라이브러리는 (i) HDR 공여체 벡터, (ii) HDR 벡터, (iii) 단일 태깅된 유전자를 갖는 세포, (iv) 유전자 내에 삽입 카세트를 통합함으로써 생성된 단일 유전자 녹아웃 세포, (v) 세포의 유전체 내에 외생 유전자 발현용

삽입 카세트를 통합함으로써 생성된 단일 유전자 녹인 세포, (vi) 다수의 태깅된 유전자를 갖는 세포, (vii) 다수의 유전자 내에 다수의 삽입 카세트를 통합함으로써 생성된 다중 유전자 녹아웃 세포, 및 (viii) 세포의 유전체 내에 다수의 외생 유전자 발현용 삽입 카세트를 통합함으로써, 생성된 다중 유전자 녹인 세포의 라이브러리를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0135] 하나의 실시형태에서, HDR 벡터 라이브러리는 유전체 데이터베이스 또는 유전자 발현 데이터베이스 내의 정보를 이용하여 구성될 수 있다. 예를 들어, 유전체 데이터베이스 또는 유전자 발현 데이터베이스 내의 각각의 유전자를 확인할 수 있으며, 이어서 유전자와 관련된 HDR 벡터를 제조할 수 있다. 하나의 실시형태에서, HDR 벡터 라이브러리는 유전자를 태깅하기 위한 벡터를 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, HDR 벡터 라이브러리는 녹인 세포를 생성하기 위한 벡터를 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, HDR 벡터 라이브러리는 녹아웃 세포를 생성하기 위한 벡터를 포함할 수 있다. 이렇게 제조된 HDR 벡터는 유전체 데이터베이스 또는 유전자 발현 데이터베이스에서 유전자의 전체 세트 또는 이의 임의의 하위세트를 나타내는 벡터 라이브러리를 구성한다. 표적 세포 선택 마커 서열, 리포터 마커 서열 또는 이들의 조합이 각각의 HDR 벡터 내에 포함될 수 있다.

[0136] 예를 들어, 본 발명의 세포 라이브러리는 적어도 2개 이상의 세포를 포함할 수 있다. 세포 라이브러리는 5개 내지 10개의 세포, 10개 내지 20개의 세포, 20개 내지 30개의 세포, 30개 내지 40개의 세포, 40개 내지 50개의 세포, 50개 내지 100개의 세포, 100개 내지 500개의 세포, 500개 내지 1,000개의 세포, 1,000개 내지 5,000개의 세포, 5,000개 내지 10,000개의 세포, 10,000개 내지 20,000개의 세포, 20,000개 내지 50,000개의 세포 또는 50,000 이상의 세포를 포함할 수 있다.

[0137] 예를 들어, 세포 라이브러리는 1개 내지 25개 사이의 임의의 개수의 태깅, 발현, 변형 또는 파괴된 유전자, 적어도 약 25개의 상이한 유전자, 또는 적어도 약 50개의 상이한 유전자, 바람직하게는 적어도 약 100개의 상이한 유전자, 보다 바람직하게는 1,000개의 상이한 유전자, 매우 바람직하게는 5,000개의 상이한 유전자, 가장 바람직하게는 10,000개의 상이한 유전자, 예를 들어 적어도 20,000개의 상이한 유전자를 나타낼 수 있다. 예를 들어, 세포 라이브러리는 적어도 약 40,000개의 유전자 또는 적어도 약 75,000개의 상이한 유전자를 나타낼 수 있다. 이들 대표된 유전자 각각은 세포 라이브러리 내의 세포에 상응하고, 유전자의 적어도 하나의 대립유전자는 삽입 카세트에 의해 상응하는 세포 내에서 태깅, 발현, 변형 또는 파괴되며, 유리하게는 유전자의 하나 이상의 대립유전자는 태깅, 발현, 변형 또는 파괴된다. 하나의 실시형태에서, 세포 라이브러리는 단일 모세포의 클론으로 이루어져 있다. 세포 라이브러리 내의 태깅, 발현, 변형 또는 파괴된 유전자의 개수는 모세포의 유전체 내에 존재하는 유전자의 최대 개수에 이를 수 있다.

[0138] 세포 라이브러리는 본질적으로 개별 액체 저장액 내에 유지되거나, 혼합된 단일 액체 저장액으로서 성장시킨 세포의 수집물일 수 있다. 따라서, 세포 라이브러리는 세포 배양물의 수집물일 수 있으며, 이때 세포 배양물 각각은 본 발명의 방법에 의해 태깅, 변형 또는 파괴된 대립유전자를 포함하는 세포를 나타낸다. 이와 관련하여, 본 발명의 구조체에 의해 태깅, 변형 또는 파괴된 대립유전자를 포함하는 세포 라이브러리는 또한 배양 접시 내의 성장 배지 상에서 단리된 세포 콜로니를 포함할 수 있다. 예를 들어, 배양 접시 상의 각각의 콜로니가 포함하는 태깅, 발현, 변형 또는 파괴된 유전자는 동일한 배양 접시에 보관된 기타 콜로니에서 태깅, 발현, 변형 또는 파괴된 유전자와 동일한 것일 수 있다.

[0139] 하나의 실시형태에서, 세포 라이브러리는 하나의 액체 저장 용액 내의 세포 배양물의 혼합물을 포함할 수 있다. 세포 배양물은 라이브러리 중의 다른 세포 배양물과 동일하거나 상이한, 태깅, 발현, 변형 또는 파괴된 유전자를 포함할 수 있다. 따라서, 하나의 실시형태에서 세포 라이브러리 중의 소정의 세포 내의 태깅, 발현, 변형 또는 파괴된 유전자는 라이브러리의 임의의 기타 세포 내의 태깅, 발현, 변형 또는 파괴된 유전자와는 상이하다. 본 실시형태의 세포 라이브러리는 다른 세포 라이브러리의 일부 또는 하위세트일 수 있다.

[0140] 하나의 실시형태에서, 세포 라이브러리는 각각이 동일한 태깅, 변형 또는 파괴된 유전자를 포함하는 세포를 포함할 수 있다. 이 경우, 삽입 카세트의 기능(예를 들어, 전장 단백질의 발현 대 단백질 단편의 발현)은 각각의 세포에 있어서 서로 동일하거나 상이할 수 있다.

[0141] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 세포 라이브러리는 복수의 표적 세포 내로 HDR 벡터의 라이브러리를 도입함으로써 제조될 수 있다. 표적 세포 선택 마커 서열을 포함하는 이들 HDR 벡터는 표적 세포의 유전체 내에 삽입되어, 유전체 내의 다양한 유전자를 태깅, 발현 또는 파괴할 수 있다. 변형된 세포는 표적 세포 선택 마커 서열에 의해 부여되는 선택 가능한 형질로 인해 선택될 수 있다.

[0142] 하나의 실시형태에서, 초기 계대 마우스 ES 세포와 같은 마우스 ES 세포는 본 발명의 세포 라이브러리를 구성하

기 위해 사용된다. 이렇게 제조된 세포 라이브러리는 마우스 유전체의 포괄적인 연구를 위한 유전자 도구가 된다. ES 세포가 배반포(blastocyst)에 다시 주사되고, 정상적으로 발달하여 궁극적으로는 생식 계통 내로 포함될 수 있기 때문에, 라이브러리 내의 돌연변이된 ES 세포는 돌연변이 형질 전환 마우스 군주의 수집물을 효과적으로 나타낸다. 돌연변이 형질 전환 마우스 군주의 얻어진 표현형이 신속하게 확인되고 특성 분석될 수 있으며, 그 결과 파괴된 유전자의 기능이 신속하게 확인되고 특성 분석될 수 있다. 얻어진 형질 전환 마우스는 또한 기타 마우스 군주와 번식되고, 역교배되어 상이한 유전적 배경에서 표적 유전자의 평가를 가능케 하는 유사 유전자형 또는 재조합 유사 유전자형 동물을 생성할 수 있다. 본 발명의 상기 양태(ES 세포 라이브러리를 포함함)를 실시하기 위해 사용될 수 있는 다양한 군주 및 유전자 조작의 대표적인 목록은 문헌[Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse, 3rd Ed., Vols. 1 and 2, Oxford University Press, New York, 1996]에서 찾아볼 수 있다.

[0143] 유사한 방법을 사용하여 사실상 어떤 비인간 형질 전환 또는 녹아웃 동물이라도 구성할 수 있다. 이들 비인간 형질 전환 또는 녹아웃 동물로는 돼지, 래트, 토끼, 소, 염소, 비인간 영장류(예를 들어, 침팬지) 및 기타 중, 특히 포유류 종을 들 수 있다.

[0144] 본 발명에 설명된 임의의 HDR 벡터는, 앞서 설명한 바와 같이 세포, 세포 라이브러리 또는 형질 전환 또는 녹아웃 동물을 만들기 위해 이용될 수 있다.

[0145] 방법

[0146] 본 발명은 세포 내에서 단백질을 태깅하거나 융합 단백질을 생성하기 위한 방법을 제공한다. 일반적으로, 방법은 (a) 본 발명의 HDR 벡터를 세포 내로 삽입하는 단계로서, HDR 벡터는 리포터 마커, 표적 세포 선택 마커 서열 또는 이들 둘 모두를 포함하는 삽입 카세트에 포함하는 단계; 및 (b) 세포를 HDR 벡터의 삽입 카세트에 의해 암호화된 세포 선택 마커의 선택을 위한 조건 하에 두거나, 리포터 마커 서열의 발현을 모니터링하는 단계를 포함한다.

[0147] 하나의 실시형태에서, HDR 벡터의 재조합 암은 상동성 유전체 영역과 혼성화하고, HDR 벡터의 재조합 암과 유전체 사이의 재조합은 표적 세포의 유전체 내로의 HDR 벡터의 삽입 카세트의 통합을 허용한다. 하나의 바람직한 실시형태에서, 리포터 마커, 표적 세포 선택 마커 서열 또는 이들 둘 모두를 포함하는 삽입 카세트는 해독 프레임이 파괴되지 않는 방식으로 개방 해독 프레임의 하류에 통합되어(프레임 내 통합), 태깅된 단백질 또는 융합 단백질을 생성하게 한다.

[0148] 하나의 실시형태에서, 방법은 표적 세포 내로 DNA 뉴클레아제를 삽입하는 단계를 추가로 포함한다. 하나의 실시형태에서, 뉴클레아제는 HDR 벡터의 재조합 암들 중 하나 이상의 상동성 유전체 서열에 또는 그 부근에 Nick 또는 절단부를 생성하는데 특이적이다. 뉴클레아제는 메가뉴클레아제(meganuclease), Cas-9 뉴클레아제, TALEN, ZFN, 또는 유전체 편집 방법에 유용한 다른 뉴클레아제일 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0149] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 방법을 통해 유전자의 하나의 대립유전자가 변형된다. 다른 실시형태에서, 본 발명의 방법을 통해 세포 내의 동일한 유전자의 모든 대립유전자가 변형된다.

[0150] 본 발명은, 유전자의 발현이 파괴되도록 내생성 유전자 내에 삽입 카세트를 도입함으로써 세포, 식물 또는 동물에서 내생성 유전자의 발현을 감소시키는 방법을 제공한다. 따라서, 본 발명은 전사체를 생성할 수 없거나 유전자 산물을 발현할 수 없는 "녹아웃" 세포를 생성하기 위한 효율적이고 정확한 방식을 제공한다. 이렇게 제조된 표적 세포는 불활성화된 유전자의 치료 또는 진단 효용성을 평가하는데 유용하며, 유전자의 발현 및 기능에 영향을 미치는 화합물을 스크리닝하는데 유용하다.

[0151] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 방법은 표적 유전자에 의해 발현이 조절(예를 들어, 활성화 또는 억제)되는 유전자의 발현을 간접적으로 조정하기 위해 사용될 수 있다. 조절된 유전자에 미치는 표적 유전자의 효과는 정상적일 수 있거나, 이는 질병 상태에 의해 유도되는 비정상적인 불균형의 결과일 수 있다.

[0152] 또한 본 발명은 세포, 식물, 또는 동물에서 외생성 유전자 또는 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 이식 유전자)을 발현하는 방법을 제공한다. 따라서, 하나의 실시형태에서 본 발명은 세포 내에서 유전자를 발현하기 위한 녹인 방법을 제공한다. 외생성 서열은 삽입 카세트 상에 있으며, 세포, 식물, 또는 동물 내로 통합될 수 있다. 하나의 실시형태에서, 외생성 유전자를 포함하는 삽입 카세트가 통합되는 부위는 유전자 사이이다. 세포 내에서의 외생성 유전자의 전사는 외생성 프로모터 또는 내생성 프로모터에 의해 조절될 수 있다. 따라서, 하나의 실시형태에서 외생성 유전자를 포함하는 삽입 카세트는 프로모터 서열을 추가로 포함할 수 있다. 특정한 실시형태에서, 외생성 유전자의 발현을 구동하는 프로모터는 상기 방법을 포함하여 임의의 이용 가능한 방법에 의

해 조건부로 제어된다. 본 발명의 일부 실시형태에서, 외생성 유전자는 태그, 리포터 마커, 선택 마커, 또는 앞서 설명한 바와 같은 기능 요소의 임의의 조합에 작동 가능하게 연결될 수 있다.

[0153] 다양한 외생성 유전자는 세포, 식물 또는 동물 내에 도입되고, 본 발명의 방법에 따라 조절될 수 있다. 예를 들어, 질병 또는 질환과 연관이 있는 유전자는 세포 내로 도입될 수 있다. 특정 상황에서, 본 발명은 결여되거나 돌연변이된 유전자, 또는 그렇지 않는 경우 기능 장애 유전자를 교체하는 방법을 제공한다. 기타 실시형태에서, 치료용 폴리뉴클레오티드가 세포 내로 도입될 수 있다. 결실된 유전자 또는 단백질을 제공하는 것 이외에, 치료용 분자는, 예를 들어 다른 분자의 기능을 억제하는 수단을 포함하여 다양한 기타 수단 중 임의의 것에 의해 작용할 수 있으며, 예를 들어 우성 음성으로 작용할 수 있다.

[0154] 세포를 이용하는 방법

[0155] HDR 벡터를 제조하여 세포 내에서 임의의 하나의 유전자 또는 유전자 조합을 활성화, 불활성화 또는 태깅하기 위해 사용할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 유전자 또는 유전자의 조합은 질병 표현형과 연관이 있다. 하나의 실시형태에서, 유전자 또는 유전자의 조합은 알려진 질병 표현형과 연관이 없다. 이렇게 변형된 세포는 표현형의 발달과 관련이 있을 수 있는 유전자 또는 유전자들을 확인하기 위해, 질병 표현형에 대해 스크리닝할 수 있다. 리포터 마커를 갖는 HDR 벡터는 또한 질병 표현형과 연관이 있는 유전자 또는 유전자의 조합을 태깅하기 위해 사용할 수 있다.

[0156] HDR 벡터가 표적 세포 선택 마커 서열 또는 리포터 마커 서열을 포함하고, 선택 또는 리포터 마커 서열이 다양한 환경 하에 발현되도록 표적 세포의 유전체 내의 유전자 내로 삽입되는 경우, 표적 세포는 약물 개발 및 기능 유전체학에 사용될 수 있다. 호르몬 및 기타 생리적 신호와 같은 다양한 자극에 반응하여, 선택 마커 또는 리포터 마커 서열의 발현에 대한 조절을 보이는 표적 세포가 확인될 수 있다. 따라서, 표적 세포 내에서 파괴된 유전자는 자극에 대한 반응과 관련이 있다. 이들 자극은 공지되거나 공지되지 않은 조정인자에 의해 조정되는 다양한 공지되거나 공지되지 않은 경로에 관한 것일 수 있다. 자극에 대한 표적 세포의 반응을 조정하는 화학 물질이 또한 확인될 수 있다.

[0157] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 변형된 세포는 표적 유전자의 발현을 조절(예를 들어, 감소 또는 증가)하는 약물 또는 화합물을 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 하나의 실시형태에서, HDR 벡터는 또한 리포터 마커 서열을 포함한다. 약물 또는 화합물 라이브러리는 리포터 마커 서열이 발현된 유전자 내로 삽입되는 표적 세포에 적용되어, 리포터 마커 서열의 발현을 조절할 수 있고, 따라서 유전자의 발현을 조절할 수 있는 후보물질을 스크리닝할 수 있다.

[0158] 하나의 실시형태에서, 1개, 2개 또는 다수의 유전자가 HDR 벡터에서 유래하는 삽입 카세트에 의해 파괴 또는 태깅되어 있는 세포는 하나의 태깅된 유전자의 발현을 조절하지만 다른 유전자의 발현을 조절하지 못하는 화합물을 스크리닝하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 질병 표현형과 연관이 있는 태깅된 유전자의 발현을 조절하지만, 하우스키핑 유전자(housekeeping gene) 또는 밀접하게 연관된 유전자의 발현을 조절하지 못하는 화합물을 확인하는데 사용될 수 있다. 따라서, 하나의 실시형태에서 본 발명은 선택된 표적 유전자에 대한 약물 후보물질의 특이성을 알아내기 위해 사용될 수 있다.

[0159] 하나의 실시형태에서, 본 발명의 변형된 세포는 표적 세포 내에서 침묵 유전자의 발현을 유도할 수 있는 화합물을 확인하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, HDR 벡터에서 유래한 삽입 카세트는 표적 세포에 통합하여, 표적 세포의 유전체 내로 포함될 수 있다. 이 같은 실시형태에서, 통합 카세트에 의해 암호화되는 선택 마커는 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 따라서 표적 유전자를 태깅하는 역할을 하는 리포터 마커와는 독립적으로 발현될 수 있다. 따라서, 활성적으로 전사되지 않는 유전체 서열의 전사를 유도할 수 있는 화합물 또는 약물이 리포터 마커를 스크리닝함으로써 확인될 수 있다.

[0160] 제형화 및 투여

[0161] 본 발명의 HDR 벡터 분자는 개체에 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명에 따르면 HDR 벡터는 생체 내 투여에 적합한 제형으로 제조될 수 있다. 개체는 마우스 또는 래트와 같은 임의의 동물일 수 있거나, 개체는 인간일 수 있다. HDR 벡터는, 일부 실시형태에서 통합 카세트의 삽입이 (1) 정상적으로 발현되지 않는 유전자의 발현을 유도하거나, (2) 일부 유전 질환 또는 이상으로 인해 과발현되는 유전자의 발현을 감소시킬 수 있다는 측면에서 생체 내에서 약물로서 기능을 할 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 HDR 벡터를 특정 유전자의 발현 패턴을 조정하는데 효과적인 양으로 투여하는 것이 치료적 응용에 해당한다.

[0162] 하나 이상의 HDR 벡터 분자가 시험관 내에서 개체 또는 세포에 동시에 또는 연속적으로 투여될 수 있다. 예를

들어, 유전자의 다양한 서열 또는 영역을 갖도록 설계된 HDR 벡터는 하나의 제형으로서 폴링되고 투여될 수 있다.

[0163] 치료제로서의 본 발명의 HDR 벡터의 사용을 용이하게 하기 위해, 선형 dsDNA와 같은 분자는 다수의 알려진 기법들 중 임의의 하나에 의해 핵산이 분해되지 않도록 보호될 수 있으며, 예를 들어 투여 이전에 리포솜 내에 캡슐화될 수 있다. 예를 들어, 핵산 및 폴리에틸렌글리콜의 제형 또한, 임의의 알려진 서방성 핵산 제형에서와 같이 생체 내에서 핵산의 반감기를 증가시킬 수 있다. 핵산의 생체 이용률을 보호하고 향상시키기 위해 기타 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 티올기는, 뉴클레오타이드의 포스포러스기(phosphorous group)를 치환함으로써 RNA 또는 DNA 분자와 같은 폴리뉴클레오타이드 내로 혼입될 수 있다. 이 같이 핵산의 "백본"에 혼입되는 경우, 티올은 이러한 부위에서 DNA의 절단을 예방할 수 있으며, 따라서 핵산 분자의 안정성을 개선시킬 수 있다. 기타 변형은 다음과 같다: 예를 들어, 핵산 분자 백본은, 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 메틸 및 기타 알킬 포스포네이트(3'-알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함함), 포스포네이트, 포스포아미데이트(3'-아미노 포스포아미데이트 및 아미노알킬포스포아미데이트를 포함함), 티오노포스포아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 정상적인 3'-5' 연결을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결 유사체, 및 한 쌍의 인접한 뉴클레오타이드 유닛이 3'-5' 내지 5'-3' 또는 2'-5' 내지 5'-2'로 연결되어 있는, 반전 극성(inverted polarity)을 갖는 것을 포함하도록 변형될 수 있다. 다양한 염, 혼합 염 및 유리산 형태가 또한 포함된다. 본 발명의 핵산을 변형시키는 또 다른 방법은 "잠금 핵산"(locked nucleic acid; LNA)의 생산을 수반한다.

[0164] 화합물의 용도

[0165] 하나의 실시형태에서, 유전적으로 변형된 세포를 이용하여 스크린에서 확인된 화합물 또는 분자는, 본 발명의 HDR 벡터에 의해 표적화되는 유전자의 활성화와 연관이 있는 질병을 치료하는데 유용하다. 따라서, 본 발명은 질병을 치료하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명의 화합물의 효과를 스크리닝하는 방법에 의해 확인된 화합물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 하나의 실시형태에서, 화합물은 표적 유전자의 하나 이상의 발현 또는 활성화에 미치는 효과를 갖는 것으로 스크린에서 확인되었다. 하나의 실시형태에서, 상기 효과는 표적 유전자의 발현 또는 활성화의 증가이다. 하나의 실시형태에서, 상기 효과는 표적 유전자의 발현 또는 활성화의 감소이다. 하나의 실시형태에서, 유전자의 발현 또는 활성을 증가 또는 감소시키는 것이 질병 치료에 유리하다.

[0166] 하나의 실시형태에서, 질병은 낮은 수준의 헴 옥시게나아제 I(HO-1) 발현과 연관이 있다. 하나의 실시형태에서, 디설피람, 티오스트렙톤, 트리메타디온, 오라노핀, 티메로살, 할로판트린 염산염 및 보리노스타트는 HO-1의 발현 수준을 증가시키는 것으로, 본 발명의 HDR 벡터로 태깅된 세포의 스크린에서 확인되었다. 따라서, 하나의 실시형태에서 디설피람, 티오스트렙톤, 트리메타디온, 오라노핀, 티메로살, 할로판트린 염산염 및 보리노스타트 중 하나는 HO-1 발현 수준의 증가가 질병 치료에 유리할 수 있는 개체에 투여될 수 있다.

[0167] 약학 조성물

[0168] 본 발명은 본 발명의 HDR 벡터에 의해 표적화되는 유전자의 하나 이상의 조절인자를 포함하는 약학 조성물을 포함한다. 본원에 설명된 약학 조성물의 제형은 약리학 분야에 알려져 있거나, 앞으로 개발될 임의의 방법에 의해 제조될 수 있다. 일반적으로, 이 같은 제조 방법은 활성 성분을 담체 또는 하나 이상의 기타 보조 성분과 결합하도록 한 후, 필요하거나 바람직한 경우에 상기 산물을 목적하는 단일 또는 다중 투여 유닛으로 성형 또는 포장하는 단계를 포함한다.

[0169] 본원에 설명된 약학 조성물의 설명이 주로 인간에 대한 윤리적 투여에 적합한 약학 조성물에 관한 것일지라도, 당업자라면 이 같은 조성물이 일반적으로 모든 종류의 동물에 대한 투여에 적합한 것으로 이해할 것이다. 인간에 대한 투여에 적합한 약학 조성물이 다양한 동물에 대한 투여에 적합하도록 하기 위해 상기 조성물에 대한 변형이 널리 알려져 있으며, 통상의 지식을 갖는 가축 약리학자(veterinary pharmacologist)라면 단순히 통상의 실험에 의해 이 같은 변형을 설계하고 실시할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여가 고려되는 개체로는 인간 및 기타 영장류, 포유류(상업적 연관이 있는 포유류, 예를 들어 비인간 영장류, 소, 돼지, 말, 양, 고양이, 개를 포함함)를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다.

[0170] 본 발명의 방법에 유용한 약학 조성물은 안구, 경구, 직장, 질, 비경구, 국소, 폐, 비강 내, 설측, 종양 내, 경막 외, 대뇌 내, 뇌실 내 투여 경로 또는 다른 투여 경로에 적합한 제형으로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 기타 고려되는 제형으로는 투사형 나노입자, 리포솜 제제, 활성 성분을 포함하는 재밀봉된 적혈구, 및 면역 기

반 제형을 들 수 있다.

- [0171] 본 발명의 약학 조성물은 단일 단위 투여량 또는 복수의 단일 단위 투여량으로서 대량으로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "단위 투여량"은 소정량의 활성 성분을 포함하는 약학 조성물의 개별 양이다. 활성 성분의 양은 개체에 투여될 수 있는 활성 성분의 투여량, 또는 이 같은 투여량의 적정 분획, 예를 들어 이 같은 투여량의 1/2 또는 1/3과 일반적으로 동일하다.
- [0172] 본 발명의 약학 조성물 내의 활성 성분, 약학적으로 허용 가능한 담체 및 임의의 부가적인 성분의 상대적인 양은 치료되는 개체가 누구인지에 따라, 그리고 개체의 크기 및 상태에 따라 달라질 것이며, 추가로 조성물이 투여되어야 하는 경로에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 조성물은 0.1% 내지 100%(w/w)의 활성 성분을 포함할 수 있다.
- [0173] 활성 성분 이외에, 본 발명의 약학 조성물은 하나 이상의 부가적인 약학적 활성제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0174] 본 발명의 약학 조성물의 제어 방출형 또는 서방형 제형은 통상의 기술을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0175] 비경구 투여에 적합한 약학 조성물의 제형은 멸균수 또는 멸균 등장성 식염수와 같은 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 활성 성분을 포함한다. 이 같은 제형은 볼루스 투여 또는 연속 투여에 적합한 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 주사용 제형은 보존제를 포함하는 앰플 또는 다중 투여 용기와 같은 단위 투여 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 비경구 투여용 제형으로는 현탁액, 용액, 유성 또는 수성 분산매 중의 유화액, 페이스트 및 이식 가능한 서방형 또는 생분해성 제형을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 이 같은 제형은 현탁제, 안정화제 또는 분산제를 포함하지만 이에 제한되지 않는 하나 이상의 부가적인 성분을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 실시형태에서, 비경구 투여의 제형에 있어 활성 성분은 적합한 분산매(예를 들어, 발열원이 없는 멸균수)에 의한 재구성을 위한 건조(즉, 분말 또는 과립) 형태로 제공되며, 그 이후에 재구성된 조성물이 비경구 투여된다.
- [0176] 약학 조성물은 멸균 주사용 수성 또는 유성 현탁액 또는 용액의 형태로 제조, 포장 또는 판매될 수 있다. 이러한 현탁액 또는 용액은 주지 기술에 따라 제형화될 수 있으며, 활성 성분 이외에도 본원에 개시되어 있는 분산제, 습윤제 또는 현탁제와 같은 부가적인 성분을 포함할 수 있다. 이 같은 멸균 주사용 제형은, 예를 들어 비독성의 비경구적으로 허용 가능한 희석제 또는 용매(예를 들어, 물 또는 1,3-부탄디올)를 이용하여 제조될 수 있다. 기타 허용 가능한 희석제 및 용매로는 링거액, 등장성 염화나트륨 용액 및 고정유(합성 모노글리세리드 또는 합성 디글리세리드)를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 유용한 기타 비경구적으로 투여 가능한 제형으로는 활성 성분을 미정질 형태로, 리포솜 제제로, 또는 생분해성 중합체 시스템의 성분으로서 포함하는 제형을 들 수 있다. 서방 또는 이식을 위한 조성물은 유화액, 이온 교환 수지, 난용성 중합체 또는 난용성 염과 같은 약학적으로 허용 가능한 중합체성 또는 소수성 물질을 포함할 수 있다.
- [0177] 실험 실시예
- [0178] 본 발명은 하기 실험 실시예를 참고하여 추가로 상세하게 설명될 것이다. 이들 실시예는 예시를 목적으로만 제공되며, 달리 명시하지 않는 한 제한하기 위한 것은 아니다. 따라서 본 발명은 결코 하기 실시예에 제한되는 것으로 이해되어서는 아니되고, 오히려 본원에 제공되는 교시의 결과로서 자명하게 되는 거의 모든 변형예를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0179] 추가의 설명 없이, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 이전 설명 및 하기 예시적인 실시예를 이용하여, 본 발명의 화합물을 제조 및 이용하고 청구된 방법을 구현할 수 있는 것으로 여겨진다. 따라서, 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시형태를 구체적으로 언급하고 있으며, 나머지 개시내용을 임의의 방식으로 제한하는 것으로 이해되어서는 아니 된다.
- [0180] 실시예 1: 세포주 개발용 상동성 재조합 벡터의 고속 생성을 위한 효율적인 방법
- [0181] 단일 단계로 HDR 수선을 위한 공여체 벡터의 구성을 가능케 하는 신규한 세트의 플라스미드 및 최신식 방법이 개발되었다. 신규한 벡터는 형광 표지(mClover3 및 mRuby3), 발광(NanoLuc®) 및 단백질 정제 태그(3x-플래그, 할로 태그)와 같은 하류 응용을 위한 다수의 태그의 삽입을 가능케 한다. 또한 이들 벡터는 변형된 세포를 신속하게 선택하기 위한 진행 항생제(퓨로마이신, 제오신™, 블라스티시딘 등)의 프레임 내 발현을 가능케 한다.
- [0182] 세포주 및 유기체의 유전자 녹인 또는 녹아웃 생성을 위한 상동성 재조합 벡터의 생성을 용이하게 하기 위해 백본 플라스미드를 개발하였다.

- [0183] 상기 시스템은 벡터 생성 과정 및 순수한 클론 세포 선택 과정을 가속화하기 위한 다수의 특징을 갖는다. 이는 단일 단계로, 좌측 및 우측 재조합 암을 100% 정확하게 클로닝하는 단계를 포함한다. 이는, 독성 단백질인 CcdB 용 이중 발현 카세트의 혼입으로 인해 가능하다. 2개의 CcdB 카세트는 생존 가능한 대장균 콜로니를 수득하기 위해 재조합 암으로 대체되어야 한다(도 1 내지 도 3).
- [0184] 백본은 단백질 태깅을 위한 임의의 단백질 마커를 포함하도록 신속하게 변형될 수 있다. 일례로, 형광 단백질(mClover3, mRuby3), 발광(NanoLuc®) 및 정제 태그(할로 태그 및 3X-플래그)를 갖는 모든 벡터를 생성한 바 있다(도 4).
- [0185] 백본은 진핵세포용 독성 항생제에 대한 임의의 내성 유전자를 포함하도록 신속하게 변형될 수 있다. 일례로, 푸로마이신, 블라스티시딘 및 제오신에 대한 내성 유전자를 갖는 모든 벡터를 생성한 바 있다(도 4).
- [0186] 상기 시스템은, 상동성 재조합에 의해 변형된 세포 내에서만 내성 유전자의 발현을 가능케 함으로써 10일 미만 이내에 변형된 세포의 순수한 클론의 선택을 가능케 한다.
- [0187] 상기 시스템에 의해 사용자는 한 세트의 상동성 재조합 암만을 설계하고, 관심 태그 각각을 이용하여 다양한 벡터 내의 재조합 암을 클로닝 함으로써, 동일한 표적 유전자 에 대한 다수의 태그(형광, 발광, 단백질 정제용 태그 등)를 시험할 수 있게 된다.
- [0188] 상기 시스템에 의해, 사용자는 진핵세포용 항생제에 대한 2개의 상이한 내성 유전자를 갖는 동일한 상동성 재조합 벡터를 이용함으로써, 동형 접합성의 변형된 세포 클론을 생성할 수 있게 된다.
- [0189] *이제, 이들 실험에 사용된 재료 및 방법이 설명된다.*
- [0190] 재료 및 방법
- [0191] 선택된 백본 HDR 공여체 벡터(500 ng)를 최종 부피 20 μ l의 KpnI 및 BamHI에 의해 절단하였다. 합성된 좌측 및 우측 재조합 암을 TE 완충액에서 25 ng/ μ l의 최종 농도로 희석하였다. 깊은 조립 반응은 2 μ l의 절단된 벡터 반응액, 1.5 μ l의 재조합 암 각각 및 5 μ l의 NeBuilder 마스터 믹스(뉴잉글랜드 바이오랩스(New England Biolabs))를 혼합함으로써 수행되었다. 반응 혼합물을 1시간 동안 50°C에서 배양하였다. 4 μ l의 깊은 조립 반응 생성물은 CcdB 유전자에 민감한, 화학적으로 컴피턴트(competent)한 대장균 균주(예를 들어, DH5 α , JM109, STL3 등) 내로 형질 전환되었다. 세포를 35°C에서 하룻밤 동안 성장시켰다. 플라스미드를 추출하고, HDR 재조합 플라스미드를 서열분석에 의해 확인하였다(도 5).
- [0192] *이제, 상기 실험의 결과가 설명된다.*
- [0193] 단백질 히스톤 3용 적색 형광 단백질 태그를 갖는 세포주의 생성
- [0194] 인간 세포 내에서 히스톤 3 유전자(유전자 기호: H3F3B)의 마지막 엑손을 절단하기 위한 sgRNA를 발현하도록 CRISPR 발현 벡터를 설계하였다.
- [0195] 좌측 및 우측 재조합 암(약 440 bp 내지 600 bp 길이)은 절단측 다음에 선택되었으며, 절단된 DNA에서의 상동성 재조합을 유도하고 히스톤 3 단백질의 C-말단에서 적색 형광 단백질(mRuby3)의 프레임 내 삽입을 조장하도록, 벡터를 생성하기 위해 이중가닥의 합성 DNA 단편으로서 생성되었다.
- [0196] CRISPR 벡터 및 히스톤 3-mRuby3 HDR 벡터를 HEK293T 세포 내로 동시에 형질 감염시키고, 48시간 이후에 세포핵 내에서의 mRuby3 발현에 대해 세포를 평가하였다. 형질 감염 72시간 이후에 세포를 수확하고, 진핵세포용 독성 항생제(제오신TM)를 포함하는 배양 배지에 접종하였다. 적색 형광 핵을 포함하는 양성 콜로니의 형성은 형질 감염 7일 후에 확인되었다(도 6).
- [0197] 단백질 히스톤 3용 적색 형광 단백질 태그를 갖는 세포주의 생성
- [0198] 인간 세포 내에서 베타 튜블린 유전자(유전자 기호: TUBB)의 마지막 엑손을 절단하기 위한 sgRNA를 발현하도록 CRISPR 발현 벡터를 설계하였다.
- [0199] 좌측 및 우측 재조합 암(약 440 bp 내지 600 bp 길이)은 절단측 다음에 선택되었으며, 절단된 DNA에서의 상동성 재조합을 유도하고 베타 튜블린 단백질의 C-말단에서 녹색 형광 단백질(mClover3)의 프레임 내 삽입을 조장하도록, 벡터를 생성하기 위해 이중가닥의 합성 DNA 단편으로서 생성되었다.
- [0200] CRISPR 벡터 및 TUBB-Clover3 HDR 벡터를 HEK293T 세포 내로 동시에 형질 감염시키고, 48시간 이후에 세포 내

에서의 mRuby3 발현에 대해 세포를 평가하였다. 형질 감염 72시간 이후에 세포를 수확하고, 진핵세포용 독성 항생제(퓨로마이신)를 포함하는 배양 배지에 접종하였다. 녹색 형광 미소관을 포함하는 양성 콜로니의 형성은 형질 감염 7일 후에 확인되었다(도 7).

[0201] 이중 표지된 세포주의 생성

[0202] 히스톤 3 단백질 내에 적색 형광 단백질 태그(mRuby3)를 갖도록 이전에 변형되었던 HEK293T 세포를 베타 튜블린 유전자 내에 부가적인 녹색 형광 태그를 포함하도록 추가로 변형되었다. 이를 위해, 세포에는 베타 튜블린 유전자(유전자 기호: TUBB)의 마지막 엑손을 표적화하는 CRISPR 플라스미드 및 HDR 벡터를 동시에 형질 감염시켜 절단된 DNA에서의 상동성 재조합을 유도하고, 베타 튜블린 단백질의 C-말단에서 녹색 형광 단백질(mClover3)의 프레임 내 삽입을 조장하였다. 48시간 후, 세포에서 mClover3 발현을 평가하였다. 형질 감염 72시간 이후에 세포를 수확하고, 진핵세포용 독성 항생제(퓨로마이신)를 포함하는 배양 배지에 접종하였다. 핵 내에 녹색 형광 미소관 및 적색 형광 히스톤 3을 포함하는 양성 콜로니의 형성은 형질 감염 7일 후에 확인되었다(도 8).

[0203] 3중 표지된 세포주의 생성

[0204] 히스톤 3 단백질 내에 적색 형광 단백질 태그(mRuby3)를 갖고 베타 튜블린 단백질 내에 녹색 형광 단백질(mClover3) 태그를 갖도록 이전에 변형되었던 HEK293T 세포는 미토콘드리아 단백질의 미토콘드리아 ATP 합성효소 베타 하위유닛 내에 부가적인 청색 형광 태그를 포함하도록 추가로 변형되었다. 이를 위해, 세포에는 미토콘드리아 단백질의 미토콘드리아 ATP 합성효소 베타 하위유닛(유전자 기호: ATP5B)의 마지막 엑손을 표적화하는 CRISPR 플라스미드 및 HDR 벡터를 동시에 형질 감염시켜 절단된 DNA에서의 상동성 재조합을 유도하고, ATP 합성효소 베타 하위유닛의 C-말단에서 청색 형광 단백질(mTagBFP2)의 프레임 내 삽입을 조장하였다. 48시간 후에 mTagBFP2 발현에 대해 세포를 평가하였다. 형질 감염 72시간 이후에 세포를 수확하고, 진핵세포용 독성 항생제(블라스티시딘)를 포함하는 배양 배지에 접종하였다. 핵 및 청색 형광 미토콘드리아 내에 녹색 형광 미소관, 적색 형광 히스톤 3을 포함하는 양성 콜로니의 형성은 형질 감염 7일 후에 확인되었다(도 9).

[0205] NanoLuc® 루시페라아제로 태깅된 헵 옥시게나아제 1을 갖는 세포주의 생성

[0206] 헵 옥시게나아제 1(HO-1)은 항산화 반응 경로의 유전자 표적이다. 변형된 세포주는 단백질을 NanoLuc® 루시페라아제로 태깅함으로써, HO-1 발현에서의 변화를 신속하게 정량화하기 위해 생성되었다. 이를 위해, HEK293T 세포에는 마지막 코돈 부근의 HO-1 유전자의 마지막 엑손을 표적화하는 sgRNA 서열을 갖는 CRISPR 벡터, 및 재조합 암(약 630 bp)을 포함하는 HDR 벡터를 동시에 형질 감염시켜 상동성 재조합에 의한 DNA 수선을 유도하였다. HDR 벡터는 NanoLuc® 루시페라아제의 프레임 내 태깅을 가능하게 하고, 또한 외생성 프로모터의 제어를 받는 퓨로마이신 내성 유전자를 포함하고 있었다(예를 들어, 도 3). 퓨로마이신에 대해 내성을 갖는 순수한 클론을 선택한 후, 알려져 있는 HO-1 발현의 활성인자인 합성 트리테르페노이드 2-시아노-3,12-디옥솔란-1,9(11)-디엔-28-오익산(CDDO)으로 세포를 처리한 이후의 HO-1의 발현에서의 작은 변화를 신속하게 검출하도록 하는 새로운 세포주의 능력이 확인되었다(도 10). 이어서, HO-1 NanoLuc® 세포주를 사용하여, 산화 및 항산화 화합물의 라이브러리를 스크리닝하고, 강력한 HO-1 단백질 발현의 활성인자를 확인하였다(도 11). 또한, HO-1 NanoLuc® 세포주를 사용하여 1200개의 FDA 승인 화합물의 라이브러리를 스크리닝하고, HO-1의 단백질 발현을 증가시킬 수 있는 7개의 화합물을 확인하였다(도 12).

[0207] 실시예 2: 고속 HDR 공여체 플라스미드 백본의 서열

[0208] 링커 펩티드를 갖는 고속 HDR 공여체 플라스미드 백본:

[0209] 밑줄: KpnI(서열번호 1의 1번 내지 6번째의 뉴클레오타이드 및 서열번호 1의 682번 내지 687번째의 뉴클레오타이드), EcoRI(서열번호 1의 700번 내지 705번째의 뉴클레오타이드 및 서열번호 1의 781번 내지 786번째의 뉴클레오타이드), XbaI(서열번호 1의 853번 내지 858번째의 뉴클레오타이드 및 서열번호 1의 934번 내지 939번째의 뉴클레오타이드), BamHI(서열번호 1의 1,116번 내지 1,121번째의 뉴클레오타이드 및 서열번호 1의 1,797번 내지 1,802번째의 뉴클레오타이드); *이탈릭체*: CCDB 유전자(서열번호 1의 336번 내지 641번째의 뉴클레오타이드); 소문자: 링커(서열번호 1의 689번 내지 699번째의 뉴클레오타이드); NNNNN: 삽입 부위 1(예를 들어, 태그, 마커, 외생성 유전자, 형광 단백질, 선택 가능한 마커, 항생제 내성 유전자 및/또는 정제 태그를 암호화하는 서열의 삽입용)(서열번호 1의 706번 내지 780번째의 뉴클레오타이드); 소문자 *이탈릭체*: P2A 펩티드 서열(서열번호 1의 797번 내지 852번째의 뉴클레오타이드); NNNNN: 삽입 부위 2(예를 들어, 태그, 마커, 외생성 유전자, 형광 단백질, 선택 가능한 마커, 항생제 내성 유전자 및/또는 정제 태그를 암호화하는 서열의 삽입용)(서열번호 1의 859번 내지 933번째의 뉴클레오타이드); **볼드체**: mRNA 안정화 서열(서열번호 1의 942번 내지 1,115번째의 뉴클레오타이드); *이탈릭체*:

CCDB 유전자(서열번호 1의 1,451번 내지 1,756번째의 뉴클레오티드)

(서열번호 1)

[illegible]

내부 프로모터를 갖는 고속 HDR 공여체 플라스미드 백본:

밀줄: KpnI(서열번호 2의 1번 내지 6번째의 뉴클레오티드 및 서열번호 2의 682번 내지 687번째의 뉴클레오티드), EcoRI(서열번호 2의 700번 내지 705번째의 뉴클레오티드 및 서열번호 2의 756번 내지 761번째의 뉴클레오티드), AgeI(서열번호 2의 1,303번 내지 1,308번째의 뉴클레오티드), XbaI(서열번호 2의 1,359번 내지 1,364번째의 뉴클레오티드), BamHI(서열번호 2의 1,541번 내지 1,546번째의 뉴클레오티드 및 서열번호 2의 2,222번 내지 2,227번째의 뉴클레오티드); *이탤릭체*: *CCDB 유전자*(서열번호 2의 336번 내지 641번째의 뉴클레오티드); 소문자: 링커(서열번호 2의 689번 내지 699번째의 뉴클레오티드); NNNNN: 삽입 부위 1(예를 들어, 태그, 마커, 외생성 유전자, 형광 단백질, 선택 가능한 마커, 항생제 내성 유전자 및/또는 정제 태그를 암호화하는 서열의 삽입용)(서열번호 2의 706번 내지 755번째의 뉴클레오티드); **볼드체로 밀줄**: EF1-알파 프로모터 서열(서열번호 2의 811번 내지 1,293번째의 뉴클레오티드); NNNNN: 삽입 부위 2(예를 들어, 태그, 마커, 외생성 유전자, 형광 단백질, 선택 가능한 마커, 항생제 내성 유전자 및/또는 정제 태그를 암호화하는 서열의 삽입용)(서열번호 2의 1,309번 내지 1,358번째의 뉴클레오티드); **볼드체**: mRNA 안정화 서열(서열번호 2의 1,368번 내지 1,540번째의 뉴클레오티드); *이탤릭체*: *CCDB 유전자*(서열번호 2의 1,876번 내지 2,181번째의 뉴클레오티드)

(서열번호 2)

[illegible]

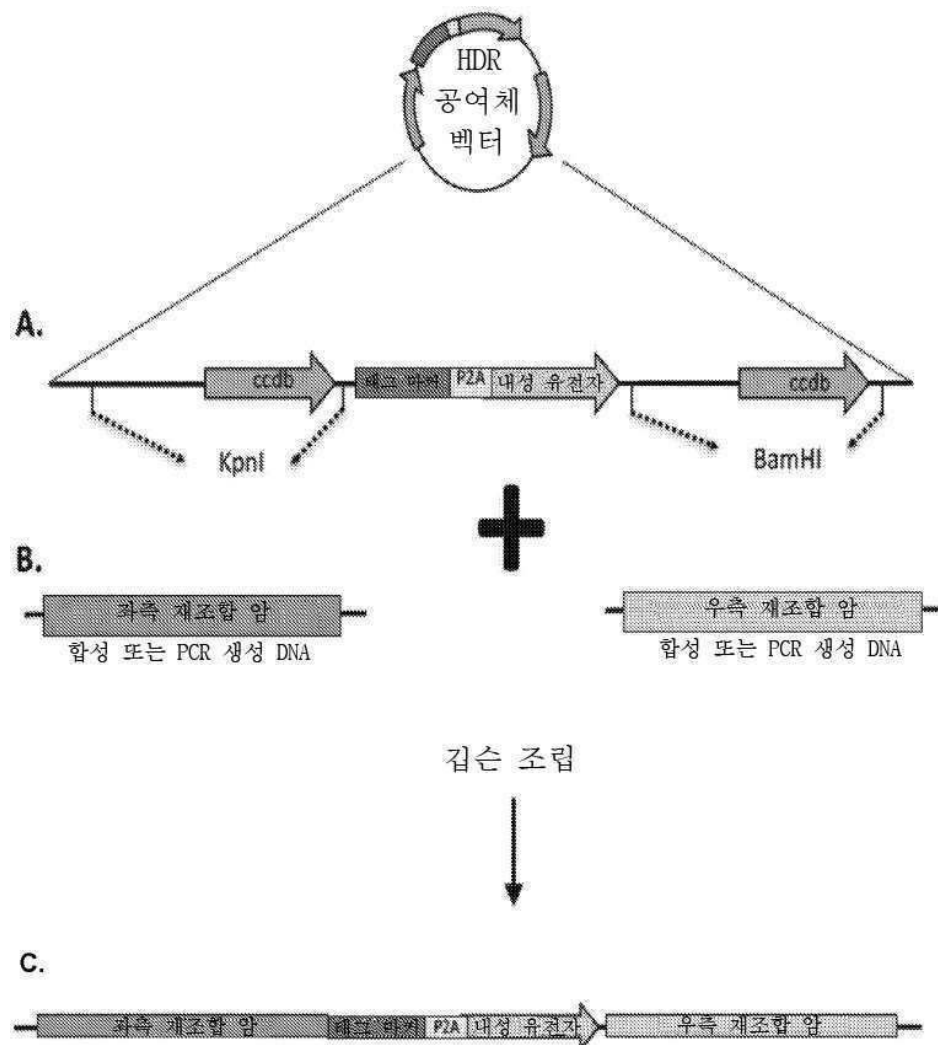
GGTTTTGCTTTTGGCCTTTCCTAGCTTTtAAAAAAAAAAGCAAAAGACGCTGGTGGCTGGCACTCCTGGTTTCCAGGACGGGGTTCAAGTCCCTGCGGT
 GTCCTTTGCTTGGATCCGGCTTACTAAAAGCCAGATAACAGTATGCGTATTTGCGCGTGATTTTTGCGGTATAAGAATATATACTGATATGTATACCCGAAG
 TATGTCAAAAAGAGGTGTGCTATGAAGCAGCGTATTACAGTGACAGTTGACAGCGACAGCTATCAGTTGCTCAAGGCATATATGATGTCAATATCTCCGGTC
 TGGTAAGCACAACCATGCAGAATGAAGCCCGTCGTCTGCGTGCCGAACGCTGAAAAGCGGAAAATCAGGAAGGGATGGCTGAGGTCGCCCCGGTTTATTGAAA
 TGAACGGCTCTTTTGTGCTGACGAGAACAGGGACTGGTGAAATGCAGTTTAAGGTTTACACCTATAAAAGAGAGAGCCGTATCGTCTGTTTGTGGATGTACAG
 AGTGATATTATTGACACGCCCGGGCGACGGATGGTGATCCCCCTGGCCAGTGCACGCTCTGCTGTGATAGATAAAGTCTCCCGTGAACCTTACCCGGTGGTGCAT
 ATCGGGGATGAAAGCTGGCGCATGATGACCACGATATGGCCAGTGTGCCGCTCTCCGTTATCGGGGAAGAAGTGGGTGATCTCAGCCACCGCGAAAATGAC
 ATCAAAAACGCCATTAACCTGATGTTCTGGGGAATATAATGTGAGGCTCCGTTATACACAGCCAGTCTGCAGGTCGACGGATCC

[0217]

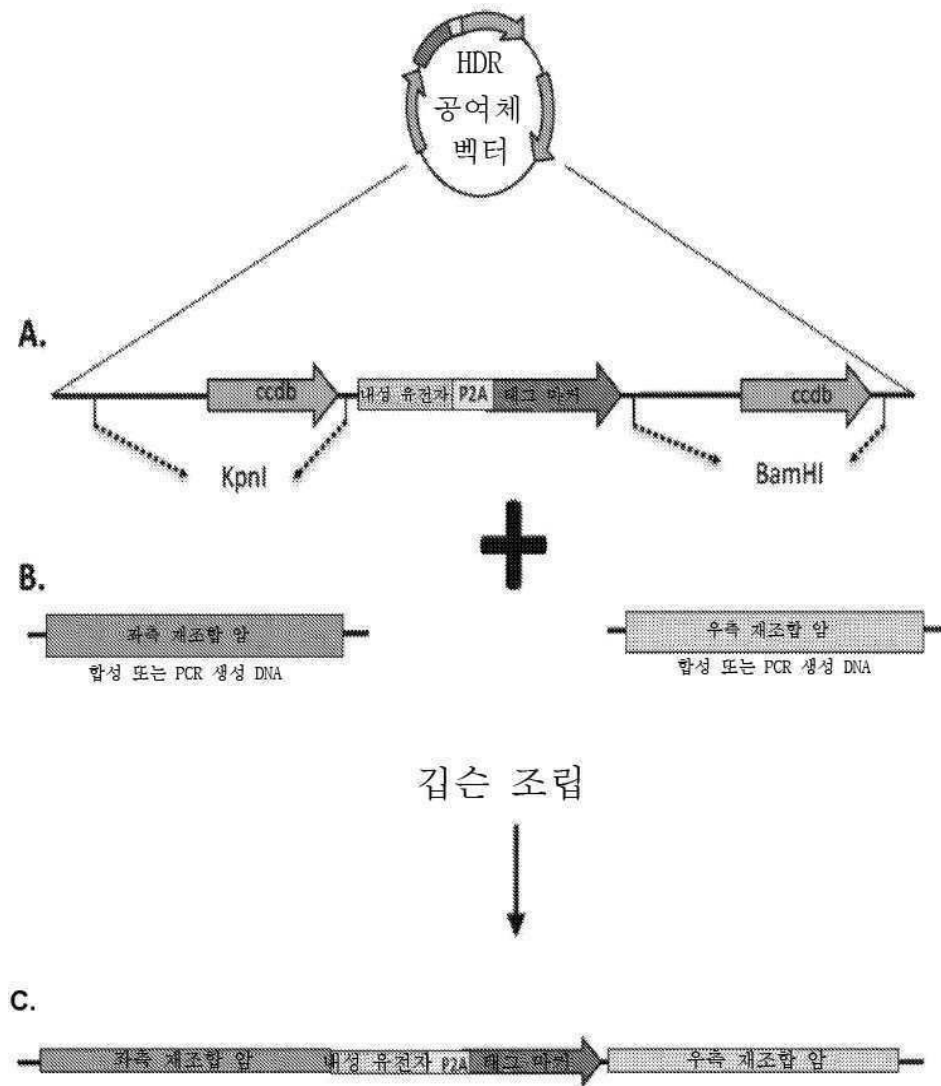
본원에서 인용된 모든 특허, 특허 출원 및 간행물의 개시내용은 그 전체가 본원에서 참고로 인용된다. 본 발명이 특정 실시형태를 참고하여 개시되어 있을지라도, 본 발명의 기타 실시형태 및 변형예가 본 발명의 진의 및 범주에서 벗어나지 않는 한, 당해 기술분야의 숙련자에 의해 고안될 수 있다는 것이 자명하다. 첨부된 청구항은 이 같은 실시형태 및 등가의 변형예 모두를 포함하는 것으로 이해되도록 하기 위한 것이다.

도면

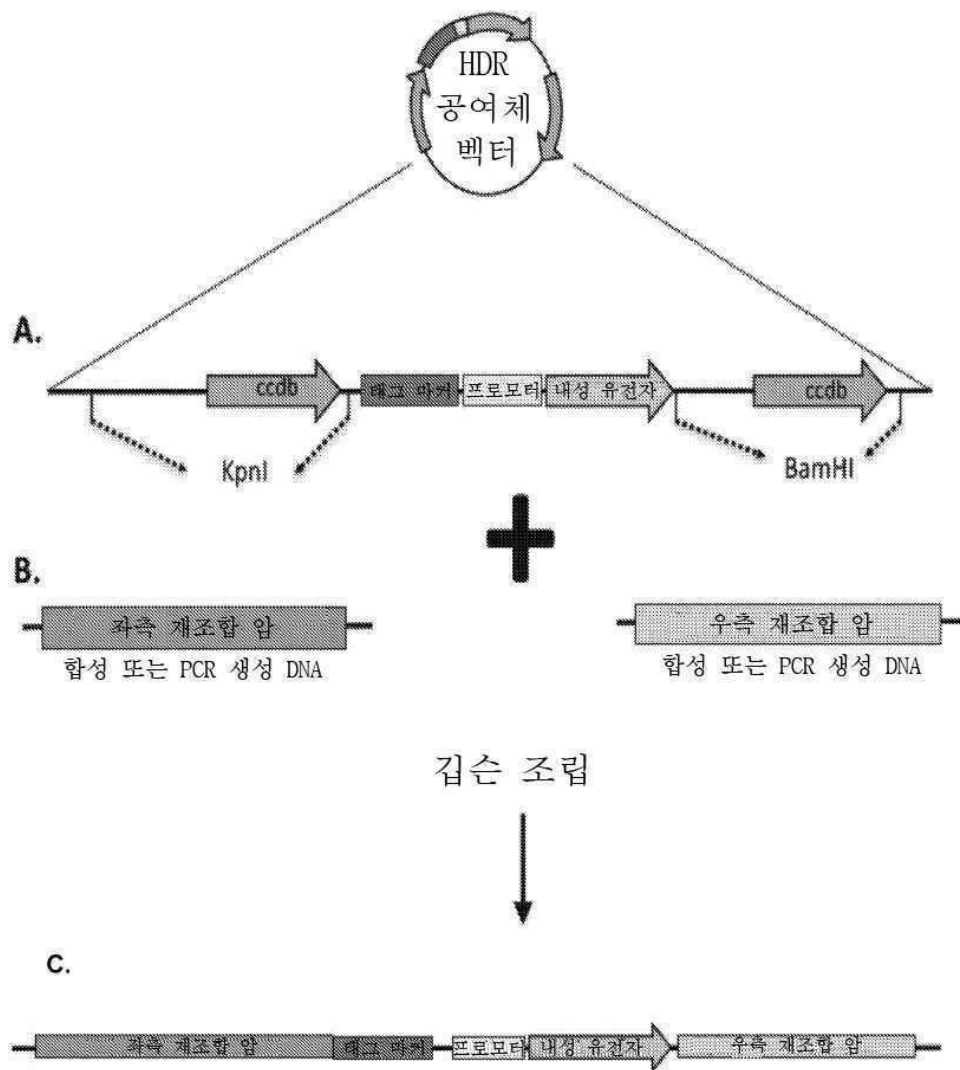
도면1



도면2

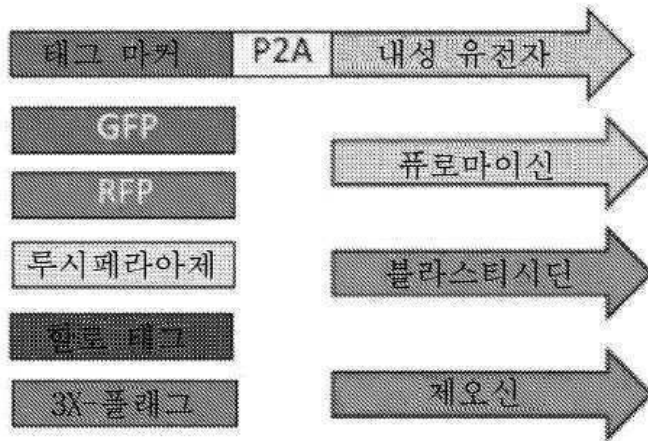


도면3

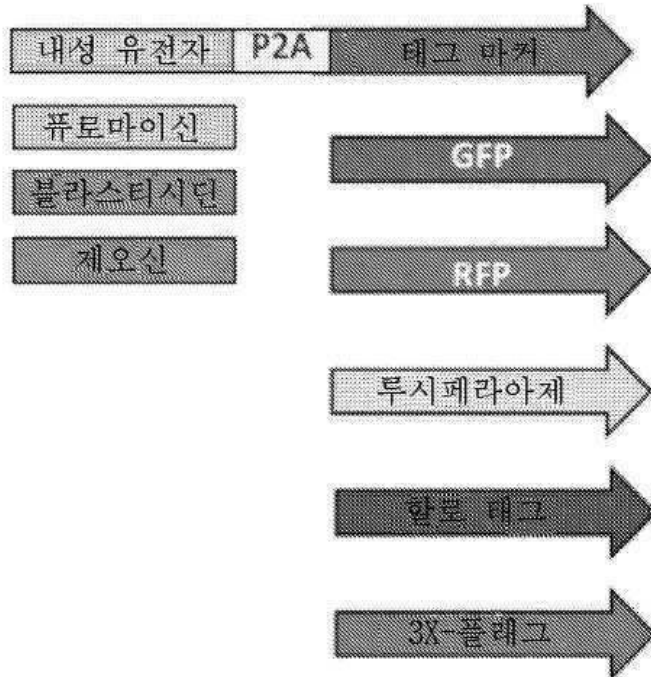


도면4

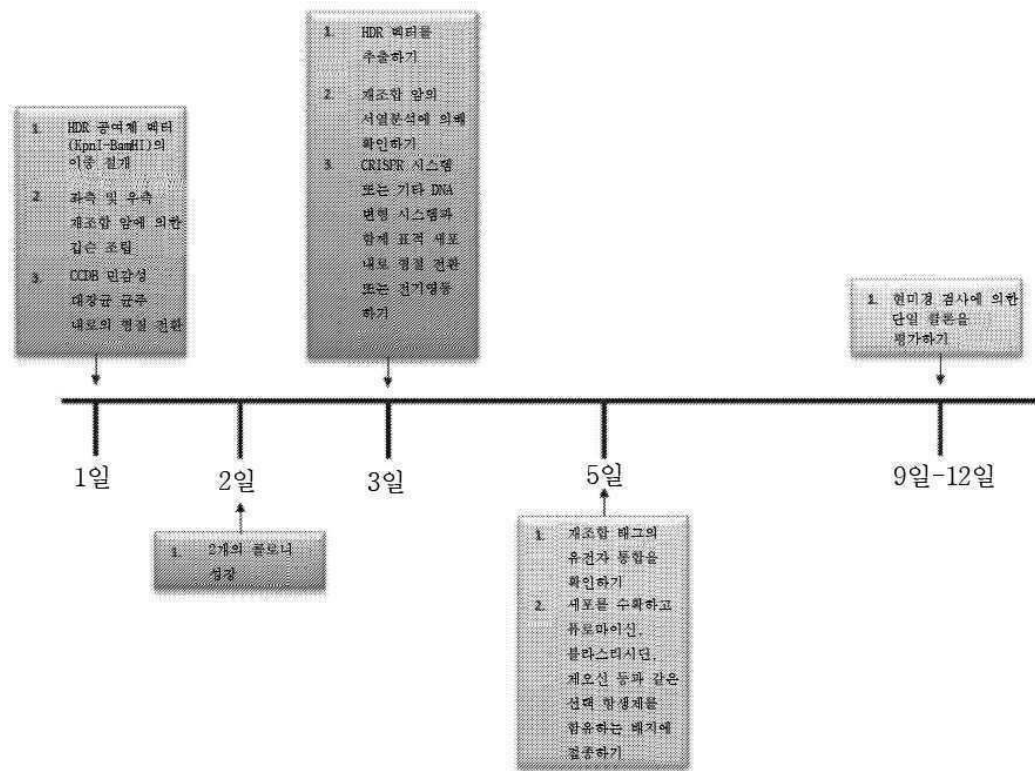
A.



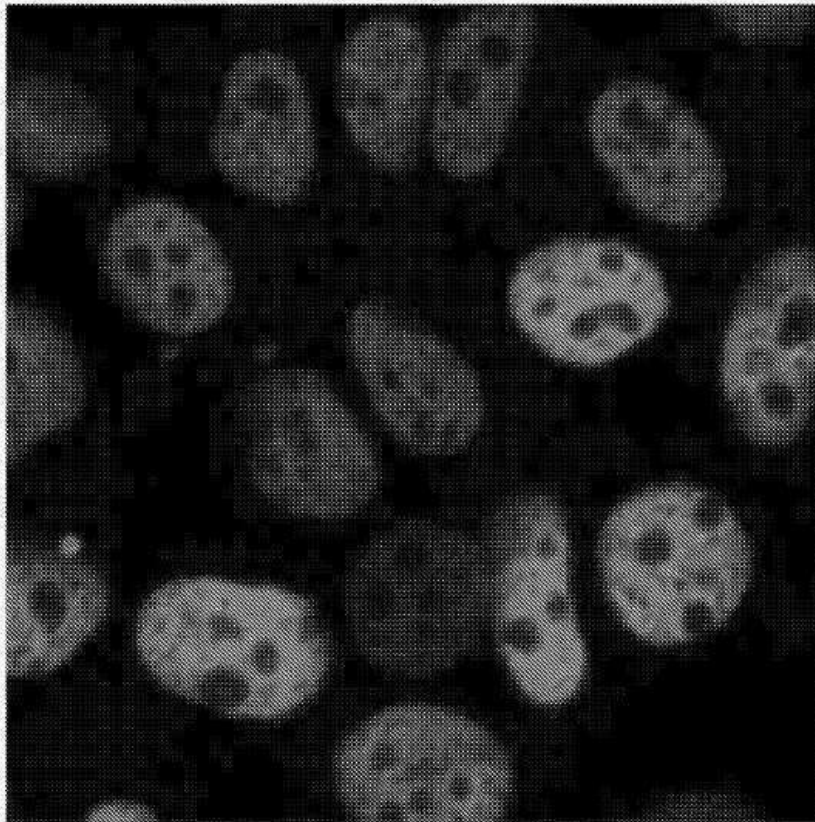
B.



도면5

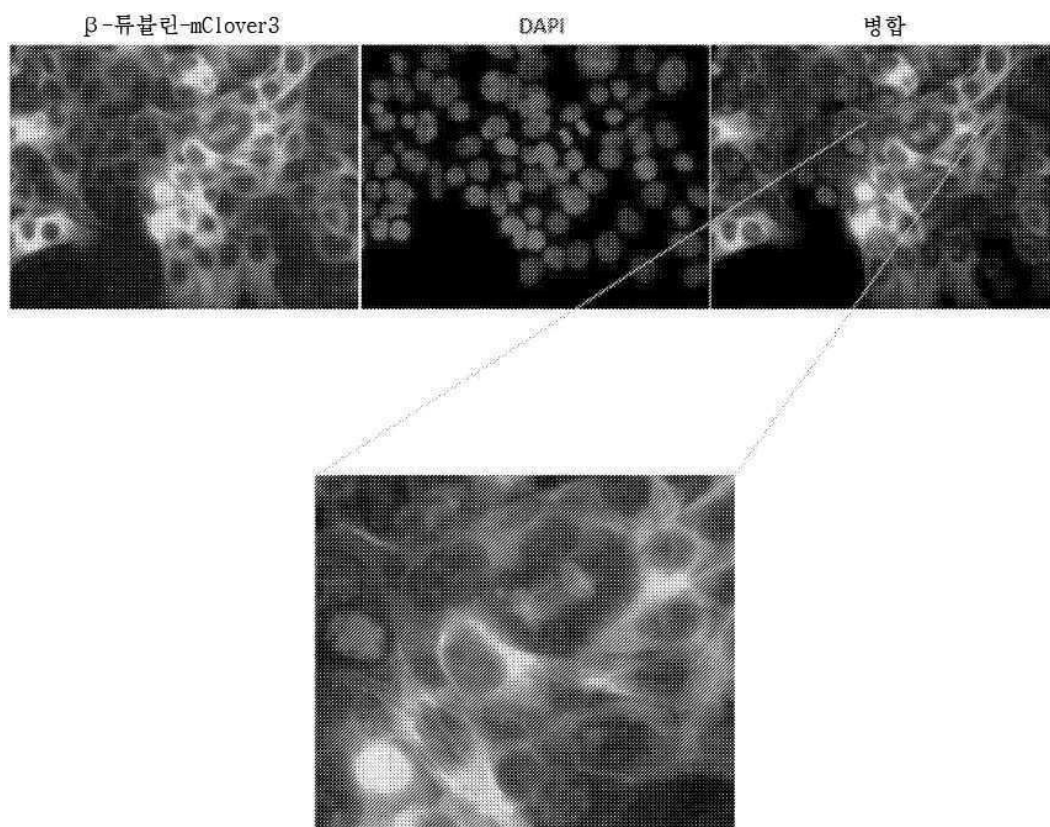


도면6

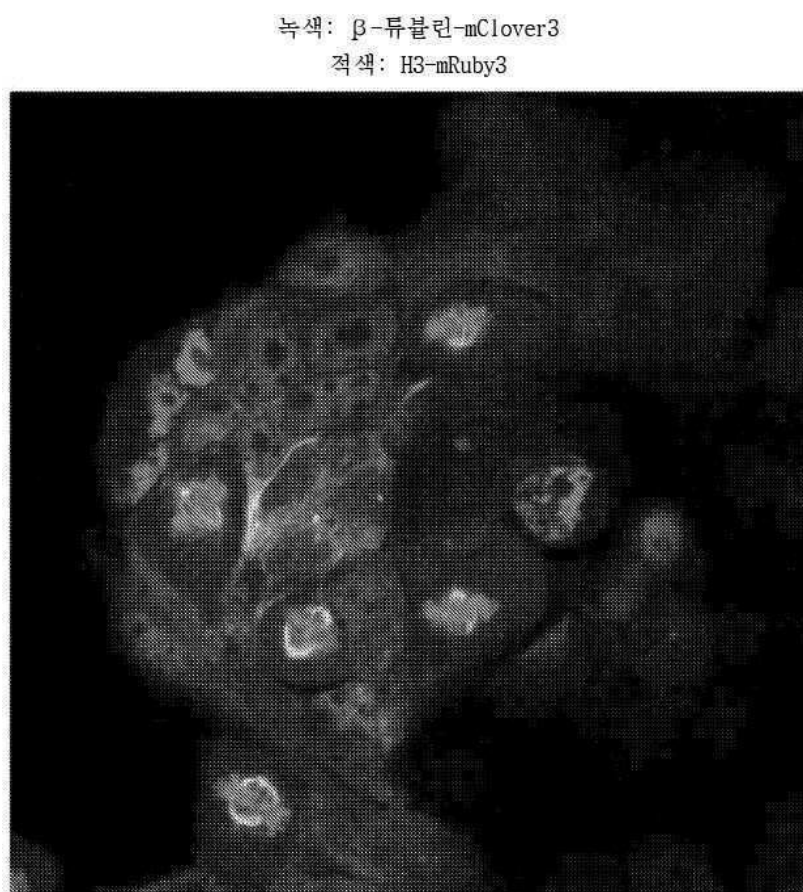


히스톤 3-mRuby3
핵 형광

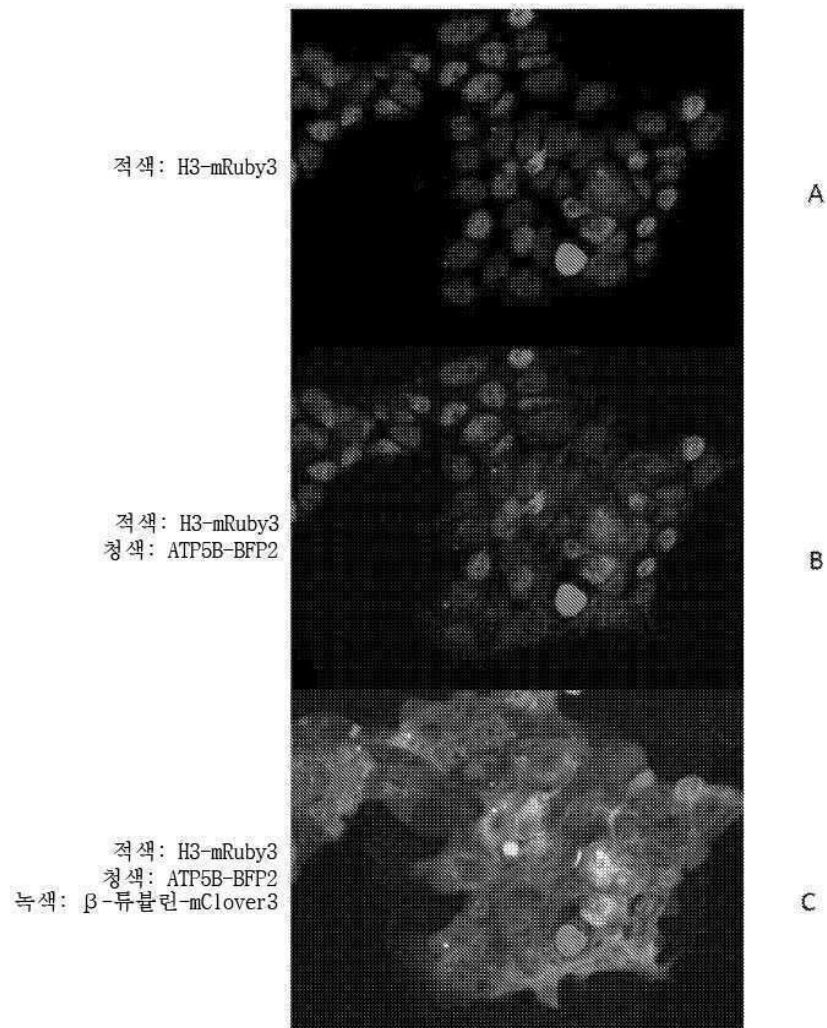
도면7



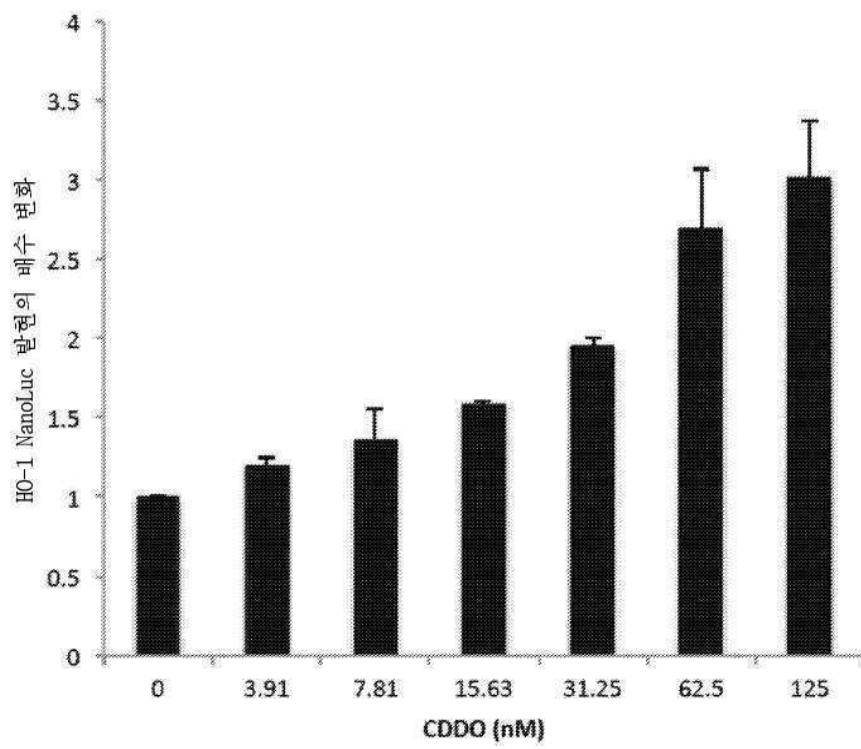
도면8



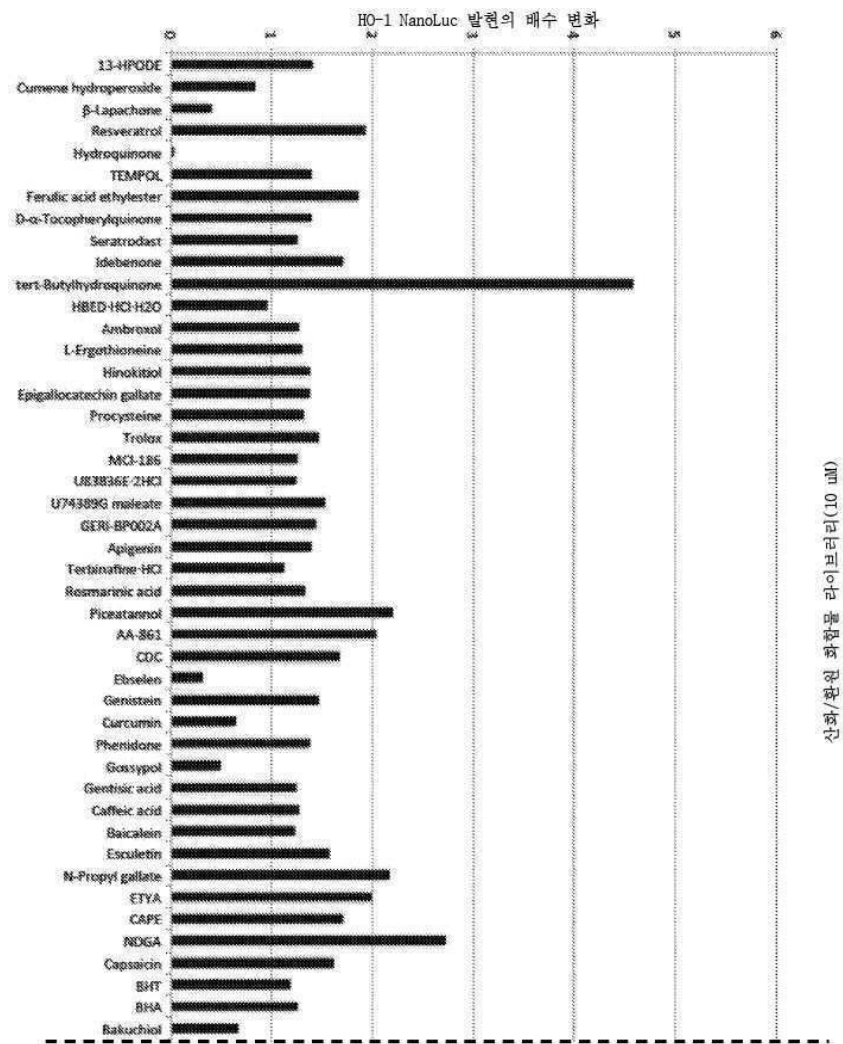
도면9



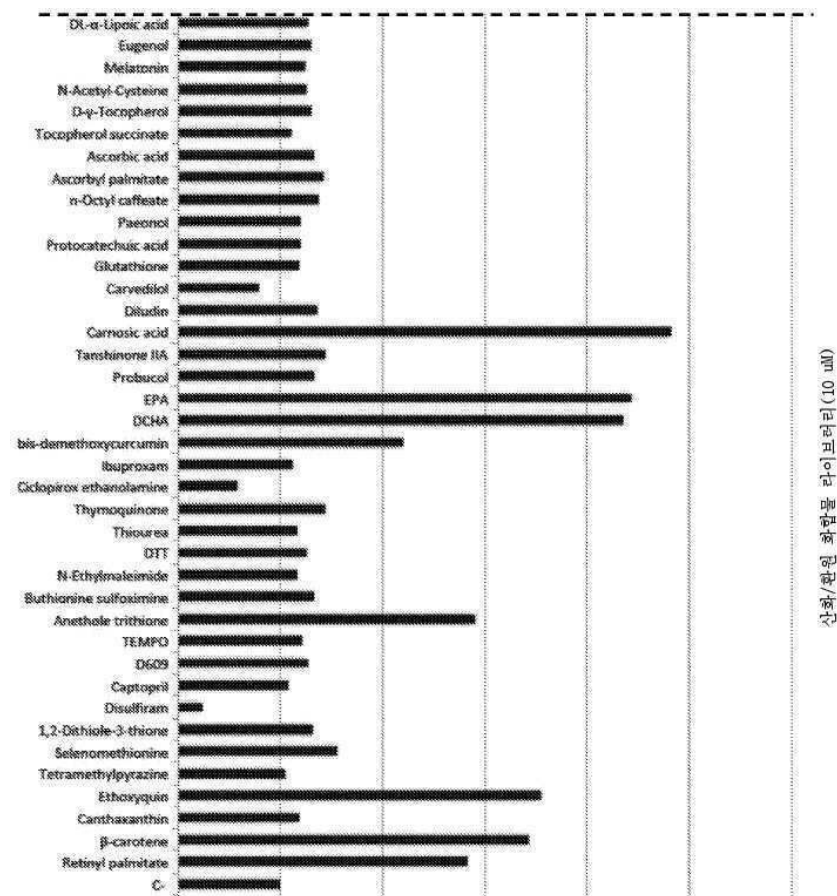
도면10



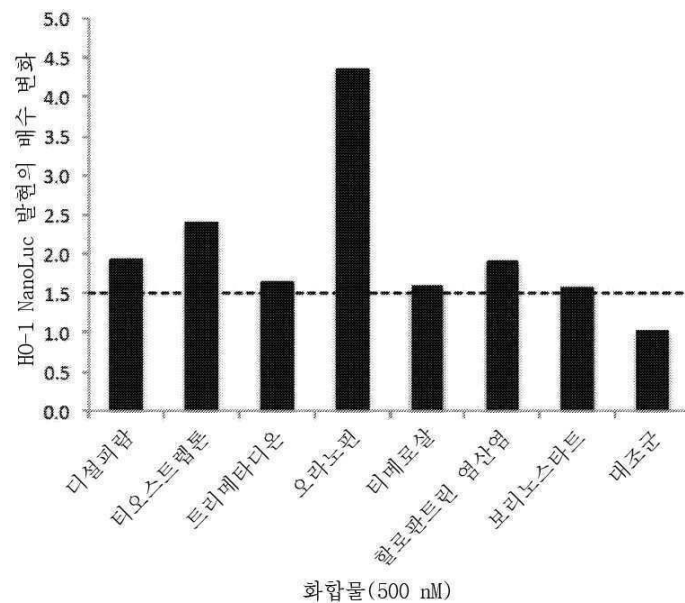
도면11a



도면11b



도면12



서열 목록

- <110> TEMPLE UNIVERSITY-OF THE COMMONWEALTH SYSTEM OF HIGHER EDUCATION
- <120> DNA plasmids for the Fast Generation of Homologous Recombination Vectors For Cell Line Development

<130> MPI19-016-D1
 <150> US 62/416,802
 <151> 2016-11-03
 <150> PCT/US 2017/059816
 <151> 2017-11-03
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1802
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Fast-HDR donor plasmid backbone with linker peptide
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (706)..(780)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (859)..(933)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 1
 ggtaccggct tactaaaagc cagataacag tatgcgtatt tgcgcgctga tttttgcggt 60
 ataagaatat atactgatat gtatacccca agtatgtcaa aaagaggtgt gctatgaagc 120
 agcgtattac agtgacagtt gacagcgaca gctatcagtt gctcaaggca tatatgatgt 180
 caatatctcc ggctctggtaa gcacaacat gcagaatgaa gcccgtcgtc tgcgtgccga 240
 acgctggaaa gcggaaaatc aggaagggat ggctgaggtc gcccgggtta ttgaaatgaa 300

 cggtctcttt gctgacgaga acagggaactg gtgaaatgca gtttaaggtt tacacctata 360
 aaagagagag ccgttatcgt ctgtttgtgg atgtacagag tgatattatt gacacgccc 420
 ggcgacggat ggtgatcccc ctggccagtg cacgtctgct gtcagataaa gtctcccgtg 480
 aactttaccc ggtgggtgcat atcggggatg aaagctggcg catgatgacc accgatatgg 540
 ccagtgtgcc ggtctccgtt atcggggaag aagtggctga tctcagccac cgcgaaaatg 600
 acatcaaaaa cgccattaac ctgatgttct ggggaatata aatgtcaggc tccgttatac 660
 acagccagtc tgcaggctga cggtacccaa ggcggtggag aattcnnnnn nnnnnnnnnn 720

 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 780

gaattcggat ctggagcaac aaacttctca ctactcaaac aagcaggtga cgtggaggag 840
aatcccgggc ctcttagann nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn 900
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnncttagat aaattcgtca gtagggttgt 960
aaagggtttt cttttcctga gaaaacaacc ttttgttttc tcagggtttg ctttttgccc 1020
tttccttagc ttttaaaaaa aaaaagcaaa agacgctggg ggctggcact cctggtttcc 1080
aggacggggg tcaagtcctt gcgggtgtctt tgcttggtac cggttacta aaagccagat 1140

aacagtatgc gtatttgccg gctgattttt gcggtataag aatatatact gatatgtata 1200
cccgaagtat gtcaaaaaga ggtgtgctat gaagcagcgt attacagtga cagttgacag 1260
cgacagctat cagtgtctca aggcatatat gatgtcaata tctccggtct ggtaagcaca 1320
accatgcaga atgaagcccg tcgtctgcgt gccgaacgct ggaaagcgga aaatcaggaa 1380
gggatggctg aggtcgcccg gtttattgaa atgaacggct cttttgctga cgagaacagg 1440
gactggtgaa atgcagttta aggtttacac ctataaaaga gagagccgtt atcgtctgtt 1500
tgtggatgta cagagtgata ttattgacac gcccgggcga cggatggtga tccccctggc 1560

cagtgcacgt ctgctgtcag ataaagtctc cgtgaaactt taccgggtgg tgcataatcg 1620
ggatgaaagc tggcgcatga tgaccaccga tatggccagt gtgccggtct ccgttatcgg 1680
ggaagaagtg gctgatctca gccaccgca aaatgacatc aaaaacgcca ttaacctgat 1740
gttctgggga atataaatgt caggtctcgt tatacacagc cagtctgcag gtcgacggat 1800
cc 1802

<210> 2

<211> 2227

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fast-HDR donor plasmid backbone with internal promoter

<220><221> misc_feature

<222> (706)..(755)

<223> n is a, c, g, or t

<220><221> misc_feature

<222> (1309)..(1358)

<223> n is a, c, g, or t

<400> 2

ggtaccggct tactaaaagc cagataacag tatgcgtatt tgcgcgctga tttttgcggt 60
ataagaatat atactgatat gtataccga agtatgtcaa aaagaggtgt gctatgaagc 120

agcgtattac agtgacagtt gacagcgaca gctatcagtt gctcaaggca tatatgatgt	180
caatatctcc ggtctggtaa gcacaacat gcagaatgaa gcccgtcgtc tgcgtgccga	240
acgctggaaa gcggaaaatc aggaagggat ggctgaggtc gcccggttta ttgaaatgaa	300
cggtctcttt gctgacgaga acagggactg gtgaaatgca gtttaagggt tacacctata	360
aaagagagag ccgttatcgt ctgtttgtgg atgtacagag tgatattatt gacacgccc	420
ggcgacggat ggtgatcccc ctggccagtg cacgtctgct gtcagataaa gtctcccggtg	480
aactttacc ggtgggtgcat atcggggatg aaagctggcg catgatgacc accgatatgg	540
ccagtgtgcc ggtctccgtt atcggggaag aagtggctga tctcagccac cgcgaaaatg	600
acatcaaaaa cgccattaac ctgatgttct ggggaatata aatgtcaggc tccgttatac	660
acagccagtc tgcaggtcga cggtagccaa ggcggtggag aattcnnnnn nnnnnnnnn	720
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnngaatt caataaaaga tctttatttt	780
cattagatct gtgtgttgggt tttttgtgtg tcgctacaat atttccctga acggaagaat	840
aaataaaact tgcctgtaa agaaaacca ggtaaaggaa agtggcagtc cagactgccc	900
ggaagtctct ggaggtcaga gcctcacccc cgtcgcttga taggacctgc tgagccacat	960
gactaaggca cgatcgctc cgcacgtgta aaggtgctgg gttccaagat ggctgccccg	1020
ccgcgaggcc cgacttaagt atgtcacttc cgcaccagcg agaaaggcgg acccttcagc	1080
caatgaggcc atagggcggg gctaggccat gatgggcttt caaactacc aatagggcgt	1140
ccgaactaaa ggcctacaa agtaacgtca cgtcgagttg cagagcgccg gcaggcgggg	1200
cagaggtggc caagccaatg cgatggctgg ggcggggtcg gacgtctat aagttgtcga	1260
taggcgggca ctccgccta gattctaagg accgcgcca ccaccggtnn nnnnnnnnn	1320
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nnnnnnnntc tagataaatt cgtcagtagg	1380
gttgtaaagg tttttctttt cctgagaaaa caaccttttg ttttctcagg ttttgccttt	1440
tggcctttcc ctagctttta aaaaaaaaa gcaaaagacg ctggtggctg gcactcctgg	1500
tttcaggac ggggttcaag tcctcgcggt gtctttgctt ggatccggt tactaaaagc	1560
cagataacag tatcgctatt tgcgcgtga tttttgcggt ataagaatat atactgatat	1620
gtataccga agtatgtcaa aaagaggtgt gctatgaagc agcgtattac agtgacagtt	1680
gacagcgaca gctatcagtt gctcaaggca tatatgatgt caatatctcc ggtctggtaa	1740
gcacaacat gcagaatgaa gcccgtcgtc tgcgtgccga acgctggaaa gcggaaaatc	1800
aggaagggat ggctgaggtc gcccggttta ttgaaatgaa cggtctcttt gctgacgaga	1860
acagggactg gtgaaatgca gtttaagggt tacacctata aaagagagag ccgttatcgt	1920

ctgtttgtgg atgtacagag tgatattatt gacacgcccg ggcgacggat ggtgatcccc	1980
ctggccagtg cacgtctgct gtcagataaa gtctcccgtg aactttaccc ggtggtgcat	2040
atcggggatg aaagctggcg catgatgacc accgatatgg ccagtgtgcc ggtctccgtt	2100
atcggggaag aagtggctga tctcagccac cgcgaaaatg acatcaaaaa cgccattaac	2160
ctgatgttct ggggaatata aatgtcaggc tccgttatac acagccagtc tgcaggtcga	2220
cggatcc	2227