



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0105475

(43) 공개일자 2015년09월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C12N 15/85 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0276 (2013.01)
C12N 15/8509 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-7022085
(22) 출원일자(국제) 2014년01월14일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2015년08월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/011418
(87) 국제공개번호 WO 2014/110552
국제공개일자 2014년07월17일
(30) 우선권주장
61/752,232 2013년01월14일 미국(US)
61/870,570 2013년08월27일 미국(US)

(71) 출원인
리컴비네텍스 인코포레이티드
미국, 미네소타 55114, 세인트 폴, 스위트301, 유니버시티 애비뉴 웨스트 1246
(72) 발명자
파렌크루그, 스캇, 씨.
미국, 미네소타 55418, 미니애폴리스, 헤이즈 스트리트 노스이스트 2751
칼슨, 다니엘, 에프.
미국, 미네소타 55125, 우드버리, 주네아우 알코베 9127
(74) 대리인
김순웅

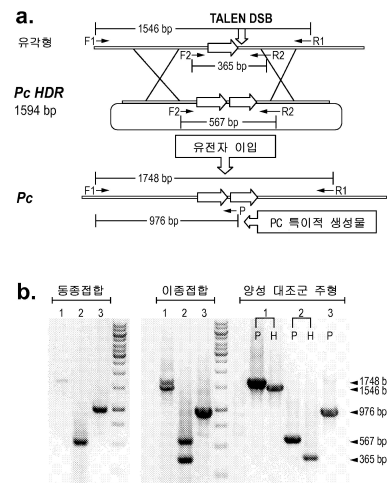
전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 유각의 가축

(57) 요약

다른 유전자 또는 염색체 부분의 변화없이, 소 종으로 무각 대립유전자(polled allele)를 이동시킴을 포함하는, 무각 대립유전자를 갖는 가축 제조용 조성물 및 제조방법이 제시되어 있다. 동물은 그들이 뿔을 갖지 않도록 유전자 변형(genetically modified)시킬 수 있다. 상기 한 과정은 소 무각 대립유전자의 유전자이입(introgression)을 포함한다. 이에 따라, 그들의 다른 형질에 대한 변화없이 무각 대립유전자를 받은 가축 품종이 만들어진다. 본 발명의 구현예는 유각 대립유전자로부터 무각 대립유전자로 게놈성(genomic) 변형을 포함하는 유전자 변형된 가축 동물이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A01K 2217/072 (2013.01)

A01K 2227/101 (2013.01)

A01K 2227/102 (2013.01)

A01K 2227/103 (2013.01)

A01K 2267/02 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

유각(有角) 대립유전자(horned allele)로부터 무각(無角) 대립유전자(polled allele)로의 게놈 변형을 포함하는 유전자 변형된(genetically modified) 가축 동물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 동물이 유각 대립유전자를 갖는 동물의 제1 품종(breed)이고 무각 대립유전자가 동물의 제2 품종에서 발견되는, 동물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 무각 대립유전자가 천연 대립유전자 및 합성 대립유전자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 동물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 천연 대립유전자가 상기 품종에 전형적이거나 품종에서 돌연변이 대립유전자인, 동물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 품종이 헤레포드(Hereford), 앵거스(Angus), 쇼르톤(Shorthorn), 카롤라이스(Charolais), 리무진(Limousin), 시멘탈(Simmental), 브라흐만(Brahman), 브란구스(Brangus), 와규(Wagyu), 및 산타 게르트루디스(Santa Gertrudis), 아이르셔(Ayrshire), 브라운 스위스(Brown Swiss), 캐나다엔(Canadienne), 도이치 벨테드(Dutch Belted), 구에른세이(Guernsey), 홀슈타인(Holstein) (홀슈타인-프리시안(Holstein-Friesian)), 저지(Jersey), 케리(Kerry), 밀킹 데본(Milking Devon), 밀킹 쇼르톤(Milking Shorthorn), 노르웨지안 레드(Norwegian Red), 부사(Busa), 캐나다엔(Canadienne), 에스토니아 레드(Estonian Red), 플렉바흐(Fleckveih), 프리이안(Frieian), 기롤란도(Girolando), 이라와라(Illawarra), 이리시 모일레드(Irish Moiled), 라인백(Lineback), 메우세 라인 이셀(Meuse Rhine Issel), 몽벨리아레데(Montbeliarède), 노르망디(Normande), 란달(Randall), 사히왈(Sahhiwal), 오스트레일리안 밀킹 제부(Australian Milking Zebu), 시멘탈(Simmental), 차이나나 마르키기아나(Chianina Marchigiana), 로마그놀라(Romagnola)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 동물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 품종이 앵거스(Angus), 레드 앵거스(Red Angus), 레드 폴(Red Poll), 갈로웨이(Galloway), 벨테드 갈로웨이(Belted Galloway), 아메리칸 화이트 파크(American White Park), 브리티쉬 화이트(British White), 아메리팍스(Amerifax), 자메이카 블랙(Jamaica Black), 자메이카 레드(Jamaica Red), 무레이 그레이(Murray Grey), 브란구스(Brangus), 레드 브란구스(Red Brangus), 세노폴(Senopol), 보어 고트(Boer goats)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 동물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 무각 대립유전자가 Pc 셀틱(Celtic) 기원 및 P_F 프리시안(Friesian) 기원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 동물.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 선조 동물 또는 선조 동물의 후손인, 동물.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 마커가 부재이고/이거나 리포터가 부재인, 동물.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 게놈 변형이 단지 무각 대립유전자에서만 변형된, 동물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 유전자 변형된 유기체가 소, 염소, 양 및 우제류로 이루어진 그룹으로부터 선택된, 방법.

청구항 12

가축으로서 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 동물 또는 상기 동물의 후손의 용도.

청구항 13

세포의 유각 대립유전자에 대한 게놈 변형을 포함하는 생체 외 세포.

청구항 14

제13항에 있어서, 유각 유전자좌에서의 변형이 유각 대립유전자로부터 무각 대립유전자로의 변형인, 세포.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 세포가 가축 세포인, 세포.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 소, 염소, 양 및 우제류로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 세포.

청구항 17

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 헤레포드(Hereford), 앵거스(Angus), 쇼르톤(Shorthorn), 카롤라이스(Charolais), 리무진(Limousin), 시멘탈(Simmental), 브라흐만(Brahman), 브랑구스(Brangus), 와규(Wagyu), 및 산타 게르트루디스(Santa Gertrudis), 아이르셔(Ayrshire), 브라운 스위스(Brown Swiss), 캐나다엔(Canadienne), 도이치 벨테드(Dutch Belted), 구에른세이(Guernsey), 홀슈타인(Holstein)(홀슈타인-프리시안), 저지(Jersey), 케리(Kerry), 밀킹 데본(Milking Devon), 밀킹 쇼르톤(Milking Shorthorn), 노르웨지안 레드(Norwegian Red), 부사(Busa), 캐나다엔(Canadienne), 에스토니아 레드(Estonian Red), 플렉베이(Fleckveih), 프리안(Frieian), 기롤란도(Girolando), 이라와라(Illawarra), 이리쉬 모일드(Irish Moiled), 라인백(Lineback), 메우스 라인 이셀(Meuse Rhine Issel), 몬트벨리아레데(Montbeliarrede), 노르망디(Normande), 란달(Randall), 사히왈(Sahhiwal), 오스트렐리안 밀킹 제부(Australian Milking Zebu), 시멘탈(Simmental), 차이안나나 마르키기아나(Chianina Marchigiana), 및 로마그놀라(Romagnola)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 가축 세포인, 세포.

청구항 18

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 1차 세포, 1차 체세포 또는 집합자인, 세포.

청구항 19

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 가축 줄기 세포 또는 원시 배아 세포인, 세포.

청구항 20

제13항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 변형되는 경우, 무각 대립유전자를 암호화하는 상동성 의존 재조합 주형을 포함하는, 세포.

청구항 21

제20항에 있어서, 세포의 유각 대립유전자에서 염색체 DNA를 절단하는 부위-지시된 엔도뉴클레아제를 추가로 포함하는, 세포.

청구항 22

동물을 클로닝하기 위한 제12항 내지 제21항 중 어느 한 항의 세포의 용도.

청구항 23

무각 대립유전자를 암호화하고, 천연 유각 대립유전자와 중첩되는 서열을 포함하는 분리된 핵산.

청구항 24

제23항의 분리된 핵산을 발현하기 위한 플라스미드.

청구항 25

가축 1차 세포, 가축 1차 체세포, 가축 줄기 세포, 가축 원시 배아 세포, 가축 접합자, 가축 배반포, 또는 가축 배아의 천연 유각 대립유전자를 변화시킴을 포함하고 상기 유각 대립유전자가 무각 대립형질 유전자로 변화되는 유전자 변형된 가축 유기체를 제조하는, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 가축은 소, 염소 및 양으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서,

- a. 천연 유각 대립유전자내 부위를 특이적으로 절단하는 부위 특이적 뉴클레아제를 암호화하는 핵산 및
- b. 무각 대립유전자를 포함하는 핵산 상동성 의존 재조합 주형

을 가축 1차 세포, 가축 1차 체세포, 가축 줄기 세포, 가축 원시 배아 세포, 가축 접합자, 가축 배반포 또는 가축 배아의 천연 유각 대립유전자로 도입함을 포함하는, 방법.

청구항 28

제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 부위 특이적 뉴클레아제가 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화인자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 및 클러스터되고 일정한 사이 공간 단축 팔린드롬 반복체(CRISPR)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 1차 체세포가 변화된, 방법.

청구항 30

제25항 내지 제28항 중 어느 하나에 있어서, 상기 배아가 변화된, 방법.

청구항 31

제25항 내지 제28항 및 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 접합자, 배반포 또는 배아를 잉태한 모 동물에 위치시킴을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 32

제25항 내지 제29항 중 어느 하나에 있어서, 전체 동물을 제조하기 위해 1차 세포, 1차 체세포 또는 접합자를 클로닝함을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 33

제25항 내지 제32항 중 어느 하나의 방법을 사용하여 제조된 가축 동물.

청구항 34

무각 표현형을 갖는 가축 선조 동물을 제조하기 위한 제25항 내지 제32항 중 어느 한 항의 방법의 용도.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 이들 각각이 본원에 참조로 포함된, 2013년 1월 14일자로 출원된 미국 가출원 제61/752,232호 및 2013년 8월 27일자로 출원된 제61/870,570호에 대한 우선권을 청구한다.
- [0003] 정부 지원 보고서(STATEMENT OF GOVERNMENT SUPPORT)
- [0004] 본원에 기술된 작업 양태는 미국 국립보건원(the National Institutes of Health)으로부터 그랜트 1R43RR033149-01A1 및 USDA - 국립 식품농업연구소(National Institute of Food and Agriculture)로부터의 생명공학 위험성 평가 프로그램 경쟁 그랜트 번호(Biotechnology Risk Assessment Program competitive grant number) 2012-33522-19766에 의해 지원된다. 미국 정부는 이들 발명에 특정 권리를 가질 수 있다.
- [0005] 본 기술 분야는 뿔을 갖지 않은 세포, 또는 동물과 같은 유전자 변형 유기체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0006] 가축 뿔은 다양한 종에서, 동물을 사육하기 보다 쉽게 만들기 위해 제거한다. 이들 뿔을 제거하는 다수의 접근법이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 발명의 요약
- [0008] 동물은 그들이 뿔을 갖지 않도록 유전적으로 변형시킬 수 있다. 상기 한 방법은 소의 무각(polled) 대립유전자의 유전자이입(introgression)을 포함한다. 따라서, 가축 품종은 그들의 다른 형질(trait)에 대한 변화없이 무각 대립유전자를 수용하도록 만들어진다.
- [0009] 본 발명의 일 구현예는 유각(horned) 대립유전자로부터 무각 대립유전자로의 게놈 변형을 포함하는 유전자 변형 가축 동물이다. 상기는 유각 대립유전자를 갖는 동물의 제1 품종이고, 무각 대립유전자는 동물의 제2 품종에서 발견된다. 무각 대립유전자는 천연 또는 합성일 수 있다.
- [0010] 본 발명의 일 구현예는 세포의 유각 대립유전자에 대한 게놈성 변형을 포함하는 생체 외(in vitro) 세포이다. 유각 대립유전자(유각 좌위)의 변형은 유각 대립유전자로부터 무각 대립유전자로의 게놈성 변형이다. 세포는 가축 세포일 수 있다.
- [0011] 본 발명의 일 구현예는 가축 1차 세포, 가축 1차 체세포, 가축 줄기세포, 가축 원시생식세포, 가축 접합자, 가축 배반포, 또는 가축 배아의 천연 유각 대립유전자를 변화시켜, 유각 대립유전자가 무각 대립유전자로 바뀔 수 있도록 포함하는, 유전자 변형 가축 유기체의 생성 방법이다.
- [0012] 구현예들은 리포터 유전자없이 세포를 호밍 엔도뉴클레아제(homing endonuclease)(부위-특이적 엔도뉴클레아제)에 노출시키고, 클론 세포의 콜로니를 생성하며, 표적 염색체 부위에 변형을 포함한 콜로니를 동정하기 위하여 콜로니 구성원의 서브셋을 시험함을 포함하는 상기 방법들 중 어느 하나를 포함한다.
- [0013] 추가의 구현예는 하나 이상의 이들 방법에 따라 제조된 유기체 (유전자 변형 동물, 유전자 변형 선조 동물(founder animal), 또는 유전자 변형 세포)에 관한 것이다. 구현예들은 이들 기술에 포함되는 플라스미드, 벡터, 및 단리된 핵산, 예를 들어, 부위-특이적 엔도뉴클레아제 및 이들을 발현하기 위한 HDR 주형 및 벡터를 포함한다.
- [0014] 본 발명의 구현예들은 가축을 만들기 위한 변형 세포의 용도를 포함한다. 클로닝은 동물의 한 제조 기술이다.
- [0015] 구현예들은 가축으로서 변형 동물 또는 그들의 후손의 용도를 포함한다. 세포 또는 동물의 제조 방법은 무각

표현형을 갖는 선조 가축(livestock founder animal)의 제조를 위한 것일 수 있다.

- [0016] 하기 특허출원은 이로써 본 명세서에 모든 목적을 위해 참조로 포함되고; 논쟁시, 명세서는 조절된다: US 2010/0146655, US 2010/0105140, US 2011/0059160, US 2011/0197290, 2월 24일자로 출원된 미국 특허원 제 13/404,662호, 2011년 2월 25일자로 출원된 미국 특허원 제 61/446,651호, 2012년 6월 21일자로 출원된 미국 특허원 제 61/662,767호, 및 2012년 8월 24일자로 출원된 제 13/594,694호. 이들 특허출원은 각각 이로써 본 명세서에 모든 목적을 위해 참조로 포함된다.

과제의 해결 수단

- [0017] 발명의 상세한 설명
- [0018] 본 명세서에 보고된 바와 같이, 뿔이 없는(hornless) 가축은 유전학적 기술을 사용하여 제조해 왔다. 통상 뿔은 있지만, 자발적 돌연변이로 인하여, 뿔이 없는 동물을 무각(polled) 동물이라 부른다. 낙농장 경영자 및 소의 후생을 보호하기 위하여, 뿔은 통상 미국, 유럽 및 다른 지역에서 대부분의 젖소로부터 손으로 제거된다. 제각(de-horning)은 고통스럽고, 동물 스트레스에 일시적인 상승을 나타내며, 동물 생산에 대한 비용을 부가시키고, 후속되는 손상으로부터 동물을 보호하고자 하는 의도에도 불구하고, 그 실행은 일부 비인간적인 것으로서 보여진다. 일부 소 품종은 자연적으로 뿔이 없고(horn-free) (예: 앵거스종), 우세한 POLLED로서 언급되는 형질이다. 본원에 제시된 기술은 제각을 수행할 필요가 없는 동물을 제공함으로써 동물의 행복을 개선시킨다. 무각(polledness)을 부여하는 2개의 대립유전자 변이체가 최근 염색체 1에 대해 확인되었다. 이들 돌연변이 중 하나를 갖는 젖소는 드물고, 일반적으로 낙농 유전 선택 지수(dairy genetic selection indices)에 대해 그들의 유각 카운터파트(horned counterpart)보다 훨씬 더 낮게 매겨진다. 유각 품종으로 POLLED 대립유전자의 감수분열 유전자이입은 전통적인 교잡육종에 의해 성취될 수 있지만, 교잡육종된 동물의 유전적 이점은 생산성을 회복하기 위해 선택적 육종의 많은 너무 긴 세대를 겪어야 하고 필요로 한다.
- [0019] 유전학자는 수십년 동안 무각의 유전적 좌위에 대해 추구해 왔다. 간단히 말해서, 무각은 20년 동안 집중적인 현대 연구의 목적이었다. Allais-Bonnet et al. (2013) Novel Insights into the Bovine Polled Phenotype and Horn Ontogenesis in Bovidae. PLoS ONE 8(5):e63512를 참조하라. 무각 돌연변이는 많은 품종에서 소 염색체 1에 대해 신속히 맵핑되었지만, 무각의 유전적 원인의 실제 부위는 다양한 이유로 찾기 어려웠다. 그러나, 아주 최근에, 적어도 2개의 무각 대립유전자 (하나는 "Celtic"이고, 하나는 "Friesian")가 존재하고, 후보 돌연변이는 이들 각각에 대해 제안되었다고 밝혀졌다. (참조: Medugorac et al. (2012) Bovine polledness - an autosomal dominant trait with allelic heterogeneity. PLoS One 7:e39477). 이들 돌연변이 중 어떠한 것도 알려진 암호화 또는 조절 영역에 위치하지 않았다. 여기에서, 본 발명자는 비-무각 (유각) 동물의 견줄만한 부위에 유전적 변화를 만들어 무각 표현형(polled phenotype)을 생성할 수 있음을 보여주고 있다.
- [0020] 그러나, 동물에 무각을 생성하고, 동물의 게놈에 충격을 주지 않으면서 그렇게 할 수 있다. Celtic POLLED 대립유전자 (Pc 대립유전자로서 또한 언급됨)의 비-감수분열 유전자이입 (10 bp를 대체하는 212 bp의 중첩(duplication))은 유각 낙농 번식용 숫소(dairy bulls)로부터 유도된 섬유아세포에서 성취되었다. Celtic POLLED 대립유전자를 포함하는 1594 bp 단편을 함유하는 플라스미드 HDR 주형을 앵거스 품종으로부터 취했다 (도 1 패널 a). TALENs는 그들이 HORNED 대립유전자를 절단할 수 있지만 POLLED 대립유전자에는 영향을 주지 않도록 설계되었다. 놀랍게도, 이 실험은 mRNA로서 전달된 한 쌍의 TALEN이 플라스미드 발현 카세트와 비교하여 유사한 활성을 갖는다고 제시하였다 (데이터는 제시되지 않음). 따라서, TALEN 발현 플라스미드의 가능한 게놈성 유전자이입을 제거하기 위하여 mRNA로서 TALEN을 전달한 실험을 수행하였다. 226개 콜로니 중 5개(2%)가 POLLED의 유전자이입을 확인하기 위해 도 1 패널 b에 제시된 PCR 시험을 각각 통과했다. 5개 클론 중 3개는 POLLED 유전자이입을 위해 동종접합되었고, 의도하는 대립유전자와 100% 동일한 것으로 서열화에 의해 확인되었다 (데이터는 제시되지 않음).
- [0021] 동물 교배 또는 인공 생식 기술을 기반으로 하는 기존 육종 프로그램은 궁극적으로 원하는 형질을 생성하거나 결합하는 유전자들의 양호한 조합을 생성하고자 하는 바람으로 많은 유전자를 혼합하는 것을 포함한다. 형질전환 기술은 기존 육종 과정을 가속화시키는 약속을 지속하고 있다. 형질전환 과정의 일부 단점은 과정이 개선되지만, 그럼에도 불구하고 느리고, 비싸고, 노동-집약적이라는 것이다. 저효율성 및 결과의 예측불가능이 통상적이다. 또한, 의도된 게놈 부위만 변화시키는 과정은 통상 알려져 있지 않다.
- [0022] 본 발명자는 농업용, 연구 도구용 또는 생물학적 목적에 유용한 다양한 가축 세포 및/또는 동물에서 다양한 유

전자의 정밀하고 높은 빈도의 교정(editing)을 개발하였다. 이들 가축 유전자-교정 과정은 플라스미드, rAAV 및 올리고뉴클레오타이드 주형을 사용하는 TALEN 및 CRISPR/Cas9 자극된 상동-지시 복구(homology-directed repair)(HDR)를 포함한다. 본 발명자는 본원에서 소 POLLED 대립유전자가 유각 홀스타인종 섬유아세포로 유전자이입되었음을 보여준다. 이 예는 뿔이 없는 다양한 품종의 젖소가 생성될 수 있음을 나타내는 것이다. 또한, 이러한 변화는 동물의 다른 유전자, 또는 계통의 다른 부분에 방해없이 이루어질 수 있다. 이들 과정은 유전적 변화가 리포터 없이 및/또는 선택 마커없이 이루어질 수 있도록 하기에 높은 효율을 성취하기 위하여 본 발명자에 의해 개발되었다. 더욱이, 상기 과정은 의도하는 부위에서만 의도하는 변화를 갖는 유전자 변형 동물을 제조하기 위하여 선조 세대에 사용될 수 있다. 이들 방법은 연구, 농업 및 생물학적인 응용을 위해 가축 세포, 포유동물 및 가축에 무각(polled) 및 유각의 (hornless) 대립유전자의 감수분열-없는 동종(intra-specific) 및 이종(inter-specific) 유전자이입을 설명하는 것이다.

[0023]

도 1은 소 DNA의 적절한 부위에 결합되고 절단되는 부위-특이적 뉴클레아제(site-specific nucleases)를 제조할 수 있는 지를 결정하는 실험을 기술하고 있다. 문제점 중 하나는 원하는 결합 부위에 반복 서열이 분자간 재조합의 높은 가능성으로 인하여 표적화를 혼란시킬 수 있음을 명심하면서, 탠덤 반복체가 결합될 수 있는 지를 결정하는 것이었다. 더욱이, 이들 결합은 배양시 살아있는 세포에서 효율적이고, 상호 협조적이어야 한다. 유각 대립유전자는 특히, 유각 대립유전자에 대한 무각 대립유전자의 높은 유사성으로 인하여 도전적이다. TALEN 결합 부위에 대해 선택된 위치는 명백하지 않았고; 성공적인 TALEN 설계는 유각 좌위를 절단 및 결합할 수 있으나, TALEN이 무각 대립유전자를 절단할 수는 없다. 이들 설계의 발견은 본 발명의 연구에 있어서 중요한 성취였다. 이 접근법의 성공은 예상할 수 없었다. 도 1에 제시된 바와 같이, 표적으로서 선택된 유각 대립유전자는 212개 잔기를 갖고, 무각 대립유전자는 상기 212개 잔기의 반복체를 가졌다. 무각 대립유전자는 추가로 반복체 사이에 10개 염기쌍(bp)이 결실되었다. 패널 a)는 212개 bp 서열을 도시하고 있으며, 10 bp는 좌측 TALEN (검정 역삼각형으로 표시됨)과 우측 TALEN (검정 삼각형으로 표시됨) 사이에 말단에서 결실되어야 한다. TALEN 쌍은 이에 따라 10 bp 결실 부위의 한 가장자리에 놓였다. TALEN 쌍은 10 bp 결실 영역의 유각 대립유전자를 절단했다. 상동 의존적 재조합(homologous dependent recombination)(HDR) 주형은 TALEN이 결합된 위치 사이에 212개 잔기 반복체(실제로 그것은 10 bp 결실된 반복체가므로 202개 잔기임)의 삽입을 안내하기 위하여 사용되었다. 무각에서 패널 a)에 도시된 바와 같이, 좌측 TALEN 및 우측 TALEN은 이어서 202개 잔기에 의해 분리된다. 그리고 무각 대립유전자의 재절단은 감소된다.결합 및 절단이 합당하게 성취될 수 있는 지를 결정하기 위하여 다양한 TALEN을 제조하였다. 패널 b)의 표는 시험한 TALEN의 일부를 열거하고 있다. 패널 c)는 %NEJ로 측정된 그들의 유효성을 갖는 시험 결과를 나타낸다. 세 번째 레인의 TALEN, HP1.3은 이어서 무각 대립유전자의 유전자이입을 위해 사용되었다.

[0024]

부위-특이적 (또는 표적화됨으로서 언급됨) 엔도뉴클레아제의 재-결합을 감소시키기 위한 구현에는 표적화된 뉴클레아제 시스템 및 외인성 대립유전자를 포함하는 HDR 주형을 세포로 도입시킴을 포함하며, 표적화된 뉴클레아제 시스템은 염색체 DNA의 내인성 동종 유각 대립유전자 서열을 특이적으로 결합하는 DNA-결합 구성원을 포함하는, 세포의 염색체 DNA로 외인성 무각 대립유전자의 유전자이입을 위한 상동-지시 복구(HDR) 방법을 포함하며, 이때 표적화된 뉴클레아제 시스템 및 HDR 주형은 HDR 주형 서열에 대한 동정성(identity)을 갖도록 염색체 DNA를 변화시키고, 내인성 대립유전자 대신에 외인성 대립유전자를 염색체 DNA로 유전자이입시키도록 작동하며, 여기서 HDR 주형 서열은 HDR 주형 서열에 대한 DNA-결합 구성원의 특이적 결합을 감소시키도록 설계된다.

[0025]

도 2는 유각 대립유전자를 갖는 세포로 무각 대립유전자를 유전자이입시키기 위한 연구 계획 및 결과를 나타낸다. 유각 대립유전자는 PCR 프라이머 F1 및 R1 사이에 1546 bp를 갖는다. 이 서열에서, PCR 프라이머 F2 및 R2 사이에 365 bp가 있다. 화살표로 표시된 212 bp 서열을 갖는 유각 대립유전자가 이 영역에 존재한다. 기저의 POLLED 대립유전자는 10 bp의 결실부(제시되지 않음)와 함께 212 bp (2개의 화살표로 제시된)의 탠덤 반복체를 갖는다. PCR 프라이머 F2 및 R2 사이의 길이는 567 bp이고; 567 bp는 365 bp의 유각 대립유전자 + 212 bp 반복체 - 10 bp 결실부이다. HDR 주형의 길이는 1594 bp였다. 주형 서열이 세포의 염색체로 유전자이입되면, 프라이머 F1 및 R1 사이에 1746 bp가 존재하고; 1746은 1546 bp의 유각 대립유전자 + 212 bp의 반복체 - 10 bp 결실부이다. 또한, 무각 대립유전자에 대해 독특한 PCR 생성물은 탠덤 반복체 영역에 P로서 제시된다. TALEN은 특히 HDR 주형을 사용하는 상동 재조합에 의해 복구될 수 있는 HORNED 대립유전자 (도 1)를 표적으로 하도록 개발되었다. TALEN 및 HDR 주형을 받은 세포는 희석시키고, 배양하여 클론 콜로니를 복제할 수 있도록 하는 단일 세포로서 플레이팅시켰다. 콜로니의 구성원은 무각 대립유전자에 대해 시험했다. 패널 b는 POLLED의 동종접합 또는 이종접합 유전자이입에 의한 콜로니의 대표적인 영상을 나타낸다. 3개의 프라이머 세트가 후보 콜로니의 양성 분류를 위해 사용되었다: F1+R1, F2+R2 및 F1+P (POLLED 특이적). PCR 생성물의 동정은 F1+R1 앰플

리콘 (amplicon)을 서열화하여 확인하였다.

[0026] 도 3은 무각 변환의 한 예이다. 무각 대립유전자는 상이한 HDR 주형이 사용된 것을 제외하고, 도 1 및 2에 대해 기술된 것과 유사한 방식으로 세포로 유전자이입시켰다. 주형은 길이가 591 bp였다:

[0027] 5'gtctggggtgagatagttttcttggtaggctgtgaaatgaagagtacgtggtagcactactttctgagctcacgcacagctggagctctgcgcctttctgtttatactgcagatgaaaacattttatcagatgtttgcctaagtatggattacatttaagatacatattttctttctgtctgaaagtctttgtagtgagacagagctggaattatgtctggggtgagatagttttctttgctcttttagatcaaaactctcttttcatttttaagtctatcccaaaagtgtgggaggtgtccttgatgttgaattataggcag (서열번호: 14). 화살촉으로 제시된 바와 같이, 12개의 콜로니 중 하나는 무각 대립유전자의 유전자이입을 예시하는 PCR 생성물을 가졌다.

[0028] 도 4는 무각 대립유전자를 세포로 유전자이입시키기 위한 다른 도식을 도시하고 있다. 325 bp의 HDR 주형이 사용되었다. 유전자이입된 대립유전자는 무각 레드 앵거스종이었고, 수령자는 유각 홀스타인종 섬유아세포였다. 주형은 29 bp의 상류 오버랩(upstream overlap) 및 84 bp의 하류(downstream) 오버랩을 가졌다. 212 bp 반복체는 오버랩 사이에 존재했다. 반복체는 본래 212 bp 서열의 10 bp 결실에 대한 대체물로서 사용되었다. 이 과정은 도 1 내지 3에 기술된 것들과 유사하되, 단 TALEN의 열변성(단일 가닥) 올리고머가 사용되었다. 도 4, 패널 b 및 c에 제시된 바와 같이, 두 조건이 시험되었다. 패널 b)에서, 세포는 2 μ g TALEN mRNA + Gal4:RecA로 코팅시킨 500 ng ssDNA로 형질감염시켰다. 각각의 레인/PCR 반응은 형질감염된 집단으로부터 회석된 ~3 세포 당량으로 이루어진다. 유각 세포로부터 프라이머 btHP-F1 및 btHP-R1을 사용한 PCR로 389 bp의 생성물이 생성된다. 무각으로의 변환으로 202개 염기쌍의 네트 삽입이 이루어지며; 이에 따라 동일한 프라이머의 PCR 생성물은 591 bp 생성물 (좌측 여백의 화살표)을 생성한다. 무각 변환을 나타내는 생성물과의 반응 수가 상부 우측 코너에 제시되어 있다. 패널 c) 2 μ g TALEN mRNA + 1,500 ng ssDNA로 형질감염시킨 유각 홀스타인종 섬유아세포 중 무각 변환의 PCR 평가. 무각 변환을 나타내는 생성물과의 반응 수가 상부 우측 코너에 제시되어 있다.

[0029] 도 5는 CRISPR/Cas9에 의한 대립유전자 유전자이입을 나타낸다. 이 방법은 TALENs 방법과 비교한다. 유전자이입된 대립유전자는 선종성 결장 폴립(Adenomatous polyposis coli; APC)이다. 패널 a)에서 APC14.2 TALEN 및 gRNA 서열 APC14.2 G1a가 야생형 APC 서열에 대해 제시되어 있다. 하기에, 새로운 HindIII 부위를 생성하는 4 bp 삽입부(참조: 박스 영역)를 전달하는 HDR 올리고가 제시되어 있다. 이어서, 2 μ M 올리고 HDR 주형, 및 1 μ g TALEN mRNA, hCas9를 암호화하는 플라스미드 DNA와 gRNA(guidance RNA) 발현 플라스미드 각각 1 μ g; 또는 1 μ g의 hCas9를 암호화하는 mRNA 및 0.5 μ g의 gRNA 발현 플라스미드로 형질감염시킨 돼지 섬유아세포를 스플릿팅시키고, 10일째 까지 37°C에서 확장전 3일 동안 30 또는 37°C에서 배양시켰다. 패널 b)에서, 차트는 RFLP 및 서베이어 검정 결과를 나타낸다. 앞서 측정된 바와 같이, TALEN 자극 HDR은 30°C에서 가장 효율적인 반면에, CRISPR/Cas9 매개된 HDR은 37°C에서 가장 효과적이었다. 이 좌위의 경우, TALEN은 서베이어 검정으로 측정된 유사한 DNA 절단 빈도에도 불구하고, HDR의 자극에 대해 CRISPR/Cas9 시스템보다 더 효과적이었다. TALEN과 대조적으로, hCas9가 mRNA 대 플라스미드로서 전달된 경우, HDR에서 차이가 거의 없었다.

[0030] 본 명세서의 기술을 고려해 보면, 부위-특이적 엔도뉴클레아제(예: TALEN)에 의한 무각 동물의 생성이 교시되어 있다. 유전자 변형 가축의 제조시 장벽 중 하나는 동물 세포에 대한 변형 효율이 통상적인 최상의 실행에 의해서도 단지 몇 %라는 것이다. 심지어 낮은 효율이 초파리 또는 마우스와 같은 유전 변형 하등 동물의 생성시 유용할 수 있는데, 이는 그들이 성공적으로 변형된 몇몇이 존재하는 지를 결정하기 위하여 수많은 동물의 생성, 테스트 및 선별을 위해 제공하는 짧으며 다산의 생식 주기를 갖기 때문이다. 그러나, 통상적으로 성취되는 이들 효율 수준은 훨씬 더 긴 임신시기 및 임신시 비교적 적은 수의 후손을 갖는 가축 우제류(artiodactyl)에는 적합치 않다. 가축을 변형시키기 위한 유전적 도구의 사용에 대한 다른 장벽은 1차 세포에서 DNA의 엔도뉴클레아제-매개된 변형이 어렵다는 것으로, 이는 세포가 불안정하기 때문이다. 실제로, TALEN-매개된 세포의 빈도는 강화 또는 선택 방법의 부재시 시간이 경과함에 따라 상당히 감소된다. 특별한 이론으로 제한하지 않으면서, 비-의도된 부위에서 DNA 절단은 세포사 또는 장애 비-표적 유전자를 유도함으로써 세포의 안정성을 보완할 수 있다고 이론을 제시하고 있다. 용어 1차 세포는 살아있는 동물로부터 단리된 세포를 의미하며, 이때 세포는 조직으로부터 그의 단리 이후 0 내지 2회의 복제를 수행한다. 결과적으로, 성공적인 유전자 변형을 위한 형질전환된 세포를 생성 및 시험하기 위해 통상 사용되는 기술은 그들의 보다 성숙되려는 경향으로 인하여 1차 세포에 사용될 수 없다. 결과적으로, 체세포 핵 전달을 위한 일차 세포 변형 또는 다른 동물 복제 기술을 수반하는 통상적인 접근법을 이용하는 경우 높은 성공률을 기대하는 것을 무리가 있다. 그러나 본원에서 보고된 바와 같이, TALENs 및 다른 부위-특이적 뉴클레아제 틀은 유전적으로 변형된 가축 일차 세포를 제조하는데 사용된다. 이들 변형은 복제 또는 직접-배아 주입(direct-embryonic injection)에 의해 유전적으로 변형된 동물 주의 선조를

만드는데 적합하다.

[0031]

본 발명의 구현에는 유전적으로 가축, 예컨대 소, 버팔로, 우제류(artiodactyls), 염소 또는 양을 변형하고, 이를 통해 동물, 및 그들의 자손들이 각을 갖지 않도록 부위-특이적 엔도뉴클레아제를 이용하기 위한 조성물 및 방법이다. 통상적인 공정을 이용하여 이러한 동물들을 만드는 많은 문제점들이 상기에서 논의되었다. 상기 유전적 변형은 예를 들면, 삽입, 결실, 외인성 핵산 절편의 삽입 또는 변화, 도치, 전좌, 이중간 대립유전자 이동, 동종간 대립유전자 이동, 천연, 합성 또는 신규 대립유전자에 대한 유전자 전환일 수 있다. 예를 들면, 염색체 또는 염색체 쌍에서의 원하지 않는 돌연변이들이 정상 서열을 대체할 수 있다. 일반적으로, 표적 DNA 부위가 동정되고 특이적으로 해당 부위에 결합하는 TALEN-쌍이 만들어진다. 상기 TALEN 은 세포 또는 배아로, 예컨대 단백질, mRNA 로써 또는 TALEN을 암호화하는 벡터로써 전달된다. 상기 TALEN은 이 후 복구되는 이중-나선 손상을 만들기 위하여 DNA를 절단하며, 종종 인델(indel), 또는 융합 서열 또는 삽입된 또는 변형된 서열을 이용하여 손상을 복구하기 위한 주형으로 제공되는 외인성 핵산의 수반을 포함하는 다형성을 야기한다. 상기 용어 외인성 핵산은 핵산이 동일하거나 세포 내에 자연적으로 존재하는 핵산 서열과 구별되는 핵산인지 여부와 관계없이 세포 또는 배아에 추가되는 핵산을 의미한다. 외인성 서열은 상기 서열이 실제로 염색체 DNA로 삽입된 핵산인지 또는 상기 서열이 세포성 DNA를 변화시키기 위한 주형으로 사용된 서열인지와 무관하게 표적 세포를 변화시키기 위해 이용되는 서열을 말한다. 상기 용어 핵산 절편은 광범위하며 염색체, 발현 카세트, 유전자, DNA, RNA, mRNA 또는 이들의 부분을 포함한다. 용어 ssDNA는 ss-올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 세포 또는 배아는 예를 들어, 가축, 우제류, 소, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군 유래로부터 선택될 수 있다. 용어 가축은 식품 또는 생물학적 재료를 위한 상품으로 키워지는 가축을 의미한다. 용어 우제류(artiodactyl)는 우제목의 발굽이 있는 포유류를 의미하며 이는 소, 사슴, 낙타, 하마, 양 및 염소를 포함하고, 이는 각 발에 짝수개의 발가락, 일반적으로 두개 또는 때때로 네개를 갖는다.

[0032]

일 구현에는 부위-특이적 뉴클레아제 (예컨대, TALEN-쌍) 에 의해서 특이적으로 결합되는 부위에서 세포 또는 배아의 DNA에 대한 유전적 변형을 만드는 TALEN-쌍 또는 다른 부위-특이적 뉴클레아제 시스템의 세포 또는 배아로의 도입, 및 상기 세포로부터 가축 동물을 생산하는 것을 포함하는 유각 대신 무각을 갖는 유전적으로 변형된 가축을 만드는 조성물 또는 방법에 관한 것이다. 직접적인 주입이 세포 또는 배아, 예를 들어 접합자(zygote), 배반포(blastocyst), 또는 배아로의 주입을 위하여 사용될 수 있다. 선택적으로, 상기 부위-특이적 뉴클레아제, HDR 주형, 및/또는 다른 인자들이 단백질, RNA, mRNA, DNA 또는 벡터의 도입을 위한 많은 알려진 임의의 기술을 이용하여 세포로 도입될 수 있다. 유전적으로 변형된 동물들은 알려진 공정, 예컨대 임신 숙주로의 배아의 이식 또는 다양한 복제 방법에 따라 배아 또는 세포로부터 만들어 질 수 있다. 상기 구 "TALEN 에 의해서 특이적으로 결합되는 부위에서 세포의 DNA에 대한 유전적 변형" 또는 "표적화된 염색체 부위", 또는 이와 같은 것들은 유전적 변형이 TALEN이 특이적으로 이들 표적 부위에 결합한 경우, TALEN 상의 뉴클레아제에 의하여 절단되는 부위에서 유전적 변형이 만들어지는 것을 의미한다. 상기 뉴클레아제는 TALEN-쌍 결합부에서 정확하게 절단하는 것은 아니며 오히려 두개의 결합 부위 사이의 결정된 부위를 절단한다.

[0033]

또다른 이러한 구현에는 유각 대립유전자 대신 무각 대립유전자를 만들기 위한 세포 또는 배아의 처리법 또는 조성물에 대한 것이다. 상기 세포 또는 동물 배아는 연구, 또는 동물 복제를 위하여 사용될 수 있다. 가축, 우제류, 소, 염소, 양의 상기 세포들은 배양된 세포, 불멸화된 세포, 일차 세포, 일차 체세포, 접합자, 생식세포, 원시 생식세포, 배반포, 또는 줄기세포일 수 있다. 예를 들면, 구현에는 복수의 배양 내 일차 세포를 TALEN 단백질 또는 TALEN 또는 TALEN 들을 암호화하는 핵산에 노출시키는 것을 포함하는 유전적 변형 창조 방법 또는 조성물이다. TALEN 은 단백질 또는 핵산 절편으로써, 예컨대 mRNA 또는 벡터 내 DNA 서열에 의하여 암호화되어 도입될 수 있다.

[0034]

무각이 되기 위한 동물의 유전적 변형은 리포터 이용과 함께 또는 이것 없이 만들어질 수 있다. 회피 리포터(Avoiding reporter)는 이것이 이 후에 제거되지 않아도 되기 때문에 또는 만약에 이것이 제거되더라도 용인되기 때문에 유용하다. 그러나 배아/세포-수준 변형 단계에서의 리포터의 발현은 리포터를 발현하지 않는 세포의 제거를 가능하게 한다. 선택적으로, 이것은 복제 또는 다른 동물 형질전환 기술에 의한 동물에서의 사용, 또는 추가적인 배양 및/또는 수의 증식 및/또는 추가적인 벡터의 첨가 및/또는 핵산 및/또는 TALEN 및/또는 다른 유전적 변형을 위한 이차 배지로의 이동을 위하여 배양물로부터 리포터를 발현하는 세포 이동을 가능하게 한다. 선택 세포는 대상 유전자와 독립적인 그들의 리포터 발현에 기초하며, 이것은 공동-선택 과정의 유형이다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 리포터는, 리포터 및 선택 마커를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 선택 마커는 유전적으로 발현되는 생체 분자이며 이는 양성 또는 음성 생존 선택 기준에 의하여 단리를 가능하게 하는 특징을 부여한다. 상기 리포터는 예를 들면, 형광 마커, 예컨대 녹색 형광 단백질 및 황색 형광 단백질일 수

있다. 상기 리포터는 선택 마커일 수 있으며, 예를 들어, 플로마이신, 간시클로비르, 아데노신 디아미나아제(ADA), 아미노글리코사이드 포스포트랜스퍼라아제(neo, G418, APH), 디히드로 엽산환원효소(DHFR), 하이그로마이신-B-포스포트랜스퍼라아제, 티미딘 키나아제(TK), 또는 잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라아제(XGPR)일 수 있다. 다른 표현형 마커가 동물 선택에 사용될 수 있다; 이러한 마커들은 판별할 수 있는 생리적 특징(예를 들면, 에피토프 또는 색), 성장 속도, 및/또는 생존능력에 기초한다. 유전적으로 변형된 세포, 배아 또는 동물을 제조하기 위한 공정은 뉴클레아제-융합 시스템, 예컨대 Cas9 또는 TALEN에 노출된 세포 또는 배아의 리포터의 발현에 대한 분석 및 유전적으로 변형된 가축 및/또는 우제류 또는 다른 동물(어류, 제브라 피쉬, 개, 마우스, 조류, 닭, 랫트 또는 실험 동물)을 만들기 위한 방법 또는 조성물에서 세포 또는 배아를 이용하는 것을 포함한다. 예를 들면, 일차 세포는 세포 배양물로부터 제거되고 복제에 사용될 수 있다. 또는, 일차 세포는 배양물로부터 제거되고 복제 주를 만들거나 추가 공정을 위하여 2차 배양물에 위치될 수 있다. 또는 리포터를 발현하는 배아 또는 접합자는 리포터를 발현하지 않는 다른 배아 또는 접합자가 복제에 사용될 수 없는 것에 반해 대리모로의 이식 또는 복제에 사용되기 위하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 리포터는 마커를 발현하는 세포 또는 배아를 선택하기 위하여 사용되는 선택 마커이다.

[0035] 일부 가축의 형질은 예컨대 다형성(큰 또는 작은), 단일 뉴클레오티드 다형성, 결실, 삽입, 또는 다른 변이체와 같은 대립유전자와 관련되어 있다. 예를 들어, 블루 벨지안 소(Belgian Blue cattle) 유래의 미오스타틴 대립유전자(11bp 결실)은 이중-근육(double-muscling) 표현형을 유발하는 것으로 잘 알려져 있다. 상기 블루 벨지안 대립유전자는 정상 발달을 방해하지 않는다.

[0036] 유사하게, 무각 대립유전자에 대하여, 본원에서 개시하는 방법은 정밀하게 그리고 다른 유전자의 파괴 없이 그리고 외인성 유전자의 융합 없이 상기 대립유전자를 위치시킨다. 무각 대립유전자는 각의 비-발달과 관련되어 있으므로, 무각이 되도록 변형된 배아(직접적 주입 또는 복제에 의하여)들은 성공적으로 잉태될 것이 기대되며, 결과적으로 건강한 동물의 출산이 기대된다. 세포들은 유각 대립유전자에서 무각 대립유전자로 변형되고, 서류시점으로부터, 이들 세포로부터 동물을 복제하고, 살아있는 동물을 생산하기 위한 단계들이 수행된다.

[0037] 본 발명의 구현예는 제 1의 가축 계보/품종의 유각의 대립형질유전자를 암호화하는 핵산의 존재 하에 제 2의 가축 계보/품종의 세포 또는 배아 내에서 TALENs 쌍으로 DNA를 절단하는 단계를 포함하는, 제 1의 가축 계보 또는 품종으로부터 제 2의 가축 계보 또는 품종으로 유각의 대립유전자의 전이 방법이다. 배아 또는 세포는 제 1의 계보/품종의 유각의 대립유전자를 가지는 제 2의 계보/품종의 동물을 생산하는데 이용될 수 있다. 상기 DNA는 상동-의존성 복구(homology-dependent repair)를 위한 주형을 제공하는 대립유전자를 포함한다. 주형으로서, 이는 각 절단면에서 DNA의 일부에 대해 상동성을 가지며, 또한 원하는 대립유전자를 함유한다.

[0038] 본 발명의 구현예는 한 품종에서 다른 품종으로 유각의 대립유전자를 이동하는 것을 포함한다. 예를 들어, 대립유전자는 앵거스 소에서 다른 소로 이동될 수 있다. 유각의 품종은 포함한다: 헤레포드(Hereford), 앵거스(Angus), 쇼르톤(Shorthorn), 카롤라이스(Charolais), 리무진(Limousin), 시멘탈(Simmental), 브라흐만(Brahman), 브란구스(Brangus), 와규(Wagyu), 및 산타 게르트루디스(Santa Gertrudis), 아이르셔(Ayrshire), 브라운 스위스(Brown Swiss), 캐나다엔(Canadienne), 도이치 벨테드(Dutch Belted), 구에른세이(Guernsey), 홀슈타인(Holstein) (홀슈타인-프리스리안(Holstein-Friesian)), 저지(Jersey), 케리(Kerry), 밀킹 데본(Milking Devon), 밀킹 쇼르톤(Milking Shorthorn), 노르웨지안 레드(Norwegian Red), 부사(Busa), 캐나다엔(Canadienne), 에스토니아 레드(Estonian Red), 플렉바흐(Fleckveih), 프리리안(Frieian), 기롤란도(Girolando), 이라와라(Illawarra), 이리시 모일레드(Irish Moiled), 라인백(Lineback), 메우세 라인 이셀(Meuse Rhine Issel), 몽벨리아레데(Montbeliared), 노르망디(Normande), 란달(Randall), 사히왈(Sahhiwal), 오스트레일리안 밀킹 제부(Australian Milking Zebu), 시멘탈(Simmental), 차이아니나 마르키기아나(Chianina Marchigiana), 및 로마그놀라(Romagnola). 또한 상기 목록 품종의 일부는 무각의 변이체를 가지고 있으나, 그 계보에서의 유전은 종종 유각의 형태로 떨어진다. 유각의 품종의 예는 포함한다: 앵거스(Angus), 레드 앵거스(Red Angus), 레드 폴(Red Poll), 갈로웨이(Galloway), 벨테드 갈로웨이(Belted Galloway), 아메리칸 화이트 파크(American White Park), 브리티쉬 화이트(British White), 아메리팩스(Amerifax), 자메이카 블랙(Jamaica Black), 자메이카 레드(Jamaica Red), 무레이 그레이(Murray Grey), 브란구스(Brangus), 레드 브란구스(Red Brangus), 세노폴(Senopol). 본 명세서의 다른 곳에서 설명한 바와 같이, TALENs은 단백질 또는 핵산에 의해 암호화된, 예를 들어 mRNA, 또는 벡터에 의해 전달될 수 있다. 용어 품종(breed)은 동종의 외관, 행동, 및 동일한 종의 다른 동물 또는 식물과 구별되는 다른 특성을 갖는 가정의 동물 또는 식물의 군을 의미한다. 특정 품종에 속하는 동물은 해당 기술분야에 속하는 숙련자에게 알려져 있다.

[0039] 상기 용어 대립유전자(allele)는 유전자 또는 유전자 좌의 두 개 또는 그 이상의 유형의 하나를 의미한다. 유기

체의 개체군 또는 종은 일반적으로 다양한 개체들 중에서 각 좌(locus)에서 여러 개의 대립유전자를 포함한다. 좌에서 대립유전자의 변이는 존재하는 대립유전자(다형성)의 수, 또는 개체군에서 이형접합자의 비율로 측정될 수 있다. 용어 자연 대립유전자(natural allele)는 여기에서 자연에서 발견되는 대립유전자를 의미하는 것으로 사용된다. 용어 신규한 대립유전자(novel allele)는 비-자연적인 대립유전자를 의미한다. 용어 합성 대립유전자(synthetic allele)는 자연에서 찾을 수 없는 대립유전자를 의미한다. 외인성(exogenous) 대립유전자는 유기체로 도입된 것이고, 내인성(endogenous) 대립유전자는 세포에서 자연적으로 있고, 보통은 그것의 야생형 비변형된 상태의 개체에서 존재하는 것이다. 이형접합 동물은 두 개의 대립유전자를 가지고 있다. 몇몇의 사례에서, 이형접합 동물에서 이미 존재하는 유전자에 대해 동물을 동형접합으로 만들기 위해 외인성 대립유전자를 도입하는 것이 바람직하다. 대립유전자의 이종 간(interspecies) 이동은 한 종에서 다른 종으로의 의미하며, 종 내의(intraspecies) 이동은 같은 종의 동물 사이의 이동을 의미한다.

[0040] 유각을 위한 두 개의 소 대립유전자는 소의 염색체 1번에 존재하는 것으로 밝혀졌다(Medugorac, 2012). Pc, 셀틱 기원(212 bp, 1,705,834-1,706,045 bp)은 중복된다(10 bp의 서열의 치환(1,706,051-1,706,060 bp)). 이러한 대립유전자를 가진 몇몇의 품종은 앵거스(Angus), 갈로웨이(Galloway), 플렉바흐(Fleckvieh), 겔브파이(Gelbvieh) 및 무르나우-베르텐펠서(Murnau-Werdenfelser)를 포함한다. 두번째의 유각의 대립유전자, PF는 프리시안 기원으로 다음과 같이 특징된다, P5ID (7 bp 치환 (CGCATCA with TTCTCAGAATAG (SEQ ID NO: 26); 1,649,163-1,649,169) 및 80,128 bp 중복 (duplication) (1,909,352-1,989,480 bp P80kbID, 다음 위치에 5개의 점 돌연변이(G1654405A, C1655463T, T1671849G, T1680646C, C1768587A)). 이러한 변화는 고정된 블록과 같이 일반적으로 유전된다. 모든 염색체의 좌표는 UMD 3.1 소 유전자 빌드로부터 있다.

[0041] 어떠한 리포터 없이 유전적으로 변형된 동물; TALENs 기술; 대립유전자의 이동

[0042] 본 발명의 특정 구현예는 리포터 및/또는 선별 마커 없이 세포 또는 배아를 변형시키는 공정에 관한 것이다. 일반적으로, 리포터 유전자의 이용과 같은 풍부 및 선별 방법의 부재하에서 TALEN-변형 세포의 빈도가 유의하게 시간이 지남에 따라 감소함이 관찰되었다. 상기 관찰은 리포터 유전자가 관련된 명세서에 보고된 공동-형질감염, 공동-선별과 같은 접근법을 초래하였다.

[0043] 그러나, 리포터가 필요하지 않고, 이들의 사용은 단지 형질전환 동물주의 생성을 지연시킬 뿐이므로 상기 TALENs 변형을 효율성 있게 실시할 수 있다. 특정 이론에 한정되지 않고, 다수의 요인들이 독립적으로 리포터가 없는 구현예에 기여하였다. 하나는 TALENs가 신속하고 고효율로 작용하는 경향이 실현된다. 그러나, TALENs 변형은 며칠의 시간 동안 불안정한 경향이 있어, 효율성이 샘플링의 시간에 따라 낮은 것으로 보일 수 있다. 또한, 안정적으로 변형된 유기체만 형질전환 동물을 제작하는 데 이용될 수 있어 단기간 변형을 이해하기 위해 약간의 보상이 있다는 것이 일반적 통념이다. 통상적인 다른 시스템에서와 같이, 안정한 혼입에 대한 선별을 하기 위해 세포 생존 유전자를 이용하는 보상이다. 또 다른 요인은 TALENs을 발현하는 벡터에 비하여 TALENs mRNA는 예상치 못한 효과가 있다는 것이다. 일반적으로 TALENs을 암호화하는 mRNA의 직접 도입은 유용하고, 실시예 8 및 9에서 사용되었다.

[0044] 리포터 없는 구현예들의 발견에 기여하는 또 다른 요인은 ssDNA(ss 올리고 뉴클레오타이드) 주형 및 TALENs 활성 사이에 예기치 않은 시너지 효과가 있다는 것이다. 이 시너지 효과의 근거는 알려지지 않았다. 예를 들어, 뉴클레오펙션에 의한 0.5-10 마이크로그램의 TALEN을 암호화하는 mRNA의 500,000-750,000 세포로의 전달은 30°C에서 3 일 동안 배양한 후 변형의 일관된 수준을 초래한다. 그러나, 0.2-1.6 nMol ssODN의 이러한 동일한 조건의 보충은, SURVEYOR 어세이에 의해 분석된 증가된 NHEJ의 관찰과 같이, TALEN 활성 증가로 이어졌다. 일반적으로, 형질감염은 1-4 마이크로그램의 TALEN mRNA와 0.2-0.4 nMol의 ssDNA로 구성된다. 구현예는 세포 또는 배아에 500,000 세포 당 약 0.05 µg 이상의 TALEN mRNA 양 또는 500,000 세포 당 0.05 µg 내지 100 µg 범위의 TALEN mRNA 양을 도입시키는 것을 포함한다; 숙련자는 명백하게 언급된 범위 내의 모든 범위와 값을 고려하여 즉시 이해할 것이다. 구현예들은 약 0.02 nMol 이상 또는 약 0.01 내지 약 10 nMol 범위의 농도에서 ssDNA를 도입시키는 것을 추가적으로 포함한다.

[0045] 용어 직접 도입(direct introduction)은, 예를 들어, 직접 mRNA 도입은 mRNA 물질의 도입을 의미한다. 반면, mRNA를 암호화하는 벡터를 통한 도입은 간접적 도입으로 불린다. 직접 도입의 많은 방법들이 알려져 있으며, 예를 들면, 전기천공법, 형질감염(transfection), 리포펙션, 리포솜, 뉴클레오펙션, 바이오리스틱 파티클(biolistic particles), 나노 입자, 지질 형질감염, 전기융합 및 직접 주입이다.

[0046] 선조 유각 동물은 후속적으로 번식시켜 새로운 형질전환주에 대한 기반을 만드는 초기 변형 동물 필요없이, 변형 세포 또는 배아로부터 즉시 제작될 수 있다. 상기 용어 선조(founder) 또는 선조 동물은 변형 복제된 세포

또는 처리/주입된 배아로부터 직접적으로 개발된 제1-세대("F0") 형질전환 동물을 의미한다. 본 명세서에 보고된 방법은 번식 및/또는 교배의 중간 단계없이, 염색체 표적 위치만 유전적으로 변형된 선조의 생물을 제공한다. 또한, 구현에는 변형에 대해 동형접합의 선조를 포함한다. 상기 선조는 세포 및/또는 배아를 리포터 유전자(및/또는 선별 마커 유전자)에 노출시키는 어떠한 단계도 없이 제작될 수 있다.

[0047]

구현예들은 유전적으로 변형된 유각 동물을 제작하는 방법을 포함한다. 상기 방법은 배아 또는 세포를 TALEN을 암호화하는 mRNA에 노출시키는 단계를 포함하고, 상기 TALEN은 상기 배아 또는 세포 내 타겟 염색체 위치(chromosomal site)에 특이적으로 결합하고, 대리모 내 상기 세포를 클로닝하는 단계 또는 대리모 내 상기 배아를 이식하는 단계를 포함하고, 이에 의해 상기 대리모는 리포터 유전자 없이 TALEN 타겟 염색체 위치만 유전적으로 변형된 동물을 임신하게 된다. 상기 동물은 모든 리포터 유전자가 없이 존재하거나 선별 마커가 없이 존재할 수 있다, 예를 들어, 선별 마커는 없지만 형광 단백질과 같은 리포터는 가질 수 있다. 선택은 mRNA로서의 TALENs 및/또는 유전적 변형을 위한 주형을 제공하기 위한, 예를 들어 대립유전자와 같은 ss 올리고뉴클레오타이드의 직접적인 도입을 포함한다.

[0048]

유전적으로 변형된 무각(polled) 동물을 제조하는 방법은 배양된 세포, 예를 들어, 일차 가축 세포에 TALENs 및/또는 벡터를 도입하는 단계를 포함한다. TALENs는 특정 염색체 부위에 연결되고 그 부위에서 유전적 변화를 유발한다. HDR 주형은 또한 세포, 예를 들어, 이중 가닥 벡터, 단일 가닥 DNA, 또는 ss 뉴클레오타이드로서 직접적으로 세포 내로 도입될 수 있다. 배양된 세포는 이어서 배양하여 복제 세포의 콜로니를 형성한다. 콜로니는 PCR로 테스트하고/또는 시퀀싱하거나, 또는 그렇지 않으면 유전적 변형에 대하여 분석하며, 바람직하게는 리포터 유전자 및/또는 선별 마커가 없는 것이다. 세포는 의도된 부위에서 유전적으로 변형된 콜로니로부터 획득되어 클로닝에 이용된다. 예를 들어, 10 내지 50,000 세포가, 예를 들어, 대리모 당 1-500 배아로 대리모에게 이식된, 10 내지 50,000 배아를 생산하는 데 이용된다; 숙련자는 명백하게 언급된 범위 내의 모든 범위와 값을 고려하여 즉시 이해할 것이다. 구현에는 세포를 리포터 유전자 없이 상기 TALEN에 노출시켜서, 클론 세포들의 콜로니를 형성시키고, 상기 콜로니의 구성원들의 서브세트(subset)를 테스트하여 상기 표적 염색체 부위에 변형이 도입된 콜로니를 식별하는 단계를 포함한다.

[0049]

배양된 세포로부터 복제 세포의 콜로니를 제작하는 방법은 공지되어 있다. 이러한 방법 중 하나는 제1 배양으로부터의 세포들을 제2 배양으로 분산시키는 것을 포함하며, 상기 다양한 세포들은 예를 들어, 세포들을 멀티웰 플레이트(multiwell plates) 또는 세포 수에 비해 상대적으로 큰 표면적을 갖는 플레이트 내로 희석함으로써 서로 접촉하지 않는다. 상기 세포는 증식될 수 있는 일정 시간 동안 배양된다. 증식된 세포는 그들이 원래의 부위로부터 멀리 이동할 가능성이 없는 조건에서 배양된다. 결과적으로, 사용자가 일정 시간 후에 세포를 관찰할 수 있고 모두 단일 세포 및 이의 자손으로 만들어진 다양한 콜로니를 볼 수 있다. 콜로니 내 세포의 서브 세트는 콜로니에 있는 다른 세포를 파괴하지 않고 샘플링할 수 있다.

[0050]

부위-특이적 뉴클레아제 시스템

[0051]

TALENs(transcription activator-like effector nucleases) 및 징크핑거 뉴클레아제(ZFNs)와 같은 게놈 편집 도구는 많은 유기체에서 생명 공학, 유전자 치료 및 기능적 게놈 연구의 분야에 영향을 미쳤다. 더욱 최근에, RGENs(RNA-guided endonucleases)는 보완적인 RNA 분자에 의해 그들의 타겟 부위에 연결된다. 더욱 최근에, RGENs(RNA-guided endonucleases)는 보완적인 RNA 분자에 의해 그들의 타겟 부위에 연결된다. Cas9/CRISPR 시스템은 REGEN이다. tracrRNA는 이러한 또다른 도구이다. 이들은 타겟된 뉴클레아제 시스템의 실시예이다: 이들 시스템은 뉴클레아제를 타겟 부위에 국한시키는 DNA-결합 일원(member)을 가진다. 상기 부위는 그 후 뉴클레아제에 의해 절단된다. TALENs 및 ZFNs는 DNA-결합 일원에 융합된 뉴클레아제를 가진다. Cas9/CRISPR는 타겟 DNA 상에서 서로를 찾는 동계(cognates)이다. DNA-결합 일원은 염색체 DNA 내 동계 서열을 가진다. DNA-결합 일원은 의도된 부위 또는 그 부근에서 핵산 분해 작용을 얻기 위하여 전형적으로 의도된 동계 서열의 관점에서 고안되었다. 특정 구현에는 이러한 시스템 모두에 제한 없이 적용될 수 있다; 뉴클레아제 재-절단(re-cleavage)을 최소화하는 구현예, 의도된 잔기에서 정밀하게 SNP를 제조하기 위한 구현예, 및 DNA-결합 부위에서 이입되는 대립유전자의 배치를 포함한다.

[0052]

TALENs

[0053]

본원에 사용된 바와 같이, 용어 TALEN은 광범위하며 또다른 TALEN의 도움 없이 이중 가닥의 DNA를 절단할 수 있는 단량체의 TALEN을 포함한다. 용어 TALEN은 또한 동일 부위에서 DNA를 절단하기 위해 함께 작업하여 설계된 TALENs의 쌍의 하나 또는 둘 다의 일원(member)을 나타내기 위해 사용된다. 함께 작업하는 TALENs는 DNA 및 TALEN-쌍의 방향(handedness)과 관련하여 좌측-TALEN 및 우측-TALEN으로 나타낼 수 있다.

- [0054] TALs에 대한 암호(cipher)은 보고되었으며(PCT 출원 WO 2011/072246), 상기 각 DNA 결합 반복은 표적 DNA 서열에서 하나의 염기쌍을 인식하도록 한다. 잔기는 DNA 서열을 표적하도록 조립될 수 있다. 간단하게, TALEN의 결합을 위한 표적 부위를 결정하고, 뉴클레아제 및 표적 부위를 인식하는 일련의 RVDs를 포함하는 융합 분자를 생성한다. 결합 시, 뉴클레아제는 DNA를 절단하여, 세포 수선 기구(cellular repair machinery)가 절단된 말단에서 유전자 변형을 생성하도록 작동할 수 있다. 용어 TALEN은 TAL(Transcription Activator-Like) 작동자(effector) 결합 도메인 및 뉴클레아제 도메인을 포함하는 단백질을 의미하며, 다른 단량체 TALENs와 함께 이량화(dimerization)를 필요로 하는 다른 단량체뿐만 아니라 그 자체로 기능적인 단량체 TALENs을 포함한다. 이량화는 두개의 단량체 TALEN이 동일한 경우 동형이량체(homodimeric) TALEN이 될 수 있고, 또는 단량체 TALEN과 다른 경우 이형이량체(heterodimeric) TALEN이 될 수 있다. TALENs은 두개의 주요 진핵생물의 DNA 복구 경로, NHEJ(non-homologous end joining) 및 상동 직접적 복구의 수단에 의해 불멸화된(immortalized) 인간 세포에서 유전자 변형을 유도하는 것으로 나타났다.
- [0055] 세포 또는 배아 내로 TALEN의 도입, 및 이로부터의 동물의 형성에 대한 다양한 작용 실시예가 본원에 제공된다. TALEN의 처리를 위한 세포는 배양된 세포, 불활화된 세포, 일차 세포, 일차 체세포, 접합체 (zygote), 생식세포, 원시생식세포, 배반포 또는 줄기세포를 포함한다. 실시예 10은 정조 줄기세포(spermatogonial stem cell)의 변형을 위한 실험 결과를 상세히 나타낸다. 이들 세포는 동물, 예를 들어 가축의 유전적 변형을 위한 다른 방법을 제공한다. 유전적 변형 또는 유전자 수정 (gene edits)은 공여체 고환으로부터 분리된 정조 줄기세포(남성 생식-주 줄기세포, 본원에서 GSC's로 약칭)에서 in vitro 수행될 수 있다. 변형된 세포는 수여체의 생식세포가 제거된 고환으로 이식된다.
- [0056] 이식된 정조줄기세포는 선조 동물을 유도하기 위해서 인공 수정(AI) 또는 체외 수정(IVF)을 통한 번식을 위해 사용될 수 있는 유전적 변형(들)을 가지는 정자를 생산한다. 본 방법은 유전적으로 변형된 선조의 세대 이상의 이점을 가진다. 이러한 이점의 하나는 특정 질병 모델을 위한 선조가 건강하지 않고 생식가능령으로 성장하기에 적합하지 않은 경우에 분명하다. 따라서 갓난 새끼돼지에서 질병 모델을 만들기 위해서 GSC's에 도입된 동일한 변형은 건강한 개체의 고환에 이식될 수 있으며 건강한 동물에서 유래한 계통의 증식을 가능하게 한다.
- [0057] 정조줄기세포에서의 TALEN-매개 삽입 결실 발생(indel, 인델)의 가능성 및 효율은 돼지 뒤센느 근위축증(DMD) 위치의 엑손 7을 표적으로 한 TALENs를 암호화하는 플라스미드의 형질감염에 의해서 처음으로 연구되었다. 25%의 생식 세포 형질감염률에도 불구하고 몇몇 nucleofection 조건, 플라스미드의 양 및 배양 온도의 시험은 19% NHEJ의 최대 효율을 냈고, 30°C에서 배양된 복제에서 TALEN 활성이 가장 높았다. GSCs는 30°C에서 5일 배양 이후에도 생존한 상태로 남아있었으나, 그럼에도 불구하고 생식 세포 생존은 37°C에서 더 높았다. 플라스미드 DNA에 비해 TALEN을 암호화하는 mRNA의 형질감염은 가축 체세포 및 GSCs 모두의 더 높은 활성 및 생존 능력을 야기했다. 특히, 본 실험에서 mRNA 형질감염의 최고 활성이 플라스미드 DNA 형질감염을 넘지 못하는데 반해, 유의적으로 낮은 양의 mRNA가 동일 수준의 변형을 성취하는 데 필요했다. 실시예 11은 원시 생식 세포(조류)에서 성공적인 TALEN-자극된 HDR을 상세히 설명한다.
- [0058] 일부 구현예에서, 단량체의 TALEN이 사용될 수 있다. 두 TAL 반응기(effector) 도메인이 각각 *FokI* 제한 효소의 촉매 영역에 융합되고, 각각 결과물 TALEN에 대한 DNA-인식 부위가 스페이서 서열에 의해 분리되도록, 인식부위에 대한 각각의 TALEN 단량체의 결합이 *FokI*을 이량체화하고 스페이서 내에서 이중 가닥 절단을 생성하도록 TALEN은 전형적으로 스페이서(spacer)와 양자간 인식 부위를 통하여 이량체로서 기능한다. 그러나, 단일 TAL 반응기가 기능을 하기 위해 이량체화가 요구되지 않는 뉴클레아제에 융합되도록 단량체의 TALENs가 또한 설계될 수 있다. 이러한 하나의 뉴클레아제는, 예를 들어 두 단량체가 단일 폴리펩티드로서 발현된 경우 *FokI*의 단일 가닥 변이체(variant)이다. 다른 자연스럽게 발생되거나 설계된 단량체의 뉴클레아제 또한 이러한 역할을 제공할 수 있다. 단량체의 TALEN에 사용된 DNA 인식 도메인은 자연적으로 발생한 TAL 반응기로부터 유래할 수 있다. 대안적으로, DNA 인식 도메인은 특정 DNA 표적을 인식하도록 설계될 수 있다. 설계된 단일 가닥 TALENs는 구축 및 배치하기에 더 용이할 수 있는데, 그들은 단지 하나의 설계된 DNA 인식 도메인을 필요로 하기 때문이다. 이량체의 DNA 서열-특이적 뉴클레아제는 두개의 다른 DNA 결합 도메인 (예컨대, 다른 유형의 분자로부터 하나의 TAL 반응기 결합 도메인 및 하나의 결합 도메인)을 사용하여 만들어질 수 있다. TALENs는 스페이서와 양자간 인식 부위를 통하여 이량체로서 기능할 수 있다. 이러한 뉴클레아제 설계(architecture)는 또한, 예컨대 하나의 TALEN 단량체 및 하나의 징크 핑거(zinc finger) 뉴클레아제 단량체로부터 발생된 표적-특이적인 뉴클레아제를 위해 사용될 수 있다. 이러한 경우에, TALEN을 위한 DNA 인식 부위 및 징크 핑거 뉴클레아제 단량체는 적절한 길이의 스페이서에 의해 분리될 수 있다. 두개의 단량체의 결합은 *FokI*이 이량체화되고 스페이서 서열 내에서 이중 가닥 절단을 생성하도록 한다. 징크 핑거 외의 DNA 결합 도메인, 예컨대 호메오도메인(homeodomain), myb

반복 또는 류신 지퍼(leucine zipper)는 또한 *FokI*에 융합될 수 있고 기능적 뉴클레아제를 생성하기 위하여 TALEN 단량체와 파트너로서 작용할 수 있다.

[0059]

용어 뉴클레아제는 엑소뉴클레아제 및 엔도뉴클레아제를 포함한다. 용어 엔도뉴클레아제는 DNA 또는 RNA 분자, 바람직하게는 DNA 분자 내에 핵산 사이 결합의 가수 분해(절단)의 촉매를 가능하게 하는 임의의 야생형 또는 변이체 효소를 지칭한다. 엔도뉴클레아제의 제한되지 않는 예는 제II형 제한 엔도뉴클레아제 예컨대 *Fok I*, *Hha I*, *HindII*, *Not I*, *BbvCI*, *EcoRI*, *BglII*, 및 *AlwI*을 포함한다. 전형적으로 약 12-45 bp의 길이, 더욱 바람직하게는 14-45 bp 길이의 폴리뉴클레오티드 인식 부위를 가지는 경우 엔도뉴클레아제는 또한 희귀 절단 엔도뉴클레아제(rare-cutting nuclease)를 포함한다. 희귀 절단 엔도뉴클레아제는 정해진 위치에 DNA DSBs(double-strand breaks)를 포함한다. 희귀 절단 엔도뉴클레아제는 예를 들어 호밍(homing) 엔도뉴클레아제, 설계된 징크 핑거 도메인과 제한 효소 예컨대 *FokI* 또는 화학적 엔도뉴클레아제의 촉매 도메인의 융합에서 기인한 키메라 ZFN(Zinc-Finger nucleae)일 수 있다. 화학적 엔도뉴클레아제에서, 화학적 또는 펩티드 클리버(cleaver)는 핵산 중합체 또는 특정 타깃 서열을 인식하는 다른 DNA와 접합되며, 그렇게 함으로써 특정 서열에 대하여 절단활성을 표적화한다. 화학적 엔도뉴클레아제는 또한 합성 뉴클레아제, 예컨대 특정 DNA 서열에 결합하는 것으로 알려진 오르조페난트롤린(orthophenanthroline), DNA 절단 분자, 및 TFOs(triplex-formin oligonucleotides)의 접합을 포함한다. 이러한 화학적 엔도뉴클레아제는 본 발명에 따른 용어 "엔도뉴클레아제"에 포함된다. 이러한 엔도뉴클레아제의 예는 *I-See I*, *I-Chu L I-Cre I*, *I-Csm I*, *PI-See L PI-Tti L PI-Mtu I*, *I-Ceu I*, *I-See IL I-See III*, *H0*, *PI-Civ I*, *PI-Ctr L PI-Aae I*, *PI-Bsu I*, *PI-Dha I*, *PI-Dra L PI-Mav L PI-Meh I*, *PI-Mfu L PI-Mfl I*, *PI-Mga L PI-Mgo I*, *PI-Min L PI-Mka L PI-Mle I*, *PI-Mma I*, *PI-30 Msh L PI-Msm I*, *PI-Mth I*, *PI-Mtu I*, *PI-Mxe I*, *PI-Npu I*, *PI-Pfu L PI-Rma I*, *PI-Spb I*, *PI-Ssp L PI-Fae L PI-Mja I*, *PI-Pho L PI-Tag L PI-Thy I*, *PI-Tko I*, *PI-Tsp I*, *I-MsoI*을 포함한다.

[0060]

상동성 지향 복구(Homology directed repair, HDR)

[0061]

HDR(homology directed repair)는 ssDNA 및 이중 가닥 DNA(dsDNA) 손상을 복구하는 세포내 메커니즘이다. 이러한 복구 메커니즘은 손상 부위에 대하여 상당히 상동성이 있는 서열을 갖는 HDR 주형이 존재하는 경우 세포에 의해 이용될 수 있다. 일반적으로 생물학적 분야에 사용되는 용어 특이적 결합은 비표적 조직에 비해 비교적 높은 친화력으로 표적에 결합하고, 일반적으로 정전기적 상호작용, 반 데르 발스 상호작용, 수소 결합 등의 복수의 비공유 상호작용과 관련된 분자를 의미한다. 특정 혼성화(hybridization)는 상보적 서열을 갖는 핵산 간의 특이적 결합 형태이다. 또한, 단백질들은 DNA, 예컨대, TALENs 또는 CRISPR/Cas9 시스템 또는 Gal4 모티브로 특이적으로 결합할 수 있다. 대립 유전자(allele)의 이입(introgression)은 주형-유도 과정과 함께 내인성(endogenous) 대립 유전자를 통해 외인성(exogenous) 대립 유전자를 복제(copying)하는 과정을 의미한다. 내인성 대립 유전자는 특정 상황에서 외인성 핵산 대립 유전자에 의해 실제로 삭제 및 대체될 수 있으나, 본 이론에서 상기 과정은 복제 메커니즘이다. 대립 유전자는 유전자 쌍이기 때문에, 이들 간에는 상당히 상동성이 높다. 대립 유전자는 단백질을 암호화하는 유전자가 될 수 있고, 또는 그와 같은 생체활성 RNA 쉘을 암호화하거나 또는 조절성 단백질 또는 RNA를 수용하기 위한 부위(site)를 제공하는 등의 다른 기능을 가질 수 있다.

[0062]

HDR 주형은 유전자 이입되는 대립 유전자를 포함하는 핵산이다. 상기 주형은 dsDNA 또는 단일-가닥 DNA(ssDNA)일 수 있다. 다른 길이를 사용할 수 있으나, ssDNA 주형은 바람직하게는 약 20 내지 약 5000 잔기이다. 숙련자는 명백하게 언급된 범위 내의 모든 범위와 값을 고려하여; 예를 들어 약 500 내지 약 1500 잔기, 약 20 내지 약 100 잔기 등으로 즉시 이해할 것이다. 추가적으로 주형은 내인성 대립 유전자 또는 대체될 수 있는 DNA에 인접한 DNA에 대한 상동성을 제공하는 플랭킹(flanking) 서열을 포함할 수 있다. 또한, 주형은 타겟된 뉴클레아제 시스템에 결합하고, 이에 따라 시스템의 DNA-결합 일원(member)에 대한 동계 결합 부위(cognate binding site)인 서열을 포함할 수 있다. 용어 동계(cognate)는 일반적으로 상호작용하는 두 개의 생체분자, 예를 들어, 수용체와 그의 리간드를 의미한다. HDR 과정의 맥락에서, 생체분자 중 하나는 의도한, 즉, 동계, DNA 부위 또는 단백질 부위와 결합하는 서열로 설계될 수 있다.

[0063]

타겟된 뉴클레아제 시스템에 대한 특이적 결합을 감소시키기 위한 일 구현에는 내인성 DNA와의 정렬(alignment)에 대해 상대적인 HDR 주형에 대해 발생한 변화(changes)를 포함한다. 변화의 한 유형은 동계 일원 간의 미스매치(mismatch)가 발생하도록 설계된다. 하나의 변화는 하나 이상의 잔기의 삽입 또는 결실이다. 또 다른 변화는 결합을 촉진하지 않는 다른 잔기에 대한 하나의 잔기의 치환이다. 용어 잔기(residue)는 분자 쉘의 단위, 예를 들어, 단백질의 아미노산 또는 핵산의 염기를 의미한다. 변화가 발생하는 부위는 시스템의 DNA-결합 멤버에 대한 동계 결합 부위이다.

- [0064] 다른 유형의 변화는 TALENs 쌍과 같은 스페이스(spacer)에 의해 작동되는 시스템 내 스페이스 내에서 변화가 발생함으로써 뉴클레아제의 작동을 방해하도록 설계되며, 상기 변화는 스페이스 영역에서 발생할 수 있다. 이러한 변화들은 결실을 포함할 수 있고, 이에 의해 뉴클레아제는 컷을 생성하는 것을 방해받는다. 이러한 다양한 변화는 일반적으로 서열이 정렬될 때 그들은 미스매치를 생성하므로, 본 명세서에서는 미스매치로 언급된다; 이러한 맥락에서, 결실, 삽입, 치환은 미스매치이다. 뉴클레아제의 쌍은 협동성(cooperativity)을 제공하는 공간을 필요로 한다; 그들의 활성은 스페이스의 추가 또는 삭제에 의해 중단될 수 있다.
- [0065] 추가적으로 구현에는 외인성 대립 유전자 내 미스매치를 위치시킨다. 시스템의 DNA-결합 일원은 적어도 부분적으로 내인성 대립 유전자와 겹치는 부위에 결합하도록 설계된다. 일단 유전자에 삽입되어 외인성 대립 유전자와 동일성을 갖게 되면, DNA-결합 일원은 결합이 감소된다. 따라서 DNA-결합 일원의 동계 부위는 비-선호(not-preferred) 외인성 대립 유전자로부터 선호(preferred) 내인성 대립 유전자로 변화한다. 동계 부위는 대립 유전자의 모든 것, 또는 그것의 부분만을 포함할 수 있다. 이러한 외인성 대립 유전자로의 미스매치의 도입이 외인성 대립 유전자의 혼입 안정화에 필요하다는 것은 놀라운 일이다. 명백하게 재-절단(re-cleavage)의 문제는 유전자에 삽입된 대립 유전자의 안정성에 매우 큰 영향을 미친다. 상기 데이터는, 비교가능한 효율성있는 과정을 통상적으로 이용할 수 없기 때문에, 이전에 다른 데서는 얻을 수 없었다.
- [0066] 구현예들은 HDR 템플레이팅 과정으로 잔기의 삽입, 결실, 또는 치환에 의한 이러한 다양한 위치에서의 미스매치를 생성하는 것을 포함한다. 예를 들어, 1-1000 잔기가 삽입, 결실 또는 치환될 수 있으며; 숙련자는 명백하게 언급된 범위 내의 모든 범위와 값을 고려하여; 예를 들어 1-3 잔기, 최소 10 잔기, 4 잔기, 4-20 잔기, 1-205 잔기, 1-220 잔기, 1-300 잔기, 1-500 잔기, 10-1000 잔기 등으로 즉시 이해할 것이다. 이들 중 하나 이상은 결합될 수 있고, 예를 들어, 하나의 위치에서의 삽입, 다른 위치에서의 결실, 및 또 다른 위치에서의 치환이다.
- [0067] 이러한 다양한 구현예들은 리포터-프리 시스템에서 실시되고 SNP 또는 SNP에 관한 구현예를 제작할 수 있다. 세포 또는 동물은, 예를 들어, 가축, 돼지, 소, 양, 염소, 닭, 토끼, 물고기, 제브라피쉬, 개, 쥐, 고양이, 쥐 및 연구용 동물일 수 있다.
- [0068] *조성물 및 키트*
- [0069] 또한, 본 발명은 부위-특이적 엔도뉴클레아제(endonucleases), CPJSPR, Cas9, ZNFs, TALENs을 암호화하는 핵산 분자, 이들의 폴리펩티드, 이러한 핵산 분자 또는 폴리펩티드를 함유하는 조성물, 또는 조작된(engineered) 세포주를 함유하는 조성물 및 키트를 제공한다. 또한, HDR은 폴드(polled) 대립 유전자의 혼입에 효과적임을 제공할 수 있다. 이러한 항목은 연구 도구로서 또는 치료적으로 사용될 수 있다.
- [0070] *백터 및 핵산*
- [0071] 다양한 핵산이 녹아웃(knockout) 목적으로, 또는 다른 목적을 위한 유전자의 발현을 얻기 위해, 우체류 또는 다른 세포로 도입될 수 있다. 형질전환 동물을 생산하기 위해 사용될 수 있는 핵산 구조물은 표적 핵산 서열을 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 핵산은 DNA, RNA, 및 핵산 유사체, 및 이중 가닥 또는 단일 가닥(즉, 센스 또는 안티센스 단일 가닥)인 핵산을 포함한다. 핵산 유사체는 핵산의 안정성, 혼성화, 또는 가용성을 향상시키기 위하여, 염기 부분(moiety), 당 부분, 또는 포스페이트 골격에서 변형될 수 있다. 염기 부분의 변형은 데옥시티미딘(deoxythymidine)에 대한 데옥시우리딘(deoxyuridine), 데옥시시티딘(deoxycytidine)에 대한 5-메틸-2'-데옥시시티딘 및 5-브로모-2'-데옥시시티딘을 포함한다. 당 부분의 변형은 리보오스 당의 2'-히드록실기 2'-O-메틸 또는 2'-O-알릴 당으로의 변형을 포함한다. 데옥시리보오스 포스페이트 골격은 각 염기 부분이 6원인 모폴리노 고리에 결합된 모폴리노 핵산, 또는 데옥시포스페이트 골격이 슈도펩티드(pseudopeptide) 골격으로 치환되고 4개의 염기가 유지된 펩티드 핵산을 생산하기 위해 변형될 수 있다. Summerton and Weller (1997) Antisense Nucleic Acid Drug Dev. 7(3):187; 및 Hyrup et al. (1996) Bioorgan. Med. Chem. 4:5 참조. 또한, 데옥시포스페이트 골격은 포스포로티오에이트(phosphorothioate) 또는 포스포로디티오에이트(phosphorodithioate) 골격, 포스포로아미디트(phosphoroamidite), 또는 알킬 포스포트리에스터(alkyl phosphotriester) 골격으로 치환될 수 있다.
- [0072] 표적 핵산 서열은 프로모터와 같은 조절 영역(Regulatory region)에 작동 가능하게 연결(operably linked)될 수 있다. 조절 영역은 돼지 조절 영역일 수 있으며, 또는 다른 종으로부터의 것일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, 작용가능하게 연결된 표적 핵산의 전사를 허용하거나 또는 용이하게 하는 등의 방법으로 핵산 서열과 관련된 조절영역의 위치를 나타낸다.
- [0073] 프로모터의 어느 유형은 표적 핵산 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 프로모터의 예는 제한 없이 조직-특

이적 프로모터, 항시성 프로모터(constitutive promoters), 및 특정 자극에 대해 반응하거나 또는 반응하지 않는 프로모터를 포함한다. 적합한 조직 특이적 프로모터는 베타 세포에서 핵산 전사의 우선적 발현(preferential expression)이 될 수 있으며, 인간 인슐린 프로모터를 포함한다. 다른 조직 특이적 프로모터는 간세포(hepatocyte) 또는 심장 조직에서 우선적 발현이 될 수 있고, 각각 알부민 또는 알파-미오신 중쇄 프로모터(alpha-myosin heavy chain promoters)를 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 중요한 조직- 또는 일시적-특이성 없이 핵산 분자의 발현을 용이하게 하는 프로모터가 사용될 수 있다(즉, 항시성 프로모터). 예를 들어, 닭 베타-액틴 유전자 프로모터(chicken beta-actin gene promoter)와 같은 베타-액틴 프로모터, 유비퀴틴(ubiquitin) 프로모터, miniCAGs 프로모터, 글리세르알데히드-3-데하이드로게나제(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) 프로모터, 또는 3-포스포글리세레이트 키나제(3-phosphoglycerate kinase; PGK) 프로모터 뿐만 아니라, 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제(herpes simplex virus thymidine kinase; HSV-TK) 프로모터, SV40 프로모터, 또는 거대세포바이러스(cytomegalovirus; CMV) 프로모터와 같은 바이러스성 프로모터도 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 닭 베타 액틴 유전자 프로모터와 CMV 증강제(enhancer)의 융합이 프로모터로서 사용된다. 예를 들어, Xu et al. (2001) Hum. Gene Ther. 12:563; 및 Kiwaki et al. (1996) Hum. Gene Ther. 7:821 참조.

[0074] 유도성 프로모터(inducible promoter)의 예는 핵산의 전사를 조절하는데 사용될 수 있는 테트라사이클린(tet)-on 프로모터 시스템이다. 이 시스템에서, 돌연변이된 Tet 억제제(Tet repressor; TetR)는 tet 또는 독시사이클린(doxycycline; dox)에 의해 조절되는 tTA(tetracycline-controlled transcriptional activator)를 생산하기 위해 단순 포진 바이러스 VP 16 트랜스-활성제(trans-activator) 단백질의 활성 도메인에 융합된다. 항생제가 없는 전사는 최소화되는 반면, tet 또는 dox의 존재 하의 전사는 유도된다. 대안적 유도성 시스템은 엑디손(ecdysone) 또는 라파마이신(rapamycin) 시스템을 포함한다. 엑디손은 곤충의 탈피호르몬으로서, 이의 생성물은 엑디손 수용체의 이형이량체 및 USP(ultraspiracle gene)의 생성에 의하여 조절된다. 발현은 엑디손 또는 무리스테론 A(muristerone A)와 같은 엑디손의 유사체를 처리하여 유도된다. 유도성 시스템을 유발하기 위해 동물에 투여되는 물질을 유도제라고 부른다.

[0075] 핵산 구조물(construct)에서 유용할 수 있는 추가적인 조절 영역은, 이로써 제한되는 것은 아니지만, 폴리아데닐화(polyadenylation) 서열, 번역 조절(translation control) 서열(예를 들어, IRES(internal ribosome entry segment)), 증강제, 유도성 요소(inducible elements), 또는 인트론을 포함한다. 비록 그들이 전사, mRNA의 안정성, 번역 효율성 등에 영향을 줌으로써 발현을 증가시킬 수 있지만, 이러한 조절 영역은 필요하지 않을 수 있다. 이러한 조절 영역은 세포(들)에서 핵산의 최적의 발현을 얻기 위해 원하는 대로 핵산 구조에 포함시킬 수 있다. 그러나, 종종 이러한 추가적인 요소 없이 충분한 발현을 얻을 수 있다.

[0076] 핵산 구조물은 신호 펩티드 또는 선택 마커를 암호화하는데 사용될 수 있다. 신호 펩티드는 암호화된 폴리펩티드가 특정 세포의 위치(예를 들면, 세포 표면)로 유도되도록 사용될 수 있다. 선택 마커의 비-제한적인 예는 푸로마이신(puromycin), 간시클로비르(ganciclovir), 아데노신 탈아미노효소(adenosine deaminase; ADA), 아미노글리코사이드 인산전달효소(aminoglycoside phosphotransferase, neo, G418, APH), 디히드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase; DHFR), 히그로마이신-B-인산전달효소(hygromycin-B-phosphotransferase), 티미딘 키나제(thymidine kinase; TK), 또는 크산틴- gua닌 포스포리보실트랜스퍼라제(xanthin-guanine phosphoribosyltransferase; XGPRT)를 포함한다. 이러한 마커는 배양에서 안정한 형질전환체를 선택하는데 유용하다. 다른 선택 마커는 녹색 형광 단백질 또는 황색 형광 단백질과 같은 형광 폴리펩티드(fluorescent polypeptides)를 포함한다.

[0077] 일부 구현예에서, 선택 마커를 암호화하는 서열은 Cre 또는 Flp과 같은 재조합효소에 대한 인식 서열의 측면에 있을 수 있다. 예를 들어, 선택 마커는 loxP 인식 부위(Cre 재조합효소에 의해 인식되는 34-bp 인식 부위) 또는 FRT 인식 부위 측면에 있을 수 있으며, 이러한 선택 마커는 구조물로부터 잘라낼 수 있다. Orban, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (1992) 89:6861, Cre/lox 기술을 검토하기 위해서, 그리고 Brand and Dymecki, Dev. Cell (2004) 6:7 참조. 또한, 선택 마커 유전자에 의해 방해받는 Cre- 또는 Flp-활성화할 수 있는 형질전환유전자(transgene)를 함유하는 전위인자(transposon)는 형질전환유전자의 조건 발현(conditional expression)을 갖는 형질전환 동물을 얻기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 마커/형질전환유전자의 발현을 추진하는 프로모터는 도처에 있거나(ubiquitous) 또는 조직-특이적일 수 있으며, F0 동물(예를 들어, 돼지)에서 마커가 도처에 있거나 또는 조직-특이적 발현이 될 것이다. 형질전환유전자의 조직 특이적 활성화는, 조직 특이적 방법으로 Cre 또는 Flp를 발현하는 돼지에 마커-방해된(marker-interrupted) 형질전환유전자를 도처에 발현하는 돼지를 이종교배함으로써, 또는 Cre 또는 Flp 재조합효소를 도처에 발현하는 돼지에 조직 특이적 방법으로 마커-방해

된 형질전환유전자를 발현하는 돼지를 이중교배함으로써 이루어질 수 있다. 형질전환유전자의 조절된 발현 또는 마커의 조절된 절단은 형질전환유전자의 발현을 허용한다.

[0078] 일부 구현예에서, 표적 핵산은 폴리펩티드를 암호화한다. 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열은 암호화된 폴리펩티드의 다음 조각을 용이하게 하기 위해 설계된 "태그(tag)"를 암호화하는 태그 서열을 포함할 수 있다(예를 들어, 편재화(localization) 또는 검출을 용이하게 함). 태그 서열은 이러한 암호화된 태그가 폴리펩티드의 카복실 또는 아미노 말단 중 하나에 위치하도록 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열에 삽입된다. 암호화된 태그의 비-제한적인 예는 글루타티온-S-전이효소(glutathione S-transferase; GST) 및 FLAG™ 태그(Kodak, New Haven, CT)를 포함한다.

[0079] 다른 구현예에서, 표적 핵산 서열은 표적 핵산의 발현이 감소하도록 표적 핵산에 대한 RNA 간섭을 유도한다. 예를 들어, 표적 핵산 서열은 CFTR(cystic fibrosis transmembrane conductance regulatory) 폴리펩티드를 암호화하는 핵산에 대하여 RNA 간섭을 유도할 수 있다. 예를 들어, CFTR DNA에 대해 상동인 이중-가닥 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA) 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)는 DNA의 발현을 감소시키는데 사용될 수 있다. siRNA에 대한 구조물은, 예를 들어, Fire et al. (1998) Nature 391:806; Romano and Masino (1992) Mol. Microbiol. 6:3343; Cogoni et al. (1996) EMBO J. 15:3153; Cogoni and Masino (1999) Nature 399: 166; Misquitta and Paterson (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:1451; 및 Kennerdell and Carthew (1998) Cell 95: 1017에 기재된 바와 같이 제조될 수 있다. shRNA에 대한 구조물은 McIntyre and Fanning (2006) BMC Biotechnology 6:1에 기재된 대로 제조될 수 있다. 일반적으로, shRNA는 짧은 헤어핀을 아닐링하고 형성할 수 있는, 상보성 영역을 함유하는 단일-가닥 RNA 분자로서 전사된다.

[0080] 핵산 구조물은 SssI CpG 메틸라제(New England Biolabs, Ipswich, MA)를 이용하여 메틸화시킬 수 있다. 일반적으로, 핵산 구조물은 37℃의 완충액에서 S-아데노실메티오닌 및 SssI CpG-메틸라제와 함께 배양시킬 수 있다. 과메틸화(Hypermethylation)는 37℃에서 1시간 동안 HinP1I 엔도뉴클레아제의 하나의 단위와 함께 구조물을 배양하고, 아가로오스 겔 전기영동에 의해 분석하여 확인할 수 있다.

[0081] 핵산 구조물은 난모세포 또는 에그(egg)와 같은 생식세포, 전구세포(progenitor cell), 성체 또는 배아 줄기 세포, 원시 생식 세포(primordial germ cell), PK-15 세포와 같은 신장세포, 섬세포(islet cell), 베타 세포, 간세포, 또는 진피 섬유아세포와 같은 섬유아세포를 포함하는, 어느 유형의 배아, 태아, 또는 성인 우체류의 세포로 다양한 기술을 이용하여 도입시킬 수 있다. 기술의 비제한적인 예는 전위인자 시스템의 이용, 세포를 감염시킬 수 있는 재조합 바이러스, 또는 리포솜(liposomes) 또는 전기천공법(electroporation), 미세주입(microinjection), 또는 인산칼슘 침전과 같은 비-바이러스 방법의 사용을 포함하며, 핵산을 세포로 전달할 수 있다.

[0082] 전위인자 시스템에서, 핵산 구조물의 전사 단위, 즉 표적 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 조절 영역은 전위인자의 역위 반복에 의해 측면에 위치한다. Sleeping Beauty (미국특허번호 6,613,752 및 미국출원 공개번호 2005/0003542 참조); Frog Prince (Miskey et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:6873); Tol2 (Kawakami (2007) Genome Biology 8(Suppl.1):S7; Minos (Pavlopoulos et al. (2007) Genome Biology 8(Suppl.1):S2); Hsmar1 (Miskey et al. (2007)) Mol Cell Biol. 27:4589); 및 Passport를 포함하는 몇몇 전위인자 시스템은 마우스, 인간, 및 돼지 세포를 포함하는 세포로 핵산을 도입하기 위해 개발되었다. Sleeping Beauty 전위인자가 특히 유용하다. 전위효소는 표적 핵산과 동일한 핵산 구조물에 암호화된 단백질로 전달될 수 있고, 별도의 핵산 구조물 또는, mRNA를 제공하여 도입시킬 수 있다(예를 들어, 생체 외에서 전사된, 캡핑된(capped) mRNA).

[0083] 핵산은 벡터 내에 포함될 수 있다. 벡터는 표적 DNA로 운반체를 이동하도록 설계된 어느 특이적 DNA 부분을 포함하는 광의의 용어이다. 벡터는 에피솜(episome), 플라스미드, 또는 바이러스/파지 DNA 부분과 같은 게놈 또는 다른 표적 DNA 서열로 DNA 삽입을 가져오는데 필요한 구성요소의 세트인, 발현벡터, 또는 벡터 시스템으로서 언급될 수 있다. 동물에서 유전자 전달에 사용된 바이러스성 벡터(예를 들어, 레트로바이러스, 아데노-관련 바이러스 및 통합 파지 바이러스(integrating phage viruses), 및 비-바이러스성 벡터(예를 들어, 전위인자)와 같은 벡터 시스템은, 두개의 기본 구성을 가진다: 1) DNA로 구성된 벡터(또는 cDNA로 역전사된 RNA) 및 2) 전위효소, 재조합효소, 또는 벡터 및 DNA 표적 서열을 인식하고 표적 DNA 서열로 벡터를 삽입하는 다른 인테그라제(integrase) 효소. 대부분의 벡터는 종종 하나 이상의 발현 조절 서열(expression control sequence)을 포함하는 하나 이상의 발현 카세트를 포함하며, 여기에서 발현 조절 서열은 각각 다른 DNA 서열 또는 mRNA의 전사 및/또는 번역을 각각 제어 및 조절하는 DNA 서열이다.

[0084] 벡터의 많은 다른 종류가 알려져 있다. 예를 들어, 플라스미드 및 바이러스성 벡터, 예를 들어 레트로바이러스

성 벡터가 알려져 있다. 일반적으로 포유동물 발현 플라스미드는 복제원점(origin of replication), 적절한 프로모터 및 임의의 증강제를 가지고, 또한 어느 필수적인 리보솜 결합 부위, 폴리아데닐화 (polyadenylation) 부위, 스플라이스(splice) 공여자(donor) 및 수여자(acceptor) 부위, 전사의 말단 서열, 5' 측면에 있는 (flanking) 비-전사된 서열을 가진다. 벡터의 예는 플라스미드(다른 유형의 벡터의 운반체일 수도 있음), 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus; AAV), 렌티바이러스(lentivirus; 예를 들어, 변형된 HIV-1, SIV 또는 FIV), 레트로바이러스(예를 들어, ASV, ALV 또는 MoMLV), 및 전위인자(예를 들어, Sleeping Beauty, P-elements, Tol-2, Frog Prince, piggyBac)를 포함한다.

[0085]

본 명세서에 사용된 바와 같이, 용어 핵산은, 예를 들어, cDNA, 게놈성 DNA, 합성(예를 들어, 화학적으로 합성된) DNA, 자연 발생하고 화학적으로 변형된 핵산, 예를 들어 합성 염기 또는 대안적 골격을 포함하는 RNA 및 DNA 둘 다를 나타낸다. 핵산 분자는 이중-가닥이거나 또는 단일-가닥(즉, 센스 또는 안티센스 단일 가닥)일 수 있다. 용어 형질전환은 본 명세서에서 넓게 사용되고, 유전자 물질이 유전공학 기술을 이용하여 변경되는 유전자 변형 유기체 또는 유전자 재조합 유기체로 나타낸다. 따라서, 녹아웃 우체류는 외인성 유전자 또는 핵산이 동물 또는 이의 후손에서 발현되는지 또는 안되는지 여부에 관계없이 형질전환된다.

[0086]

본 명세서에서 제시한 핵산 서열은 DNA 및 RNA 서열을 모두 나타내며, DNA 또는 RNA에 대하여, 경우에 따라 관례상 "T" 또는 "U"에 대하여 "T"를 축약할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 3개 이상의 뉴클레오타이드 서브유닛의 핵산 분자이다. 폴리뉴클레오타이드 유사체 또는 다중 핵산은 화학적으로 변형된 폴리뉴클레오타이드 또는 다중 핵산이다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오타이드 유사체는 폴리뉴클레오타이드의 당-포스페이트 골격의 일부를 대안적인 작용기로 대체함으로써 생성될 수 있다. 본 명세서에 "모폴리노 (morpholino)"로 나타낸, 모폴리노-변형된 폴리뉴클레오타이드는 염기가 모폴리노-포스포로다이하미데이트 골격으로 연결된 폴리뉴클레오타이드 유사체이다(예를 들어, 미국특허 5,142,047 및 5,185,444 참조). 모폴리노와 더불어, 폴리뉴클레오타이드 유사체의 다른 예는 염기가 폴리비닐 골격으로 연결된 유사체, 염기가 슈도펩티드 2-아미노에틸-글리신기에 의한 아마이드 결합으로 연결된 PNA (peptide nucleic acid), 뉴클레오사이드 서브유닛이 메틸포스포네이트기에 의하여 연결된 유사체, 뉴클레오사이드 서브유닛에 연결된 포스페이트 잔기가 포스포로아미데이트기로 대체된 유사체, 및 포스포로티오에이트화된 DNA, 2' O-메틸 기를 갖는 당 부분을 포함하는 유사체를 포함한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 잘 알려져있고 통상적으로 이용되는 고상체 합성 기술을 통하여 제조될 수 있다. 대안적으로, 상기 합성을 위하여 다른 적절한 방법이 사용될 수 있다(예를 들어, 일반 분자 클로닝 및 화학적 핵산 합성 기술). 또한 모폴리노 또는 포스포로티오에이트 유도체와 같은 폴리뉴클레오타이드 유사체의 제조를 위하여 유사한 기술이 사용될 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오타이드 및 폴리뉴클레오타이드 유사체는 상업적으로 수득될 수 있다. 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 약학적으로 허용가능한 조성물의 예는 예를 들어 (a) 나트륨, 칼륨, 암모늄 등과 같은 양이온으로 형성된 염; (b) 무기산, 예를 들어, 염산, 브롬화 수소산으로 형성된 산부가염 (c) 유기산, 예를 들어, 아세트산, 옥살산, 타르타르산으로 형성된 염 및 (d) 염소, 브롬 및 요오드와 같은 원소 음이온으로 형성된 염을 포함하는 염이다.

[0087]

폴리펩티드

[0088]

활성의 변화 없이 일반적으로 아미노산 서열에 수행되는 다양한 보존적 변화가 있다. 이러한 변화는 보존적 치환 또는 돌연변이라고 지칭한다; 즉, 특정한 크기 또는 특성을 갖는 아미노산 그룹에 속하는 아미노산이 다른 아미노산으로 대체될 수 있는 것이다. 아미노산 서열에 대한 치환은 아미노산이 속하는 클래스(class)의 다른 구성으로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 비극성 (소수성) 아미노산은 알라닌, 류신, 이소류신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 티로신을 포함한다. 극성 중성 아미노산은 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴 및 글루타민을 포함한다. 양전하된 (염기성) 아미노산은 아르기닌, 리신 및 히스티딘을 포함한다. 음전하된 (산성) 아미노산은 아스파르트산 및 글루탐산을 포함한다. 이러한 변형은 폴리아크릴 아마이드 겔 전기영동으로 결정되는 겔보기 분자량 또는 등전점에 대하여 영향을 미칠것으로 예상되지 않는다. 예시적인 보존적 치환은 양전하를 유지하기 위하여 Arg가 Lys로 및 반대로; 음전하를 유지하기 위하여 Asp가 Glu로 및 반대로; 유리 -OH가 유지되도록 Thr이 Ser로; 및 유리 NH₂를 유지하기 위하여 Asn을 Gln으로 치환을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 더욱이, 일부 경우에서 폴리펩티드 서열 또는 상응하는 핵산 서열의 점 돌연변이, 결실 및 삽입은 폴리펩티드 또는 핵산 단편의 기능 손실 없이 이루어질 수 있다. 치환은 예를 들어, 1, 2, 3 또는 그 이상의 잔기를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 기술된 아미노산 잔기는 단일 문자 아미노산 부호 또는 세글자 약어를 사용한다. 본 명세서에서 사용된 약어는 표준 폴리펩티드 명명법 J. Biol. Chem., (1969), 243, 3552-3559를 따른다. 모든 아미노산 잔기 서열은 본 명세서에서 아미노-말단에서 카복시 말단의 통상의 방향으로, 좌우의 배향의 화학식으로 나타낸다.

- [0089] 경우에 따라 본원에 제시된 서열에 대하여 펩티드의 퍼센트 상동성의 결정이 필요할 수 있다. 이러한 경우, 퍼센트 동정성은 펩티드 또는 펩티드의 일부의 잔기의 수로 측정된다. 예를 들어, 90% 동정성의 폴리펩티드는 또한 더 큰 펩티드의 부분일 수 있다. 구현에는 본 명세서에서 제시된 서열의 제시된 동정성 및/또는 보존적 치환을 갖는 이와 같은 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [0090] 폴리펩티드에 대하여 본 명세서에서 사용되는 용어 정제된(purified)은 자연적으로 발생하지 않은 카운터파트(예를 들어, 펩티도미메틱(peptidomimetic)), 또는 화학적으로 합성되었으며, 실질적으로 다른 폴리펩티드에 의하여 오염되지 않은, 또는 자연적으로 수반되는 세포성분(예를 들어, 기타 세포 단백질, 폴리뉴클레오티드, 또는 세포 성분)의 대부분으로부터 분리 또는 정제된 폴리펩티드를 의미한다. 정제된 폴리펩티드의 예는 자연적으로 연관되는 단백질 또는 자연적으로 발생하는 유지물질 없이, 건조 중량으로 최소 70%인 것이다. 정제된 폴리 펩티드 제
- [0091] 조는 건조중량으로, 예를 들어 폴리펩티드의 최소 80%, 최소 90% 또는 최소 99%일 수 있다. 또한 폴리펩티드는 태그 서열(예를 들어, 히스티딘 태그, myc 태그 또는 FLAG® 태그)를 포함하여 폴리펩티드를 용이하게 정제하거나 또는 표시할 수 있도록(예를 들어, 친화성 기질에 포획되거나, 현미경하에서 시각화) 조작할 수 있다. 따라서, 달리 언급하지 않는 한, 폴리 펩티드를 포함하는 정제된 조성물은 정제된 폴리펩티드를 의미한다.
- [0092] 폴리펩티드는 화학적 변형을 포함할 수 있다; 이러한 맥락에서, 용어는 자연적으로 발생하는 아미노산의 화학 구조의 변화를 의미한다. 그러한 변형은 측쇄 또는 말단, 예를 들어 아미노 말단 또는 카르복시 말단의 변경으로 이루어질 수 있다. 일부 구현예에서, 변형은 다른 물질에 폴리펩티드를 연결하거나, 치료제를 결합하는데 편리하게 이용될 수 있는 화학기를 만드는데 유용하다.
- [0093] 재조합효소(recombinases)
- [0094] 본 발명의 구현예는 재조합효소(예: RecA 단백질, Rad51)를 포함하는 표적화된 뉴클레아제 시스템 또는 DNA 재조합과 관련된 다른 DNA-결합 단백질의 투여를 포함한다. 재조합효소는 핵산 단편과 함께 필라멘트를 형성하고, 사실상, 상기 서열과 실질적으로 상동성인 DNA 서열을 찾기 위해 세포 DNA를 찾는다. 예를 들어, 재조합효소는 HDR에 대한 주형으로서 작용하는 핵산 서열과 결합될 수 있다. 그 다음에, 재조합효소는 HDR 주형과 결합하여 필라멘트를 형성하고 세포 안쪽에 위치한다. 재조합효소 및/또는 재조합효소와 결합하는 HDR 주형은 단백질, mRNA로서, 또는 재조합효소를 암호화하는 벡터와 함께 세포 또는 배아 안에 위치할 수 있다. 미국출원공개 2011/0059160 (미국출원번호 12/869,232)의 기재는 모든 목적을 위해 참조로 본 명세서에 포함되며; 논쟁의 경우, 명세서는 조절된다. 용어 재조합효소는 두개의 비교적 긴 DNA 가닥 사이에서 비교적 짧은 DNA 조각의 결합을, 세포에서 효소적으로 촉매화하는 유전자 재조합 효소를 말한다. 재조합 효소는 Cre 재조합효소, Hin 재조합효소, RecA, RAD51, Cre, 및 FLP를 포함한다. Cre 재조합효소는 loxP 부위 사이의 DNA의 부위-특이적 재조합을 촉진하는 P1 박테리오파지로부터 타입 I 토포이소머라제이다. Hin 재조합효소는 박테리아 살모넬라에서 발견된 198개의 아미노산으로 구성된 21kD의 단백질이다. Hin은 DNA의 절단과 재조합을 시작하기 위해 활성 부위 세린에 의존하는 DNA 전효소(invertases)의 세린 재조합효소 과(family)에 속한다. RAD51은 인간 유전자이다. 이 유전자에 의해 암호화된 단백질은 DNA 이중 가닥 절단의 복구를 돕는 RAD51 단백질과의 일원이다. RAD51 과 일원은 박테리아 RecA 및 효모 Rad51에 상동성이다. Cre 재조합효소는 loxP 부위에 의해 측면화된 특정 서열을 결실시키는 실험에 사용되는 효소이다. FLP는 빵 효모 (baker's yeast)인 사카로마이세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisiae)의 2μ 플라스미드로부터 유래된 플립라제(Flippase) 재조합 효소(FLP 또는 Flp)를 나타낸다.
- [0095] 본 명세서에서, "RecA" 또는 "RecA 단백질"은 필수적으로 모두 또는 대부분의 동일한 기능을 갖는 RecA-유사 재조합 단백질의 과(family)를 의미한다: 특히, (i) DNA 중합효소에 의한 차후 연장에 대해 그들의 상동 표적에 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드를 적절하게 배치하는 능력; (ii) DNA 합성을 위해 이중가닥 핵산을 위상적으로(topologically) 재조합하는 능력; 및, (iii) 상보적 서열 (complementary sequences)을 효율적으로 찾고 결합하는 RecA/올리고뉴클레오티드 또는 RecA/폴리뉴클레오티드 복합체의 능력. 가장 특징적인 RecA 단백질은 대장균(E. Coli)으로부터 유래한 것이고; 단백질의 원래의 대립유전자 형태 이외에도 RecA803과 같은 많은 돌연변이 RecA-유사 단백질이 확인되었다. 또한, 많은 유기체들은 효모, 초파리(Drosophila), 인간을 포함하는 포유동물, 및 식물을 포함하는 RecA-유사 가닥-전이 단백질을 가진다. 이러한 단백질은 예를 들면, Rec1, Rec2, Rad51, Rad51B, Rad51C, Rad51D, Rad51E, XRCC2 및 DMC1을 포함한다. 재조합 단백질의 한 구현예는 대장균의 RecA 단백질이다. 대안적으로, RecA 단백질은 대장균의 돌연변이체 RecA-803 단백질, 다른 박테리아 근원으로부터의 RecA 단백질 또는 다른 유기체로부터의 상동 재조합 단백질일 수 있다.

[0096]

유전자 변형 동물(Genetically modified animals)

[0097]

해당 기술분야에서 알려진 다양한 기술은 비-인간 동물로 핵산 구조물을 도입시켜서 선조 동물을 생산하는데 이용될 수 있으며, 이때 핵산 구조물은 계놈에 통합된다. 이러한 기술은 제한없이 전핵 미세주입법(pronuclear microinjection (미국특허번호 4,873,191)), 배(germ)로 레트로바이러스-매개 유전자 전달, 배아줄기세포로 유전자 표적화, 배아의 전기천공법(electroporation), 정자-매개 유전자 전달(Lavitrano et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 14230-14235; Lavitrano et al. (2006) Reprod. Fert. Develop. 18, 19-23), 및 난구세포(cumulus cell) 또는 유선세포(mammary cell)와 같은 체세포, 또는 성체, 태아, 또는 배아 줄기세포의 생체 외 형질전환에 이어서, 핵이식(nuclear transplanted)을 포함한다. 전핵 미세주입법, 정자-매개 유전자 전달, 및 체세포 핵 전이는 특히 유용한 기술이다.

[0098]

통상, 전핵 미세주입법에서 핵산 구조물은 수정란(fertilized egg)으로 도입다; 1 또는 2 세포 수정란은 정자의 머리로부터의 유전 물질을 함유하는 전핵(pronuclei)으로서 사용되고, 수정란은 원형질(protoplasm) 내에서 인식할 수 있다. 수정란 단계의 전핵(pronuclear)은 생체 외 또는 생체 내에서 얻을 수 있고(예를 들어, 공여자 동물의 난관으로부터 수술로 회수됨), 생체 외에서 수정란은 생산될 수 있다. 예를 들어, 돼지에서, 성숙한 난모세포는 미니튜브 5-웰 수정 접시 내 500 μ l Minitube PORCPRO IVF MEDIUM SYSTEM (Minitube, Verona, WI)에서 수정될 수 있다. 생체 외 수정(in vitro fertilization; IVF)을 준비하기 위해, 새로 수집된 또는 냉동 멧돼지(boar)의 정액을 세척하고, PORCPRO IVF 배지에서 4 x 10⁵ 정자가 되도록 재현탁시켰다. 정자 농도는 컴퓨터 보조 정액 분석(SPERMVISION, Minitube, Verona, WI)으로 분석될 수 있다. 최종 생체 외 인공수정은, 멧돼지에 따라, 대략 40 운동성(motile) 정자/난모세포의 최종 농도로 10 μ l 부피에서 수행될 수 있다. 수정하는 난모세포는 모두 38.7°C, 5.0% CO₂ 대기에서 6시간 동안 배양한다. 인공 수정 6시간 후, 추정 접합자는 NCSU-23에서 2회 세척하고, 0.5 mL의 동일한 배지로 이동시킬 수 있다. 이러한 시스템은 10-30%의 다정자(polyspermic) 인공수정율로 대부분의 멧돼지에 대해서 일상적으로 20-30%의 배반포를 생산할 수 있다.

[0099]

체세포 핵 전이에서, 유전자 변형된 세포 또는 할구(blastomere), 예를 들어 배아 할구, 태아 섬유아세포(fetal fibroblast), 성체 귀 섬유아세포(adult ear fibroblast), 또는 과립막 세포(granulosa cell)는 할구(blastomere), 태아 섬유아세포(fetal fibroblast), 성체 귀 섬유아세포(adult ear fibroblast), 또는 과립막 세포(granulosa cell)는 결합된 세포(combined cell)를 확립하기 위해 적출된 난모세포로 도입될 수 있다. 일부 관례에서, 감수분열 2에서 저지된 난모세포는 "에그(egg)"라고 한다. 배아의 생산 후(예를 들어, 난모세포의 융합 또는 활성화에 의해), 배아는 활성화(activation)된지 약 20 내지 24시간 후에 수여자 암컷의 난관으로 전달된다. 표준 육종 기술은 초기 이형접합 선조 동물로부터 표적 핵산에 대한 동종접합 동물을 생산하는데 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0100]

도 1. 패널 a) 소 유각/무각 좌위의 도식. TALEN은 화살촉으로 표시된 유각형 변이체(horned variant)를 절단하도록 설계되었다. 패널 b) 4개 TALEN의 센스 가닥 서열. 패널 c) 각각의 TALEN 쌍을 암호화하는 mRNA로 형질감염시킨 지 3일 후 유각 홀스타인(Holstein)종 섬유아세포의 서베이어 검정. TALEN ID 및 형질감염 후 배양 온도는 겔 위에 제시되어 있다. 서열은 다음과 같이 동정된다: HP 1.1 좌측 및 우측 (서열번호: 1 및 2); HP1.2 좌측 및 우측 (서열번호: 3 및 4); HP1.3 좌측 및 우측 (서열번호: 5 및 6); HP1.4 좌측 및 우측 (서열번호: 7 및 8).

도 2. 무각(POLLED)의 TALEN-매개된 유전자이입. 패널 a) 홀스타인(유각)종 세포로 무각 대립유전자를 유전자 이입시키기 위한 계획의 도식. 기존의 무각 대립유전자는 10 bp의 결실부(제시되지 않음)를 갖는 212 bp의 탠덤 반복체(적색 화살표)이다. TALEN은 무각 HDR 플라스미드를 사용하여 동종접합 재조합에 의해 복구시킬 수 있는 유각 대립유전자(녹색 수직 화살표)를 특히 표적으로 하도록 개발하였다. 패널 b) 무각의 동종접합 또는 이종접합 유전자이입된 콜로니의 대표 영상. 3개의 프라이머 세트가 대상 콜로니의 양성 분류를 위해 사용되었다: F1+R1, F2+R2 및 F1+P (무각 특이적). PCR 생성물의 동정은 F1+R1 앰플리콘을 서열화하여 확인하였다.

도 3. 단리된 콜로니 중 무각 변환의 예. 개별 콜로니는 도 2에 기술된 세포집단으로부터 전파시켰다. 각각의 콜로니는 도 2에 기술된 PCR 방법에 의해 분석했다. 클론 3은 무각 대립유전자로의 이종접합 변환을 나타내는 389 및 591 bp의 생성물(화살표)을 갖는다. 사용된 복구 주형은 길이가 591개 잔기였다.

도 4. 패널 a) 유각 대립유전자를 무각 대립유전자로 변환시키기 위한 도식. HP 1.3 TALEN + 짧은 복구 주형을 유각 세포로 도입시킨다. 복구 주형은 무각 앵거스(Angus)종 계놈성 DNA로부터 PCR에 의해 생성시켰고; 상동성

길이가 제시되어 있다. 패널 b) 2 μ g TALEN mRNA + Gal4:RecA로 코팅시킨 500 ng ssDNA로 형질감염시킨 유각 홀스타인종 섬유아세포 중 무작 변환의 PCR 평가. 각각의 레인/PCR 반응은 형질감염된 집단으로부터 희석된 ~3 세포 당량으로 이루어진다. 유각 세포로부터 프라이머 btHP-F1 및 btHP-R1을 사용한 PCR로 389 bp의 생성물이 생성된다. 무각으로의 변환으로 202개 염기쌍의 네트 삽입(net insertion)이 이루어지며; 이에 따라 동일한 프라이머의 PCR 생성물은 591 bp 생성물 (좌측 여백의 화살표)을 생성한다. 무각 변환을 나타내는 생성물과의 반응 수가 상부 우측 코너에 제시되어 있다. 패널 c) 2 ug TALEN mRNA + 1500 ng ssDNA로 형질감염시킨 유각 홀스타인종 섬유아세포 중 무작 변환의 PCR 평가. 무각 변환을 나타내는 생성물과의 반응 수가 상부 우측 코너에 제시되어 있다.

도 5. 돼지 APC에서 TALEN 및 CRISPR/Cas9 매개된 HDR의 비교. 패널 a) APC14.2 TALEN (서열번호: 9 및 10) 및 gRNA 서열 APC14.2 GlA (서열번호: 12)가 야생형 APC 서열 (서열번호: 11)에 대해 제시되어 있다. 하기에, 새로운 HindIII 부위를 생성하는 4 bp 삽입부를 전달하는 HDR 올리고 (서열번호: 13)가 제시되어 있다. 이어서, 2 μ M 올리고 HDR 주형, 및 1 μ g TALEN mRNA, hCas9를 암호화하는 플라스미드 DNA와 gRNA 발현 플라스미드 각각 1 μ g; 또는 1 μ g의 hCas9를 암호화하는 mRNA 및 0.5 μ g의 gRNA 발현 플라스미드로 형질감염시킨 돼지 섬유아세포를 스플릿팅(split)시키고, 10일째 까지 37°C에서 확장전 3일 동안 30 또는 37°C에서 배양시켰다. 패널 b) RFLP 및 서베이어 검정을 나타내는 차트가 생성되어 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0101]

실시에 1 TALEN 디자인 및 생산

[0102]

후보 TALEN 표적 DNA 서열 및 RVD 서열을 온라인 툴 "TAL EFFECTOR NUCLEOTIDE TARGETER"를 이용하여 동정하였다. TALEN DNA 형질감염을 위한 플라스미드 또는 *in vitro* TALEN mRNA 전사체들을 그 후 최종 목적 벡터로서 pCGOLDYTALEN (Addgene ID 38143) 및 RCIScript-GOLDYTALEN (Addgene ID 38143)를 이용하는 골든 게이트 에셈블리 프로토콜 (Golden Gate Assembly protocol)에 따라 구축하였다. 최종 pC-GoldyTALEN 벡터들을 PureLink® HIPURE PLASMID MIDIPREP Kit (Life Technologies)를 이용하여 준비하고 사용 전 서열분석하였다. QIAPREP SPIN MINIPREP kit (Qiagen)를 이용하여 준비된 조립된 RCIScript 벡터를 SacI를 이용하여 이전에 지시된 바 (Carlson, 2010)와 같이 mMESSAGE mMACHINE® T3 키트 (Ambion)을 이용한 *in vitro* TALEN mRNA 전사체를 위한 주형으로 사용하기 위해 정렬하였다. 3'-O-Mem7G(5')ppp(5')G RNA 캡 유사체(New England Biolabs), 5-메틸씨티딘 트리포스페이트 슈도유리딘 트리포스페이트(TriLink Biotechnologies, San Diego, CA) 및 아데노신 트리포스페이트 구아노신 트리포스페이트로 구성된 리보뉴클레오타이드 카테일 치환된 변형된 mRNA를 전에 기술된 바 (Carlson, 2012)와 같이 RCIScript-GOLDYTALEN 벡터로부터 합성하였다. 최종 뉴클레오타이드 반응 농도는 캡 유사체 6mM, 구아노신 트리포스페이트 1.5mM, 다른 뉴클레오타이드 7.5mM 이다. mRNA 결과물은 MEGACLEAR REACTION CLEANUP 키트 (Applied Biosciences)를 이용한 정제 전에 DNase 처리되었다.

[0103]

실시에 2 CRISPR/Cas9 디자인 및 제조.

[0104]

유전자 특이적 gRNA 서열을 이들의 방법(참조: Mali, 2013)에 따라 처리 랩 gRNA 벡터 (Addgene ID: 41824)에 클로닝하였다. 상기 Cas9 뉴클레아제는 hCas9 플라스미드(Addgene ID: 41815), 또는 RCIScript-hCas9로부터 합성된 mRNA의 동시 형질감염에 의해 제공하였다. 상기 RCIScript-hCas9는 hCas9 플라스미드(hCas9 cDNA를 포괄하는) 기원의 XbaI-AgeI 단편을 RCIScript 플라스미드에 서브클로닝함에 의해 제조하였다. mRNA의 합성은 선형화가 KpnI를 사용하여 수행되는 것을 제외하는 상기와 같이 수행하였다.

[0105]

실시에 3 공여자 복구 주형 제조

[0106]

A) BB-HDR (1,623bp) 플라스미드. 벨기에인 블루 대립유전자를 포괄하는 1,695bp 단편을 벨기에인 블루 계놈 DNA, 및 PCR 2.1 벡터(Life Technology)에 클로닝된 TOPO로부터 PCR 증폭시켰다((btGDF8 BB 5-1 : 5'-CAAAGTTGGTGACGTGAC AGAGGTC (서열번호 15); btGDF8 BB 3-1 : 5'-GTGTGCCATCCCTACTTTGTGGAA (서열번호 16)). 상기 플라스미드는 하기 프라이머 (BB del HR 1623 5-1 : 5' -GATGTATTCTCAGACTTTTCC (서열번호 17); BB del HR 1623 3-1 : 5'- GTGGAATCTCATCTTACCAA (서열번호 18))의 프라이머 및 이전과 같이 클로닝된 TOPO를 사용한 PCR에 의해 증폭시켰다. 각각의 플라스미드는 사용전에 서열 입증하였다. 형질감염 등급 플라스미드는 패스트-이온(Fast-Ion) MIDI 플라스미드 엔도-부재 키트(PLASMID ENDO-FREE kit) (IBI Scientific)를 사용하여 제조하였다. rAA V 패키징(packaging). BB-HDR은 pAAV-MCS에 클로닝하였고 ADENO-연합된 바이러스 헬퍼-부재 시스템(Agilient)을 사용하여 패키징하였다. 간략하게, 10cm 디쉬 AAV-293 세포는 각각 pAAV-Helper, pAAV-RC 및 AAV-BB-HDR 플라스미드 5 μ g으로 형질감염시켰다. 형질감염 2일 후에, 상기 세포는 1ml의 성장 배지로 옮겨내어

플레이트로부터 제거하였다. 바이러스 입자는 5분동안 미세원심분리기에서 최대 속도로 원심분리하기 전에 3회 동결-해동 주기에 의해 방출시켰다. 상기 상등액을 흡입제거하고 표적 세포의 감염을 위해 직접 사용하였다.

[0107]

B) 무각의 1594 주형. 383 무각의 대립형질 유전자를 포괄하는 1,784bp 단편은 앵거스(Angus) 계놈 DNA, 및 PCR 2.1 벡터(Life Technologies)로 클로닝된 TOPO로부터 PCR 증폭시켰다(F1 : 5'-GGGCAAGTTGCTCAGCTGTTTTTG (서열번호 19); R1- 5'- TCCGCATGGTTTAGCAGGATTCA (서열번호 20)). 상기 플라스미드는 분석적 프라이머 세트를 위해 그리고 하기의 프라이머 (1594 F:5'-ATCGAACCTGGGTCTTCTGC ATTG (서열번호 21);R1: 5'-TCCGCATGGTTTAGCAGGATTCA (서열번호 22)) 및 이전과 같이 클로닝된 TOPO를 사용한 PCR에 의해 1,592bp HDR 주형의 유도체화를 위한 양성 대조군 주형으로서 사용하였다. 각각의 플라스미드는 사용 전에 서열 입증하였다. 형질감염 등급 플라스미드는 패스트-이온 MIDI 플라스미드 엔도-부재 키트 (IBI Scientific)를 사용하여 제조하였고 5 μ g 또는 10 μ g은 2 μ g HP 1.3 TALEN mRNA로 형질감염시켰다. 모든 올리고뉴클레오타이드 주형은 통합된 DNA 기술에 의해 합성하고, 100 nmole 합성은 표준 탈염에 의해 정제하고 TE 중에서 400 μ M로 재현탁시켰다.

[0108]

실시예 4 조직 배양 및 형질감염.

[0109]

돼지 또는 소 섬유아세포는 10% 태아 소 혈청, 100 I.U./ml의 페니실린 및 스트렙토마이신, 및 2mM L-글루타민이 보충된 DMEM에서 5% CO₂에서 37 또는 30°C(지적된 바와 같이)에 유지시켰다. 형질감염을 위해, 모든 TALEN 및 HDR 주형들은 달리 언급되지 않는 경우 NEON 형질감염 시스템(Life Technologies)를 사용한 형질감염을 통해 전달하였다. 간략하게, 100% 컨플루언스에 도달한 낮은 계대수의 오사바우(Ossabaw), 로드라스(Laudrace), 와규(Wagyu) 또는 홀슈타인(Holstein) 섬유아세포를 1:2로 나누고 다음날 70 내지 80% 컨플루언스 시점에 수거하였다. 각각의 형질감염은 플라스미드 DNA 또는 mRNA 및 올리고스와 혼합된 완충액 "R" 중에 재현탁된 500,000 내지 600,000 세포로 이루어지고 하기의 파라미터에 의해 100 μ l 틱을 사용하여 전기천공하였다: 입력 전압; 1800V; 펄스 너비; 20ms; 및 펄스 수; 1. 전형적으로, 2 내지 4 μ g의 TALEN 발현 플라스미드 또는 1 내지 2 μ g의 TALEN mRNA 및 목적하는 유전자에 특이적인 2 내지 3 μ M의 올리고스는 각각의 형질감염에 포함되었다. 이들 양으로부터의 이탈은 도면 범례에 지적된다. 형질감염 후 세포는 각각 30 또는 37°C에서 3일 배양을 위해 6웰-디쉬의 2개의 별도의 웰로 60:40으로 나누었다. 3일 후, 세포 집단을 에디트의 안정성을 평가하기 위해 적어도 10일까지 37°C에서 확장시켰다.

[0110]

실시예 5 회식 클로닝

[0111]

형질감염 3일 후, 50 내지 250 세포를 10cm 디쉬에 씨딩하고 개별 콜로니가 직경이 약 5mm에 도달할때까지 배양하였다. 이 시점에서, PBS 중에서 회식된 6ml의 TRYPLE (Life Technologies) 1:5 (vol/vol)를 첨가하고 콜로니를 흡인하고 24-웰 디쉬 웰의 웰에 이동시키고 동일한 420 조건하에서 배양하였다. 컨플루언스에 도달한 콜로니를 수거하고 냉동보존 및 유전형질분석을 위해 나누었다. 샘플 제제: 3일 및 10일에 형질감염된 세포 집단은 6-웰 디쉬의 웰로부터 수거하고 10-30%를 50 μ l의 IX PCR 혼용 용해 완충액(10 mM Tris-Cl pH 8.0, 2 mM EDTA, 0.45% Tryton X-100(vol/vol), 200 μ g/ml 프로테아제 K가 새롭게 보충된 0.45% Tween-20(vol/vol))에 재현탁시켰다. 상기 용해물은 하기의 프로그램을 사용한 열 순환기에서 프로세싱하였다: 60분동안 55°C, 15분동안 95°C. 회식 클로닝 기원의 콜로니 샘플은 20 내지 30 μ l의 용해 완충액을 사용하여 상기와 같이 처리하였다.

[0112]

실시예 6

[0113]

선택된 유전자이입의 검출은 38주기(95°C, 25 s; 62°C, 25 s; 72°C, 60 s) 동안 IX MyTaq 레드 믹스 (Bioline)을 사용하고 F1 프라이머(상기 실시예 3 참조) 및 "P" 프라이머 (5'-ACGTACTCTTCATTTACAGCCTAC)(서열번호 23)를 사용하는 PCR에 의해 수행하였다. 제2 PCR 분석은 (F2: 5'-GTCTGGGGTGAGATAGTTTCTTGG (서열번호 24); R2-5'-GGCAGAGATGTTGGTCTTGGGTGT) (서열번호 25)를 사용하여 수행하였다. 양 시험을 통과한 후보물은 플랭킹 F1 및 R1 프라이머를 사용한 PCR에 이어서 TOPO 클로닝 및 서열 분석으로 분석하였다.

[0114]

실시예 7 앰플리콘 서열화 및 분석.

[0115]

DNA는 형질감염된 집단으로부터 분리하고 100-250 ng은 제조업자의 추천에 따라 어셈블리된 50 μ l의 플라티늄 타크 DNA 폴리머라제 높은 정확도(PLATINUM TAQ DNA POLYMERASE HIGH FIDELITY) (Life Technologies)에 첨가하였다. 각각의 샘플은 다중 서열화를 수행할 수 있게 하기 위해 특유 바코드를 갖는 프라이머 세트에 할당하였다. PCR 생성물 부분은 2.5% 아가로스 겔 상에 적용하여 미네루트 PCR 정제 키트(MINELUTE PCR PURIFICATION Kit) (Qiagen)를 사용한 PCR 클린업 전에 크기를 확인하였다. 샘플을 정량하고 서열화를 위해 단일 샘플에 혼주하였다. 상기 단일 배합된 샘플은 25% PhiX(서열 다양성에 대해)로 스카이킹하고 150 염기쌍 쌍간 말단 판독을 생성시키는 Illumina MISEQ 서열분석기상에서 서열분석하였다. 판독 질은 FASTQC 판독-쌍을 사용하여 평가하고 중첩

말단은 EA-UTILS 팩키지 기원의 FASTQ-JOIN을 사용하여 연결하였다. 커스텀(custom) PERL 스트립트를 사용하여 연결된 판독 및 카운트 삽입 유형을 역다중화하였다. 정배향 및 역배향 프라이머에 정확한 일치는 역다중화 단계에서 요구되었다. 클로닝된 동물은 RFLP 분석 및 서열분석에 의해 유전자형질 분석하였다.

[0116] 실시예 8 TALEN을 암호화하는 mRNA를 사용한 가축 세포의 형질감염은 효율적인 표적 절단을 유도한다.

[0117] TALEN cDNA(TALEN 쌍 p6511.1 및 DMD7.1)는 이전에 기재된 바와 같이 전사되고 제조업자의 프로토콜에 따른 (Carson, 2010) MMESAGE MACHINE T3 키트 (Applied Biosciences)를 사용한 mRNA 합성 전에 미넬루트 PCR 정제 키트(Qiagen)을 사용하여 정제된 pT3TS 클로닝 벡터에서 T3 프로모터의 다운스트림에 클로닝하였다. 또한 문헌 [Carlson 2013]을 참조한다. 변형된 mRNA는 3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G RNA 캡 유사체 (New England Biolabs), 5-메틸시티딘 트리포스페이트 슈도우리딘 트리포스페이트(TriLink Biotechnologies, San Diego, CA) 및 2개의 표준 리보뉴클레오타이드, 아데노신 트리포스페이트 및 구아노신 트리포스페이트로 이루어진 리보뉴클레오타이드 콕테일 대신 MMESAGE MACHINE T3 키트 (Applied Biosciences)를 사용하여 동일한 벡터로부터 합성하였다. mRNA 합성 반응물은 메가클리어 반응 클린업(MEGACLEAR REACTION CLEANUP) 키트 (Applied Biosciences)를 사용한 정제 전에 DNase 처리하였다. a) 지적된 양의 p6511.1 TALEN을 하기의 세팅과 함께 NEON 뉴클레오펙션 시스템(Life Technologies)을 사용한 돼지 섬유아세포 (복제물 당 500,000 내지 750,000 세포)에 형질감염시켰다: 1 펄스, 1800 v; 20 ms 너비 및 100 uL의 팁. 형질감염된 세포는 SURVEYOR 분석 (Transgenomic)에 의한 인텔 분석 전에 30 또는 37°C에서 3일 동안 배양하였다. % NHEJ는 문헌[참조: Guischin et al., 2010]에 기재된 바와 같이 계산하고, 그래프상에 플롯팅하였다. p6511.1 TALEN을 암호화하는 4μg의 플라스미드 DNA (pDNA)는 또한 %NHEJ의 비교를 위해 동일한 조건하에서 형질감염시켰다. b) mRNA 구조, 조성물 또는 생체 외 합성 반응식은 TALEN 활성화에 대해 거의 효과를 갖지 않는다. DMD7.1 TALEN을 암호화하는 mRNA는 표준 또는 변형된 리보뉴클레오타이드를 사용하는 동일한 반응 (이원 "D")에서 또는 개별적으로(별도의 반응에서 "I" 좌측 및 우측 TALEN) 합성하였다. 상기 반응은 이어서 2개의 복제물로 나누고 이중 하나에 추가의 polyA 꼬리를 제조업자의 프로토콜에 따라 poly(A) 트레일링 키트 (Ambion)을 사용하여 첨가하였다.

[0118] 플라스미드 DNA로부터 TALEN의 발현은 가축 세포에서 TALEN 매개된 인텔의 유도를 위해 효과적인 방법이었지만; TALEN 암호화 플라스미드의 세포 계층으로의 통합이 가능하다. 대조적으로, mRNA는 숙주 세포의 계층으로 통합할 수 없다. TALEN 암호화 플라스미드의 통합을 회피하기 위해, 실험은 TALEN 활성화의 유사 수준이 TALEN을 암호화하는 miRNA의 형질감염에 의해 성취될 수 있는지를 결정하기 위해 수행하였다. p6511.1 TALEN 쌍을 암호화하는 TALEN에 대한 mRNA는 표준 또는 변형된 리보뉴클레오타이드를 사용하여 합성하였다. 2개 양의 각각의 TALEN mRNA 제제는 뉴클레오펙션에 의해 돼지 섬유아세포내로 형질감염시키고 인텔 분석 전에 30 또는 37°C에서 3일 동안 배양하였다. % NHEJ는 30°C에서 항온처리된 모든 mRNA 형질감염과 유사하였고 용량 반응은 37°C에서 항온처리된 형질감염된 세포에서 관찰될 수 있었다. 변형된 리보뉴클레오타이드와 표준 리보뉴클레오타이드간의 % NHEJ에서 상당한 차이는 상기 복제물에서 검출될 수 없었지만, 등량이 사용되지 않았다. 현저하게, 30°C에서 항온처리된 모든 그룹에서 mRNA 형질감염은 동일한 조건하에서 플라스미드 DNA로서 형질감염된 p6511.1 TALEN을 상당히 능가하였다.

[0119] 또 다른 실험을 수행하여 제2 유전자좌, 돼지 DMD에서 변형된 것과 표준의 뉴클레오타이드로 합성된 mRNA의 영향을 조사하였다. 상기 실험은 또한 polyA 꼬리의 부가가 TALEN 활성화에 영향을 주는지 및 각각의 TALEN 단량체 (좌측 및 우측 단량체)는 동일한 전사 반응(이원)에서 합성될 수 있는지 또는 이들이 개별적으로 합성되어야만 하는지 및 형질감염 전에 혼합되어야만 하는지를 평가하였다. 1 또는 4μg의 DMD7.1 TALEN mRNA는 돼지 섬유아세포내로 형질감염시키고 30 또는 37°C에서 3일 동안 배양하였다. p6511.1 TALEN과 관련하여, 30°C에서 배양된 세포에서 TALEN 활성화에서 거의 차이가 관찰되지 않았고, 이는 변형된 뉴클레오타이드, 생체 외 mRNA의 폴리아데닐화 또는 mRNA의 이원 전사가 활성화에 대해 영향을 가짐을 시사한다. 용량 반응은 또한 4μg의 mRNA가 1μg의 형질감염을 능가함으로써 37°C 배양된 복제물에서 관찰될 수 있다. 또한, 폴리아데닐화된 mRNA는 37°C 복제물에서 비-아데닐화된 mRNA를 능가하는 것으로 나타났다.

[0120] 명백하게, DMD7.1 TALEN을 암호화하는 플라스미드 DNA가 돼지 섬유아세포내로 형질감염되는 경우, 14일까지 배양된 세포에 대한 3일째 측정된 %NHEJ 수준에서의 상당한 감소(40-60%)가 나타났다. %NHEJ에서 어떠한 감소도 여기서 보여지는 mRNA 형질감염된 복제물 중 어느 하나에 대해 관찰되지 않았고 상기 데이터는 14일 변형 수준 동안 나타내지 않는다. 따라서, mRNA 전사는 TALEN 활성화에 대해서 뿐만 아니라 배양에서 연장된 기간 후 높은 비율의 변형된 세포를 유지하기 위해 DNA 형질감염 보다 우수한 것으로 나타난다. 특정 이론에 제한되는 것 없이, 이것은 상기 결과가 플라스미드 DNA에 비해 mRNA로 형질감염되는 경우 개선된 세포 생존성으로 인한 것으로

사료된다.

[0121] 실시예 9 어떠한 선택이 없는 mRNA 형질감염에 의해 생성된 콜로니의 분석.

[0122] TALEN을 암호화하는 1 내지 4 μ g의 mRNA를 실시예 8에서와 같이 소 또는 돼지 1차 섬유아세포에 첨가하였다. 상기 세포는 TALEN으로 노출 후 3일동안 30℃에서 성장시키고 세포를 계수하고 10cm 디쉬상에서 cm²당 1 내지 20 개 세포의 밀도 범위로 분주하였다. 직경 3 내지 4mm의 개별 콜로니가 관찰될 수 있을 때까지 10 내지 15일동안 세포를 배양하였다. 콜로니는 약한 흡인하에 p-200 피펫터를 사용하여 흡인하고 500 μ l의 성장 배지(Carlson, 2011)와 함께 24-웰 플레이트의 웰로 방출하였다. 명백히 한정된 콜로니(플레이트 당 약 10 내지 30)를 갖는 플레이트를 다중 콜로니로부터 세포를 흡인시키는 기회를 제한하는 콜로니 흡인을 위해 선택하였다. 콜로니가 24-웰 디쉬에서 70 내지 90%의 컨플루언트에 도달하게 되면, 일부를 인텔 분석을 위해 수거하고 나머지를 냉동보존시켰다. 인텔 분석 결과는 섬유아세포 클론에서 유전형질 분포의 표의 마지막 5개 라인에 위치한다. 이들 결과는 콜로니가 선택 마커의 사용 없이 TALEN mRNA 형질감염된 섬유아세포로부터 용이하게 분리될 수 있음을 입증한다. 분석된 클론에서 돌연변이 빈도는 3일째에 공급원 집단의 변형 수준에 의해 정확하게 예측되었다. 양 대립형질 변형을 갖는 클론은 또한 용이하게 동정될 수 있다.

[0123] 섬유아세포 클론에서 유전형질 분포 표

TALEN 쌍	선택		3일 Mod	예측된% Mod 클론	예측된% Bi-대립형질 Mod	관찰된 Mod 클론 (%)	관찰된 Bi- 대립형질 Mod(%)
LDLRE2.1	Puro	Pig ♂	19	34.5	10.5	30/81 (37)	5/26 (19)
LDLRE2.1	Puro	Pig ♀	21.5	38.3	12	23/76 (30)	8/23 (35)†
LDLRE2.1	Puro	Pig ♂	14.4	26.7	7.7	12/94 (13)	2/12 (≥ 17) ^A
LDLRE2.1-2x ^B	Puro	Pig	19.7	35.5	10.9	8/24 (33)	2/8 (≥ 25) ^A
LDLRE4.2	Puro	Pig ♂	20	36	11.1	4/48 (8.3)	1/4 (25) ^A
LDLRE4.2	Puro	Pig ♀	19	34.4	10	8/47 (17)	0/8 ^A
DMDE6	Puro	Pig	25	43.8	15.6	17/35 (49)	NA
DMDE7.1	Puro	Pig	27	47	15.6	12/29 (41)	3/10 (30)
DMDE7.1-2x ^B	Puro	Pig	22	39.2	12.4	22/41 (54)	7/22 (≥ 32) ^{A†}
GHRHR2.3	G-418	Pig	29	50	17	26/43 (60)	15/26 (≥ 58) ^{C†}
ACAN12	Puro	Cow	29	50	17	27/35 (77)	2/6 (NA) ^D
btGDF83.1	Puro	Cow	17	31	9.3	7/24 (29)	0/7
GHRHR2.3	None	Pig ♂	32.5	55	19.4	21/25 (84)	6/21 (≥ 29) ^A
GHRHR2.3	None	Pig ♀	35	58	21	13/13 (100)	3/13 (≥ 23) ^A
LDLR2.1	None	Pig ♀	34	57	20	88/166 (53)	5/16 (31%)
btGDF83.1	None	Cow	29	50	17	23/45 (51)	2/23 (≥ 9) ^E
btGDF83.1	None	Cow	35	58	21	23/41 (56)	7/23 (≥ 30) ^E

[0124]

[0125] ^ABi-대립형질 KO는 PCR 생성물의 서열 분석에 의해 동정되었다. 상기 기술을 사용해서는 중첩 또는 상동접합성 결실만이 동정될 수 있다.

[0126] ^B섬유아세포는 형질감염시키고 동일한 TALEN 쌍을 사용하여 2주내에 2회 회수하였다.

[0127] ^C5/15 Bi-대립형질 콜로니가 이중 프레임-변환 대립유전자로서 확인되었다.

[0128] ^DPCR 앰플리콘내 두드러질 수 있는 총 결실을 갖는 콜로니만이 분석되었다.

[0129] ^EBi-대립형질 KO 콜로니는 고 한정 용융 분석에 의해 동정되었다. 동종접합성 변형만이 동정될 수 있다.

[0130] † - 95% 신뢰 간격이 예상되는 bi-대립형질 틀린 가설을 능가한다.

[0131] 실시예 10 TALEN을 암호화하는 DNA 및 mRNA는 정조줄기세포에서 활성이다.

[0132] 돼지 배아 세포는 10주령 수태지로부터 분리하였고 차등에 의해 집적하였다. eGFP 및 DMD - 특이적 TALEN을 암호화하는 플라스미드는 프로그램 X-001 및 X-005를 사용하고 AMAXA NUCLEOFECTOR 시스템 아맥사 용액 "V"- 및 "L" 및 "B"를 사용한 배아 세포내로 형질감염시켰다. 문헌[참조: Carlson 2013]을 참조한다. 각각의 형질감염 반응은 10⁶의 집적된 배아 세포 및 플라스미드 DNA를 암호화하는 지적된 μ g의 TALEN으로 수행하였다. 상기 동

일한 방법을 사용하여 DMD7.1 TALEN을 암호화하는 mRNA를 전달하였다. 뉴클레오택션 후, 이들은 37℃ 또는 30℃에서 5% CO₂ 대기에서 5일동안 배양하였다. 형질감염 효율은 GFP 및 UCH-L1 발현의 동시 국소위치 확인을 위한 면역형광 분석을 위해 평가하였다. 세포 생존능은 트립판 블루 배척에 의해 평가하였다.

[0133] 실시예 11 TALEN은 원시 배아 세포에서 HDR을 자극했다.

[0134] TALEN 자극된 HDR은 또한 닭 Ddx4 유전자좌에서 닭 원시 배아 세포(PGC)에서 시험하였다. 2개의 TALEN 쌍을 인트론 1(Ta11.1) 및 엑손 7(Ta17.1)상에 제조하였고 이들의 기능은 DF1 닭 세포에서 입증하였다. 또한 실시예 8 및 문헌[Carlson 2013]을 참조한다. 후속적으로, 각각의 TALEN 쌍은 GFP와 Ddx4 유전자의 엑손 2가 융합하도록 디자인된 공여자 표적화 벡터와 동시 형질감염시켰다. 예상된 바와 같이, Ta11.1을 사용한 절단은 상동성 재조합을 자극한 반면 공여자 표적화 벡터내 상동성 서열의 외부에 있는 Ta17.은 HDR을 자극하지 않았다.

[0135] 실시예 12 TALEN 자극된 HDR에 의한 뿔 모양의 세포로의 소 무각의 대립유전자의 유전자이입

[0136] 무각의 대립유전자는 최근에 도 1에 도시된 바와 같이 동정되었다(문헌참조: Medugorac, Seichter et al. 2012). 4개의 TALEN 쌍은 선택되어 (도 1) 복제된 영역의 3'를 절단하도록 디자인하였다. 뿔 모양의 홀슈타인 섬유아세포는 TALEN 쌍을 암호화하는 mRNA로 형질감염시키고 형질감염 3일 후 활성화에 대해 분석하였다. 조사자 분석은 각각의 TALEN 쌍의 활성을 밝혔다(도 1). 피크 활성은 HP1.3과 함께 관찰되었고 따라서 후속 실험을 위해 선택되었다. 뿔 모양의 홀슈타인 1차 섬유아세포는 지적된 양 및 처리로 ssDNA 복구 주형과 함께 2μg의 HP1.3 TALEN mRNA로 형질감염시켰다(도 4). 형질감염 3일 후 세포 집단은 PCR에 의해 무각의 것으로의 변환에 대해 분석하였다. NLS-RecA-Gal4를 사용한 복구 주형의 피복 (Liao and Essner 2011)은 무각 변환의 빈도에 상당한 효과를 나타냈다(도 4 패널 b 및 c). 무각 변환은 또한 개별 콜로니에서 명백하였다(도 3).

[0137] 방법: 대략적으로 600,000 세포를 하기의 파라미터(1 펄스; 1800 v; 20 ms 너비)하에 NEON 형질감염 시스템으로 형질감염시켰다. 각각의 형질감염은 지적된 복구 주형과 함께 2μg의 TALEN mRNA로 이루어졌다. 복구 주형은 하기의 방법에 의해 Gal4:RecA로 피복하였다. 500ng(총 3μl)의 복구 주형 PCR 생성물은 95℃에서 10분동안 항온처리하고 0.8μl의 완충액 [100 mM Tris OAc, pH 7.5; 500mM NaOAc; 10mM DTT; 10mM Mg(OAc)₂], 0.6 ul 16.2mM ATP γS (Sigma) 및 총 반응 용적 8 ul의 1,250 ng의 NLS-RecA-Gal4의 첨가 전에 2분동안 빙상에 위치시켰다. 이어서 상기 반응은 30분동안 37℃에서 항온처리하였고 빙상에 위치시켰다. 전체 용적을 단일 형질감염에 사용하였다. 세포를 배양하고 이전에 기재된 방법을 사용하여 분석하였다(문헌참조: Carlson, Tan et al. 2012). 상기 591 bp HDR 주형을 사용하였다.

[0138] 실시예 13

[0139] 무각 대립유전자를 유전자이입하기 위해 본원에 기재된 방법에 의해 제조된 세포 또는 변형된 배아를 대리 암컷에 클로닝하고/하거나 위치시키고 잉태시켜 무각 대립형질 유전자를 포함하는 생존 동물로 출생하게 한다.

[0140] 추가 기재

[0141] 1. 유각 대립형질 유전자로부터 무각 대립유전자로의 계통 변형을 포함하는 유전자 변형된 가축 동물. 2. 1에 있어서, 상기 동물이 유각 대립유전자를 갖는 동물의 제1 품종이고 무각 대립유전자가 동물의 제2 품종에서 발견되는, 동물. 3. 1 또는 2에 있어서, 상기 무각 대립유전자가 천연 대립유전자 및 합성 대립유전자로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 동물. 4. 3에 있어서, 상기 천연 대립유전자가 상기 품종에 전형적이거나 품종에서 돌연변이 대립유전자인, 동물. 5. 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 제1 품종이 헤레포드(Hereford), 앵거스(Angus), 쇼르톤(Shorthorn), 카롤라이스(Charolais), 리무진(Limousin), 시멘탈(Simental), 브라흐만(Brahman), 브란구스(Brangus), 와규(Wagyu), 및 산타 게르트루디스(Santa Gertrudis), 아이르셔(Ayrshire), 브라운 스위스(Brown Swiss), 캐나다엔(Canadienne), 도이치 벨테드(Dutch Belted), 구에른세이(Guernsey), 홀슈타인(Holstein) (홀슈타인-프리스얀(Holstein-Friesian)), 저지(Jersey), 케리(Kerry), 밀킹 데본(Milking Devon), 밀킹 쇼르톤(Milking Shorthorn), 노르웨지안 레드(Norwegian Red), 부사(Busa), 캐나다엔(Canadienne), 에스토니아 레드(Estonian Red), 플렉바흐(Fleckveih), 프리이안(Frieian), 기롤란도(Girolando), 이라와라(Illawarra), 이리시 모일레드(Irish Moiled), 라인백(Lineback), 메우세 라인 이셀(Meuse Rhine Issel), 몽벨리아레데(Montbeliaredede), 노르망디(Normande), 란달(Randall), 사히왈(Sahhiwal), 오스트레일리안 밀킹 제부(Australian Milking Zebu), 시멘탈(Simental), 차이아나나 마르키기아나(Chianina Marchigiana), 및 로마그놀라(Romagnola)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 동물. 6. 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 품종이 앵거스(Angus), 레드 앵거스(Red Angus), 레드 폴(Red Poll), 갈로웨이(Galloway), 벨테드 갈로웨이(Belted Galloway), 아메리칸 화이트 파크(American White Park), 브리티쉬 화이

트(British White), 아메리팍스(Amerifax), 자메이카 블랙(Jamaica Black), 자메이카 레드(Jamaica Red), 무레이 그레이(Murray Grey), 브란구스(Brangus), 레드 브란구스(Red Brangus), 세노폴(Senopol), 보어 고트(Boer goats)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 동물. 7. 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 상기 무각 대립유전자가 Pc 셀틱(Celtic) 기원 및 PF 프리시안(Friesian) 기원으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 동물. 8. 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 선조 동물 또는 선조 동물의 후손인, 동물. 9. 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 마커가 부재이고/이거나 리포터가 부재인, 동물. 10. 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 계놈 변형이 단지 무각 대립유전자에서만 변형된, 동물. 11. 10에 있어서, 상기 유전자 변형된 유기체가 소, 염소, 양 및 우제류로 이루어진 그룹으로부터 선택된, 방법. 12. 가축으로서 1 내지 11 중 어느 하나의 동물 또는 상기 동물의 후손의 용도. 13. 세포의 유각 대립유전자에 대한 계놈 변형을 포함하는 생체 외 세포. 14. 13에 있어서, 유각 유전자좌에서의 변형이 유각 대립유전자로부터 무각 대립유전자로의 변형인, 세포. 15. 13 또는 14에 있어서, 상기 세포가 가축 세포인, 세포. 16. 13 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포가 소, 염소, 양 및 우제류로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 세포. 17. 13 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포가 헤레포드(Hereford), 앵거스(Angus), 쇼르톤(Shorthorn), 카롤라이스(Charolais), 리무진(Limousin), 시멘탈(Simmental), 브라흐만(Brahman), 브란구스(Brangus), 와규(Wagyu), 및 산타 게르트루디스(Santa Gertrudis), 아이르셔(Ayrshire), 브라운 스위스(Brown Swiss), 캐나다엔(Canadienne), 도이치 벨테드(Dutch Belted), 구에른세이(Guernsey), 홀슈타인(Holstein)(홀슈타인-프리시안), 저지(Jersey), 케리(Kerry), 밀킹 데본(Milking Devon), 밀킹 쇼르톤(Milking Shorthorn), 노르웨지안 레드(Norwegian Red), 부사(Busa), 캐나다엔(Canadienne), 에스토니아 레드(Estonian Red), 플렉베이(Fleckveih), 프리안(Frieian), 기롤란도(Girolando), 이라와라(Illawarra), 이리쉬 모일드(Irish Moiled), 라인백(Lineback), 메우스 라인 이셀(Meuse Rhine Issel), 몬트벨리아레데(Montbeliared), 노르망디(Normande), 란달(Randall), 사히왈(Sahhiwal), 오스트렐리안 밀킹 제부(Australian Milking Zebu), 시멘탈(Simmental), 차이안나나 마르키기아나(Chianina Marchigiana), 및 로마그놀라(Romagnola)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 가축 세포인, 세포. 18. 13 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포가 1차 세포, 1차 체세포 또는 접합자인, 세포. 19. 13 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 가축 줄기 세포 또는 원시 배아 세포인, 세포. 20. 13 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포가 변형되는 경우, 무각 대립유전자를 암호화하는 상동성 의존 재조합 주형을 포함하는, 세포. 21. 20에 있어서, 세포의 유각 대립유전자에서 염색체 DNA를 절단하는 부위-지시된 엔도뉴클레아제를 추가로 포함하는, 세포. 22. 동물을 클로닝하기 위한 12 내지 21 중 어느 하나의 세포의 용도. 23. 무각 대립유전자를 암호화하고, 예를 들어, mRNA 및/또는 HDR 주형으로서 천연 유각 대립유전자와 중첩되는 서열을 포함하는 분리된(또는 합성 또는 천연으로부터 분리된) 핵산. 24. 예를 들어, 키트로서 다른 성분들과 혼합될 수 있는 23의 분리된 핵산을 발현하기 위한 플라스미드 또는 벡터. 25. 가축 1차 세포, 가축 1차 체세포, 가축 줄기 세포, 가축 원시 배아 세포, 가축 접합자, 가축 배반포, 또는 가축 배아의 천연 유각 대립유전자를 변화시킴을 포함하고 상기 유각 대립유전자가 무각 대립형질 유전자로 변화되는 유전자 변형된 가축 유기체를 제조하는 방법. 26. 25에 있어서, 가축이 소, 염소 및 양으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법. 27. 25 또는 26에 있어서, 천연 유각 대립유전자내 부위를 특이적으로 절단하는 부위 특이적 뉴클레아제를 암호화하는 핵산 및 무각 대립유전자를 포함하는 핵산 상동성 의존 재조합 주형을 가축 1차 세포, 가축 1차 체세포, 가축 줄기 세포, 가축 원시 배아 세포, 가축 접합자, 가축 배반포 또는 가축 배아의 천연 유각 대립유전자로 도입함을 포함하는 방법. 28. 25 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 부위 특이적 뉴클레아제가 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화인자-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 및 클러스터되고 일정한 사이 공간 단축 팔린드롬 반복체(CRISPR)로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법. 29. 25 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 1차 체세포가 변화된, 방법. 30. 25 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 배아가 변화된, 방법. 31. 25 내지 28 또는 30 중 어느 하나에 있어서, 접합자, 배반포 또는 배아를 잉태한 모 동물에 위치시킴을 추가로 포함하는, 방법. 32. 25 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 전체 동물을 제조하기 위해 1차 세포, 1차 체세포 또는 접합자를 클로닝함을 추가로 포함하는, 방법. 33. 25 내지 32 중 어느 하나의 방법을 사용하여 제조된 가축 동물. 34. 무각 표현을 갖는 가축 원조 동물을 제조하기 위한 25 내지 32 중 어느 하나의 방법의 용도.

[0142] 참조문헌

[0143] 명세서 내 모든 임의의 부분에 제시된 특허출원, 특허, 공보 및 저널 잡지는 모든 목적을 위해 본원에 참조로 인용되고; 분쟁이 있는 경우 본원 명세서가 지배한다.

- M. CHRISTIAN, et al., *Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases*, 186 Genetics (2010).
- J.C. MILLER, et al., *A TALE nuclease architecture for efficient genome editing*, 29 Nature Biotech. (2011).
- D. A. MCGREW & K. L. KNIGHT, *Molecular design and functional organization of the RecA protein*, 38 Crit Rev Biochem Mol Biol (2003).
- M. M. COX, *Recombinational DNA repair in bacteria and the RecA protein*, 63 Prog Nucleic Acid Res Mol Biol (1999).
- B. REISS, et al., *RecA protein stimulates homologous recombination in plants*, 93 Proc Natl Acad Sci U S A (1996).
- B. REISS, et al., *RecA stimulates sister chromatid exchange and the fidelity of double-strand break repair, but not gene targeting, in plants transformed by Agrobacterium*, 97 Proc Natl Acad Sci U S A (2000).
- O. G. SHCHERBAKOVA, et al., *Overexpression of bacterial RecA protein stimulates homologous recombination in somatic mammalian cells*, 459 Mutat Res (2000).
- R. J. YANEZ & A. C. PORTER, *Gene targeting is enhanced in human cells overexpressing hRAD51*, 6 Gene Ther (1999).
- Z. CUI, et al., *RecA-mediated, targeted mutagenesis in zebrafish*, 5 Mar Biotechnol (NY) (2003).
- N. TAKAHASHI & I. B. DAWID, *Characterization of zebrafish Rad52 and replication protein A for oligonucleotide-mediated mutagenesis*, 33 Nucleic Acids Res (2005).
- T. CERMAK, et al., *Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting*, (in press) Nucl. Acids Res. (2011).

[0144]

D. F. CARLSON, et al., *Strategies for selection marker-free swine transgenesis using the Sleeping Beauty transposon system*, 20 Transgenic Res (2011).

A.M. GEURTS, et al., *Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases*, 325 Science (2009).

I.D. CARBERY, et al., *Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases*, 186 Genetics (2010).

T. MASHIMO, et al., *Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases*, 5 PLoS One (2010).

L. TESSON, et al., *Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs*, 29 Nat Biotechnol (2011).

C. J. PALGRAVE, et al., *Species-specific variation in RELA underlies differences in NF-kappaB activity: a potential role in African swine fever pathogenesis*, 85 J Virol (2011).

C. MUSSOLINO, et al., *A novel TALE nuclease scaffold enables high genome editing activity in combination with low toxicity*, Nucleic Acids Res (2011).

D. Y. GUSCHIN, et al., *A rapid and general assay for monitoring endogenous gene modification*, 649 Methods Mol Biol (2010).

Y. DOYON, et al., *Transient cold shock enhances zinc-finger nuclease-mediated gene disruption*, 7 Nat Methods (2010).

H.J. KIM, et al., *Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly*, 19 Genome Res. (2009).

H. J. LEE, et al., *Targeted chromosomal deletions in human cells using zinc finger nucleases*, 20 Genome Res (2010).

E. E. PEREZ, et al., *Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases*, 26 Nat Biotechnol (2008).

D. J. BLAKE, et al., *Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle*, 82 Physiol Rev (2002).

L. GROBET, et al., *A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle*, 17 Nat Genet (1997).

R. KAMBADUR, et al., *Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle*, 7 Genome Res (1997).

Carlson, D. F., W. Tan, et al. (2012). "Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock." Proceedings of the National Academy of Sciences.

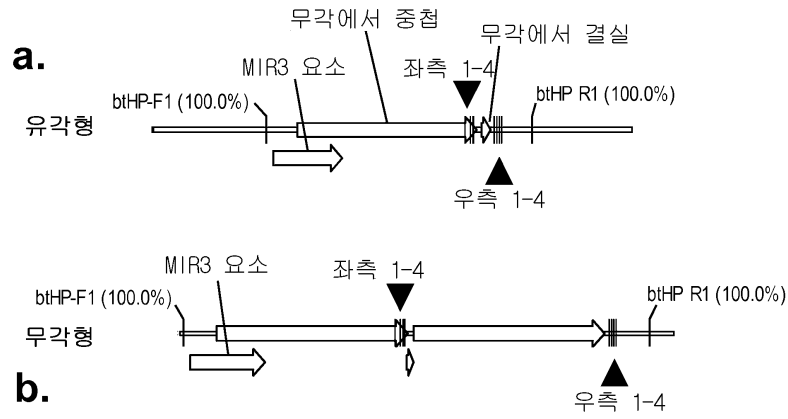
Liao, H. K. and J. J. Essner (2011). "Use of RecA fusion proteins to induce genomic modifications in zebrafish." Nucleic acids research 39(10): 4166-4179.

Medugorac, I., D. Seichter, et al. (2012). "Bovine polledness - an autosomal dominant trait with allelic heterogeneity." PloS one 7(6): e39477.

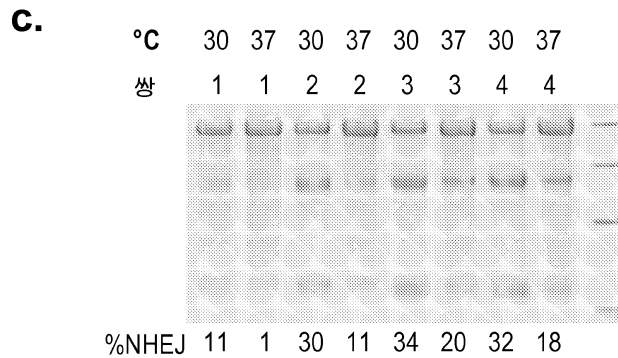
Carlson et al., (2013) "Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases." Proceedings of the National Academy of Sciences.

도면

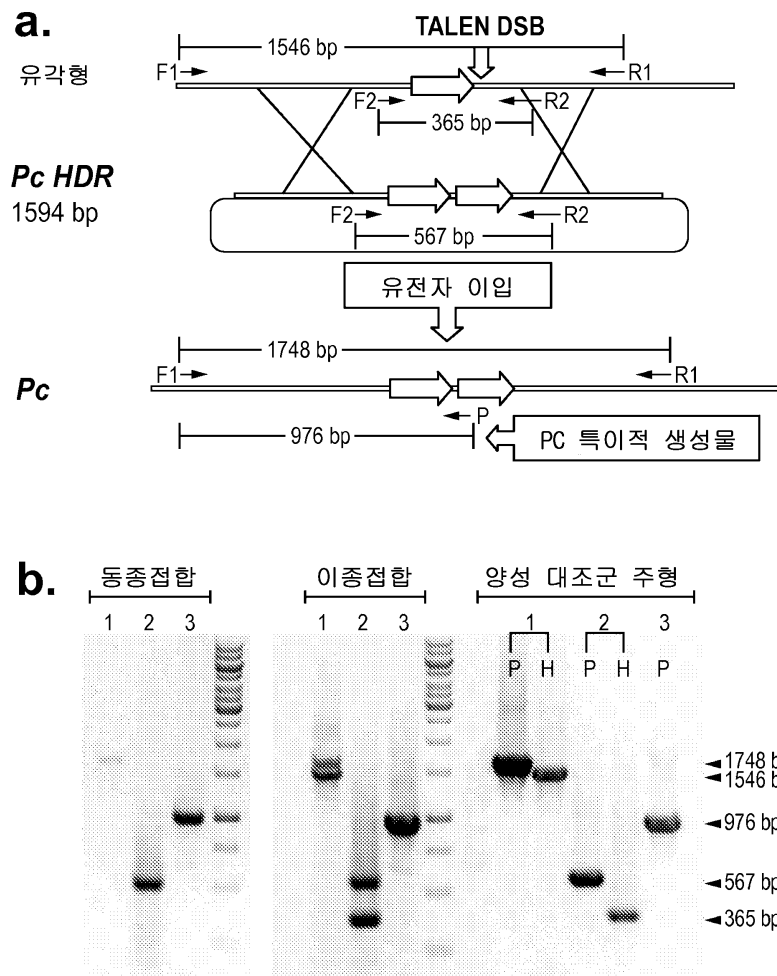
도면1



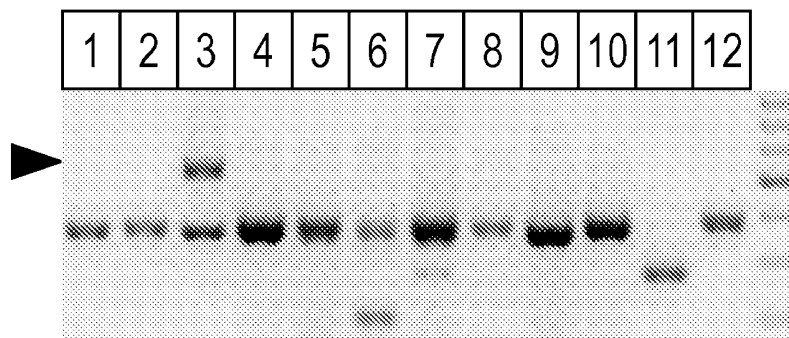
TALEN ID	우측 TALEN (센스 가닥)	좌측 TALEN (센스 가닥)
HP1.1	GAGATAGTTTTCTTGGT	TTTAGATCAAACTCTCTTTTC
HP1.2	AGTTTTCTTGGTAGG	TAGATCAAACTCTCTTTTC
HP1.3	TTTCTTGGTAGGCTG	ATCAAACTCTCTTTTC
HP1.4	TCTTGGTAGGCTGGT	CAAACTCTCTTTTC



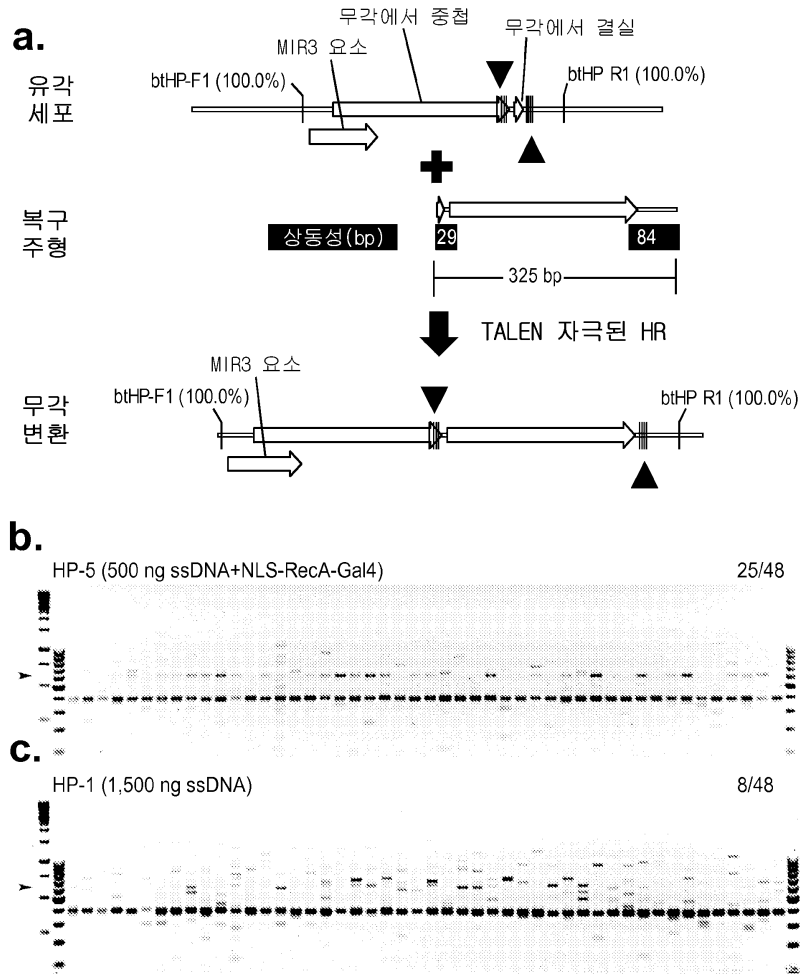
도면2



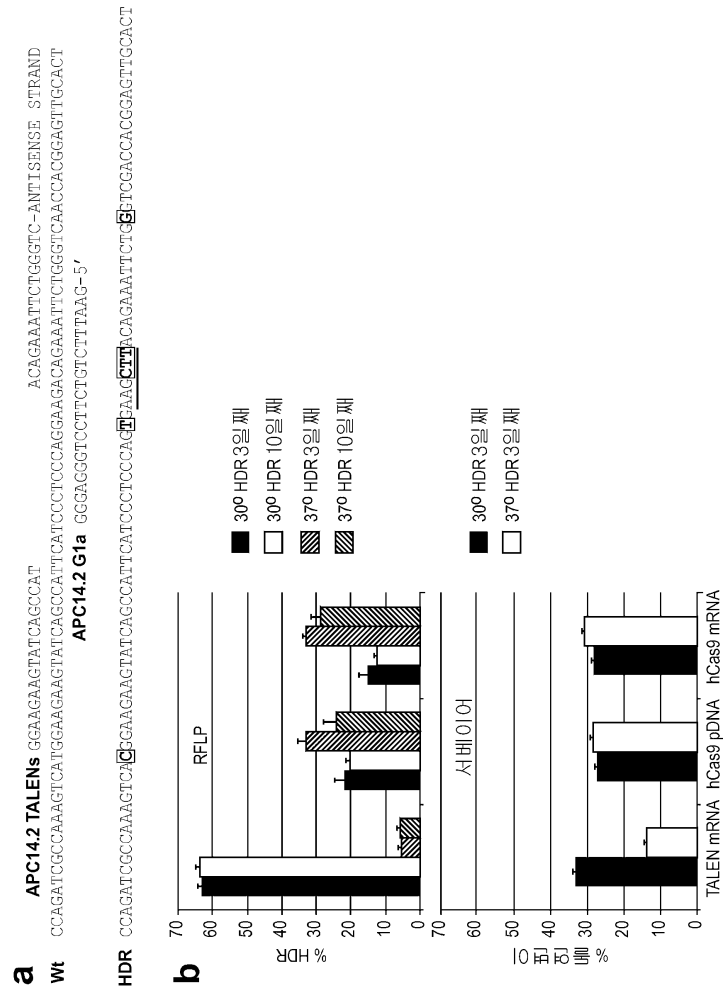
도면3



도면4



도면5



서열목록

- <110> Fahrenkrug, Scott C
Carlson, Daniel F
- <120> Hornless Livestock
- <130> ip-dardi1524
- <150> US 61/752,232
- <151> 2013-01-14
- <150> US 61/870,570
- <151> 2013-08-27
- <160> 26
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 17
- <212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TALEN	
<400>	1	
	gagatagttt tcttggt	17
<210>	2	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TALEN	
<400>	2	
	tttagatcaa aactctcttt tc	22
<210>	3	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TALEN	
<400>	3	
	agttttcttg gtagg	15
<210>	4	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TALEN	
<400>	4	
	tagatcaaaa ctctcttttc	20
<210>	5	
<211>	15	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	TALEN	
<400>	5	
	tttcttggtg ggctg	15
<210>	6	

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TALEN
 <400> 6
 atcaaaactc tcttttc 17
 <210> 7
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TALEN
 <400> 7
 tcttggtagg ctggt 15

 <210> 8
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TALEN
 <400> 8
 caaaactctc ttttc 15
 <210> 9
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TALEN
 <400> 9
 ggaagaagta tcagccat 18
 <210> 10
 <211> 16
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> TALEN
 <400> 10

acagaaattc tgggtc	16
<210> 11	
<211> 86	
<212> DNA	
<213> Sus scrofa	
<400> 11	
ccagatcgcc aaagtcattg aagaagtatc agccattcat ccctcccagg aagacagaaa	60
ttctgggtca accacggagt tgcact	86
<210> 12	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> gRNA	
<400> 12	
gggagggtcc ttctgtcttt aag	23
<210> 13	
<211> 90	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HDR	
<400> 13	
ccagatcgcc aaagtcacgg aagaagtatc agccattcat ccctcccagg gaagcttaca	60
gaaattctgg gtcgaccacg gattgcact	90
<210> 14	
<211> 325	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HDR Template	
<400> 14	
gtctggggtg agatagtttt cttggtaggc tgtgaaatga agagtacgtg gtaccaacta	60
ctttctgagc tcacgcacag ctggacgtct gcgcctttct tgttatactg cagatgaaaa	120
cattttatca gatgtttgcc taagtatgga ttacatttaa gatacatatt tttctttctt	180

gtctgaaagt cttttagtg agagcaggct ggaattatgt ctggggtgag atagttttct	240
ttgtctcttta gatcaaaact ctcttttcat ttttaagtct atcccaaaag tgtgggaggt	300
gtccttgatg ttgaattata ggcag	325
<210> 15	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Primer	
<400> 15	
caaagttggt gacgtgacag aggtc	25
<210> 16	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
><223> Synthetic Primer	
<400> 16	
gtgtgccatc cctactttgt ggaa	24
<210> 17	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Primer	
<400> 17	
gatgtattcc tcagactttt cc	22
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Primer	
<400> 18	
gtggaatctc atcttaccaa	20
<210> 19	
<211> 24	

<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Primer	
<400>	19	
	gggcaagttg ctcagctgtt ttg	24
<210>	20	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Primer	
<400>	20	
	gggcaagttg ctcagctgtt ttg	24
<210>	21	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Primer	
<400>	21	
	atcgaacctg ggtcttctgc attg	24
<210>	22	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Primer	
<400>	22	
	tccgcatggt ttagcaggat tca	23
<210>	23	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Synthetic Primer	
<400>	23	
	acgtactctt catttcacag cctac	25
<210>	24	

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Primer

<400> 24

gtctgggggtg agatagtttt cttgg

25

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Primer

<400> 25

ggcagagatg ttggtcttgg gtgt

24

<210> 26

<211> 12

<212> DNA

<213> Bos taurus

<400> 26

ttctcagaat ag

12