



등록특허 10-2138723



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년07월29일  
(11) 등록번호 10-2138723  
(24) 등록일자 2020년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*A01K 67/027* (2006.01) *C12N 15/85* (2006.01)  
*C12N 5/0735* (2010.01) *C12N 5/074* (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
*A01K 67/0276* (2013.01)  
*C12N 15/8509* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2016-7002367  
(22) 출원일자(국제) 2014년08월07일  
심사청구일자 2019년08월07일  
(85) 번역문제출일자 2016년01월27일  
(65) 공개번호 10-2016-0035585  
(43) 공개일자 2016년03월31일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/050178  
(87) 국제공개번호 WO 2015/021298  
국제공개일자 2015년02월12일  
(30) 우선권주장  
61/863,147 2013년08월07일 미국(US)

(56) 선행기술조사문현  
US20130267575 A1  
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 43 항

심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 **LINCRNA-결핍 비인간 동물**

**(57) 요 약**

하나 이상의 lncRNA의 기능성 결여를 나타내는 유전자 변형된 비인간 동물이 제공된다. lncRNA-암호화 서열을 파괴, 결실 및/또는 치환하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 조기 노화되는 유전자 변형된 마우스가 제공된다. 또한 하나 이상의 lncRNA의 기능상실을 포함하도록 유전자 변형된 세포, 조직 및 배아가 제공된다.

(52) CPC특허분류

**C12N 5/0606** (2013.01)

**C12N 5/0696** (2013.01)

**A01K 2217/075** (2013.01)

**A01K 2227/105** (2013.01)

**A01K 2267/03** (2013.01)

**A01K 2267/0393** (2013.01)

(72) 발명자

린 존

미국 매사추세츠 02215 보스턴 커먼웰스 애비뉴  
416 아파트먼트 619

**프렌듀이 데이비드**

미국 뉴욕 10016 뉴욕 이스트 38 스트리트 330 아  
파트먼트 53에이

**발렌주엘라 데이비드 엠.**

미국 뉴욕 10598 요크타운 하이츠 지오다노 드라이  
브 529

(56) 선행기술조사문헌

WO2012018881 A2

eLife. 2013; 2: e01749(2013.12.31)

PLoS Genet. vol. 7(9), e1002248(Epub 2011 Sep  
1)

US20120004278 A1

CN101619312 A

Developmental Cell, vol.24(2),  
pp.206-214(2013).

Development, vol.137(16), pp.2643-2652(2010).

Transgenic Research, vol.23, pp.201-250(2013).

Nature Biotechnology, vol.21(6),  
pp.652-659(2003).

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

제1 항에 있어서, 하나의 변형된 내인성 긴 비암호화 RNA (lincRNA) 좌위를 포함하는 유전자 변형된 비인간 동물로서,

적어도 하나의 변형된 lincRNA 좌위는

(a) linc RNA 좌위의 제2 엑손, 최종 엑손 및 상기 제2 엑손과 상기 최종 엑손 사이에서 모든 엑손의 삽입 핵산으로의 치환; 또는

(b) lincRNA 좌위의 전체 RNA 암호화 영역의 삽입 핵산으로의 치환

에 의한 기능상실 돌연변이를 포함하고,

상기 lincRNA 좌위는 전사적으로 활성이고,

상기 삽입 핵산은 (i) 리포터를 암호화하고, (ii) 뉴클레오타이드 서열의 발현을 유발시키는 내인성 lincRNA 프로모터에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 변형된 내인성 lincRNA 좌위에 위치하는 핵산 서열을 포함하고,

상기 비인간 동물은 lincRNA의 기능상실과 관련된 표현형을 나타내는,

유전자 변형된 비인간 동물.

#### 청구항 2

제1 항에 있어서, 삽입 핵산은 선택가능한 마커를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 3

제2 항에 있어서, 선택가능한 마커를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 선택가능한 마커의 발현을 유발시키는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 4

제1 항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열의 발현은 lincRNA의 발현 패턴을 따르는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 5

제1 항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 코작(Kozak) 공통서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 6

제1 항에 있어서, 리포터는  $\beta$ -갈락토시다제, 녹색 형광 단백질(GFP), 증강된 녹색 형광 단백질(eGFP), 엠플럼(mPlum), 엠체리(mCherry), 티디토마토(tdTomato), 엠스트로베리(mStrawberry), 제이-레드(J-Red), 디에스레드(DsRed), 엠오렌지(mOrange), mKO, 엠시트린(mCitrine), 비너스(Venus), YPet, 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 에메랄드(Emerald), CyPet, 시안 형광 단백질(CFP), 세루리안(Cerulean), 티-사파이어(T-Sapphire), 루시퍼라제, 알칼린 포스파타제, 또는 이들의 조합 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 7

제2 항에 있어서, 삽입 핵산은 리포터를 암호화하는 세그먼트 및/또는 선택가능한 마커를 암호화하는 세그먼트에 측접하는 부위-특이적 재조합 부위를 포함하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 8

제1 항에 있어서, lincRNA는 *Pint*, *Celrr*, *Crnde*, *Eldr*, *Fendrr*, *Halr1*, *Hotair*, *Hottip*, *Hoxallos*, *Pantr1*,

*Pantr2*, *Ptgs2os2*, *lincenc1*, *Trp53cor1*, *lincppara*, *Mannr*, *Haglr*, *Peril*, *Kantr*, *Tug1*, 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 9

제1 항에 있어서, 비인간 동물은 변형된 lincRNA 좌위에 동형 접합성인 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 10

제1 항에 있어서, 비-인간 동물은 설치류인 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 11

제1 항에 있어서, 비-인간 동물은 래트 또는 마우스인 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 12

제1 항 내지 제11 항 중 어느 한 항에 있어서, 비-인간 동물은 마우스인 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 13

제12 항에 있어서, lincRNA 좌위는 *Pint*, *Pantr2*, *Fendrr*, *HOTTIP*, *Haglr*, *Kantr*, *Peril*, 또는 *Tug1*인 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 14

제13 항에 있어서, 표현형은

- (a) 조로-관련 표현형;
- (b) 치사;
- (c) 폐 발달의 결함;
- (d) 골격 및/또는 근육 조직의 형태적 또는 기능적 기형;
- (e) 하나 이상의 조직에서 근육량의 손실;
- (f) 뇌 발생에서의 결함;
- (g) 감염 또는 다른 염증 발작 결함; 또는
- (h) 상기 (a) 내지 (g)의 임의의 조합

인 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 15

제12 항에 있어서, lincRNA은 *Pint*이고, 기능상실 돌연변이는 하기를 나타내는 마우스를 생성하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물:

- (a) 야생형 대조군보다 더 느린 성장 속도;
- (b) 근육 강도의 감소;
- (c) 섬유증;
- (d) 야생형 대조군보다 더 낮은 체지방 함량;
- (e) 야생형 대조군보다 더 낮은 대퇴골 골 무기질 밀도 및 골량;
- (f) 야생형 대조군에 비해 감소된 근육량;
- (g) 중앙값 수명의 감소;
- (h) 척추변형;

- (i) 장기 위축;
- (j) 조로-표현형;
- (k) 뇌 발생에서의 결함; 또는
- (l) 상기 (a) 내지 (k)의 임의의 조합.

#### 청구항 16

제15 항에 있어서, 삽입 핵산은 게놈 좌표 염색체 6: 31166026-31197846 사이에서 게놈 서열을 치환하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 17

제12 항에 있어서, lincRNA는 *Pantr2*이고 기능상실 돌연변이는 뇌 발생에서의 결함 및/또는 조로 관련 표현형을 나타내는 마우스를 생성하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 18

제17 항에 있어서, 삽입 핵산은 게놈 좌표 염색체 1: 42707143-42713698 사이에서 게놈 서열을 치환하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 19

제12 항에 있어서, lincRNA는 *Fendrr*이고 기능상실 돌연변이는 치사 및/또는 폐 발달의 결함을 나타내는 마우스를 생성하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 20

제19 항에 있어서, 삽입 핵산은 게놈 좌표 염색체 8: 121054882-121074065 사이에서 게놈 서열을 치환하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 21

제12 항에 있어서, lincRNA는 *HOTTIP*이고 기능상실 돌연변이는 골격 및/또는 근육에서 적어도 하나의 형태적 또는 기능적 결함을 나타내는 마우스를 생성하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 22

제21 항에 있어서, 삽입 핵산은 게놈 좌표 염색체 6: 52262834-52267603 또는 염색체 6: 52265374-52267603 사이에서 게놈 서열을 치환하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 23

제12 항에 있어서, lincRNA는 *Haglr*이고 기능상실 돌연변이는 치사를 나타내는 마우스를 생성하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 24

제23 항에 있어서, 삽입 핵산은 게놈 좌표 염색체 2: 74750433-74762886 사이에서 게놈 서열을 치환하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 25

제12 항에 있어서, lincRNA는 *Kantr*이고 기능상실 돌연변이는 뇌 발생에서의 결함 및/또는 조로 관련 표현형을 나타내는 마우스를 생성하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

#### 청구항 26

제25 항에 있어서, 삽입 핵산은 게놈 좌표 염색체 X: 152298544-152327475 사이에서 게놈 서열을 치환하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

**청구항 27**

제12 항에 있어서, lincRNA는 *Peril*이고 기능상실 돌연변이는 뇌 발생에서의 결함, 조로 관련 표현형, 및/또는 출산전후 치사를 나타내는 마우스를 생성하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

**청구항 28**

제27 항에 있어서, 삽입 핵산은 게놈 좌표 염색체 3: 34767849-34782292 사이에서 게놈 서열을 치환하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

**청구항 29**

제12 항에 있어서, lincRNA는 *Tug1*이고 기능상실 돌연변이는 뇌 발생에서의 결함 및/또는 조로-관련 표현형을 나타내는 마우스를 생성하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

**청구항 30**

제29 항에 있어서, 삽입 핵산은 게놈 좌표 염색체 11: 3639794-3648758 또는 염색체 11: 3639794-3645518 사이의 게놈 서열을 치환하는 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

**청구항 31**

제1 항 내지 제11 항 및 제13 항 내지 제30 항 중 어느 한 항의 비인간 동물로부터 유래된 세포, 조직, 또는 배아.

**청구항 32**

만능 세포에서 관심 대상의 lincRNA 좌위에 의한 상동성 재조합을 겪어서 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암에 측첩되는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터로서,

삽입 핵산은 리포터를 암호화하는 핵산 서열을 포함하고,

관심 대상의 lincRNA 좌위에 의한 상동성 재조합에 따라, 삽입 핵산은

(i) 내인성 lincRNA 프로모터에 작동가능하게 연결되고,

(ii) (a) linc RNA 좌위의 제2 엑손, 최종 엑손, 및 상기 제2 엑손과 상기 최종 엑손 사이에서 모든 엑손의 삽입 핵산으로 치환되거나; 또는

(b) lincRNA 좌위의 전체 RNA 암호화 영역의 삽입 핵산으로 치환되고,

상기 리포터를 암호화하는 핵산 서열은 lincRNA 좌위에서 상기 핵산 서열의 발현을 유발시키는 내인성 lincRNA 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것을 특징으로 하는 표적화 벡터.

**청구항 33**

제32 항에 있어서, 리포터는  $\beta$ -갈락토시다제, 녹색 형광 단백질(GFP), 증강된 녹색 형광 단백질(eGFP), 앰플럼, 앰체리, 티디토마토, 앰스트로베리, 제이-레드, 디에스레드, 앰오렌지, mKO, 앰시트린, 비너스, YPet, 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 에메랄드, CyPet, 시안 형광 단백질(CFP), 세루리안, 티-사파이어, 루시피라제, 알칼린 포스파타제, 또는 이들의 조합 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 표적화 벡터.

**청구항 34**

제32 항에 있어서, 삽입 핵산은 선택가능한 마커를 암호화하는 핵산 서열을 더 포함하되, 선택가능한 마커를 암호화하는 핵산 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결되는 것을 특징으로 하는 표적화 벡터.

**청구항 35**

제34 항에 있어서, 리포터를 암호화하는 세그먼트 및/또는 선택가능한 마커를 암호화하는 세그먼트에 측첩하는 부위-특이적 재조합 부위를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 표적화 벡터.

### 청구항 36

제33 항 또는 제34 항에 있어서, 리포터를 암호화하는 핵산 서열 및/또는 선택가능한 마커를 암호화하는 핵산 서열은 코작 공통서열을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 표적화 벡터.

### 청구항 37

제1 항의 비인간 동물의 제조방법으로서,

(A) 만능 세포를 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암에 측접되는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 작제물과 접촉시키는 단계로서, 표적화 작제물은 세포의 계놈 내에서 lincRNA 좌위에 의한 상동성 재조합을 겪어서 변형된 lincRNA 좌위를 포함하는 변형된 만능 세포를 형성하는 단계;

(B) 변형된 만능 세포를 숙주 배아 내로 도입하는 단계; 및

(C) 대리모에서 숙주 배아를 임신시키는 단계로서, 대리모는 변형된 lincRNA 좌위를 포함하는 자손을 생산하는 단계

를 포함하되,

변형된 lincRNA 좌위는

(a) 내인성 lincRNA 프로모터를 포함하고, 및

(b) (I) linc RNA 좌위의 제2 엑손, 최종 엑손 및 상기 제2 엑손과 상기 최종 엑손 사이에서 모든 엑손의 삽입 핵산으로의 치환; 또는

(II) lincRNA 좌위의 전체 RNA 암호화 영역의 삽입 핵산으로의 치환

에 의한 기능상실 돌연변이를 포함하고,

상기 lincRNA 좌위는 전사적으로 활성이고,

상기 삽입 핵산은 (i) 리포터를 암호화하고, (ii) 뉴클레오타이드 서열의 발현을 유발시키는 내인성 lincRNA 프로모터에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 변형된 내인성 lincRNA 좌위에 위치하는 핵산 서열을 포함하고,

상기 적어도 하나의 lincRNA의 기능상실 돌연변이는 자손이 기능상실 돌연변이와 관련된 표현형을 나타내는, 방법.

### 청구항 38

제37 항에 있어서, lincRNA는 *Pint*, *Celrr*, *Crnde*, *Eldr*, *Fendrr*, *Ha1r1*, *Hotair*, *Hottip*, *Hoxa11os*, *Pantr1*, *Pantr2*, *Ptgs2os2*, *lincenc1*, *Trp53cor1*, *lincppara*, *Mannr*, *Hag1r*, *Peri1*, *Kantr*, *Tug1*, 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 39

시험관 내에서 만능 세포 내 lincRNA 좌위를 변형시키는 방법으로서,

(A) lincRNA 좌위에 의해 상동성 재조합을 겪을 수 있는 5' 및 3' 상동성 암에 측접되는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 작제물을 만능 세포 내로 도입하는 단계; 및

(B) lincRNA 좌위에서 표적화된 유전자 변형을 포함하는 변형된 만능 세포를 동정하는 단계

를 포함하되,

변형된 lincRNA 좌위는

(a) 내인성 lincRNA 프로모터를 포함하고, 및

(b) (I) linc RNA 좌위의 제2 엑손, 최종 엑손 및 상기 제2 엑손과 상기 최종 엑손 사이에서 모든 엑손의 삽입 핵산으로의 치환; 또는

(II) lincRNA 좌위의 전체 RNA 암호화 영역의 삽입 핵산으로의 치환

에 의한 기능상실 돌연변이를 포함하고,

상기 lincRNA 좌위는 전사적으로 활성이고,

상기 삽입 핵산은 (i) 리포터를 암호화하고, (ii) 뉴클레오파이드 서열의 발현을 유발시키는 내인성 lincRNA 프로모터에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 변형된 내인성 lincRNA 좌위에 위치하는 핵산 서열을 포함하고,

상기 만능 세포로부터 생성된 비인간 동물은 기능상실 돌연변이와 관련된 표현형을 나타내는, 방법.

#### 청구항 40

제39 항에 있어서, 만능 세포는 인간 iPS 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 41

제40 항에 있어서, 만능 세포는 마우스 또는 래트 배아 줄기 (ES) 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 42

제39 항 내지 제41 항 중 어느 한 항에 있어서, lincRNA는 *Pint*, *Celrr*, *Crnde*, *Eldr*, *Fendrr*, *Ha1r1*, *Hotair*, *Hottip*, *Hoxa11os*, *Pantr1*, *Pantr2*, *Ptgs2os2*, *lincenc1*, *Trp53cor1*, *lincppara*, *Mannr*, *Hag1r*, *Peril*, *Kantr*, *Tug1*, 또는 이들의 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 43

세포, 조직, 또는 배아를 얻는 방법으로서, 제1 항 내지 제11 항 및 제13 항 내지 30 항 중 어느 한 항의 비인간 동물로부터 세포, 조직 또는 배아를 유도하는 단계를 포함하는, 방법.

#### 청구항 44

삭제

#### 청구항 45

삭제

#### 청구항 46

삭제

#### 청구항 47

삭제

#### 청구항 48

삭제

#### 청구항 49

삭제

#### 청구항 50

삭제

#### 청구항 51

삭제

#### 청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

#### 관련출원과의 상호참조

[0002]

본 출원은 2013년 8월 7일자로 출원된 미국 가출원 특허 제61/863,147호의 유익을 주장하며, 이 기초출원은 본 명세서에 그의 전문이 참고로 포함된다.

[0003]

#### EFS웹을 통해 텍스트 파일로서 제출된 서열 목록에 대한 언급

[0004]

서열목록의 공식적 사본은 2014년 8월 7일 생성된 파일명이 448071SEQLIST.TXT이면서, 용량이 1 킬로바이트인 ASCII 형식의 서열목록으로서 EFS-Web을 통해 전자적으로 제출되며, 명세서와 동시에 제출된다. 본 ASCII 형식 문서에 포함된 서열목록은 본 명세서의 부분이며, 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0005]

#### 본 발명의 기술분야

[0006]

긴 비암호화 RNA(long non-coding: "lncRNA")에서 하나 이상의 결핍을 포함하는 비인간 동물, 세포 및 조직 및 그들의 제조방법. 비기능적 lncRNA, 또는 하나 이상의 lncRNA의 네아웃(knockout)을 포함하는 비인간 동물, 및 이의 제조방법. 조로와 일치되는 표현형을 나타내는 유전자 변형된 비인간 동물.

## 배경 기술

[0007]

긴 비암호화 RNA(lncRNA) 및 거대 유전자간 비암호화 RNA(lincRNA)로서 알려진 하위부류는 구조, 합성 및 그들의 유전자의 염색질 특징이 mRNA와 비슷한 포유류에서 대략 15,000개의 다양한 전사체를 포함한다. 특정 lncRNA 와 관련된 기능 또는 표현형은 매우 다수의 동정된 lncRNA에 대해 알려져 있지 않다. 일부 lncRNA는 동물에서 전사의 활성자 또는 리프레서로서 전사 제어에 참여하는 것으로 믿어지며; 나머지는 전사 후에 또는 일부 다른 메커니즘에 의해 기능할 수 있다. 따라서, lncRNA를 조작하는 능력은 lncRNA의 정체와 기능에 따라서 관심 대상의 발생하는 표현형에 대한 도구를 제공할 수 있다. lncRNA를 조작하는 방법 및 조성물에 대한 당업계의 필요 및 lncRNA 조작을 통한 비인간 동물의 표현형을 생성하기 위한 필요가 있다.

## 발명의 내용

[0008]

하나 이상의 lncRNA의 네아웃을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 비기능성 긴 비암호화 RNA(lncRNA)를 포함하는 비인간 동물, 세포, 조직 및 배아가 제공된다. lncRNA 발현을 조작하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. lncRNA를 변형 또는 네아웃하는 것과 관련된 표적화 조성물이 또한 제공된다. 하나 이상의 lncRNA의 비기능과 관련된 표현형을 나타내는 비인간 동물, 세포 및 조직이 제공된다.

[0009]

일 양태에서, 게놈에서 적어도 하나의 변형된 lncRNA 좌위를 포함하는 비인간 동물이 제공되어, 변형된 lncRNA 좌위는 lncRNA를 암호화하는 핵산 서열에서 기능상실 돌연변이를 포함한다.

- [0010] 일 실시형태에서, lncRNA는 긴 유전자간 비암호화 RNA(lncRNA)이다.
- [0011] 일 양태에서, 기능상실 돌연변이는 적어도 하나의 lncRNA 기능의 파괴 또는 넉아웃을 특징으로 한다.
- [0012] 일 실시형태에서, 변형된 lncRNA 좌위는 lncRNA 또는 이의 일부를 암호화하는 하나 이상의 엑손의 결실을 포함한다. 일 양태에서, 파괴(disruption) 또는 넉아웃은 lncRNA 좌위의 제2 엑손에서 시작하는 lncRNA 좌위 내의 하나 이상의 엑손의 결실; lncRNA 좌위의 제1 엑손에서 시작하는 lncRNA 좌위 내의 하나 이상의 엑손의 결실; 또는 lncRNA 좌위의 전체 RNA 암호화 영역의 결실을 포함한다.
- [0013] 일 양태에서, 파괴 또는 넉아웃은 lncRNA 좌위 또는 이의 일부의 삽입 핵산으로의 치환을 포함한다. 일 실시형태에서, 삽입 핵산은 리포터를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 이러한 경우에, 제1 뉴클레오타이드 서열은 리포터의 발현을 유발시키는 프로모터에 작동가능하게(operably) 연결된다. 일 실시형태에서, 리포터를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열은 내인성 lncRNA 프로모터와 작동가능한 연결로 lncRNA 좌위에 위치되되, 내인성 lncRNA 프로모터는 뉴클레오타이드 서열의 발현을 유발시킨다. 이러한 경우에, 핵산 서열의 발현은 lncRNA의 발현 패턴에 따른다. 일 양태에서, 삽입 핵산은 코작(Kozak) 공통서열을 포함한다. 구체적 실시형태에서, 삽입 핵산의 제1 뉴클레오타이드 서열은 코작 공통서열을 포함한다.
- [0014] 일 실시형태에서, 삽입 핵산은 선택가능한 마커를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하되, 제2 뉴클레오타이드 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결된다.
- [0015] 일 양태에서, 삽입 핵산은 리포터를 암호화하는 세그먼트 및/또는 선택가능한 마커를 암호화하는 세그먼트에 측접하는 부위-특이적 재조합 부위를 포함한다.
- [0016] 다양한 양태 및 실시형태에서, lncRNA 좌위 또는 이의 일부의 치환은 lncRNA 좌위의 제2 엑손에서 시작하는 lncRNA 좌위 내에서 하나 이상의 엑손의 삽입 핵산으로의 치환; lncRNA 좌위의 제1 엑손에서 시작하는 lncRNA 좌위 내에서 하나 이상의 엑손의 삽입 핵산으로의 치환; 또는 lncRNA 좌위의 전체 RNA 암호 영역의 삽입 핵산으로의 치환을 포함한다.
- [0017] 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 비인간 동물은 하나 이상의 다음의 표현형: (a) 조로-관련 표현형; (b) 출산전후 치사; (c) 폐 발달(lung development)의 결함; (d) 꼬리 및 뒷다리에서 형태적 기형; (e) 하나 이상의 조직에서 근육량의 손실; 또는 (f) 상기 (a) 내지 (e)의 임의의 조합을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 일 양태에서, 본 명세서에 제공된 비인간 동물은 lncRNA *Pint*의 파괴 또는 넉아웃을 포함하고, 비인간 동물은 (a) 야생형 대조군보다 더 느린 성장 속도; (b) 근육 강도의 감소; (c) 섬유증; (d) 야생형 대조군보다 더 낮은 체지방 함량; (e) 야생형 대조군보다 더 낮은 대퇴골 골 무기질 밀도 및 골량; (f) 야생형 대조군에 비해 감소된 근육량; (g) 중앙값 수명의 감소; (h) 척추변형; (i) 장기 위축; 또는 (j) 상기 (a) 내지 (i)의 임의의 조합을 포함하는 조로-관련 표현형을 특징으로 한다.
- [0019] 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 비인간 동물은 뇌 발생에서 결함을 나타낸다. 일부 이러한 경우에, lncRNA는 *Pantr2*, *Kantr*, *Peril*, *Celrr*, *Pantr1*, *Crnde*, *lincenc1*, *Pint*, *lincppara* 또는 *Tug1*이다.
- [0020] 다양한 양태 및 실시형태에서, 비인간 동물은 포유류이다. 다양한 양태 및 실시형태에서, 포유류는 설치류, 예를 들어 마우스, 래트 또는 햄스터이다. 다양한 양태 및 실시형태에서, 포유류는 양, 소 또는 돼지 종이다.
- [0021] 일 양태에서, 유전자 변형된 비인간 동물이 제공되되, 유전자 변형은 lncRNA의 기능상실을 초래한다.
- [0022] 일 양태에서, 유전자 변형된 비인간 동물이 제공되되, 유전자 변형은 하나 이상의 lncRNA의 파괴 또는 넉아웃을 포함한다.
- [0023] 일 실시형태에서, 유전자 변형은 적어도 2개의 lncRNA의 파괴 또는 넉아웃을 포함한다. 일 실시형태에서, 유전자 변형은 적어도 3, 4, 5 또는 6개의 lncRNA의 파괴 또는 넉아웃을 포함한다.
- [0024] 일 실시형태에서, 유전자 변형은 하나 이상의 lncRNA의 파괴 또는 lncRNA 좌위 내에서 넉아웃 및 파괴되거나 또는 넉아웃된 lncRNA의 프로모터에 작동가능하게 연결된 검출가능한 모이어티(리포터)를 암호화하는 유전자를 포함한다. 일 실시형태에서, 검출가능한 모이어티(리포터)를 암호화하는 유전자는 *lacZ*( $\beta$ -갈락토시다제를 암호화), GFP, eGFP, 엠플럼(mPlum), 엠체리(mCherry), 티디토마토(tdTomato), 엠스트로베리(mStrawberry), 제이-레드(J-Red), 디에스레드(DsRed), 엠오렌지, mKO, 엠시트린(mCitrine), 비너스(Venus), YPet, 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 에메랄드(Emerald), CyPet, 시안 형광 단백질(cyan fluorescent protein: CFP), 세루리안

(Cerulean), 티-사파이어(T-Sapphire), 루시퍼라제, 알칼린 포스파타제 및 이들의 조합물로부터 선택된다.

- [0025] 일 실시형태에서, 유전자 변형은 하나 이상의 lncRNA의 파괴 또는 넉아웃 및 lncRNA 좌위 내에서 검출가능한 모이어티의 발현을 유발시키는 프로모터에 작동가능하게 연결된 검출가능한 모이어티(리포터)를 암호화하는 유전자를 포함한다.
- [0026] 다양한 양태 및 실시형태에서, 검출가능한 모이어티는 당업계에 공지된 임의의 리포터 유전자를 포함한다.
- [0027] 일 양태에서, 유전자 변형된 비인간 동물이 제공되되, 유전자 변형은 *HOTAIR*, *HOTTIP*, *Hoxa11os*(이전에 *HoxA11as*로 지칭됨), *Pantr1*(이전에 *lincRNA-Brn1-a*로 지칭됨), *Pantr2*(이전에 *lincRNA-Brn1-b*로 지칭됨), *Ptgs2os2*(이전에 *lincRNA-Cox2*로 지칭됨), *E1dr*(이전에 *Fab1* 및 *lincRNA-Egfr*로 지칭됨), *Lincenc1*(이전에 *lincRNA-Enc1*로 지칭됨), *Mannr*(이전에 *lincRNA-Evi1*로 지칭됨), *Fendrr*(이전에 *lincRNA-Foxf1*로 지칭됨), *Ha1r1*(이전에 *Haunt* 및 *lincRNA-HoxA1*로 지칭됨), *Hag1r*(이전에 *lincRNA-HoxD3*로 지칭됨), *Celrr*(이전에 *Celr* 및 *lincRNA-Insig2*로 지칭됨), *Crnde*(이전에 *lincRNA-Irx5*로 지칭됨), *Kantr*(이전에 *Spasm* 및 *lincRNA-Jarid1c*로 지칭됨), *Pint*(이전에 *linc-Pint* 및 *lincRNA-MkIn1*로 지칭됨), *Trp53cor1*(이전에 *lincRNA-p21*로 지칭됨), *lincppara*(이전에 *lincRNA-Ppara*로 지칭됨), *Peri1*(이전에 *lincRNA-Sox2*로 지칭됨), *Tug1*(이전에 *lincRNA-Tug1*로 지칭됨), 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 lncRNA를 암호화하는 lncRNA 핵산 서열의 파괴를 포함한다.
- [0028] 일 양태에서, 유전자 변형된 비인간 동물이 제공되되, 유전자 변형은 *Pint*(이전에 *linc-Pint* 및 *lincRNA-MkIn1*로 지칭됨)의 파괴 또는 넉아웃을 포함한다.
- [0029] 일 양태에서, lncRNA의 파괴를 포함하는 핵산 좌위가 제공된다. 일 실시형태에서, 파괴는 lncRNA의 넉아웃을 포함한다. 일 실시형태에서, 파괴는 lncRNA의 프로모터에 작동가능하게 연결된 검출가능한 모이어티를 암호화하는 유전자의 배치를 포함한다. 일 실시형태에서, 파괴는 lncRNA의 프로모터와 작동가능하게 연결된 검출가능한 모이어티를 암호화하는 유전자의 배치 및 lncRNA의 넉아웃을 포함한다.
- [0030] 일 양태에서, lncRNA를 포함하는 좌위에 작제물을 표적화하는 적어도 하나의 표적화 서열을 포함하는 핵산 작제물이 제공되되, 작제물은 lncRNA의 전사를 파괴하거나, lncRNA를 넉아웃시키거나 또는 lncRNA를 치환할 수 있다.
- [0031] 일 실시형태에서, 핵산 작제물은 추가로 (검출가능한 모이어티의 발현을 유발시키는 추가된 프로모터가 있는 또는 없는) 검출가능한 모이어티를 포함한다. 일 실시형태에서, 핵산 작제물은 프로모터에 의해 유발되는 선택가능한 마커 유전자를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 핵산 작제물은 검출가능한 모이어티(그 자체의 프로모터가 있거나 또는 없음)와 프로모터에 의해 유발되는 선택가능한 마커 유전자를 둘 다 포함한다. 일 실시형태에서, 선택가능한 마커 및/또는 검출가능한 모이어티는 검출가능한 모이어티 및/또는 선택가능한 마커의 절단을 지시하는 부위-특이적 재조합 부위의 상류 및 하류에 측접한다.
- [0032] 일 실시형태에서, 표적화 벡터가 제공된다. 일 양태에서, 표적화 벡터는 관심 대상의 lncRNA 좌위에 의한 상동성 재조합을 겪을 수 있는 5' 및 3' 상동성 암(homology arm)들에 측접되는 삽입 핵산을 포함한다. 일 실시형태에서, 표적화 벡터의 삽입 핵산은 리포터를 암호화하는 제1 핵산 서열을 포함한다. 일 양태에서, 관심 대상의 lncRNA 좌위에 의한 상동성 재조합 후에, 리포터를 암호화하는 제1 핵산 서열은 lncRNA 좌위에서 lncRNA의 발현을 유발시키는 내인성 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일 실시형태에서, 표적화 벡터의 삽입 핵산의 제1 및/또는 제2 핵산 서열은 추가로 코작 공통서열을 포함한다. 일 실시형태에서, 표적화 벡터는 추가로 프로모터의 발현을 유발시키는 프로모터를 포함한다.
- [0033] 일 양태에서, 표적화 벡터의 삽입 핵산은 선택가능한 마커를 암호화하는 제2 핵산 서열을 추가로 포함하되, 제2 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일 실시형태에서, 표적화 벡터는 리포터를 암호화하는 세그먼트 및/또는 선택가능한 마커를 암호화하는 세그먼트 핵산에 측접하는 부위-특이적 재조합 부위를 추가로 포함한다.
- [0034] 일 양태에서, 조로-관련 표현형을 나타내는 비인간 동물이 제공되되, 비인간 동물은 *Pint* 비기능성을 제공하는 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 변형은 *Pint* 좌위의 RNA 암호화 서열의 파괴이다. 일 실시형태에서, 변형은 *Pint* 좌위의 전체 RNA-암호화 서열의 결실이다. 일 실시형태에서, 변형은 동물이 더 이상 기능성 *Pint*를 생성하지 못하도록, *Pint* 좌위 내로 표적화 벡터의 삽입을 포함한다.
- [0035] 일 실시형태에서, 변형은 추가로 *Pint* 좌위에서 검출가능한 모이어티(예를 들어, 그 자체의 프로모터가 있거나 또는 없는 리포터 유전자) 및 선택적으로 선택가능한 마커에서 포함한다. 일 실시형태에서, 검출가능한 모이어

티 및/또는 선택가능한 마커는 검출가능한 모이어티 및/또는 선택가능한 마커의 절단을 지시하는 부위-특이적 재조합 부위의 상류 및 하류에 측접된다. 일 실시형태에서, 비인간 동물은 추가로 부위 특이적 재조합효소 부위와 양립가능한 유도성 부위 특이적 재조합효소를 포함한다.

[0036] 일 양태에서, 비인간 동물의 세포, 조직 또는 배아가 제공되되, 세포 또는 조직은 *HOATIR*, *HOTTIP*, *Hoxa11os*(이전에 *HoxA11as*로 지칭됨), *Pantr1*(이전에 *lincRNA-Brn1-a*로 지칭됨), *Pantr2*(이전에 *lincRNA-Brn1-b*로 지칭됨), *Ptgs2os2*(이전에 *lincRNA-Cox2*로 지칭됨), *El1dr*(이전에 *Fab1* 및 *lincRNA-Egfr*로 지칭됨), *Lincenc1*(이전에 *lincRNA-Enc1*로 지칭됨), *Mannr*(이전에 *lincRNA-Evi1*로 지칭됨), *Fendrr*(이전에 *lincRNA-Foxf1*로 지칭됨), *Halr1*(이전에 *Haunt* 및 *lincRNA-HoxA1*로 지칭됨), *Haglr*(이전에 *Mdgt* 및 *lincRNA-HoxD3*로 지칭됨), *Ce1rr*(이전에 *Ce1r* 및 *lincRNA-Insig2*로 지칭됨), *Crnde*(이전에 *lincRNA-Irx5*로 지칭됨), *Kantr*(이전에 *Spasm* 및 *lincRNA-Jarid1c*로 지칭됨), *Pint*(이전에 *linc-Pint* 및 *lincRNA-Mkln1*로 지칭됨), *Trp53cor1*(이전에 *lincRNA-p21*로 지칭됨), *lincppara*(이전에 *lincRNA-Ppara*로 지칭됨), *Per1*(이전에 *lincRNA-Sox2*로 지칭됨), *Tug1*(이전에 *lincRNA-Tug1*로 지칭됨), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 기능성 lincRNA를 암호화하는 핵산 서열이 없다.

[0037] 일 실시형태에서, 기능성 lincRNA를 암호화하는 핵산 서열이 없는 세포 또는 조직은 기능성 *Pint*(이전에 *lincRNA-Mkln1*로서 지칭됨)가 없다.

[0038] 일 양태에서, 상류의 상동성 암 및 하류의 상동성 암을 포함하는 핵산 작제물이 제공되되, 상류 및 하류의 상동성 암은 lncRNA 좌위를 표적화하고, 작제물은 lncRNA의 전사를 파괴하거나, lncRNA를 넉아웃시키거나, 또는 lncRNA를 치환할 수 있다.

[0039] 다양한 양태 및 실시형태에서, lncRNA 좌위를 표적화하는 표적화 작제물은 코작 서열, 검출가능한 모이어티(예를 들어, 리포터, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 리포터; 예를 들어, 선택적으로 이와 작동가능하게 연결된 프로모터를 지님)를 암호화하는 서열, 선택가능한 마커(예를 들어, 이와 작동가능하게 연결된 프로모터를 지님)를 암호화하는 핵산 서열, 및 이들의 조합물로부터 선택되는 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, 리포터 및/또는 선택가능한 마커는 선택가능한 마커 유전자를 암호화하는 핵산 서열 및/또는 검출가능한 모이어티를 암호화하는 핵산 서열의 결실을 이루도록 배열된 부위 특이적 재조합 부위와 측접된다. 일 실시형태에서, 작제물은 검출가능한 모이어티에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하지 않는다.

[0040] 일 양태에서, lncRNA 좌위 내에 핵산 서열을 삽입하는 단계를 포함하는 lncRNA를 파괴하는 방법이 제공되되, 삽입은 lncRNA의 전사를 파괴하거나, 하나 이상의 lncRNA-암호화 영역을 결실시키거나 또는 lncRNA의 전체 암호화 서열을 결실시킨다.

[0041] 일 양태에서, 비인간 동물이 lncRNA의 기능성 형태를 더 이상 발현시키지 않도록 비인간 동물의 계놈을 변형시키는 단계를 포함하는, lncRNA의 파괴 또는 넉아웃을 포함하는 비인간 동물의 제조방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 표적화 벡터를 사용하여 lncRNA의 전사를 파괴하거나, 하나 이상의 lncRNA-암호화 영역을 결실시키거나, 비인간 동물의 계놈에서 lncRNA의 전체 암호화 서열을 결실시키는 단계를 포함한다.

[0042] 일 양태에서, 만능(pluripotent) 또는 전능(totipotent) 비인간 동물 세포의 계놈을 변형시켜 lncRNA의 전사를 파괴하거나, lncRNA-암호화 영역을 암호화하는 하나 이상의 엑손을 결실시키거나, 또는 세포 계놈에서 lncRNA의 전체 암호화 서열을 결실시키는 단계; 공여 세포로서의 세포를 사용하고 공여 세포를 숙주 배아 내로 도입하여 공여 세포-숙주 배아 복합체를 형성하는 단계; 및 임신에 적합한 조건 하에서 적합한 비인간 동물에서 공여 세포-숙주 배아 복합체를 임신시키는 단계를 포함하는, lncRNA 기능의 넉아웃을 포함하는 비인간 동물의 제조방법이 제공되되, 임신 후에 lncRNA 기능의 넉아웃을 포함하는 자손이 얻어진다. 일 실시형태에서, 자손은 lncRNA 기능의 넉아웃에 대해 동형접합성으로 번식된다.

[0043] 일 양태에서, 비인간 동물 세포의 체세포 또는 생식 세포의 계놈을 변형시켜 lncRNA의 전사를 파괴하거나, 하나 이상의 lncRNA-암호화 영역을 결실시키거나, 또는 세포 계놈에서 lncRNA의 전체 암호화 서열을 결실시키는 단계; 핵이 제거된 난자 내 세포 계놈을 사용하여 변형된 난자를 형성하는 단계; 임신에 적합한 조건 하에서 적합한 대리 비인간 동물에서 변형된 난자를 임신시키는 단계; 및 lncRNA 넉아웃을 포함하는 비인간 동물은 자손을 얻는 단계를 포함하는, lncRNA 기능의 넉아웃을 포함하는 비인간 동물의 제조방법이 제공된다. 일 실시형태에서, 자손은 lncRNA 기능의 넉아웃에 대해 동형접합성으로 번식된다.

[0044] 일 실시형태에서, 적어도 하나의 lncRNA 좌위 내 유전자 변형을 포함하는 비인간 동물의 제조방법이 제공된다. 이러한 방법은 만능 세포를 5' 및 3' 상동성 암에 측접되는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 작제물과 접촉시키는

단계로서; 표적화 작제물은 세포 계놈에서 lncRNA 좌위에 의한 상동성 재조합을 겪어서 변형된 만능 세포를 형성하는 단계; (b) 변형된 만능 세포를 숙주 배아 내로 도입하는 단계; 및 (c) 대리모에서 숙주 배아를 임신시키는 단계로서, 상기 대리모는 변형된 lncRNA 좌위를 포함하는 자손을 생산하고, 상기 유전자 변형은 적어도 하나의 lncRNA의 기능상실을 초래하는 단계를 포함한다.

[0045] 일 양태에서, 만능 세포에서 lncRNA 좌위를 변형시키는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 만능 세포 내로 lncRNA 좌위에 의한 상동성 재조합을 겪을 수 있는 5' 및 3' 상동성 암에 측정되는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 작제물을 도입하는 단계; 및 lncRNA 좌위에서 표적화된 유전자 변형을 포함하는 변형된 만능 세포를 동정하는 단계를 포함하되, 상기 유전자 변형은 lncRNA 기능의 기능상실을 초래한다. 일 실시형태에서, 만능 세포는 인간 유도 만능(iPS) 세포이다.

[0046] 다양한 양태 및 실시형태에서, 변형된 세포는, 예를 들어, 만능 세포, 유도된 만능 세포, 줄기 세포, 배아 줄기 세포 등을 포함한다. 구체적 실시형태에서, 세포는 배아 줄기(embryonic stem: ES) 세포이다. 구체적 실시형태에서, ES 세포는 마우스 또는 래트 ES 세포이다.

[0047] 다양한 양태 및 실시형태에서, 비인간 동물은, 예를 들어, 동물의 양, 소, 돼지 및 뮤린종을 포함한다. 구체적 실시형태에서, 동물은 뮤린 종, 예를 들어, 마우스 또는 래트로부터 유래된다.

[0048] 다른 그리고 추가적인 양태 및 실시형태가 본 명세서를 읽을 때 당업자에 의해 인식되는 바와 같이 포함된다.

### 도면의 간단한 설명

[0049] 특히 또는 출원 파일은 컬러로 실행된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)을 지니는 본 특허 또는 특허 출원의 복사는 요청하고 필요한 요금을 지불 할 때 특허청에 의해 제공될 것이다.

도 1은 *Fendrr* 유전자 좌위의 표적화된 파괴 전략을 도시한 도면. 엑손 1 내지 6을 포함하는 야생형 마우스 *Fendrr* 좌위의 부분적 맵을 나타낸다. 상동성 재조합 시, 표적화 LTVEC는 총 19.2kb의 계놈 *Fendrr* 서열을 코작서열을 도입하는 LacZ-네오마이신 내성 카세트로 치환하였다. 열린 박스는 비암호화 엑손을 나타낸다. *Fendrr* 계놈 좌위 상의 그리고 LacZ-네오마이신 내성 카세트에서 적색 및 녹색 박스는 표적화를 위해 사용된 상동성 서열이다.

도 2는 임신 중기 lncRNA 표적화된 마우스 배아에서 공간적 및 시간적 LacZ 리포터 유전자 발현을 도시한 도면. a, 이형접합적 e12.5 배아를 고정시키고 나서,  $\beta$ -갈락토시다제로 염색하였으며, 이는 발생 중인 뇌 및 두개 안면 영역(예를 들어, *Pantr1* 및 *Pantr2*, *Celrr* 및 *Haglr*, 또한 도 9 참조), 신경관(*Pantr2*, *Halr1* 및 *lincppara*), 등대동맥(*Celrr*), 심장(*Celrr*, *Haglr*, 또한 도 9 참조), 폐(*Fendrr*), 지아(*HOTTIP*, *Hoxa11os* 및 *Mannr*), 전장(*HOTTIP*, *Hoxa11os* 및 *Fendrr*), 후부 영역 및 꼬리(*HOTAIR*, *HOTTIP* 및 *Hoxa11os*) 내의 도입된 LacZ 리포터 유전자의 넓은 발현 범위를 나타내었다. 유사한 분석은 *Tug1*에서 넓게 퍼진 lacZ 발현 패턴을 나타낸 반면, 다른 리포터 유전자의 발현은 표피(*Eldr*), 유방눈(*Lincenc1*, 또한 도 9 참조) 또는 수염 기원관(*Trp53cor1*, 또한 도 9 참조)으로 제한될 수 있었다. 나타낸 예는 lncRNA 네아웃 프로젝트 당 적어도 5개의 유전자형 확인 배아를 나타낸다. b, 표시한 단계(e9.5 내지 e12.5)로부터의 선택된 lncRNA(*HOTTIP*, *Hoxa11os* 및 *Celrr*) F1 이형 접합적 배아에서 발현 패턴은 발현이 제한된 부위에서 초기에 시작하고, 이어서 이후의 단계에서 이 초기 부위를 지나서 연장된다는 것을 나타내었다. *Celrr* 발현은 e9.5에 뇌로 국한되었지만, e12.5까지 척수로 진행한다. *Hoxa11os* 발현은 발생 중인 꼬리싹에서 시작하고, e12.5까지 배아의 전체 꼬리 영역, 뒷다리 및 앞다리로 진행한다. *HOTTIP* 발현은 또한 발생 중인 꼬리싹에서 시작하고, 이어서, e11.5 및 e12.5까지 앞다리 및 뒷다리의 발생 중인 원위 오토포드(autopod)에서 관찰하였다. 나타낸 예는 lncRNA 프로젝트마다의 적어도 5개의, 유전자형-확인 배아를 나타낸다.

도 3은 6 내지 8주령 lncRNA F0 세대 이형접합체의 뇌에서 LacZ 리포터 유전자 발현(청색)을 도시한 도면. A, *Celrr*, 소뇌측부 및 복부 교(ventral pon)를 제외하고 회백질에서의 광범위한 발현; B, *Crnde*, 상부 소구(colliculi)에서 발현(등쪽 사진, 화살표); C, *Pantr1*, 신피질, 후구, 기부 전뇌 및 시상하부에서의 발현; D, *Pantr2*, 신피질, 후구, 소뇌, 시상하부 및 기부 전뇌에서의 발현; E, *Lincenc1*, 후각 투사 및 측두엽의 후각 투사 영역에서 특히 강한 발현 패턴으로 신피질, 소뇌의 일부, 및 안쪽 시상하부에서의 발현(배쪽 사진, 적색 화살표); F, *Pint*, 시상하부에서 특히 강한 발현으로 회백질에서 편재해서 발현; G, *lincppara*, 시상하부에서 특히 밀집하게 발현된 회백질에서 광범위하게 발현; H, *Peril*, 시상하부의 정중선에서 발현(배쪽 사진, 화살표 머리); I, *Kantr*, 소뇌심부층에서 잠재적으로 일부 발현(등쪽 사진, 별표); 및 J, *Tug1*, 신피질을 제외하고 대부분의 구조에서 척수 회백질 및 옆은 회백질에서의 발현. n = 2, 유전자형은 lncRNA 네아웃 프로젝트마다 수컷

마우스를 확인하였다.

도 4는 *Pint*가 출생 후 3일 내지 8주령으로부터 증가된 발현을 나타낸다는 것을 도시한 도면. F0 이형접합체에서 제3일, 제3주 및 제8주에 LacZ 리포터 유전자 발현(청색)은 *Pint*가 연령에 따라 점점 더 발현된다는 것을 나타낸다. A, 제3일에,  $\beta$ -갈락토시다제 염색은 뇌의 일부, 뒷다리의 힘줄 및 인대, 및 폐의 일부 세기관지에서만 관찰된다(화살표). B, 제3주에, 뇌, 뒷다리, 심장의 심방, 폐 및 간에서 염색이 증가된다. C, 8주령까지, 전뇌, 뒷다리 및 가슴의 골격근, 심방 및 심근, 폐 및 간 조직은 모두 증가된 *Pint* 발현을 나타내는 강한  $\beta$ -갈락토시다제 염색을 나타낸다. 나타낸 예는 그룹 당  $n > 4$  마우스를 나타낸다.

도 5는 *Pint* 네아웃 마우스에서 조로-관련 표현형을 도시한 도면. (A) *Pint*<sup>-/-</sup> 및 *Pint*<sup>+/+</sup> 수컷 마우스는 그들의 야생형(WT) 한배 새끼보다 상당히 더 느린 성장을 나타내고, 거의 6개월령에 상당한 체중 손실을 나타내기 시작한다. 데이터를 평균  $+$  SEM으로서 플롯팅하고, 각각의 그룹에 대해  $n > 9$ 마리 마우스이다. 유의도를 일원분산분석(one-way ANOVA)(\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ )에 의해 평가하였다. (B) 이형 접합적 및 WT 마우스와의 동형 접합성의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 분석. *Pint*<sup>-/-</sup> 수컷 마우스는 *Pint*<sup>+/+</sup> 및 야생형 한배 새끼에 비해 생존에서 상당한 감소를 나타낸다. 데이터를 1년 관찰에 걸쳐 생존 백분율로서 플롯팅한다. (C) *Pint*<sup>+/+</sup> 및 WT 한배 새끼에 비교한 *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스에서 배쪽 및 등쪽 피부 절편. (D, E, F, 및 G) 12-, 26- 및 52-주령에 신체 조성의 마이크로CT(MicroCT) 평가. (D, E) 수컷 *Pint*<sup>-/-</sup> 및 *Pint*<sup>+/+</sup> 마우스는 26주령만큼 빨리 신체 지방의 상당한 감소를 나타낸다. 암컷 *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스는 52주령에 주목할 만하게 더 많은 나이에서 체지방이 감소되었다(\*\*\*,  $P < 0.001$ , 일원분산분석). (F, G) 수컷과 암컷 *Pint*<sup>-/-</sup> 둘 다에서 그들의 *Pint*<sup>+/+</sup> 및 WT 한배 새끼에 비해 대퇴골 골 무기질 밀도(BMD)의 상당한 감소가 관찰되었다(\*,  $P < 0.05$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ , 일원분산분석). (H) 마이크로CT 영상은 WT 한배 새끼에 비해 더 나이든 수컷 및 암컷 *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스에서 보이는 명백한 척추변형(척주의 만곡)을 도시한다. (I) 대략 70%의 수컷 및 암컷 *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스는 0 내지 20%의 *Pint*<sup>+/+</sup> 및 WT 한배 새끼에 비해 12주령까지 척추변형이 있다. 26주령까지 척추변형을 지니는 *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스의 비율은 거의 90% 증가되었고, WT 한배 새끼의 20% 미만에 비해 *Pint*<sup>+/+</sup> 마우스의 대략 60%로 나타났다. 모든 관찰에 대해 그룹 당  $n > 9$  마우스를 보고하였다.

도 6은 *Fendrr* 네아웃 마우스가 e13.5에 비정상적 폐 형태를 나타내었음을 도시한 도면. A. *Fendrr* KO 배아 내 e12.5에서 LacZ 리포터 유전자 발현은 안면, 대동맥 생식선 중신(AGM) 영역 및 폐(L) 및 기관(T)을 포함하는 호흡관의 정면 비강 영역(FN)에서 긍정적 발현을 나타낸다. B. e13.5에서 폐의 절개는 Het에 비해 KO의 엽에서 비정상, 혼란형의 구상형 표현형을 나타내었다.

도 7은 *HOTAIR* KO 마우스의 4번째 미추골에서 관찰한 호메호 형질전환을 도시한 도면. A.  $\mu$ CT에 의한 마우스 골격의 천골 및 미측 영역의 시각화는 *HOTAIR* KO 마우스에서 3번째 미추골과 유사한 구조에 대한 4번째 미추골의 호메오틱 변형(homeotic transformation)을 나타낸다. B. WT 및 *HOTAIR* KO 4번째 미추골의 등, 옆구리 및 복부 비교는 호메오틱 변형을 나타내는 KO에서의 구조적 이상을 나타낸다.

도 8은 *HOTTIP* KO 마우스가 비정상 뒷다리 자세, 앞 및 뒷발 및 근육 소모성 표현형에서 감소된 악력을 나타낸다는 것을 도시한 도면. A. *HOTTIP* KO 마우스는 꼬리로 매달았을 때 뒷발의 보통의 "움켜짐(clasping)" 자세를 보여주었다. WT, 야생형; KO, 네아웃. B. 우리 견디기 시험(cage endurance test)은 *HOTTIP* KO 마우스가 뒤집힌 와이어 케이지 상부로부터 매달린 채로 남아있는 능력이 감소되었음을 나타내었다. 각각의 그룹에 대해  $n=5$  마우스. C. 우측 및 좌측 TA(전경골근), GA(비복근) 및 Quad(사두근) 근육을 WT, Het 및 KO 마우스로부터 취하고, 칭량하였다. 근육 중량을 체중에 대해 정규화하고 나서 우측/좌측 근육 중량을 둘 다 포함하도록 계산하였다. 데이터는 각각의 그룹에 대해  $+$  SEM,  $n = 6$  마우스를 의미한다. 수컷과 암컷 둘 다에서 *HOTTIP* KO 동물의 GA에서만 근육 중량에서 상당한 감소를 관찰하였다(수컷 데이터는 나타내지 않음). 별표는 모든 다른 대조군에 비해 KO GA 근육 중량에서 상당한 차이를 나타낸다( $P < 0.01$ ). D. WT, Het 및 KO에서 GA 근섬유수의 비교. 섬유계수의 상당한 감소를 KO에서 관찰하였다. 일원분산분석을 이용함으로써 유의도를 평가하였다( $P < .0001$ ). E. 근섬유의 평균 단면적의 비교. GA 근육으로부터 취한 횡단면을 라미닌(시그마(Sigma))으로 염색하고 나서 측정하였다. KO와 대조군 골격근 사이에 주목할 만한 크기 차이가 없다. 모든 근육 분석에 대해  $n= 6$  마우스.

도 9는 고도로 특이적인 염색 패턴을 나타내는 4개의 lncRNA 네아웃에 대해 작은 면적으로 정확한 염색을 도시한 도면: *Peril*, *Ptgs2os2*, *Trp53cor1* 및 *Lincenc1*에 대한 구체적 임신 중기 LacZ 발현 프로파일 (A) *Peril*에

대한 *LacZ* 리포터 프로파일링은 구체적 신경 발현 패턴뿐만 아니라 심장 및 후방의 꼬리 영역에서 강한 발현을 나타낸다. (B) *Ptgs2os2 lacZ* 리포터 발현은 발생 중인 앞다리 및 뒷다리 기준으로 제한된다. (C) *Trp53cor1 lacZ* 리포터 발현은 비강 과정에서 발생 중인 수염 기원판에 특이적이다. 동일한 한배 새끼로부터 수집한 E12.5 배아는 단기간에 걸쳐 수염 기원판 발생의 진행을 포획한다. (D) 유방눈 발현을 나타내기 위해(화살촉) 앞다리 및 뒷다리를 *Lincenc1<sup>+/−</sup>* 배아에서 제거하였다. E12.5 *Lincenc1<sup>+/−</sup>* 배아의 배쪽 사진: *lacZ* 발현을 5개 쌍의 유방 눈에서 검출한다.

도 10은 *HOTTIP* 네아웃에서 뒤꿈치 뼈의 상실을 특징으로 하는 표현형을 도시한 도면: *Hottip* 돌연변이체 마우스에서 관찰한 골격 기형. 뒷다리에서의 골격근 표현형에 추가로, *Hottip<sup>−/−</sup>* 마우스는 또한 3D 마이크로CT에 의해 시각화된 골격뼈 이상을 나타낸다. 수컷과 암컷(C 및 F) *Hottip<sup>−/−</sup>* 마우스는 둘 다 (A 및 D) WT과 (B 및 E) *Hottip<sup>+/−</sup>* 한배 새끼 대조군에 비해 종골이 짧아졌다.

도 11은 연구의 lncRNA 네아웃에 대해 배아 및 성체 조직에서 리포터 발현의 표(표 2)를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050]

용어 설명

[0051]

용어 "배아 줄기 세포" 또는 "ES 세포"는 배아 내로 도입 시 발생 중인 배아의 임의의 조직에 기여할 수 있는 배아 유래 전능 또는 만능 세포를 포함한다. 용어 "만능 세포"는 하나 이상의 분화된 세포 유형으로 발생되는 능력을 소유하는 미분화 세포를 포함한다.

[0052]

용어 "거대 표적화 벡터" 또는 "LTVEC"는 진핵 세포에서 상동성 유전자 표적화를 수행하도록 의도된 다른 접근에 의해 전형적으로 사용되는 것보다 더 큰 클로닝된 계놈 DNA의 단편으로부터 유래된 진핵 세포에 대한 거대 표적화 벡터를 포함한다. LTVEC의 예는 박테리아 상동성 염색체(homologous chromosome: BAC) 및 효모 인공 염색(yeast artificial chromosome: YAC)을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0053]

용어 "재조합 부위"는 부위 특이적 재조합효소에 의해 인식되고 재조합 사건에 대한 기질로서 작용할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0054]

용어 "부위 특이적 재조합효소"는 "재조합 부위" 사이의 재조합을 용이하게 할 수 있는 효소의 그룹을 포함한다. "부위 특이적 재조합효소"의 예는 Cre, Flp 및 Dre 재조합 부위를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0055]

핵산 서열에 대해 용어 "생식계열"은 자손으로 계대될 수 있는 핵산 서열을 포함한다.

[0056]

어구 "작동가능하게 연결된"은 구성성분이 그들의 의도된 방식으로 함께 기능하도록 연결된다는 것을 의미한다. 일 예에서, 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 적절한 전사 조절을 보유하기 위해 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 사일런서 서열 등)에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0057]

본 명세서에서 사용되는 용어 "긴 비암호화 RNA" 또는 "lncRNA"는 200개 보다 긴 뉴클레오타이드의 비단백질 암호화 전사체를 포함한다.

[0058]

본 명세서에 용어 "긴 유전자간 비암호화 RNA" 또는 "lincRNA"는 lncRNA의 하위 그룹을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 바와 같은 lincRNA는 계놈의 단백질-암호화 영역의 엑손과 중복되지 않는다.

[0059]

용어 "좌위"는 계놈 DNA 내 DNA의 세그먼트로서 정의된다. 예를 들어, lncRNA 좌위는 lncRNA를 암호화하는 계놈 DNA 내 DNA의 세그먼트이다.

[0060]

I. 적어도 하나의 lncRNA 좌위의 유전자 변형을 포함하는 조성물

[0061]

하나 이상의 lncRNA의 파괴 또는 넛아웃을 포함하지만, 이들로 제한되지 않은 비인간 동물, 세포, 조직 및 배아가 제공된다. lncRNA 발현을 조작하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. lncRNA를 변형 또는 넛아웃과 관련된 표적화 조성물이 또한 제공된다. 하나 이상의 lncRNA의 비기능과 관련된 표현형을 나타내는 비인간 동물, 세포 및 조직이 제공된다. 다음의 설명이 특정 lncRNA의 측량과 관련됨에도 불구하고, 상기 방법 및 조성물은 임의의 lncRNA에 의해 실행될 수 있다.

[0062]

본 명세서에서 적어도 하나의 긴 비암호화 RNA(lncRNA) 좌위 내 표적화된 유전자 변형을 포함하는 비인간 동물,

세포, 조직 및 배아가 제공된다. 이러한 경우에, 변형된 lncRNA 좌위는 lncRNA를 암호화하는 핵산 서열 내 기능 돌연변이의 상실을 포함한다. 또한 적어도 하나의 lncRNA의 기능상실 돌연변이를 포함하는 비인간 동물로부터 유래된 세포, 조직 및 배아가 제공된다.

[0063] 용어 "기능상실"은 그것이 lncRNA와 관련된다면, lncRNA 발현의 감소 또는 결여 및/또는 lncRNA의 활성/기능의 감소 또는 결여를 초래하는 lncRNA 좌위에서 임의의 변형을 포함할 수 있다. lncRNA의 발현 수준은, 예를 들어 세포 또는 유기체에서 lncRNA의 수준에 대해 분석함으로써 직접적으로 측정될 수 있다.

[0064] 일반적으로, lncRNA 발현 수준 및/또는 lncRNA의 활성 수준이 lncRNA의 발현 및/또는 활성을 저해하도록 유전자 변형 또는 돌연변이되지 않는 적절한 대조군 세포 또는 유기체에서의 lncRNA 수준보다 통계적으로 더 낮다면( $p \leq 0.05$ ), lncRNA의 발현 수준 및/또는 활성은 감소된다. 구체적 실시형태에서, lncRNA의 농도 및/또는 활성은 감소된 수준 및/또는 활성의 lncRNA를 갖도록 변형되지 않은 대조군 세포 또는 유기체에 비해 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% 이상만큼 감소된다.

[0065] 다른 예에서, lncRNA의 발현 수준 및/또는 활성을 감소시키는 표적화된 유전자 변형을 갖는 세포 또는 유기체는 서던 블로트 분석, DNA 시퀀싱, PCR 분석 또는 표현형 분석을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 방법을 이용하여 선택된다. 이어서, 이러한 세포 또는 유기체는 본 명세서에 기재된 다양한 방법 및 조성물에서 사용된다.

[0066] "대상 세포" 또는 "대상 유기체"는 본 명세서에 개시된 유전자 변형과 같은 유전자 변용(alteration)이 달성된 것이거나 또는 이렇게 변용된 세포/유기체로부터 내려오고 변용을 포함하는 세포/유기체이다. "대조군" 또는 "대조군 세포" 또는 "대조군 유기체"는 대상 세포 또는 유기체의 표현형의 변화를 측정하기 위한 기준점을 제공한다. 일 실시형태에서, 대조군 세포/유기체는, 그것이 감소된 발현 및/또는 활성을 초래하는 유전자 변형 또는 돌연변이를 결여하는 것을 제외하고 lncRNA에서 유전자 변형을 지니는 세포/유기체와 가능한 밀접하게 매칭된다(예를 들어, 각각의 세포는 동일한 세포주로부터 유래될 수 있다). 다른 예에서, 대조군 세포/유기체는, 예를 들어: (a) 야생형 세포/유기체, 즉, 대상 세포/유기체에서 초래되는 유전자 변용에 대한 출발 물질과 동일한 유전자의 야생형 세포/유기체; (b) 출발 물질과 동일한 유전자형이지만 삭제(null) 작제물에 의해(즉, 마커 유전자를 포함하는 작제물과 같은 관심 대상의 속성에 대해 알려진 효과가 없는 작제물에 의해) 유전자 변형된 세포/유기체; (c) 대상 세포/유기체의 비유전자 변형 자손인 세포/유기체(즉, 대조군 세포 및 대상 세포는 동일한 세포주로부터 유래됨); (d) 대상 세포/유기체와 유전적으로 동일하지만 관심 대상의 유전자의 발현을 유도하는 조건 또는 자극에 노출되지 않은 세포/유기체; 또는 (e) 유전자 변형이 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드의 발현에서 변용을 초래하지 않는 조건 하의 대상 세포/유기체 그 자체를 포함할 수 있다.

[0067] 동물, 세포, 조직 또는 배아에 관해 용어 "동물"은 포유류, 어류 및 조류를 포함한다. 포유류는, 예를 들어, 인간, 비인간 영장류, 원숭이, 유인원, 고양이, 개, 말, 황소, 사슴, 들소, 양, 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 기니픽), 가축(예를 들어, 소 종, 예를 들어, 젖소, 수소 등; 양 종, 예를 들어, 양, 염소 등; 및 돼지 종, 예를 들어, 돼지 및 야생돼지)을 포함한다. 새는, 예를 들어 닭, 칠면조, 타조, 거위, 오리 등을 포함한다. 애완용 동물 및 농장 동물이 또한 포함된다. 동물, 세포, 조직 또는 배아에 관해 어구 "비인간 동물"은 인간을 제외한다.

[0068] 일 실시형태에서, 동물은 비인간 동물이다. 다른 실시형태에서, 비인간 동물은 포유류이다. 다른 실시형태에서, 포유류는 설치류이다. 추가 실시형태에서, 설치류는 마우스, 래트 또는 햄스터이다.

[0069] 본 명세서에 기재된 바와 같은 유전자 변형은 관심 대상의 lncRNA 좌위로부터의 하나 이상의 결실, 관심 대상의 lncRNA 좌위에 대한 첨가, 관심 대상의 lncRNA 좌위의 치환 및/또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 관심 대상의 좌위는 암호화 영역 또는 비암호화 조절 영역을 포함할 수 있다.

[0070] 본 명세서에 제공된 유전자 변형은 관심 대상의 lncRNA 좌위에 표적화된다. lncRNA의 기능상실은 lncRNA 유전자에서의 표적화된 유전자 변형(즉, 조절 영역, 암호화 영역, 엑손 및/또는 인트론 등에서의 유전자 변형)으로부터 초래될 수 있다. 이러한 표적화된 변형은 하나 이상의 뉴클레오타이드의 첨가, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 치환, lncRNA 좌위의 파괴, lncRNA 좌위 또는 이의 일부의 넉아웃, lncRNA 좌위 또는 이의 일부의 네인(knock-in), 내인성 lncRNA 핵산 서열 또는 이의 일부의 이종성 핵산 서열로의 치환, 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 구체적 실시형태에서, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10, 50, 100, 400개 이상의 뉴클레오타이드는 표적화된 계획 변형을 형성하도록 변화된다.

[0071] 일 실시형태에서, 기능상실 돌연변이는 적어도 하나의 lncRNA 기능의 파괴 또는 넉아웃을 특징으로 한다.

[0072] lncRNA 좌위는 변형이 lncRNA의 기능상실을 초래하도록 좌위의 임의의 영역에서 유전자 변형될 수 있다. 일 실

시형태에서, lncRNA 좌위의 변형은 전체 lncRNA 암호화 영역 또는 이의 일부의 결실을 포함한다. 일 실시형태에서, 변형된 lncRNA 좌위는 lncRNA 또는 이의 일부를 암호화하는 하나 이상의 엑손의 결실을 포함한다. 다른 실시형태에서, 결실은 lncRNA 좌위의 제1 엑손에서 시작하는 lncRNA 좌위 내의 하나 이상의 엑손의 결실을 포함한다. 다른 실시형태에서, 결실은 lncRNA 좌위의 제2 엑손에서 시작하는 lncRNA 좌위 내의 하나 이상의 엑손의 결실을 포함한다.

[0073] 일부 경우에, lncRNA 좌위 또는 이의 일부는 삽입 핵산으로 치환된다. 이러한 경우에, 치환은 lncRNA 좌위 또는 이의 일부의 전체 RNA 암호화 영역의 삽입 핵산으로의 치환, lncRNA 좌위의 하나 이상의 엑손의 삽입 핵산으로의 치환, lncRNA 좌위의 제1 엑손에서 시작하는 lncRNA 좌위 내의 하나 이상의 엑손의 삽입 핵산으로의 치환 또는 제2 엑손에서 시작하는 lncRNA 좌위 내의 하나 이상의 엑손의 삽입 핵산으로의 치환일 수 있다.

[0074] 일부 예에서, 삽입 핵산은 그것이 lncRNA 프로모터와 작동가능하게 연결되어 lncRNA 프로모터가 삽입 핵산의 발현을 유발시키도록 lncRNA 좌위에 위치된다. 이러한 경우에, 핵산 서열의 발현은 lncRNA의 발현 패턴을 따른다.

[0075] 일 실시형태에서, lncRNA 좌위 또는 이의 일부는 리포터를 암호화하는 제1 핵산 서열을 포함하는 삽입 핵산으로 치환된다. 예를 들어, 삽입 핵산이 리포터 유전자를 포함하고 lncRNA 프로모터에 작동가능하게 연결된 lncRNA 좌위 내에 위치되는 경우에, 리포터 유전자의 발현은 내인성 lncRNA 프로모터에 의해 유발된다. 대안적으로, 삽입 핵산은 내인성 lncRNA 프로모터와 작동가능한 연결에서 삽입되지 않는다. 이러한 경우에, 삽입 핵산은 프로모터를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 삽입 핵산은 리포터의 발현을 유발시키는 프로모터 유전자에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함한다.

[0076] 일 실시형태에서, lncRNA 좌위 또는 이의 일부는 선택가능한 마커를 암호화하는 제2 핵산 서열을 포함하는 삽입 핵산으로 치환된다. 이러한 경우에, 제2 핵산 서열은 선택가능한 마커의 발현을 유발시키는 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0077] 다른 실시형태에서, lncRNA 좌위 또는 이의 일부는 리포터 유전자 및 선택가능한 마커 유전자를 포함하는 삽입 핵산으로 치환된다. 이러한 경우에, 리포터 유전자 및/또는 선택가능한 마커 유전자는 프로모터에 작동가능하게 연결될 수도 있고 연결되지 않을 수도 있다.

[0078] 상기 방법 및 조성물에서 사용될 수 있는 다양한 프로모터는 본 명세서의 다른 곳에서 제공된다.

[0079] 이러한 유전자 변형(표적 lncRNA의 발현 및/또는 활성의 감소 또는 조절을 초래하는 것을 포함)은 또한 생식계 열을 통해 전달될 수 있다. 구체적 실시형태에서, 유전자 변형은 목적으로 하는 표적 좌위의 낙아웃을 초래한다. 이러한 비인간 동물은, 예를 들어, 본 명세서의 다른 곳에 논의된 바와 같은 다양한 실험 시스템에서의 용도를 발견한다.

[0080] 예를 들어, lncRNA 낙아웃은 lncRNA 기능, 발생에서 lncRNA의 역할 및 조로를 포함하는 노화, 뇌 발생, 배아 발생, 폐 발달, 골격 발생, 근육 발생, 암 또는 전사의 조절을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 세포 경로 및 질환에서 lncRNA의 역할을 연구하기 위한 동물 모델을 제공한다.

[0081] 다양한 방법은 표적화된 유전자 변형을 발생하기 위해 사용될 수 있고, 본 명세서의 다른 곳에 기재된다.

#### A. lncRNA

[0083] 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물에서 사용된 비인간 동물, 세포, 조직 및 배아는 적어도 하나의 lncRNA의 기능상실을 초래하는 유전자 변형을 가진다. lncRNA는 200개 초과의 뉴클레오타이드의 긴 비암호화 RNA이다. lncRNA의 하위 그룹인 긴 유전자간 비암호화 RNA(lincRNA)는 유전자 사이에 있으며, 단백질 암호화 영역과 중복되지 않는다.

[0084] 임의의 lncRNA 좌위는 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물에서 변형될 수 있다. 일 실시형태에서, 유전자 변형된 비인간 동물, 세포, 조직 또는 배아는 lncRNA 내 유전자 변형을 포함한다. 다른 실시형태에서, lncRNA는 lincRNA이다.

[0085] lncRNA의 비제한적 예는 *HOTAIR*, *HOTTIP*, *Hoxa11os*(이전에 *HoxA11as*로 지칭됨), *Pantr1*(이전에 *lincRNA-Brn1-a*로 지칭됨), *Pantr2*(이전에 *lincRNA-Brn1-b*로 지칭됨), *Ptgs2os2*(이전에 *lincRNA-Cox2*로 지칭됨), *EIdr*(이전에 *Fab1* 및 *lincRNA-Egfr*로 지칭됨), *lincenc1*(이전에 *lincRNA-Enc1*로 지칭됨), *Mannr*(이전에 *lincRNA-Evi1*로 지칭됨), *Fendrr*(이전에 *lincRNA-Foxf1*로 지칭됨), *Ha1r1*(이전에 *Haunt* 및 *lincRNA-HoxA1*로 지칭됨), *Hag1r*(이전에 *Mdgt* 및 *lincRNA-HoxD3*로 지칭됨), *Celrr*(이전에 *Celr* 및 *lincRNA-Insig2*로 지칭됨), *Crnde*(이전에

*lncRNA-Irx5*로 지칭됨), *Kantr*(이전에 *Spasm* 및 *lncRNA-Jarid1c*로 지칭됨), *Pint*(이전에 *linc-Pint* 및 *lncRNA-Mkln1*로 지칭됨), *Trp53cor1*(이전에 *lncRNA-p21*로 지칭됨), *lincppara*(이전에 *lncRNA-Ppara*로 지칭됨), *Peril*(이전에 *lncRNA-Sox2*로 지칭됨), *Tug1*(이전에 *lncRNA-Tug1*로 지칭됨) 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0086] 이제 단백질 암호화 유전자가 게놈에 대해 바람직하지 않다는 것은 분명하다(Mattick, J.S. (2009), *PLoS Genet* 5:e1000459). 포유류 세포에서 대규모 전체 게놈 발현 연구는 게놈의 대략 3/4이 RNA로서 발현될 수 있고 (Carninci, P., et al. (2005), *Science* 309:1559-1563; Djebali, S., et al. (2012), *Nature* 489:101-108; Kapranov, P., et al. (2007), *Science* 316:1484-1488), 대부분의 전사체가 단백질을 암호화하지 않는다는 것을 나타내었다. 비암호화 전사체 중에서 긴 비암호화 RNA(lncRNA)로서 알려진 다양한 부류가 있다. 인간 세포 (Derrien, T., et al. (2012), *Genome Res* 22:1775-1789.), lncRNA 및 거대 유전자간 비암호화 RNA(lncRNA)로서 알려진 하위 부류(Guttman, M., et al. (2009), *Nature* 458:223-227; Khalil et al. (2009))에서 거의 10,000개의 게놈 좌위로부터의 대략 15,000개 전사체를 나타내는 것은 그들의 유전자의 구조, 합성 및 염색질 특징에서 단백질 암호화 mRNA와 유사하다. 이 구조적 유사성이 매칭되는 기능적 다양성에 대해 확장되든 아니든, 단백질은 미결문제로 남아있다.

[0087] 개개 lncRNA에 대한 기능성 연구는 X 염색체 불활성화(Marahrens, Y., et al. (1997), *Genes Dev* 11:156-166), 임프린팅(Leighton, P.A., et al. (1995), *Nature* 375:34-39; Mohammad, F., et al. (2010), *Development* 137:2493-2499; Sleutels, F., et al. (2002), *Nature* 415:810-813; Takahashi, N., et al. (2009), *Hum Mol Genet* 18:1879-1888), 망막 분화(Young, T.L., et al. (2005), *Curr Biol* 15:501-512), 및 심장 및 체벽 발생 (Grote, P., et al. (2013), *Dev Cell* 24:206-214)에서 역할을 동정하였다. lncRNA *HOTAIR*에 대한 연구는 특이적 게놈 좌위에 대해 lncRNA가 구체적 게놈 좌위에 염색체 변형 복합체(*HOTAIR*의 경우에 폴리콤(polycomb) 억제 복합체 2)를 가이드함으로써 전사의 그 자체의 부위로부터 멀리 떨어진 부위에서 유전자 발현을 조절할 수 있다는 것이 우선 나타났다(Rinn, J.L., et al. (2007), *Cell* 129:1311-1323). 유사한 작용 메커니즘은 X 염색체 불활성화에서 *Xist* lncRNA에 대해 발견되었다. 이 발견은 넓은 범위의 다수의 세포 과정 및 장기 계통 생리학에서 lncRNA의 참여를 지시하는 lncRNA 및 단백질 암호화 유전자에 대한 상호관련된 발현 패턴의 분석에 의해 뒷받침되는 유전자 발현의 조절에서 lncRNA에 대한 더 넓은 역할을 시사한다(Guttman et al. (2009)). lncRNA에 대한 다수의 최근의 연구는 부류로서 lncRNA 역할의 전반적인 그림을 확립한 전반적인 게놈 전략을 사용하였다. 단백질 유전자 발현에 대한 lncRNA의 작용이 넓은지의 여부의 질문에 답하기 위해, 미묘하고, 완충 또는 특이적이며, 직접적이고, 결정요인은 살아있는 동물에서 그들의 개개 역할의 조사를 필요로 한다.

[0088] 본 명세서의 다음의 설명에서 마우스 네아웃 모델에서의 다양한 lncRNA의 네아웃을 초래하는 유전자 변형의 비제한적 예가 제공된다. 20개의 lncRNA 유전자에 대한 네아웃 마우스에서 유전자 발현 및 표현형의 측량을 수행하였는데, 이는 조직 특이적 발현의 다양한 시공간적 패턴을 나타내고; 출산전후 치사를 보이는 2개의 네아웃 계통을 나타내며; 다른 표현형이 조로-관련 표현형 및 폐, 골격, 뇌 및 근육에서의 결함을 포함한다는 것을 나타낸, *LacZ* 프로파일링을 포함한다.

[0089] 살아있는 동물 환경에서 lncRNA의 기능을 시험하는 것을 시작하기 위해, 20개의 lncRNA 유전자에 대해 네아웃 마우스 계통을 생성하였다. 각각의 돌연변이체 대립유전자는 발현 프로파일링이 성체 및 배아에서 광범위한 시공간적 및 조직 특이적 전사 패턴을 나타내는 *lacZ* 리포터를 운반하였다. 18개의 동형 접합성 네아웃 계통 중에서, 여섯(약 33%)은 식별할 수 있는 돌연변이체 표현형을 나타내었고, 이 중 둘(11%)은 출산전후에 치명적이었으며, 뇌, 폐, 골격 및 근육에서의 비정상적 형태인 조로-관련 표현형 및 배아 발생에서 그리고 매우 다수의 조직 및 기관의 생리학에서 새로운 부류의 기능적 RNA에 대해 다양한 역할을 함께 지시하는 유전자 발현 패턴의 전반적인 변화를 포함하였다.

#### [0090] B. lncRNA 좌위의 유전자 변형

[0091] 본 명세서에서 비인간 동물, 세포, 조직 또는 배아에서 적어도 하나의 lncRNA 좌위의 유전자 변형을 위한 방법 및 조성물이 제공된다.

[0092] 관심 대상의 lncRNA 좌위의 유전자 변형은 본 명세서의 다른 곳에서 상세하게 기재되는 바와 같은 좌위의 임의의 변형(즉, 결실, 삽입, 치환 등)일 수 있다. 이러한 경우에 유전자 변형은 lncRNA의 기능상실을 초래한다. 일 실시형태에서, 유전자 변형은 적어도 하나의 lncRNA의 파괴 또는 네아웃을 포함한다.

## [0093] i. 넉아웃 대립유전자 설계 및 구성

넉아웃과 같이 변형된 lncRNA 대립유전자의 설계 및 구성은 몇몇 기술적 쟁점에 의해 복잡하게 된다. 예를 들어, lncRNA에 대한 구조-기능 관계가 일반적으로 결여되어 있으며, lncRNA 좌위는 오픈 리딩 프레임을 갖지 않는다. 따라서, 넉아웃과 같은 단백질 암호화 서열을 변형시키기 위한 대립유전자의 설계를 가이드하는 동일한 전략은 lncRNA에 적용가능하지 않을 수도 있다. 추가로, 넉아웃과 같은 변형된 lncRNA 대립유전자의 설계를 추가로 복잡하게 하는 lncRNA 유전자의 경계는 잘 정해지지 않는다. 이들 기술적 어려움의 비제한적 예 및 lncRNA 넉아웃 설계에서 이들 난관을 성공적으로 극복하기 위해 본 명세서에서 사용된 전략은 본 명세서에서 이하에 상세하게 기재된다.

[0095] 일 예에서, 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물은 모델 시스템으로서 마우스에 적용되었다. 그러나, 다음의 설명이 마우스에 관한 것이지만, 임의의 비인간 동물, 세포, 조직 또는 배아는 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다.

[0096] 거의 25년 전의 발명 이후로, 유전자 변형된 소위 넉아웃 마우스를 생성하는 방법은 마우스를 포유류 유전자 기능의 연구를 위한 최고의 시스템으로서 확립되었다(Capecchi, M.R. (2001), *Nat Med* 7:1086-1090; Evans, M.J. (2001), *Nat Med* 7:1081-1083; Smithies, O. (2001), *Nat Med* 7:1083-1086). 몇몇을 제외하고, 개체 유전자 연구뿐만 아니라 대규모 국제적 프로젝트에서 넉아웃 마우스 기법의 적용(Bradley, A., et al. (2012), *Mamm Genome* 23:580-586)은 단백질 암호화 유전자에 중점을 두었지만, 비암호화 RNA에 기법을 적용하는 가치를 입증하는 마이크로RNA에 대한 전반적인 넉아웃 마우스 자원을 생성하는데 중점을 두었다(Prosser, H.M., et al. (2011), *Nat Biotechnol* 29:840-845)([mcmanuslab.ucsf.edu/microrna\\_knockout](http://mcmanuslab.ucsf.edu/microrna_knockout)).

[0097] 그러나, lncRNA에 넉아웃 마우스 기법을 적용하는 것은 일부 기술적 문제 및 어려움이 존재한다. 대부분의 단백질은 기능에 대해 중요한 것으로 알려지거나 또는 적어도 예측된 구성요소 또는 도메인을 가진다. 이들 필수 부분에 대해 암호화 서열을 결실시키는 것은 종종 삭제 대립유전자를 생성하는데 충분하다. 마찬가지로, 조직 특이적 재조합 부위의 작용에 의한 이후의 결실에 중요한 엑손 또는 엑손들을 단리시키는 조건적 대립유전자가 설계될 수 있다. 구조-기능 관계는 모두에 대해 아직 확립되지 않았지만 소수의 lncRNA에 대해서는 확립되었고, 가이드로서의 오픈 리딩 프레임이 없기 때문에, 단백질 암호화 유전자에 대해 이용가능한 넉아웃 전략은 lncRNA를 암호화하는 계획 좌위에 적용가능하지 않을 수 있다. lncRNA 유전자의 주석은 개선되었지만(Derrien et al. (2012)), 일부 유전자의 정확한 경계는 여전히 애매하게 남아있는데, 이는 넉아웃 대립유전자 설계를 복잡하게 할 수 있다. 단백질 암호화 유전자에 대한 넉아웃 마우스에 적용되는 강력한 도구는 표적 유전자의, 예를 들어,  $\beta$ -갈락토시다제에 대한 암호화 서열 또는 형광 단백질과 같은 리포터로의 치환인데, 리포터의 발현은 표적 유전자의 프로모터에 의해 제어됨으로써 마우스에서 그의 발현의 공간적 및 시간적 패턴을 보고한다. 리포터 유전자의 비제한적 예가 본 명세서의 다른 곳에 제공된다.

[0098] 리포터 유전자 치환은 lncRNA를 암호화하는 잘 연구된 Gt(ROSA)26Sor 좌위(Zambrowicz, B.P., et al. (1997), *Proc Natl Acad Sci USA* 94:3789-3794) 및 작은 비암호화 RNA miR-155에 대한 유전자(Thai, T.H., et al. (2007), *Science* 316:604-608)와 같은 비암호화 RNA에 성공적으로 적용되었지만, lncRNA에 대한 이러한 대립유전자를 생성하기 위한 규칙이 개발될 필요가 있을 수 있다. 동정된 수 천의 lncRNA에 의한 이들 자격에도 불구하고, 새로운 부류의 유전자에 넉아웃 마우스 기법의 힘을 적용하는 것을 탐구하는데 시간이 걸린다. 이 목표를 유념해 두고, 본 명세서에서, 예를 들어, 각각이  $\beta$ -갈락토시다제 리포터 치환을 지니는 유전자-제거 결실 대립유전자를 운반하는 넉아웃 마우스 계통의 생성에 의한 20개의 lincRNA가 기재된다.

[0099] 임의의 lncRNA 좌위는 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물에 의해 변형될 수 있다. 일 실시형태에서, lncRNA는 거대 유전자간 비암호화 RNA(lincRNA)이다. lincRNA 유전자의 비제한적 예는 표 1에 열거되지만, 그러나 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물은 임의의 lncRNA에 의해 실행될 수 있다.

[0100] 표 1은 본 연구에서 표적화된 10개의 상이한 염색체에 대한 20개의 lincRNA 유전자 및 생성된 26개의 넉아웃 결실 대립유전자를 열거한다. 정의에 의해 lincRNA 유전자는 이웃하는 단백질 암호화 유전자로부터 단리되며, 그들의 전사체는 중복되지 않기 때문에, 거대 유전자간 비암호화 RNA 부류의 구성원을 돌연변이시키는 것이 선택되었다(Guttman et al. (2009)). 이 특징은 가까운 유전자의 발현을 방해하는 최소의 기회를 갖는 결실 대립유전자를 설계하게 한다. 표적화된 lincRNA 유전자는 신경 발현 그리고 유전자 발현의 발생 및 조절에 대한 그들의 잠재적 연구에 중점을 두고 다양한 발현 패턴을 반영하도록 선택되었다(Cabili, M.N., et al. (2011), *Genes Dev* 25:1915-1927; Khalil, A.M., et al. (2009), *Proc Natl Acad Sci USA* 106:11667-11672).

## 표 1

LincRNA 네이웃 결실 대립유전자			
LincRNA	결실 특성		
	결실 시작 엑손 <sup>1</sup>	크기 (kb)	개놈 좌표 <sup>2</sup>
<i>HOTAIR</i>	E1	2.3	Ch15: 102945399–102947720
	E2	0.43	Ch15: 102945399–102945826
<i>HOTTIP</i>	E1	4.8	Ch6: 52262834–52267603
	E2	2.2	Ch6: 52265374–52267603
<i>Hoxa11os</i> ( <i>HoxA11as</i> )	E3	3.5	Ch6: 52246320–52249795
	E4	3.1	Ch6: 52246643–52249795
	E5	0.70	Ch6: 52249094–52249795
<i>Pantr1</i> ( <i>LincRNA-Brn1-a</i> )	E1	47	Ch1: 42648175–42694815
<i>Pantr2</i> ( <i>LincRNA-Brn1-b</i> )	E1	6.5	Ch1: 42707143–42713698
<i>Ptgs2os2</i> ( <i>lincRNA-Cox2</i> )	E1	5.9	Ch1: 150159024–150164899
<i>Eldr</i> ( <i>Fabl</i> , <i>LincRNA-Egfr</i> )	E1	17	Ch11: 16934419–16951083
<i>Lincenc1</i> ( <i>LincRNA-Enc1</i> )	E2	26	Ch13: 97455710–97482249
<i>Mannr</i> ( <i>LincRNA-Evi1</i> )	E1	32	Ch3: 29891188–29923147
<i>Fendrr</i> ( <i>LincRNA-Foxf1</i> )	E2	19	Ch8: 121054882–121074065
<i>Halr1</i> ( <i>Haunt</i> , <i>LincRNA-HoxA1</i> )	E2	8.6	Ch6: 52106776–52115377
<i>Haglr</i> ( <i>Mdgt</i> , <i>LincRNA-HoxD3</i> )	E1	12	Ch2: 74750433–74762886
<i>Celrr</i> ( <i>Celr</i> , <i>LincRNA-Insig2</i> )	E2	50	Ch1: 121087772–121137464
<i>Crnde</i> ( <i>LincRNA-Irx5</i> )	E2	25	Ch8: 92325913–92350749
<i>Kantr</i> ( <i>Spasm</i> , <i>LincRNA-Jarid1c</i> )	E1	29	ChX: 152298544–152327475

lincRNA 넉아웃 결실 대립유전자			
<i>Pint</i> ( <i>Linc-Pint</i> , <i>LincRNA-Mkln1</i> )	E2	32	Ch6: 31166026–31197846
<i>Trp53cor1</i> ( <i>LincRNA-p21</i> )	E1	22	Ch17: 29057474–29079078
	E2	2.9	Ch17: 29057474–29060353
<i>Lincppara</i> ( <i>LincRNA-Ppara</i> )	E1	29	Ch15: 85671665–85701064
<i>Peril</i> ( <i>LincRNA-Sox2</i> )	E1	14	Ch3: 34767849–34782292
<i>Tug1</i> ( <i>LincRNA-Tug1</i> )	E1	9.0	Ch11: 3639794–3648758
	E2	5.7	Ch11: 3639794–3645518

<sup>1</sup>LincRNA 유전자는 종종 다수의 주석이 달린 전사체를 가진다. 모든 결실은 마지막 주석의 엑손에서 끝난다.

<sup>2</sup>GRCm38 (GCA 000001635.3)

[0102]

[0103]

lincRNA 넉아웃 돌연변이에 대한 설계 전략은 두 목표에 의해 가이드되었다. 우선, lincRNA 유전자의 전사 활성을 정확하게 보고하는 대립유전자가 생성되었다. 조직 특이적 lincRNA 발현에 대한 풍부한 증거가 있지만 (Cabilio *et al.* (2011)), 공간적으로 그리고 시간적으로 조직과 장기 발현을 해결할 수 있고, 서브도메인 및 일부 경우에 조직 해부 실험에 의해 해결되지 않은 세포 유형 특이성을 나타내는 *lacZ* 발현 프로파일링에 의해 얻어진 더 고정밀도의 발현 패턴을 생성함으로써 이 지식 기초를 보완하는 것이 바람직하였다. 추가로, 공개된 lincRNA 넉아웃 대립유전자 중 어떤 것도 리포터를 포함하지 않았다. 둘째로, 돌연변이와 관련된 임의의 표현형이 표적화된 RNA의 중요한 기능에 관해 정보를 제공하도록 lincRNA의 합성 및 기능이 제거된 유전자 제거 결실이 만들어졌다. 넉아웃 결실은 크기가 약 400 bp 내지 50kb의 범위에 있으며, 결반은 모든 주석이 달린 엑손을 결실시켰다. 대부분의 남아있는 대립유전자에 대해, 결실은 제2 엑손에서 시작하였다. 박테리아 인공 염색체 (LTVEC)에 기반한 거대 표적화 벡터의 구성 및 사용을 위한 벨로시젠(VelociGene)(등록상표) 공학적 조작 방법의 적용(Valenzuela, D.M., *et al.* (2003a), *Nat Biotechnol* 21:652–659)은 새로운 부류의 거대 기능성 RNA에 대한 삭제 대립유전자를 보장하는데 필요한 거대 유전자 제거 결실의 구성 가능하게 하는데 중요하였다.

[0104]

대립유전자 설계를 가이드할 수 있는 lincRNA 유전자에 대한 구조와 기능 사이의 관계에 대해 알려진 것이 거의 없다. Gt(ROSA)26Sor(Zambrowicz *et al.*, (1997)) 및 BIC(miR-155)(Thai *et al.* (2007)) 유전자의 파괴에 의한 경험은 제1 엑손 후에 결실 및 삽입이  $\beta$ -갈락토시다제 또는 다른 리포터의 신뢰가능하고 조직 특이적인 발현을 생성할 수 있다는 것을 확립하였다. 그러나, 이 전략은 변형된 대립유전자로부터의 융합 전사체가 제1 엑손에서 암호화된 5' 부분으로부터의 lincRNA의 기능적 부분을 보유한다면 완전한 삭제 돌연변이를 달성하지 못할 수 있다(Tsai, M.C., *et al.* (2010), *Science* 329, 689–693). 따라서 표 1에 나타낸 넉아웃 대립유전자 설계는 lincRNA 기능을 없애는 가장 높은 확률을 갖는 완전히 제거되는 돌연변이에 대한 바람과  $\beta$ -갈락토시다제 리포터로부터 정확하고 정보적인 유전자 발현 프로파일을 생성한 대립유전자를 생성하는 목적 간의 절충이었다. 예를 들어, *HOTAIR* 유전자에 대해, 두 대립유전자는 전체 RNA 암호화 서열 근처에서 결실된 하나 그리고 결실이 제2 엑손에서 시작된 두 번째에 의해 생성되었다. 대립유전자는 둘 다 동일한 표현형을 생성하였지만(이하에 기재), 두 번째만이 유전자 발현의 리포터로서 기능하였다.

[0105]

단백질 암호화 유전자와 매우 가깝게 존재하고 갈라지는 프로모터를 공유할 수 있는 lincRNA에 대해, 결실 시작점은 이웃하는 유전자의 전사를 파괴하는 기회를 회피하기 위해 제2 엑손에서 설정된다. 도 1은 *Fendrr* (*LincRNA-Foxf1*) 유전자에 대한 이러한 예를 나타낸다. 다이어그램은 모든 대립유전자에 대해 공통적인 설계 구성요소의 예를 나타낸다: lincRNA에 대한 모든 또는 대부분의 서열 암호화의 표적화된 결실 및 G418-내성 ES 세포 콜로니의 선택을 위한 네오마이신 포스포트랜스퍼라제를 발현시키는  $\beta$ -갈락토시다제 및 카세트 (*neo*<sup>r</sup>)를 암호화하는 이콜라이(*E. coli*) *lacZ* 유전자로부터의 서열을 함유하는 카세트로 치환. 표현형 분석 전에 Cre-매개 절단을 가능하게 하는 *LoxP* 재조합 부위 인식 부위는 약물 선택 카세트에 측정한다. *lacZ* 서열에 융합하는 기능성 오픈 리딩 프레임이 없기 때문에, 각각의 대립유전자는  $\beta$ -갈락토시다제 리포터의 효율적인 번역을 위한 시작 코돈 및 코작 공통서열을 운반할 수 있다(Kozak, M. (1987), *Nucleic Acids Res* 15, 8125–8148). 코작 공통서열의 비제한적 예는 A/GCCRCCATGG(서열번호 1) 및 GCGGCCRCATGG(서열번호 2), R은 A 또는

G이다.

[0106] LTVEC 표적화 벡터는 ES 세포 내로 도입되었고, 대립유전자 상실 방법에 의해 정확하게 표적화된 클론에 대해 선별되었다(Frendewey, D., et al. (2010), *Methods Enzymol* 476, 295-307).

[0107] 벨로시마우스(VelociMouse)(등록상표) 방법(Poueymirou, W.T., et al. (2007), *Nat Biotechnol* 25, 91-99)을 *lacZ* 발현 프로파일링 또는 동형접합성에 대한 품종개량에 대한 준비가 된 완전히 ES 세포-유래된 F0 세대 이형 접합적 마우스로 표적화된 ES 세포를 전환시키기 위해 8-세포 배아 단계 주사에 적용하였다. lncRNA 넉아웃 동물을 생성하기 위한 방법의 추가적인 상세한 설명을 본 명세서의 다른 곳에 제공된 실시예 1 내지 13에서 제공한다.

[0108] ii. 리포터 발현 프로파일링

[0109] 본 명세서의 다른 곳에 기재한 바와 같이, lncRNA 좌위의 lncRNA 좌위의 유전자 변형은 lncRNA 좌위 또는 이의 일부에 대한 삽입 핵산으로의 치환 또는 삽입 핵산에 의한 삽입/첨가를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 삽입 핵산은 리포터 유전자를 포함한다. 일 실시형태에서, 리포터 유전자는 내인성 lncRNA 프로모터와 작동가능하게 연결된 lncRNA 좌위에 위치된다. 이러한 변형은 내인성 lncRNA 프로모터에 의해 유발되는 리포터 유전자를 발현시킨다. 대안적으로, 리포터 유전자는 내인성 lncRNA 프로모터와 작동가능하게 연결되도록 위치되지 않는다.

[0110] 임의의 리포터(또는 검출가능한 모이어티)는 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다. 리포터의 비제한적 예는, 예를 들어,  $\beta$ -갈락토시다제(*lacZ* 유전자에 의해 암호화됨), 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein: GFP), 증강된 녹색 형광 단백질(enhanced Green Fluorescent Protein: eGFP), 엠플럼, 엠체리, 티디토마토, 엠스트로베리, 제이-레드, 디에스레드, 엠오렌지, mKO, 엠시트린, 비너스, YPet, 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 에메랄드, CyPet, 시안 형광 단백질(CFP), 세루리안, 티-사파이어, 루시퍼라제, 알칼린 포스파타제, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0111] 다음의 설명은  $\beta$ -갈락토시다제를 암호화하는 *lacZ* 리포터 유전자를 이용하는 비제한적 예이다. 본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 임의의 리포터 유전자에 의해 수행될 수 있다.

[0112]  $\beta$ -갈락토시다제 활성에 대한 20개의 표적화된 lincRNA 유전자 X-gal 엔색의 발현 패턴을 조사하기 위해 성체 마우스로부터의 전체 배아 또는 전체 장착 조직 및 장기 상에 적용하였다. 표적화된 lincRNA 유전자는 다양한 독특한 리포터 유전자 발현 패턴을 나타내었고(도 11에서 표 2), 대부분의 주요 장기 계통 및 조직 유형을 나타낸다. 리포터 발현 패턴은 대부분의 lincRNA가 하나의 유전자 *Pint*에 의해 다수의 성체 조직에서 전사된 것을 나타내었는데, 이는 시험한 모든 조직에서 편재한 발현을 나타낸다. lincRNA 유전자의 약 1/3에 대해, 발현은 단일 기관, 예를 들어, *Pantr2*, *Kantr* 및 *Hag1r*에 대해 뇌, *Mannr* 및 *Fendrr*에 대해 폐, *Eldr*에 대해 비뇨생식계 및 *Ha1r1*에 대해 흉곽으로 제한된다. *HOTAIR*, *Ptgs2os2* 및 *Hag1r*을 포함하는 lincRNA 유전자 중 셋은 임의의 성체 조직에서 발현을 나타내지 않았다.

[0113] 배아 발현은 lincRNA의 통상적인 특징이 되는 것으로 나타난다. 배아 12.5일(E12.5)에 또는 그 즈음에 이형 접합적 배아 내  $\beta$ -갈락토시다제 리포터 발현의 시험은 모두 20개의 표적화된 lincRNA 유전자에 대해 다양한 구체적 패턴을 나타내었다(장기 위축1에서 표 2, 도 2a). 발현 프로파일은 *Eldr*에 대해 상피, *Trp53cor1*에 대해 수염 기원관(도 9) 또는 *Lincenc1*에 대해 유방눈(도 9)과 같이 편재한(*Tug1*) 내지 고도로 제한된 범위에 있다. *HOTTIP* 및 *Hoxa11os*에 대해 상이한 정도의 지아 및 꼬리에서 보이는 시공간적 패턴은 HoxA 클러스터에서 인접한 단백질 암호화 유전자에 대해 보고한 것과 매우 유사하다(Hostikka, S.L., and Capecchi, M.R. (1998), *Mech Dev* 70:133-145; Lu, P., et al. (2008), *Development* 135:1395-1405).  $\beta$ -갈락토시다제 리포터에 대해 관찰한 후부 꼬리싹 및 생식결절에서 *HOTAIR*의 발현은 현장 혼성화(*in situ* hybridization)에 의해 결정된 것과 동일하다(Schorderet, P., and Duboule, D. (2011), *PLoS Genet* 7:e1002071). 상이한 시간의 배아 발생에서  $\beta$ -갈락토시다제의 분석은 일부 lincRNA 발현에 대해 제한된 부위에서 초기에 시작하며, 이어서 이후의 단계에서 이 초기 좌위를 지나서 연장되고(도 2b), 또한, Hox 단백질 발현을 연장시킨다(Nagy, A. (2003) *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press). 예를 들어, *HOTTIP* 및 *Hoxa11os* 유전자의 발현은 E9.5 배아의 극단 후부에서 시작하며, 이어서, 이후의 시간에 지아 내로 연장된다. 유사하게, E9.5에 배아의 전방 말단 근처의 부위에서 *Celrr*에 대한 초기 발현을 유지하였고, 다음 2일에 걸쳐 척수의 총 길이로 연장된다.

[0114] 인간 조직 특이적 lncRNA 중에 보이는 빈번한 뇌 발현과 일치되게(Derrien et al. (2012)), 20개의 표적화된 마우스 lincRNA 유전자의 절반은 뇌에서 전사적으로 활성이다. 배아 lincRNA 발현에 의해, 뇌 패턴(도 3)은 독특

하였고 편재한 것으로부터(*lincppara* 및 *Pint*) 고도로 제한된 것(*Peril*, *Crnde* 및 *Kantr*)까지 다양하였다. 표적화된 20개의 lncRNA 유전자 중에서, *Pint*만이 대부분 출생후 수명으로 제한되는 전반적인 전신 발현 패턴을 나타내었다. *Pint*에 대해 독특하게, 연령에 따른 그의 발현의 증가가 관찰되었다(도 4). 3일령 신생아에서, *Pint* 전사 활성은 낮거나(뇌) 또는 검출가능하지 않지만(흉곽근), 이어서 3주령 마우스에서 서서히 나타나고 8주령까지 강하고 편재하게 된다. *Pint* 발현의 강도 및 시간은 상이한 기관 및 조직 중에서 다르지만, 일반적 경향은 출생 후 성체의 정체기까지 발현이 꾸준히 증가된다. 이 연령관련 동적 발현 패턴은 신규하며; 본 발명자들은 수백의 단백질 암호화 유전자 네아웃에 대해 *lacZ* 프로파일링 실험에서 유사한 프로파일을 관찰하지 못하였다.

[0115] *iii. 표현형*

lncRNA 좌위의 유전자 변형은 본 명세서에 제공된 비인간 동물에서 다양한 표현형을 초래할 수 있다. 이러한 표현형은, 예를 들어, 조로-관련 표현형, 뇌, 골격, 근육 또는 폐를 포함하는 다양한 장기 발현생의 결합, 배아 발생, 출산전후 또는 배아 치사율에서의 결합, 탈모, 조기 성장 저해, 척추변형 또는 비정상적 자세를 포함할 수 있다.

[0117] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 적어도 하나의 변형된 긴 비암호화 RNA(lncRNA)를 포함하는 비인간 동물은 다음의 표현형 중 하나 이상을 갖는 것을 특징으로 한다: (a) 조로-관련 표현형; (b) 출산전후 치사; (c) 폐 발달의 결합; (d) 꼬리 및 뒷다리에서의 형태적 기형; (e) 하나 이상의 조직에서 근육량의 손실; (f) 뇌 발생에서의 결합; 또는 (g) 상기 (a) 내지 (f)의 임의의 조합.

[0118] 일 실시형태에서, lncRNA 좌위의 유전자 변형은 치사를 초래한다. 일부 경우에, lncRNA 좌위의 변형은 배아치사이다. 일 실시형태에서 lncRNA 좌위의 변형은 출산전후 치사이다. 일 실시형태에서, *Fendrr* lncRNA 또는 *Peril* lncRNA의 파괴 또는 네아웃은 출산전후 치사를 초래한다. 다른 실시형태에서, *Haglr*의 파괴 또는 네아웃은 치사를 초래한다.

[0119] 일 실시형태에서, lncRNA 좌위의 유전자 변형은 조로-관련 표현형을 초래한다. 이러한 동물에서, 조로의 징후는, 예를 들어, 느린 체중증가, 더 조기의 정체기, 조기 성장 정지, 약 12주령까지의 척추변형, 약 26주령까지의 중증의 척추변형, 약 6개월에 텔의 상실, 약 6개월에 뒷다리 근육의 상실 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 조로-관련 표현형에서 초래되는 유전자 변형은 *Pint*의 파괴 또는 네아웃이다. 일 실시형태에서, lncRNA는 *Pint*이고, 비인간 동물은 (a) 야생형 대조군보다 더 느린 성장 속도; (b) 근육 강도의 감소; (c) 섬유증; (d) 야생형 대조군보다 더 낮은 체지방 함량; (e) 야생형 대조군보다 더 낮은 대퇴골 끝 무기질 밀도 및 골량; (f) 야생형 대조군에 비해 감소된 근육량; (g) 중앙값 수명의 감소; (h) 척추변형; (i) 장기 위축; 또는 (j) 상기 (a) 내지 (i)의 임의의 조합을 포함하는 조로-관련 표현형을 특징으로 한다.

[0120] lncRNA 좌위의 기능상실 유전자 변형은 또한 뇌 발생에서 결함을 초래할 수 있다. 일 실시형태에서, 조로-관련 표현형에서 생기는 유전자 변형은 *Pantr2*, *Kantr*, *Peril*, *Celrr*, *Pantr1*, *Crnde*, *lincenc1*, *Pint*, *lincppara* 또는 *Tugl*의 파괴 또는 네아웃이다. 구체적 실시형태에서, lncRNA는 *Pantr2*이다. 다른 구체적 실시형태에서, lncRNA는 *Pint*이다.

[0121] 본 명세서에 제공되는 lncRNA 네아웃 마우스의 다양한 예의 표현형 분석을 수행하였고, 본 명세서에서 이하에 기재한다.

[0122] *lacZ* 프로파일링에 의해 나타내는 전신 *Pint* 발현에서 현저한 연령관련 증가(도 4)는 *Pint*가 마우스 연령에 따른 정상 건강상태의 유지에서 전반적인 항상성 역할을 가질 수 있다는 것을 시사하였다. 이 가설을 시험하기 위해, 네아웃 대립유전자는 동형접합성 및 야생형(WT)으로 변식시켰고, 이형 접합적(Het) 및 동형 접합성 네아웃(KO) 마우스는 출생부터 26주령까지 지켜보았으며, 성장 속도 및 결함의 병적 건강상태의 임의의 공공연한 징후에 대해 시험하였다. *Pint* KO 마우스는 더 느린 속도로 연령에 따라 체중이 증가하였고, WT 마우스보다 더 조기 예 그리고 상당히 더 저체중에서 체중 정체기에 도달되었는데(도 5A 및 도 5B), 이는 조기 성장 저해를 나타낸다. 수컷과 암컷 KO와 Het 마우스는 둘 다 느린 성장 표현형을 나타내었지만, 이는 수컷에서 더 분명하였다. 개개 마우스의 마이크로CT 분석에 의한 골격 영상화는 그들이 노화됨에 따라 12주령까지 대략 70%의 수컷 및 암컷 *Pint* KO 마우스에서 척추변형의 외관을 나타내었고, 거의 90%의 26주령 KO 마우스는 중증의 척추변형을 나타내었다(도 5C 및 도 5D). 대조적으로, 단지 10 내지 20%의 26-주령의 WT 마우스는 약간의 연령 관련 척추변형을 나타내었다. 26주령까지의 *Pint* Het 마우스에서 상당한 척추변형이 나타나지 않았는데, 이는 *Pint*에 대해 보통의 연령 의존적 반수체기능부전을 나타낸다. 6개월령 KO 마우스에서 텔의 연령관련 상실이 또한 관찰되었는데

이는 수컷(9마리 중에 2마리)보다 암컷(10마리 KO 중 5마리)에서 더 중증이었고, 한 마리의 Het에서만 보이고 동일 연령의 WT 마우스 중에는 보이지 않았다. 덜 중증의 표현형, 꼬리로 매달 때 뒷다리 움켜짐 거동이 동일 연령의 약 20% WT 마우스에 비해 6개월령 *Pint* KO 마우스의 약 2/3(60%의 암컷, 67%의 수컷)에서 주목되었다. 이 표현형은 뒷다리 근육 강도의 연령 관련 상실을 나타낸다(*HOTTIP* 넉아웃 계통에서 이 표현형의 다른 예에 대해 도 8 참조). *Pint* 넉아웃 마우스에서 돌연변이 관련 결함의 범위는 조로 관련 표현형을 시사한다.

[0123]

동형접합성으로 번식된 19마리의 lincRNA 넉아웃 마우스 계통 중에서, 둘(11%)(*Peril* 및 *Fendrr*)은 출산전후 치사를 나타내었다(L.A. Goff *et al.*, 미공개). *Fendrr* 유전자의 넉아웃은 최근에 보고되었다(Grote *et al.* (2013)). 대립유전자는 제1 엑손에서 전사 정지 요소의 삽입으로 이루어졌다. *Fendrr*의 동형 접합성 돌연변이를 운반하는 배아에서, 문헌[Grote *et al.* (2013)]은 돌출된 배꼽류, 복부 체벽 두께의 감소, 및 우심방 내 혈액 축적을 야기한 심장 결함과 관련된 E13.75 주위의 치사를 관찰하였다. 이들 표현형 중 어떤 것도 본 명세서에 기재된 *Fendrr* 넉아웃 계통에서 관찰되지 않았는데, 이는 엑손 2로부터 최종 주석의 엑손까지 26kb 결실을 가진다(도 1). E12.5 배아의 X-gal 염색은 전비 돌기, 상부 호흡관, 폐에서 그리고 이형 접합성(나타내지 않음)과 동형 접합성 배아 둘 다에서 동일한 후부 AGM(대동맥-생식용기-중신) 영역(도 6A)에서 *lacZ* 발현을 나타내었다. E13.5에 발생 중인 폐에서 단리된 외양은 넉아웃 배아에서 결함을 나타내었다: 폐엽은 붕괴된 구형으로 나타났고, 파괴되었다(도 6B). 본 명세서에 기재된 *Fendrr* 유전자의 결실 대립유전자 넉아웃에 대해 마우스 동형 접합형은 출생 후에 생존하였지만, 분명한 호흡 문제 후에 얼마 안 되어 죽었다. *Fendrr* 돌연변이체 출산전후 치사 표현형은 마우스에서 2개의 상이한 유전자 배경에 대해 동일하였다: C57B16NTac/129S6SvEvTac 혼성체 배경은 본 명세서에서 보고되었고, 마우스에서 별개의 번식 프로그램에서 C57BL/6 배경에 대해 추가로 역교배되었다.

[0124]

성체까지 생존하고 돌연변이체 대립유전자의 정상 멘델 분리를 나타낸 lincRNA 넉아웃 마우스 중에서 다수의 온화한 표현형이 또한 관찰되었다(L.A. Goff *et al.*, 미공개). 이들 중에서, *Pantr2*, *HOTAIR* 및 *HOTTIP*와 같은 다수의 lincRNA 유전자 넉아웃에서 *lacZ* 발현과 검출가능한 표현형 사이에 강한 상관관계가 있다. *Pantr2* 유전자 제거(6.5kb 완전 암호화 서열 결실, 표 1)를 위한 마우스 동형 접합형은 대뇌피질의 부적절한 발생을 나타내었고(CNS에서 강한 염색), 이는 중간 전구세포의 수 및 상부층 돌출 뉴런의 발생에 영향을 미치는 뉴런 이동의 결함이 감소되었다(L.A. Goff *et al.*, 미공개). *HOTAIR* 및 *HOTTIP* 유전자의 결실(완전한 또는 부분적 유전자 제거 중 하나, 표 1)은 완전히 침투하는 형태적 기형에 의해 야기되었다. *HOTAIR* KO 마우스에서, 3번째 미추골과 해부학적으로 유사한 것으로 나타난 4번째 미추골의 명확한 호메오 유전자 변형이 관찰되었다(도 7)(꼬리싹에서 특이적인 일시적 *lacZ* 염색). *HOTTIP* KO 마우스(배아 지아에서 양의 염색)는 그들의 꼬리로부터 매달릴 때 야생형 한배 새끼에 비해 비정상적 자세를 나타내었다(도 8A). 이 거동 이상은 마우스가 뒤집힌 와이어 케이지 상에서 매달린 채로 남아있도록 시험된 시험에 의해 측정된 바와 같이 악력의 상실을 수반하였다. 야생형 및 *HOTTIP* Het 돌연변이체는 대략 1분 동안 보유되는 반면 그들의 KO 한배 새끼는 10 내지 20초 내에 그들의 움켜짐을 풀었다(도 8B). 악력의 이러한 분명한 감소는 비복근에 대한 근육량의 상실과 관련되지만, 전경골근 또는 사두근에 대해서는 그렇지 않다(도 8C). 비복근에서 섬유 수의 대략 40% 감소가 관찰되었지만, 그들의 평균 크기는 감소되지 않았다(도 8D 및 도 8E). *HOTTIP* 넉아웃 마우스에서 근육 결함에 추가로, 골격 기형(뒷다리 발꿈치뼈 길이의 단축)이 또한 발견되었다(도 10).

[0125]

과거 몇 년간 특히 포유류에서 계놈의 비단백질 암호화 구성성분의 이해에서 폭발적인 증가가 있었다. 수십년간 알려진 비암호화 기능성 RNA의 부류(리보솜, 전달, 소핵, 핵소체내 저분자, 소세포질 RNA 및 RNase P의 RNA 성분, RNase MRP 및 텔로미라제 효소 및 더 최근에 발견된 마이크로RNA 및 PIWI-관련 piRNA)에 추가로, 이제 긴 비암호화 RNA 부류의 적어도 10,000개 구성원을 포함할 수 있다(Carninci *et al.* (2005); Derrien *et al.* (2012); Djebali *et al.* (2012); Guttman *et al.* (2009); Kapranov *et al.* (2007)). 본 발명자들은 lncRNA 유전자의 계놈 존재 및 발현을 차차 이해하게 되었기 때문에, 다음의 목표는 그들의 생물학적 기능을 발견하는 것이다. 이 도전을 방해하는 첫 번째 단계로서, 포유류 유전자 기능의 결정을 위한 가장 강력한 도구인 마우스 유전자 표적화 기법을 적용하여 그들의 우세한 신경 계통 발현 및 발생 중에 예상되는 기능에 대해 선택되는 20개의 lincRNA 유전자에 대한 넉아웃 마우스 계통의 자원을 생성하였다.

[0126]

lincRNA에 대해 알려지지 않은 구조-기능 관계 때문에, 이런 초기 연구에서는 관찰된 임의의 표현형이 완전히 삭제 대립유전자의 결과였다는 것을 보장하기 위해 모든 lincRNA가 암호화 가능성이 있는 것이 아니라면, 대부분이 제거된 결실을 지니는 넉아웃 대립유전자를 생성하는 것이 중요하였다. 대안의 스플라이싱 또는 전사 개시 부위에 의해 생성될 가능성이 있는 전사체를 여러 번 보고한 다수의 lincRNA 좌위의 애매모호하고 복잡한 주석은 넉아웃 대립유전자 설계의 곤란함을 더하며, 정상 하위 대립인자의 위험을 회피하는 조건적 대립유전자의 구성이 달성되는 것을 어렵게 만든다. lincRNA 기능에 중요한 분자 특징의 새로운 이해는 더 분명하게 진행중이며

유연한 조건적 전략으로 작용하고 또한 허용하는데 중요한 서열의 변형에 관한 lincRNA 대립유전자의 차세대 설계에 관한 정보를 제공해야 한다.

[0127] 본 명세서에 기재된 lincRNA 네아웃 측량의 목표는 또한 제거 기능에 추가로 유전자의 시공간적 발현 패턴을 보고한 대립유전자를 생성하는 것이었다. 가이드로서 단백질 암호화 오픈 리딩 프레임을 갖지 않음에도 불구하고, 20개의 표적화된 유전자 모두에 대해 유전자 발현을 보고한 대립유전자는 성공적으로 설계되었다. 성체 단계에서 *lacZ* 발현이 생성되지 않은 대립유전자 중 하나는 *Ptgs2os2*였는데(배아 발현에 대해 도 2a 및 도 9 참조), 이는 염증 신호에 의해 가장 강하게 유도된 lincRNA 중 하나인 것으로 알려져 있다(Carpenter, S., et al. (2013), *Scienceexpress* 01 August 2013; Guttman et al. (2009)). 이 측량에서, 시험감염 실험을 수행하지 않았지만, *Ptgs2os2* 네아웃 계통은 lincRNA의 발현이 감염 또는 다른 염증 발작에 반응하는 방법 및 그것이 과정에서 하는 생물학적 역할의 연구를 위한 가치있는 자원을 증명하여야 한다.

[0128] 관찰한 유전자 발현 패턴의 다양성 및 특이성은 단백질 암호화 유전자에 대한 리포터 대립유전자에 의해 보이는 것을 연상시켰다. 배아 발현은 시험한 거의 모든 lincRNA 유전자에 의해 공유되는 특징이었다. 이는 발생 중인 중요한 사건의 조절에서 lincRNA에 대한 공통적인 역할을 지시할 수 있다. 배아 발생 동안 시공간적 패턴을 변화시키는 것은 훨씬 유사한 HOX 단백질(도 2b), 절묘하게 특이적인 발현, 예컨대 *Trp53cor1*에 대한 수염 기원판 염색 및 *Lincenc1*에 대한 유방눈 발현(도 2a 및 도 9), 성체 조직에서 편재한 발현, 예컨대 *Pint*에 대해(도 4), 그리고 발현 패턴에서의 일시적 변화, 예컨대 배아 발생에서 *Celrr*에 대해 보이는 정량적 변화(도 2b) 또는 *Pint*에 대해 연령에 따른 전반적 발현의 신규한 정성적 증가(도 4)를 관찰하였다. 본 측량에 대해 선택한 다수의 lincRNA 유전자가 신경 세포 계통에서 발현된 것으로 알려졌기 때문에, 뇌 특이적 리포터 발현을 관찰하였지만(도 3), *lacZ* 프로파일링은 세포 또는 절개된 조직에 기반한 분석보다 더 풍부한 생물학적 정보와 함께 더 고분해능을 제공하였다.

[0129] 동형접합성으로 번식시킨 19개의 lincRNA 네아웃 계통 중에서 관찰한 표현형 중에서, 치사는 2배로 관찰되었고 (11%), 더 낮을 가능성이 있는 빈도는 20개의 무작위로 선택한 단백질 암호화 유전자의 네아웃에 대해 예상되었다. *HOTAIR*(도 6), *HOTTIP*(도 7 및 8), *Pantr2*(L.A. Goff et al., 비공개) 및 기타(M. Sauvageau et al., 비공개) 및 빈번한 배아 발현에 대해 보이는 비치사 표현형의 세부 요소들과 짹지어진 다소 낮은 치사율은 단일의 중요한 기능보다 유전자 발현 또는 다른 과정을 완충 또는 조절할 수 있다는 것을 시사한다. 이 방법으로, lincRNA는 그들의 더 작은 비암호화 등가물에 대해 그들이 다른 기능적 lncRNA와 불필요하고 중복된 표적 및 기능을 공유한다는 점에서 miRNA와 유사할 수 있었다.

[0130] 이 작업의 한 가지 목표는 더 면밀한 발현 및 표현형 연구의 대상으로서 작용할 수 있는 통상적인 대립유전자 전략 및 기능성 리포터 능력을 지니는 lincRNA 네아웃 마우스 계통의 자원을 생성하는 것이었다. 각각의 경우에 *LacZ* 카세트의 첨가는 유전자 기능의 자발적 파괴 및 X-Gal 염색에 의한 lincRNA 발현 패턴의 조절 연구를 허용하였다. 이들 연구는 마우스 배발생 동안 그리고 성체 기간 내내 lincRNA 발현의 동적인 공간적 및 시간적 패턴을 나타내며, 생체내에서 이런 새로운 부류의 분자의 조절/기능의 특성에 대한 상당한 통찰을 제공하고, 정확한 영역은 추구될 수 있는 이들 유전자의 기능이다. 이 측량은 단백질 암호화 유전자에 대한 국제 네아웃 마우스 협회(International Knockout Mouse Consortium for protein-coding genes)에 의해 달성된 것과 유사한 lincRNA 부류의 모든 구성원을 돌연변이시키기 위한 대규모 프로젝트를 위한 모델로서 작용할 수 있었다(Bradley et al. (2012)).

## II. 비인간 동물에서 lncRNA 좌위를 변형시키기 위한 방법

[0131] 비인간 동물, 세포, 조직 또는 배아에서 lncRNA 좌위를 유전자 변형시키는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0132] 임의의 lncRNA 좌위는 본 명세서에 제공된 방법에 의해 변형될 수 있다. lncRNA 유전자의 비제한적 예는 *HOTAIR*, *HOTTIP*, *Hoxa11os*(이전에 *HoxA11as*로 지칭됨), *Pantr1*(이전에 *lincRNA-Brn1-a*로 지칭됨), *Pantr2*(이전에 *lincRNA-Brn1-b*로 지칭됨), *Ptgs2os2*(이전에 *lincRNA-Cox2*로 지칭됨), *Eldr*(이전에 *Fab1* 및 *lincRNA-Egfr*로 지칭됨), *Lincenc1*(이전에 *lincRNA-Enc1*로 지칭됨), *Mannr*(이전에 *lincRNA-Evi1*로 지칭됨), *Fendrr*(이전에 *lincRNA-Foxf1*로 지칭됨), *Halr1*(이전에 *Haunt* 및 *lincRNA-HoxA1*로 지칭됨), *Haglr*(이전에 *Mdgt* 및 *lincRNA-HoxD3*로 지칭됨), *Celrr*(이전에 *Celr* 및 *lincRNA-Insig2*로 지칭됨), *Crndel*(이전에 *lincRNA-Irx5*로 지칭됨), *Kantr*(이전에 *Spasm* 및 *lincRNA-Jarid1c*로 지칭됨), *Pint*(이전에 *linc-Pint* 및 *lincRNA-Mk1n1*로 지칭됨), *Trp53cor1*(이전에 *lincRNA-p21*로 지칭됨), *lincppara*(이전에 *lincRNA-Ppara*로 지칭됨), *Peril*(이전에 *lincRNA-Sox2*로 지칭됨), *Tug1*(이전에 *lincRNA-Tug1*로 지칭됨), 또는 이들의 조합물을 포함한다.

- [0134] 일 실시형태에서, 만능 세포 내 관심 대상의 lncRNA 좌위를 변형시키는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 (a) 만능 세포 내에 lncRNA 좌위에 의해 상동성 재조합을 겪을 수 있는 5' 및 3' 상동성 암에 측접하는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 작제물을 도입하는 단계; 및 (b) lncRNA 좌위에서 표적화된 유전자 변형을 포함하는 변형된 만능 세포를 동정하는 단계를 포함한다. 이러한 방법에서, 유전자 변형은 lncRNA의 기능상실을 초래한다. 일 실시 형태에서, 만능 세포는 마우스 또는 래트 배아 줄기 세포이다. 다른 실시형태에서, 만능 세포는 인간 iPS 세포이다.
- [0135] A. 표적화 벡터 및 삽입 핵산
- [0136] 추가로 본 명세서에 제공된 유전자 변형된 비인간 동물, 세포, 조직 또는 배아를 제조하기 위한 방법에서 사용될 표적화 벡터 또는 표적화 작제물이 제공된다.
- [0137] 일 실시형태에서, 관심 대상의 lncRNA 좌위에 의해 상동성 재조합을 겪을 수 있는 5' 및 3' 상동성 암에 측접되는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터가 제공된다.
- [0138] 표적화 벡터 및 표적화 벡터의 구성 성분의 예(즉, 삽입 핵산, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드, 발현 카세트 등)는 본 명세서에서 이하에 상세하게 기재된다.
- [0139] i. 삽입 핵산
- [0140] "삽입 핵산" 또는 "삽입 폴리뉴클레오타이드"는 표적 좌위에서 통합시키고 싶은 DNA의 세그먼트를 포함한다. 일 실시형태에서, 삽입 핵산은 관심 대상의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 실시형태에서, 삽입 핵산은 하나 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있다. 주어진 발현 카세트는 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드, 발현에 영향을 미치는 다양한 조절 구성성분과 함께 선택 마커 및/또는 리포터 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0141] 임의의 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드가 다양한 삽입 폴리뉴클레오타이드에 포함될 수 있으며, 이에 의해 표적 게놈 좌위에 통합될 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 관심 대상의 표적화된 lncRNA 게놈 좌위 내로 통합될 관심 대상의 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.
- [0142] 일 실시형태에서, 삽입 핵산에 포함된 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 리포터를 암호화한다. 다른 실시형태에서, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 선택가능한 마커를 암호화한다.
- [0143] 일 실시형태에서, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 부위-특이적 재조합 부위에 측접될 수 있다. 구체적 실시 형태에서, 부위-특이적 재조합 부위는 리포터를 암호화하는 세그먼트 및/또는 선택가능한 마커를 암호화하는 세그먼트에 측접한다.
- [0144] 삽입 핵산 내에 포함될 수 있는 선택 마커 및 리포터 유전자를 포함하는 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드의 비제한적 예는 본 명세서의 다른 곳에서 상세하게 논의된다.
- [0145] 표적 lncRNA 좌위에서 통합될 때 삽입 폴리뉴클레오타이드 내의 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 유전자 변형을 세포 내로 도입할 수 있다. 유전자 변형은 내인성 핵산 서열의 결실 및/또는 외인성 또는 이종성 또는 이종상동성 폴리뉴클레오타이드의 표적 게놈 좌위 내로의 첨가를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 유전자 변형은 표적 게놈 좌위에서 내인성 핵산 서열의 외인성 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드로의 치환을 포함한다. 따라서, 본 명세서에 제공된 방법은 표적 lncRNA 좌위에서 넉아웃, 결실, 삽입, 치환("넉인"), 점돌연변이, 도메인 스왑(swap), 엑손 스왑, 인트론 스왑, 조절 서열 스왑, 유전자 스왑 또는 이들의 조합을 포함하는 유전자 변형의 생성을 가능하게 한다. 이러한 변형은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7 또는 임의의 후속적 삽입 폴리뉴클레오타이드의 표적 게놈 좌위 내로의 도입 시 생길 수 있다.
- [0146] 삽입 폴리뉴클레오타이드 내의 및/또는 표적 게놈 좌위에 통합된 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 그것이 도입되는 세포에 대해 천연이거나 상동성인 서열을 포함할 수 있고; 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 그것이 도입되는 세포에 대해 이종성일 수 있으며; 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 그것이 도입되는 세포에 대해 외인성일 수 있고; 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 그것이 도입되는 세포와 상이한 종으로부터 유래될 수 있다. 서열에 대해 용어 "상동성"은 세포에 대해 천연인 서열이다. 서열에 대해 용어 "이종성"은 외래 종으로부터 유래된 서열이거나, 또는 동일한 종으로부터 유래된다면, 의도적인 인간 개입에 의해 조성물 및/또는 게놈 좌위에서 그의 천연 형태로부터 실질적으로 변형된다. 서열에 대해 용어 "외인성"은 외래 종으로부터 유래된 서열이다. 용어 "이종상동성"은 다른 종에서 알려진 기준 서열에 대해 기능적으로 동일한 하나의 종(즉, 종 변이체)으로부터

의 폴리뉴클레오타이드이다. 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 원핵생물, 진핵생물, 비인간, 설치류, 햄스터, 마우스, 래트, 인간, 원숭이, 조류, 농업 포유류 또는 비농업 포유류를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 유기체로부터 유래될 수 있다. 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 암호화 영역, 비암호화 영역, 조절 영역, 또는 게놈 DNA를 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7 및/또는 임의의 후속적 삽입 폴리뉴클레오타이드는 이러한 서열을 포함할 수 있다.

[0147] 일 실시형태에서, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 상기 기재한 바와 같은 약 500개 뉴클레오타이드 내지 약 200kb의 범위에 있을 수 있다. 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 약 500개 뉴클레오타이드 내지 약 5kb, 약 5kb 내지 약 200kb, 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 30kb, 약 30kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 50kb, 약 60kb 내지 약 70kb, 약 80kb 내지 약 90kb, 약 90kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 110kb, 약 120kb 내지 약 130kb, 약 130kb 내지 약 140kb, 약 140kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 160kb, 약 160kb 내지 약 170kb, 약 170kb 내지 약 180kb, 약 180kb 내지 약 190kb, 또는 약 190kb 내지 약 200kb일 수 있다.

[0148] 삽입 폴리뉴클레오타이드 내의 및/또는 표적 게놈 좌위에서 삽입된 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있거나, RNA를 암호화할 수 있거나, miRNA를 암호화할 수 있거나, 또는, 예를 들어, 조절 서열, 프로모터 서열, 인핸서 서열, 전사 리프레서-결합 서열, 코작 공통 세그먼트, 시작 코돈 또는 비단백질-암호화 서열의 결실을 포함하는 관심 대상의 임의의 조절 영역 또는 비암호화 영역을 포함할 수 있지만, 단백질-암호화 서열의 결실을 포함하지 않는다. 추가로, 삽입 폴리뉴클레오타이드 내의 및/또는 표적 게놈 좌위에서 삽입된 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 신경계, 끌격계, 소화계, 순환계, 근육계, 호흡계, 심혈관계, 림프계, 내분비계, 비뇨계통, 생식계 또는 이들의 조합에서 발현되는 단백질을 암호화할 수 있다.

[0149] 일 실시형태에서, 삽입 핵산은 내인성 유전자의 적어도 하나의 엑손의 넉인 대립유전자를 포함한다. 일 실시형태에서, 삽입 핵산은 전체 내인성 유전자의 넉인 대립유전자(즉, "유전자-스왑 넉인(gene-swap knock-in)")를 포함한다.

[0150] 일 실시형태에서, 삽입 핵산은, 예를 들어, 프로모터, 인핸서 또는 전사 리프레서-결합 구성요소를 포함하는 조절 구성요소를 포함한다.

[0151] 추가 실시형태에서, 삽입 핵산은 조건적 대립유전자를 포함한다. 일 실시형태에서, 조건적 대립유전자는 본 명세서에 전문이 참고로 포함되는 미국 특허 제2011/0104799호에 기재되는 바와 같은 다기능성 대립유전자이다. 구체적 실시형태에서, 조건적 대립유전자는 (a) 표적 유전자의 전사에 대해 센스 배향인 작동 서열 및 센스 또는 안티센스 배향인 약물 선택 카세트; (b) 안티센스 배향으로 관심 대상의 뉴클레오타이드 서열(NSI) 및 반전 모듈에 의한 조건(conditional by inversion module: COIN, 이는 엑손-분할 인트론 및 반전가능한 유전자을 가미(genetrap)-유사 모듈을 이용함; 예를 들어, 본 명세서에 전문이 참고로 포함되는 미국 특허 제2011/0104799호 참조); 및 (c) (i) 작동 서열 및 DSC가 없고, (ii) 센스 배향에서 NSI 그리고 안티센스 배향에서 COIN을 포함하는 조건적 대립유전자를 형성하기 위해 제1 재조합 부위에 노출 시 재조합가능한 단위를 포함한다.

[0152] 일 실시형태에서, 삽입 핵산은 암호화 서열에서 유전자 변형을 포함한다. 일 실시형태에서, 유전자 변형은 암호화 서열의 결실 돌연변이를 포함한다. 일 실시형태에서, 유전자 변형은 두 내인성 암호화 서열의 융합한다.

[0153] 일 실시형태에서, 유전자 변형은 비단백질-암호화 서열의 결실을 포함하지만, 단백질-암호화 서열의 결실을 포함하지 않는다. 일 실시형태에서, 비단백질-암호화 서열의 결실은 lncRNA 좌위 또는 이의 일부의 결실을 포함한다. 일 실시형태에서, 비단백질-암호화 서열의 결실은 조절 구성요소의 결실을 포함한다. 일 실시형태에서, 유전자 변형은 프로모터의 결실을 포함한다. 일 실시형태에서, 유전자 변형은 프로모터 또는 조절 구성요소의 첨가를 포함한다. 일 실시형태에서, 유전자 변형은 프로모터 또는 조절 구성요소의 치환을 포함한다.

[0154] 일 실시형태에서, 표적화 벡터의 핵산 서열은 게놈 내로 도입될 때 포유류, 비인간 동물, 또는 비인간 포유류 lncRNA 좌위의 영역의 유전자 변형을 생성할 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있되, lncRNA 좌위에서 유전자 변형은 lncRNA의 기능상실을 초래한다. 일 실시형태에서, lncRNA 넉아웃("삭제 대립유전자)이 생성된다. 다른 실시형태에서, lncRNA 좌위의 파괴가 생성된다.

[0155] 추가 실시형태에서, 삽입 핵산은 포유류, 비인간 동물 또는 비인간 포유류 lncRNA 좌위의 일부의 삽입 핵산 서열로의 치환을 초래한다. 일 실시형태에서, 삽입 핵산 서열은 리포터 핵산 서열이다.

- [0156] 치환될 포유류, 비인간 또는 비인간 포유류 좌위의 주어진 삽입 폴리뉴클레오타이드 및 대응하는 영역은 비암호화 영역, 암호화 영역, 인트론, 엑손, 비번역 영역, 조절 영역, 프로모터 또는 인핸서 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다. 게다가, 결실될 포유류, 비인간, 또는 비인간 포유류 좌위의 주어진 삽입 폴리뉴클레오타이드 및/ 또는 영역은, 예를 들어, 길이로 10 내지 100개의 뉴클레오타이드, 길이로 100 내지 500개의 뉴클레오타이드, 길이로 500 내지 1kb 뉴클레오타이드, 길이로 1kb 내지 1.5kb 뉴클레오타이드, 길이로 1.5kb 내지 2kb 뉴클레오타이드, 길이로 2kb 내지 2.5kb 뉴클레오타이드, 길이로 2.5kb 내지 3kb 뉴클레오타이드, 길이로 3kb 내지 5kb 뉴클레오타이드, 길이로 5kb 내지 8kb 뉴클레오타이드, 길이로 8kb 내지 10kb 뉴클레오타이드 또는 그 이상을 포함하는, 임의의 목적으로 하는 길이를 가질 수 있다. 다른 예에서, 삽입 또는 치환의 크기는 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb이다. 다른 실시형태에서, 결실될 포유류, 인간 세포 또는 비인간 포유류 좌위의 주어진 삽입 폴리뉴클레오타이드 및/또는 영역은 적어도 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800 또는 900개의 뉴클레오타이드 또는 적어도 1kb, 2kb, 3kb, 4kb, 5kb, 6kb, 7kb, 8kb, 9kb, 10kb, 11kb, 12kb, 13kb, 14kb, 15kb, 16kb, 17kb, 18kb, 19kb, 20kb, 25kb, 30kb, 35kb, 40kb, 45kb, 50kb 이상이다.
- [0157] 일 실시형태에서, 삽입 핵산은 그것이 내인성 lncRNA 프로모터에 작동가능하게 연결되도록 관심 대상의 lncRNA 좌위 내로 삽입된다. 이러한 경우에, lncRNA 프로모터는 삽입 핵산 서열의 발현을 유발시킨다. 일 실시형태에서, 삽입 핵산 서열은 리포터 핵산 서열이다.
- [0158] 일부 경우에, 삽입 핵산은 프로모터를 포함한다. 일 실시형태에서, 삽입 핵산은 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드의 발현을 유발시키는 프로모터에 작동가능하게 연결된 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일 실시형태에서, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 리포터 핵산 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 선택 마커 핵산 서열을 포함한다.
- [0159] 일 실시형태에서, 프로모터는 구성적 활성 프로모터이다.
- [0160] 일 실시형태에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다. 일 실시형태에서, 유도성 프로모터는 화학적으로 조절된 프로모터이다. 일 실시형태에서, 화학적으로 조절된 프로모터 알코올-조절 프로모터이다. 일 실시형태에서, 알코올-조절 프로모터는 알코올 탈수소효소(alcA) 유전자 프로모터이다. 일 실시형태에서, 화학적으로 조절된 프로모터는 테트라사이클린-조절된 프로모터이다. 일 실시형태에서, 테트라사이클린-조절된 프로모터는 테트라사이클린-반응성 프로모터이다. 일 실시형태에서, 테트라사이클린-조절된 프로모터는 테트라사이클린 오퍼레이터 서열(tetO)이다. 일 실시형태에서, 테트라사이클린-조절된 프로모터는 테트라사이클린-온(tet-On) 프로모터이다. 일 실시형태에서, 테트라사이클린-조절된 프로모터는 테트라사이클린-오프(tet-Off) 프로모터이다. 일 실시형태에서, 화학적으로-조절된 프로모터는 스테로이드 조절된 프로모터이다. 일 실시형태에서, 스테로이드 조절된 프로모터는 래트 글루코코티코이드 수용체의 프로모터이다. 일 실시형태에서, 스테로이드 조절된 프로모터는 에스토로겐 수용체의 프로모터이다. 일 실시형태에서, 스테로이드-조절된 프로모터는 엑디손 수용체의 프로모터이다. 일 실시형태에서, 화학적으로-조절된 프로모터는 금속-조절된 프로모터이다. 일 실시형태에서, 금속-조절된 프로모터는 메탈로프로테인 프로모터이다. 일 실시형태에서, 유도성 프로모터는 생리적으로-조절된 프로모터이다. 일 실시형태에서, 생리적으로-조절된 프로모터는 온도-조절된 프로모터이다. 일 실시형태에서, 온도-조절된 프로모터는 열 충격 프로모터이다. 일 실시형태에서, 생리적으로-조절된 프로모터는 광-조절된 프로모터이다. 일 실시형태에서, 광-조절된 프로모터는 광-유도성 프로모터이다. 일 실시형태에서, 광-조절된 프로모터는 광-억제성 프로모터이다.
- [0161] 일 실시형태에서, 프로모터는 조직 특이적 프로모터이다. 일 실시형태에서, 프로모터는 뉴런-특이적 프로모터이다. 일 실시형태에서, 프로모터는 신경교-특이적 프로모터이다. 일 실시형태에서, 프로모터는 근육 세포-특이적 프로모터이다. 일 실시형태에서, 프로모터는 심장 세포-특이적 프로모터이다. 일 실시형태에서, 프로모터는 골세포-특이적 프로모터이다. 일 실시형태에서, 프로모터는 내피세포-특이적 프로모터이다. 일 실시형태에서, 프로모터는 면역세포-특이적 프로모터이다. 일 실시형태에서, 면역세포 프로모터는 B 세포 프로모터이다. 일 실시형태에서, 면역세포 프로모터는 T 세포 프로모터이다.
- [0162] 일 실시형태에서, 프로모터는 발생적으로-조절된 프로모터이다. 일 실시형태에서, 발생적으로-조절된 프로모터는 발생의 배아기 동안에만 활성이다. 일 실시형태에서, 발생적으로-조절된 프로모터는 성체 세포에서만 활성이다.
- [0163] 구체적 실시형태에서, 프로모터는 세포 유형을 기준으로 선택될 수 있다. 따라서, 다양한 프로모터는 진핵

세포, 포유류 세포, 비인간 포유류 세포, 만능 세포, 비인간 만능 세포, 인간 만능 세포, 인간 ES 세포, 인간 성인 줄기 세포, 발생적으로-제한된 인간 전구세포, 인간 iPS 세포, 인간 세포, 설치류 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 햄스터 세포, 섬유아세포 또는 CHO 세포에서의 용도를 발견한다.

[0164] 일부 실시형태에서, 삽입 핵산은 부위-특이적 재조합 표적 서열에 측접하는 핵산을 포함한다. 전체 삽입 핵산은 이러한 부위-특이적 재조합 표적 서열에 의해 측접될 수 있지만, 삽입 핵산 내의 임의의 영역 또는 개개 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 또한 이러한 부위에 의해 측접될 수 있다는 것이 인식된다. 부위-특이적 재조합 부위는 재조합 부위 폴리펩타이드를 세포 내로 도입하는 것 또는 부위-특이적 재조합 부위를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포 내로 도입하는 것을 포함하는 임의의 수단에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 부위-특이적 재조합 부위를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 삽입 핵산 내에 또는 별개의 폴리뉴클레오타이드 내에 위치될 수 있다. 부위-특이적 재조합 부위는, 예를 들어, 유도성 프로모터, 세포에 대해 내인성인 프로모터, 세포에 이종성인 프로모터, 세포-특이적 프로모터, 조직 특이적 프로모터, 또는 발생 단계-특이적 프로모터를 포함하는 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 삽입 핵산 또는 삽입 핵산 내의 임의의 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드에 측접할 수 있는 부위-특이적 재조합 표적 서열은 loxP, lox511, lox2272, lox66, lox71, loxM2, lox5171, FRT, FRT11, FRT71, attP, att, FRT, rox 또는 이들의 조합을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0165] 일부 실시형태에서, 부위-특이적 재조합 부위는 삽입 핵산 내에 포함된 선택 마커 및/또는 리포터 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 측접한다. 이러한 예에서, 표적화된 좌위에서 삽입 핵산의 통합 후에, 부위-특이적 재조합 부위 사이의 서열이 제거될 수 있다.

[0166] 일 실시형태에서, 삽입 핵산은 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 선택 마커는 선택 카세트 내에 포함될 수 있다. 이러한 선택 마커는 네오마이신 포스포트랜스페라제(neo<sup>r</sup>), 하이그로마이신 B 포스포트랜스페라제(hyg<sup>r</sup>), 퓨로마이신-N-아세틸트랜스페라제(puro<sup>r</sup>), 블라스터시딘 S 탈아미노효소(bsr<sup>r</sup>), 잔틴/구아닌 포스포리보실 트랜스페라제(gpt), 또는 단순포진바이러스 티미딘 키나제(HSV-k) 또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 일 실시형태에서, 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 세포 내에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일 실시형태에서, 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 부위-특이적 재조합 표적 서열에 측접된다.

[0167] 삽입 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결되는 리포터 유전자를 추가로 포함할 수 있되, 리포터 유전자는  $\beta$ -갈락토시다제(1acZ 유전자에 의해 암호화됨), GFP, 엠플럼, 엔체리, 티디토마토, 엠스트로베리, 제이-레드, 디에스레드, 엠오렌지, mKO, 엠시트린, 비너스, YPet, 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 에메랄드, 증강된 녹색 형광 단백질(EGFP), CyPet, 시안 형광 단백질(CFP), 세루리안, 티-사파이어, 루시퍼라제, 알칼린 포스파타제, 및/또는 이들의 조합으로 이루어지거나 또는 포함하는 군으로부터 선택되는 리포터 단백질을 암호화한다. 이러한 리포터 유전자는 세포 내에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 이러한 프로모터는 유도성 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 대해 내인성인 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 대해 이종성인 프로모터, 세포-특이적 프로모터, 조직 특이적 프로모터, 또는 발생 단계-특이적 프로모터일 수 있다.

[0168] 일 실시형태에서, 유전자 변형은 비단백질-암호화 서열의 결실을 포함하지만, 단백질-암호화 서열의 결실을 포함하지 않는다. 일 실시형태에서, 비단백질-암호화 서열의 결실은 lncRNA 좌위 또는 이의 일부의 결실을 포함한다. 일 실시형태에서, 비단백질-암호화 서열의 결실은 조절 구성요소의 결실을 포함한다. 일 실시형태에서, 유전자 변형은 조절 구성요소의 결실을 포함한다. 일 실시형태에서, 유전자 변형은 프로모터 또는 조절 구성요소의 첨가를 포함한다. 일 실시형태에서, 유전자 변형은 프로모터 또는 조절 구성요소의 치환을 포함한다.

### 0169) ii. 발현 카세트

[0170] 본 명세서에서 lncRNA 좌위를 표적화하기 위해 본 명세서에 제공되는 표적화된 계보 통합 시스템에서 사용되는 다양한 구성성분(즉, 뉴클레아제 제제, 인식 부위, 삽입 핵산, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드, 리포터 서열, 표적화 벡터, 선택 마커 및 기타 구성성분 중 임의의 하나 또는 임의의 조합)을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 문자가 제공된다.

[0171] 용어 "폴리뉴클레오타이드", "폴리뉴클레오타이드 서열", "핵산 서열" 및 "핵산 단편"은 본 명세서에서 상호호환적으로 사용된다. 이들 용어는 뉴클레오타이드 서열 등을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드는 합성, 비천연 또는 변용된 뉴클레오타이드 염기를 선택적으로 포함하는 단일- 또는 이중 가닥인 RNA 또는 DNA의 중합체일 수 있다. DNA의 중합체 형태로 폴리뉴클레오타이드는 cDNA, 계보 DNA, 합성 DNA, 또는 이들의 혼합물의 하나 이상의 세그

먼트를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 리보뉴클레오타이드는 천연으로 생기는 분자와 합성 유사체 둘 다, 그리고 이들의 임의의 조합을 포함한다. 본 명세서에 제공되는 폴리뉴클레오타이드는 또한 단일 가닥 형태, 이중 가닥 형태, 헤어핀, 줄기-및-루프 구조 등을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 모든 형태의 서열을 포함한다.

[0172]

추가로 lncRNA 좌위를 표적화하기 위한 표적화된 계놈 통합 시스템의 다양한 구성성분을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드가 제공된다. 용어 "재조합 폴리뉴클레오타이드"와 "재조합 DNA 작제물"은 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용된다. 재조합 작제물은 핵산 서열의 인공 또는 이종성 조합, 예를 들어, 천연에서 함께 발견되지 않는 조절 및 암호화 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 재조합 작제물은 상이한 공급원으로부터 유래된 조절 서열 및 암호화 서열, 또는 동일한 공급원으로부터 유래된 조절 서열 및 암호화 서열을 포함할 수 있지만, 천연에서 발견되는 것과 상이한 방식으로 배열된다. 이러한 작제물은 단독으로 사용될 수 있거나 또는 벡터와 함께 사용될 수 있다. 벡터가 사용된다면, 벡터의 선택은 당업자에게 잘 공지된 바와 같은 숙주 세포를 형질전환시키기 위해 사용되는 방법에 의존한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터가 사용될 수 있다. 본 명세서에 제공된 임의의 단리된 핵산 단편을 포함하는 숙주 세포를 성공적으로 형질전환, 선택 및 증식시키기 위해 필요한 유전자 구성성분이 또한 제공된다. 선별은 특히 DNA의 서던 분석, mRNA 발현의 노던 분석, 단백질 발현의 면역블로트 분석 또는 표현형 분석에 의해 달성될 수 있다.

[0173]

구체적 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 lncRNA 좌위를 표적화하기 위한 표적화된 계놈 통합 시스템의 구성성분 중 하나 이상은 원핵 세포, 진핵 세포, 박테리아, 효모 세포, 또는 포유류 세포 또는 다른 관심 대상의 유기체 또는 세포 유형에서 발현을 위한 발현 카세트에서 제공될 수 있다. 카세트는 본 명세서에 제공된 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 5' 및 3' 조절 서열을 포함할 수 있다. "작동가능하게 연결된"은 작동가능하게 연결된 화합물이 그들의 의도된 방식으로 기능하는 관계를 포함한다. 예를 들어, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드와 조절 서열(즉, 프로모터) 사이의 작동가능한 연결은 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드의 발현을 가능하게 하는 기능적 연결이다. 작동가능하게 연결된 구성요소는 연속적 또는 비연속적일 수 있다. 두 단백질 암호화 영역의 결합을 지칭하기 위해 사용될 때, 작동가능하게 연결된 암호화 영역이 동일한 리딩 프레임 내에 있다는 것을 의미한다. 다른 예에서, 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 적절한 전사 조절을 유지하기 위해 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 사이런서 서열 등)에 작동가능하게 연결될 수 있다. 카세트는 추가적으로 유기체 내로 공동 도입될 적어도 하나의 추가적인 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 대안적으로, 추가적인 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 다중 발현 카세트 상에 제공될 수 있다. 이러한 발현 카세트는 조절 영역의 전사 조절 하에 있을 재조합 폴리뉴클레오타이드의 삽입을 위한 복수의 제한 부위 및/또는 재조합 부위를 구비한다. 발현 카세트는 추가적으로 선택 마커 유전자를 포함할 수 있다.

[0174]

발현 카세트는 관심 대상의 포유류 세포 또는 숙주 세포에서 기능성인 전사의 5'-3' 방향으로, 전사 및 번역 개시 영역(즉, 프로모터), 본 명세서에 제공된 재조합 폴리뉴클레오타이드 및 전사 및 번역 종결 영역(즉, 종결 영역)을 포함할 수 있다. 본 명세서에 제공된 조절 영역(즉, 프로모터, 전사 조절 영역, 코작 서열 및 번역 종결 영역) 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포에 대해 또는 서로에 대해 천연/유사할 수 있다. 대안적으로, 본 명세서에 제공되는 조절 영역 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포 또는 서로에 대해 이종성일 수 있다. 예를 들어, 이종성 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 프로모터는 폴리뉴클레오타이드가 유래된 종파 상이한 종으로부터 유래되거나 또는 동일/유사한 종으로부터 유래된다면, 하나 또는 둘 다는 그들의 본래의 형태 및/또는 계놈 좌위로부터 실질적으로 변형되거나, 또는 프로모터는 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드에 대해 천연 프로모터가 아니다. 대안적으로, 본 명세서에 제공된 조절 영역 및/또는 재조합 폴리뉴클레오타이드는 전체적으로 합성일 수 있다.

[0175]

종결 영역은 전사 개시 영역에 의해 천연일 수 있거나, 작동가능하게 연결된 재조합 폴리뉴클레오타이드에 의해 천연일 수 있거나, 숙주 세포에 의해 천연일 수 있거나, 또는 프로모터, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 숙주 세포 또는 이들의 임의의 조합에 대해 다른 공급원(즉, 외래 또는 이종성)으로부터 유래될 수 있다.

[0176]

발현 카세트를 제조함에 있어서, 적절한 배향으로 DNA 서열을 제공하기 위해 다양한 DNA 단편이 조작될 수 있다. 이를 위하여, 연결자 또는 링커는 DNA 단편을 결합하기 위해 사용될 수 있거나, 편리한 제한 부위, 과잉의 DNA의 제거, 제한 부위의 제거 등을 제공하기 위해 다른 조작이 수반될 수 있다. 이 목적을 위해, 시험관내 돌연변이유발, 프라이머 수선, 제한, 어닐링, 재치환, 예를 들어 전이 및 전환이 수반될 수 있다.

[0177]

다수의 프로모터는 본 명세서에 제공된 발현 카세트에서 사용될 수 있다. 프로모터는 목적으로 하는 결과에 기반하여 선택될 수 있다. 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드의 발현 시간, 위치 및/또는 수준을 조절하기 위해 발

현 카세트 내 상이한 프로모터의 사용에 의해 상이한 적용이 향상될 수 있다는 것이 인식된다. 이러한 발현 작제물은 또한, 필요하다면, 프로모터 조절 영역(예를 들어, 유도성, 구성적, 환경적으로- 또는 발생적으로-조절된, 또는 세포- 또는 조직 특이적/선택 발현을 부여하는 것), 전사 개시 시작 부위, 코작 공통서열, 리보솜 결합 부위, RNA 가공 신호, 전사 종결 부위 및/또는 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다.

[0178] 본 명세서에 제공된 폴리뉴클레오타이드를 함유하는 발현 카세트는 또한 형질전환된 세포의 선택을 위한 선택 마커 유전자를 포함할 수 있다. 선택가능한 마커 유전자는 형질전환된 세포 또는 조직의 선택을 위해 이용된다.

[0179] 적절하다면, 상기 방법 및 조성물(즉, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드, 뉴클레아제 제제 등)에서 사용되는 서열은 세포 내에서 증가된 발현을 위해 최적화될 수 있다. 즉, 유전자는 개선된 발현을 위해, 예를 들어, 포유류-선호 코돈, 인간-선호 코돈, 설치류-선호 코돈, 마우스-선호 코돈, 래트-선호 코돈, 햄스터-선호 코돈 등을 포함하는, 관심 대상의 주어진 세포에서 바람직한 코돈을 이용하여 합성될 수 있다.

[0180] 본 명세서에 제공된 다양한 방법 및 조성물은 선택 마커를 사용할 수 있다. 다양한 선택 마커는 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다. 이러한 선택 마커는, 예를 들어, G418, 하이그로마이신, 블라스토시딘, 네오마이신 또는 퓨로마이신과 같은 항생제에 대해 내성을 부여할 수 있다. 이러한 선택 마커는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제(neo<sup>r</sup>), 하이그로마이신 B 포스포트랜스퍼라제(hyg<sup>r</sup>), 퓨로마이신-N-아세틸트랜스퍼라제(puro<sup>r</sup>) 및 블라스토시딘 S 탈아미노효소(bsr<sup>r</sup>)를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 선택 마커는 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결되고, 선택 마커의 발현은 세포에 대해 독성이다. 이러한 선택 마커의 비제한적 예는 잔틴/구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제(gpt), 하하이포잔틴-구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(HGPRT) 또는 단순 포진바이러스 티미딘 키나제(HSV-TK)를 포함한다. 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

### iii. 표적화 벡터

[0182] 표적화 벡터는 진핵, 비인간, 포유류, 비인간 포유류, 인간, 설치류, 마우스, 래트 또는 햄스터 핵산의 관심 대상의 lncRNA 좌위 내로 삽입 핵산을 도입하기 위해 사용된다. 표적화 벡터는 삽입 핵산을 포함하고, 삽입 핵산에 측접하는 5' 및 3' 상동성 암을 추가로 포함한다. 삽입 핵산에 측접하는 상동성 암은 진핵, 비인간, 포유류, 비인간 포유류, 인간, 설치류, 마우스, 래트 또는 햄스터 핵산의 표적 lncRNA 좌위 내 영역에 대응한다. 참조의 용이함을 위해, 표적화된 게놈 좌위 내 대응하는 동족 게놈 영역은 "표적 부위"로서 지칭된다. 예를 들어, 표적화 벡터는 제1 및 제2 표적 부위에 상보적인 제1 및 제2 상동성 암에 측접하는 제1 삽입 핵산을 포함할 수 있다. 이와 같이, 이에 의한 표적화 벡터는 세포의 게놈 내에서 상동성 암과 상보적 표적 부위 사이에 생기는 상동성 재조합 사건을 통해 표적 좌위 핵산 내로 삽입 핵산의 통합에 도움을 준다.

[0183] 일 실시형태에서, 진핵, 포유류, 비인간 포유류, 인간, 설치류, 마우스 또는 햄스터 핵산의 표적 좌위는 5' 상동성 암에 상보적인 제1 핵산 서열 및 3' 상동성 암에 대해 상보적인 제2 핵산 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, 제1 핵산 서열과 제2 핵산 서열은 적어도 5kb만큼 분리된다. 다른 실시형태에서, 제1 핵산 서열과 제2 핵산 서열은 적어도 1kb만큼이지만 50kb 미만으로 분리된다. 일 실시형태에서, 제1 핵산 서열과 제2 핵산 서열은 적어도 2kb만큼 분리된다. 일 실시형태에서, 제1 핵산 서열과 제2 핵산 서열은 적어도 3kb, 적어도 4kb, 적어도 5kb, 적어도 6kb, 적어도 7kb, 적어도 8kb, 적어도 9kb, 적어도 10kb, 적어도 15kb, 적어도 20kb, 적어도 30kb, 적어도 40kb 또는 적어도 50kb만큼 분리된다. 또한 추가 실시형태에서, 제1 핵산 서열과 제2 핵산 서열은 적어도 1kb만큼이지만 2kb 미만으로, 적어도 2kb만큼이지만 3kb 미만으로, 적어도 4kb만큼이지만 5kb 미만으로, 적어도 5kb만큼이지만 6kb 미만으로, 적어도 6kb만큼이지만 7kb 미만으로, 적어도 7kb만큼이지만 8kb 미만으로, 적어도 약 8kb만큼이지만 9kb 미만으로, 적어도 9kb만큼이지만 10kb 미만으로, 또는 적어도 10kb만큼이지만 15kb 미만으로, 적어도 약 15kb만큼이지만 약 20kb, 적어도 약 20kb만큼이지만 약 30kb 미만으로, 또는 적어도 약 40kb 만큼이지만 약 50kb 미만으로 분리된다.

[0184] 표적화 벡터의 상동성 암은 길이로, 예를 들어, 적어도 5 내지 10kb, 5 내지 15kb, 10 내지 20kb, 20 내지 30kb, 30 내지 40kb, 40 내지 50kb, 50 내지 60kb, 60 내지 70kb, 70 내지 80kb, 80 내지 90kb, 90 내지 100kb, 100 내지 110kb, 110 내지 120kb, 120 내지 130kb, 130 내지 140kb, 140 내지 150kb, 150 내지 160kb, 160 내지 170kb, 170 내지 180kb, 180 내지 190kb, 190 내지 200kb 이상을 포함하는 대응하는 표적 부위를 지니는 상동성 재조합 사건을 촉진시키기에 충분한 임의의 길이를 가질 수 있다. 이하에 추가로 상세하게 약술하는 바와 같이, 거대 표적화 벡터는 더 긴 길이의 표적화 암을 사용할 수 있다. 구체적 실시형태에서, 5' 상동성 암과 3' 상동성 암의 총 합은 적어도 10kb이거나 또는 5' 상동성 암과 3' 상동성 암의 총 합은 적어도 약 16kb

내지 약 100kb 또는 약 30kb 내지 약 100kb이다. 다른 실시형태에서, LTVEC의 5'과 3' 상동성 암의 총 합의 크기는 약 10kb 내지 약 150kb, 약 10kb 내지 약 100kb, 약 10kb 내지 약 75kb, 약 20kb 내지 약 150kb, 약 20kb 내지 약 100kb, 약 20kb 내지 약 75kb, 약 30kb 내지 약 150kb, 약 30kb 내지 약 100kb, 약 30kb 내지 약 75kb, 약 40kb 내지 약 150kb, 약 40kb 내지 약 100kb, 약 40kb 내지 약 75kb, 약 50kb 내지 약 150kb, 약 50kb 내지 약 100kb, 또는 약 50kb 내지 약 75kb, 약 10kb 내지 약 30kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 120kb, 또는 약 120kb 내지 약 150kb이다. 일 실시형태에서, 결실의 크기는 LTVEC의 5'과 3' 상동성 암의 총 합의 크기와 동일 또는 유사하다.

[0185]

상동성 암 및 표적 크기(즉, 동족 계놈 영역) "상보체"는 두 영역이 상동성 재조합 반응을 위한 기질로서 작용하기 위해 서로 충분한 수준의 서열 동일성을 공유할 때 서로 "상보적"이다. "상동성"은 대응하는 또는 "상보적" 서열에 대해 동일하거나 또는 서열 동일성을 공유하는 DNA 서열을 의미한다. 주어진 표적 부위와 표적화 백터 상에서 발견되는 상동성 암 사이의 서열 동일성은 상동성 재조합이 일어나게 하는 임의의 정도의 서열 동일성일 수 있다. 예를 들어, 서열이 상동성 재조합을 겪도록 하는 표적화 백터(또는 이의 단편) 및 표적 부위(또는 이의 단편)의 상동성 암에 의해 공유되는 서열 동일성의 양은 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% or 100% 서열 동일성일 수 있다. 게다가, 상동성 암과 상보적 표적 부위 사이의 상동성의 상보적 영역은 절단된 인식 부위에서 상동성 재조합을 촉진시키기에 충분한 임의의 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 상동성 암이 세포의 계놈 내에서 대응하는 표적 부위와 상동성 재조합을 겪기 위해 충분한 상동성을 갖도록 주어진 상동성 암 및/또는 상보적 표적 부위는 길이로 적어도 5 내지 10kb, 5 내지 15kb, 10 내지 20kb, 20 내지 30kb, 30 내지 40kb, 40 내지 50kb, 50 내지 60kb, 60 내지 70kb, 70 내지 80kb, 80 내지 90kb, 90 내지 100kb, 100 내지 110kb, 110 내지 120kb, 120 내지 130kb, 130 내지 140kb, 140 내지 150kb, 150 내지 160kb, 160 내지 170kb, 170 내지 180kb, 180 내지 190kb, 190 내지 200kb, 200kb 내지 300kb 이상(예컨대 본 명세서의 다른 곳에 기재된 LTVEC 백터에서 기재된 바와 같음)인 상보적 상동성 영역을 포함할 수 있다. 언급의 용이함을 위해, 상동성 암은 본 명세서에서 5' 및 3' 상동성 암으로서 지칭된다. 이 용어는 표적화 백터 내의 삽입 핵산에 대한 상동성 암의 상대적 위치에 관한 것이다.

[0186]

따라서 표적화 백터의 상동성 암은 표적화된 좌위 내에서 표적 부위에 대해 상보적이되도록 설계된다. 따라서, 상동성 암은 세포에 대해 천연인 좌위에 대해 상보적일 수 있고, 또는 대안적으로 그들은 계놈 DNA의 이식유전자, 발현 카세트 또는 이종성 또는 외인성 영역을 포함하지만, 이들로 제한되지 않은 세포의 계놈 내로 통합되는 DNA의 이종성 또는 외인성 세그먼트 영역에 대해 상보적일 수 있다. 대안적으로, 표적화 백터의 상동성 암은 인간 인공 염색체의 영역 또는 적절한 숙주 세포에 포함된 임의의 다른 공학적으로 조작된 계놈 영역에 대해 상보적일 수 있다. 또한 추가로, 표적화 백터의 상동성 암은 BAC 라이브러리, 코스미드 라이브러리, 또는 P1 과지 라이브러리의 영역으로부터 유래되거나 또는 이들에 대해 상보적일 수 있다. 따라서, 구체적 실시형태에서, 표적화 백터의 상동성 암은 주어진 세포에 대해 천연, 이종성 또는 외인성인 진핵, 비인간, 포유류, 비인간 포유류, 인간, 설치류, 마우스 또는 래트 계놈 좌위에 대해 상보적이다. 일 실시형태에서, 상동성 암은 합성 DNA로부터 유래된다.

[0187]

표적화 백터(예컨대 거대 표적화 백터)는 또한 본 명세서의 다른 곳에서 논의한 바와 같은 선택 카세트 또는 리포터 유전자를 포함할 수 있다. 선택 카세트는 선택 마커를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있되, 본 명세서의 다른 곳에 논의된 바와 같은 핵산 서열 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 표적화 백터의 선택 마커 및/또는 리포터 유전자는 5' 및 3' 상동성 암에 의해 측정될 수 있거나 또는 상동성 암에 대해 5' 또는 3'인 것으로 발견되었다.

[0188]

일 실시형태에서, 표적화 백터는 리포터를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 삽입 핵산을 포함한다. 일부 경우에, 관심 대상의 lncRNA 좌위에 의한 상동성 재조합 후에, 리포터를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열은 lncRNA 좌위에서 lncRNA의 발현을 유발시키는 내인성 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 추가 실시형태에서, 표적화 백터의 삽입 핵산 서열은 코작 공통서열을 포함한다. 이러한 경우에, 삽입 핵산이 리포터를 포함하는 경우, 코작 공통서열은 리포터를 암호화하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0189]

다른 실시형태에서, 표적화 백터의 삽입 핵산은 선택가능한 마커를 암호화하는 제2 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 경우에, 제2 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0190]

일 실시형태에서, 삽입 핵산의 제1 및/또는 제2 뉴클레오타이드 서열은 코작 공통서열을 포함한다.

[0191]

일 실시형태에서, 표적화 백터(예컨대 거대 표적화 백터)는 본 명세서의 다른 곳에 기재된 바와 같은 프로모터

에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자 및/또는 선택가능한 마커 유전자를 포함한다. 이러한 리포터 유전자 및/또는 선택가능한 마커 유전자는 본 명세서의 다른 곳에 기재된 바와 같은 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0192] 일 실시형태에서, 표적화 벡터는 부위-특이적 재조합 부위 유전자를 포함한다. 일 실시형태에서, 부위-특이적 재조합 부위 유전자는 Cre 재조합 부위를 암호화한다. 일 실시형태에서, Cre 재조합 부위 유전자는 Crei이되, Cre 재조합 부위를 암호화하는 두 엑손은 원핵 세포 내에서 그의 발현을 방지하기 위해 인트론에 의해 분리된다. 일 실시형태에서, 부위-특이적 재조합 부위 유전자는 Dre 재조합 부위를 암호화한다.

[0193] 일 실시형태에서, Cre 재조합 부위 유전자는 추가로 핵에 대해 Cre(또는 임의의 재조합 부위 또는 뉴클레아제 제제)의 국소화를 용이하게 하는 핵 국소화 신호를 포함한다(예를 들어, 유전자는 NL-Cre 유전자이다). 구체적 실시형태에서, Cre 재조합 부위 유전자는 추가로 핵 국소화 신호 및 인트론(예를 들어, NL-Crei)을 포함한다.

[0194] 다양한 실시형태에서, 상기 논의한 Cre 또는 Crei 재조합 부위의 발현을 위한 적합한 프로모터는 Prm1, Blimp1, Gata6, Gata4, Igf2, Lhx2, Lhx5 및/또는 Pax3으로부터 선택되거나 이들을 포함한다. 구체적 실시형태에서, 프로모터는 Gata6 또는 Gata4 프로모터이다. 다양한 프로모터는, 예를 들어, 설치류, 예컨대 마우스 또는 래트, 진핵생물, 비인간 포유류, 포유류, 인간 또는 햄스터를 포함하는 임의의 유기체로부터 유래될 수 있다. 다른 구체적 실시형태에서, 프로모터는 Prm1 프로모터이다. 다른 구체적 실시형태에서, 프로모터는 마우스 Prm1 프로모터이다. 다른 구체적 실시형태에서, 프로모터는 Blimp1 프로모터 또는 이의 단편, 예를 들어, Blimp1 프로모터의 1kb 또는 2kb 단편이다. 예를 들어, 미국 특허 제8,697,851호 및 미국 특허 출원 공개 제2013-0312129호를 참고하며, 이를 둘 다 본 명세서에 그들의 전문이 참고로 포함된다.

[0195] 일 실시형태에서, 삽입 핵산은 2개의 부위-특이적 재조합 부위에 측접되는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 부위-특이적 재조합 부위의 예는 loxP, lox511, lox2272, lox66, lox71, loxM2, lox5171, FRT, FRT11, FRT71, attp, att, FRT, rox 및 이들의 조합물을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

#### iv. 거대 표적화 벡터

[0197] 용어 "거대 표적화 벡터" 또는 "LTVEC"는 세포 내에서 상동성 표적화를 수행하도록 의도된 다른 접근에 의해 전형적으로 사용되는 것보다 더 큰 핵산 서열로부터 유래된 것에 대응하는 상동성 암을 포함하고/하거나 세포 내에서 상동성 재조합 표적화를 수행하도록 의도된 다른 접근에 의해 전형적으로 사용되는 것보다 더 큰 핵산 서열을 포함하는 삽입 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 거대 표적화 벡터를 포함한다. 구체적 실시형태에서, LTVEC의 상동성 암 및/또는 삽입 폴리뉴클레오타이드는 진핵 세포의 게놈 서열을 포함한다. LTVEC의 크기는 전통적인 분석, 예를 들어, 서던 블로팅 및 긴 범위(예를 들어, 1kb 내지 5kb) PCR에 의한 표적화 사건의 선별을 가능하게 할 만큼 크다. LTVEC의 예는 박테리아 인공 염색체(BAC), 인간 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체(YAC)로부터 유래된 벡터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. LTVEC의 비제한적 예 및 이의 제조방법은, 예를 들어, 미국 특허 제6,586,251호, 제6,596,541호, 제7,105,348호 및 WO 2002/036789호(PCT/US01/45375)에 기재되어 있으며, 이를 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0198] LTVEC는 적어도 약 10kb, 약 15kb, 약 20kb, 약 30kb, 약 40kb, 약 50kb, 약 60kb, 약 70kb, 약 80kb, 약 90kb, 약 100kb, 약 150kb, 약 200kb, 약 10kb 내지 약 15kb, 약 15kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 30kb, 약 30kb 내지 약 50kb, 약 50kb 내지 약 300kb, 약 50kb 내지 약 75kb, 약 75kb 내지 약 100kb, 약 100kb to 125kb, 약 125kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 175kb, 약 175kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 225kb, 약 225kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 275kb 또는 약 275kb 내지 약 300kb을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 임의의 길이를 가질 수 있다.

[0199] 일 실시형태에서, LTVEC의 상동성 암은 BAC 라이브러리, 코스미드 라이브러리, 또는 P1 파지 라이브러리로부터 유래된다. 다른 실시형태에서, 상동성 암은 세포의 표적화된 lncRNA 게놈 좌위로부터 유래되며, 일부 예에서 LTVEC가 표적화하도록 설계된 표적 게놈 좌위는 전통적인 방법을 이용하여 표적화가능하지 않다. 또 다른 실시형태에서, 상동성 암은 합성 DNA로부터 유래된다.

[0200] 일 실시형태에서, LTVEC 내 상류의 상동성 암과 하류의 상동성 암의 총 합은 적어도 10kb이다. 다른 실시형태에서, 상류의 상동성 암은 약 5kb 내지 약 100kb의 범위에 있다. 일 실시형태에서, 하류의 상동성 암은 약 5kb 내지 약 100kb의 범위에 있다. 다른 실시형태에서, 상류와 하류의 상동성 암의 총 합은 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 30kb, 약 30kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 50kb, 약 50kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 70kb, 약 70kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 90kb, 약 90kb 내지 약 100kb, 약 100kb

내지 약 110kb, 약 110kb 내지 약 120kb, 약 120kb 내지 약 130kb, 약 130kb 내지 약 140kb, 약 140kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 160kb, 약 160kb 내지 약 170kb, 약 170kb 내지 약 180kb, 약 180kb 내지 약 190kb, 또는 약 190kb 내지 약 200kb이다. 일 실시형태에서, 결실의 크기는 LTVEC의 5'과 3' 상동성 암의 총 합의 크기와 동일 또는 유사하다.

[0201] 일 실시형태에서, LTVEC는 본 명세서의 다른 곳에 논의된 바와 같이 선택 카세트 또는 리포터 유전자를 포함한다.

### III. 서열의 도입 방법 및 유전자이식 동물의 생성

[0203] 상기 약술한 바와 같이, 하나 이상의 lncRNA 좌위의 표적화된 유전자 변형을 가능하게 하는 방법 및 조성물이 본 명세서에서 제공된다. 추가로 추가적인 표적화된 유전자 변형이 만들어질 수 있다는 것이 인식된다. 이들 표적화된 유전자 변형을 가능하게 하는 이러한 시스템은 다양한 구성성분을 사용할 수 있으며, 언급의 용이함을 위해, 본 명세서에서 용어 "표적화된 게놈 통합 시스템"은 일반적으로 통합 사건(즉, 다양한 뉴클레아제 제제, 인식 부위, 삽입 DNA 폴리뉴클레오타이드, 표적화 벡터, 표적 게놈 좌위 및 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드)에 필요한 모든 구성성분을 포함한다.

[0204] 본 명세서에 제공된 방법은 표적화된 게놈 통합 시스템의 다양한 구성성분을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 작제물을 세포 내로 도입하는 단계를 포함한다. "도입하는"은 세포 내부에 대한 접근은 서열이 세포 내우에 대한 접근을 얻는 방법으로 세포에 서열(폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드)을 제시하는 것을 의미한다. 본 명세서에 제공된 방법은 폴리뉴클레오타이드가 적어도 하나의 세포의 내부에 대한 접근을 얻는 것을 제외하고 표적화된 게놈 통합 시스템의 임의의 구성성분을 세포 내로 도입하는 특정 방법에 의존하지 않는다. 폴리뉴클레오타이드를 다양한 세포 유형에 도입하는 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 안정한 형질감염 방법, 일시적 형질감염 방법 및 바이러스 매개 방법을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0205] 일부 실시형태에서, 상기 방법 및 조성물에서 사용되는 세포는 게놈 내로 안정하게 혼입된 DNA 작제물을 가진다. "안정하게 혼입된" 또는 "안정하게 도입된"은 뉴클레오타이드 서열이 세포의 게놈 내로 통합되고 이의 자손에 의해 유전될 수 있도록 세포 내로 폴리뉴클레오타이드의 도입을 의미한다. 임의의 프로토콜은 DNA 작제물 또는 표적화된 게놈 통합 시스템의 다양한 구성성분의 안정한 혼입을 위해 사용될 수 있다.

[0206] 형질감염 프로토콜뿐만 아니라 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열을 세포 내로 도입하기 위한 프로토콜은 다를 수 있다. 비제한적 형질감염 방법은 화학물질 기반 형질감염을 포함하고, 상기 방법은 리포좀; 나노입자; 인산칼슘(Graham *et al.* (1973). *Virology* 52 (2): 456-67, Bacchetti *et al.* (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (4): 1590-4 및, Kriegler, M (1991). *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman and Company. pp. 96-97); 덴드리머; 또는 양이온성 중합체, 예컨대 DEAE-덱스트란 또는 폴리에틸렌이민의 사용을 포함한다. 비화학적 방법은 전기천공법; 초음파천공법; 및 광학적 형질감염을 포함한다. 입자 기반 형질감염은 유전자총, 자기 보고 형질감염의 사용을 포함한다(Bertram, J. (2006) *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7, 277-28). 바이러스 방법이 또한 형질감염을 위해 사용될 수 있다.

[0207] 비인간 동물은 본 명세서에 개시된 다양한 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 이러한 방법은 (1) 본 명세서에 개시된 방법을 사용하는 표적화된 lncRNA 게놈 좌위에서 삽입 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전자 변형된 만능 세포를 생성하기 위해 비인간 동물의 만능 세포의 관심 대상의 표적 lncRNA 게놈 좌위에서 하나 이상의 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드를 통합하는 단계; (2) 표적 lncRNA 게놈 좌위에서 관심 대상의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 갖는 유전자 변형된 만능 세포를 선택하는 단계; (3) 유전자 변형된 만능 세포를, 예를 들어 상실 배 단계 전에 비인간 동물의 숙주 배아 내로 도입하는 단계; 및 (4) 유전자 변형된 만능 세포를 포함하는 숙주 배아를 대리모에 이식하여 유전자 변형된 만능 세포로부터 유래된 F0 세대를 생성하는 단계를 포함한다. 유사한 방법은 시험감염 표적 염색체 좌위를 표적화하기 위해 사용될 수 있다. 비인간 동물은 비인간 포유류, 설치류, 마우스, 래트, 햄스터, 원숭이, 농업 포유류 또는 애완 포유류, 또는 어류 또는 조류일 수 있다.

[0208] 만능 세포는 인간 ES 세포, 비인간 ES 세포, 설치류 ES 세포, 마우스 ES 세포, 래트 ES 세포, 햄스터 ES 세포, 원숭이 ES 세포, 농업 포유류 ES 세포 또는 애완동물 포유류 ES 세포일 수 있다. 다른 실시형태에서, 만능 세포는 비인간 세포, 포유류 세포, 인간 세포, 비인간 포유류 세포, 인간 만능 세포, 인간 ES 세포, 인간 성체 줄기 세포, 발생적으로-제한된 인간 전구 세포, 인간 iPS 세포, 설치류 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 햄스터 세포이다. 일 실시형태에서, 표적화된 유전자 변형은 lncRNA의 기능상실을 초래한다.

[0209] 비인간 동물을 생성하기 위해 핵 전달 기법이 또한 사용될 수 있다. 간략하게, 핵 전달을 위한 방법은: (1) 난

모세포를 적출하는 단계; (2) 제핵 난모세포와 조합될 공여세포 또는 핵을 단리시키는 단계; (3) 세포 또는 핵을 제핵 난모세포 내로 삽입하여 재구성된 세포를 형성하는 단계; (4) 재구성된 세포를 동물의 자궁 내로 이식하여 배아를 형성하는 단계; 및 (5) 난모세포 배아를 발생시키는 단계를 포함한다. 이러한 방법에서 난모세포는 그들이 살아있는 동물의 수란관 및/또는 난소로부터 또한 단리될 수 있음에도 불구하고 일반적으로 감소된 동물로부터 검색된다. 난모세포는 제핵 전에 당업자에게 공지된 다양한 배지에서 성숙될 수 있다. 난모세포의 제핵은 당업자에게 잘 공지된 다수의 방식으로 수행될 수 있다. 재구성된 세포를 형성하기 위한 공여세포 또는 핵의 제핵 난모세포 내로의 삽입은 융합 전 투명대 하에 공여세포의 미세주입법에 의한다. 융합은 접촉/융합면을 가로지르는 DC 전기 펄스의 적용(전기융합)에 의해, 폴리에틸렌 글라이콜과 같은 융합-촉진 화학물질에 대한 세포의 노출에 의해, 또는 센다이(Sendai) 바이러스와 같은 불활성화된 바이러스의 방법에 의해 유도될 수 있다. 재구성된 세포는 핵 공여체 및 수용체 난모세포의 융합 전에, 융합 동안 및/또는 융합 후에 전기적 및/또는 비전기적 수단에 의해 전형적으로 활성화된다. 활성화 방법은 전기적 펄스, 화학적으로 유도된 충격, 정자에 의한 침투, 난모세포 내 2가 양이온의 증가된 수준 및 난모세포 내 (기나제 저해제를 거쳐서) 세포 단백질의 인산화를 감소시키는 것을 포함한다. 활성화된 재구성된 세포 또는 배아는 전형적으로 당업자에게 잘 공지된 배지에서 배양되고, 이어서, 동물의 자궁에 전달된다. 예를 들어, 미국 특허 제20080092249호, WO/1999/005266A2호, 미국 특허 제20040177390호, WO/2008/017234A1호, 및 미국 특허 제7,612,250호를 참조하며, 이들 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0210]

하기 단계를 포함하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 생식계열 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 비인간 동물의 제조를 위한 다른 방법이 제공된다: (a) 본 명세서에 기재된 다양한 방법을 사용하는 원핵 세포에서 비인간 동물의 표적화된 게놈 lncRNA 좌위를 변형시키는 단계; (b) 표적화된 게놈 좌위에서 유전자 변형을 포함하는 변형된 원핵 세포를 선택하는 단계; (c) 변형된 원핵 세포의 게놈으로부터 유전자 변형된 표적화 벡터를 단리시키는 단계; (d) 유전자 변형된 표적화 벡터를 비인간 동물의 만능 세포 내로 도입하여 표적화된 lncRNA 게놈 좌위에서 삽입 핵산을 포함하는 유전자 변형된 만능 세포를 생성하는 단계; (e) 유전자 변형된 만능 세포를 선택하는 단계; (f) 상실배 단계 전에 유전자 변형된 만능 세포를 비인간 동물의 숙주 배아 내로 도입하는 단계; 및 (g) 유전자 변형된 만능 세포를 포함하는 숙주 배아를 대리모에 이식하여 유전자 변형된 만능 세포로부터 유래된 F0 세대를 생성하는 단계. 이러한 방법에서 표적화 벡터는 거대 표적화 벡터를 포함할 수 있다. 비인간 동물은 비인간 포유류, 설치류, 마우스, 래트, 햄스터, 원숭이, 농업 포유류 또는 애완 포유류일 수 있다. 만능 세포는 인간 ES 세포, 비인간 ES 세포, 설치류 ES 세포, 마우스 ES 세포, 래트 ES 세포, 햄스터 ES 세포, 원숭이 ES 세포, 농업 포유류 ES 세포 또는 애완 포유류 ES 세포일 수 있다. 다른 실시형태에서, 만능 세포는 비인간 세포, 포유류 세포, 인간 세포, 비인간 포유류 세포, 인간 만능 세포, 인간 ES 세포, 인간 성체 줄기 세포, 발생-제한된 인간 전구 세포, 인간 iPS 세포, 인간 세포, 설치류 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 햄스터 세포이다. 일 실시형태에서, 표적화된 유전자 변형은 lncRNA의 기능상실을 초래한다.

[0211]

추가 방법에서, 단리시키는 단계 (c)는 추가로 (c1) 유전자 변형된 표적화 벡터(즉, 유전자 변형된 LTVEC)를 선형화시키는 단계를 포함한다. 또한 추가 실시형태에서, 도입하는 단계 (d)는 추가로 (d1) 뉴클레아제 제제를 만능 세포 내로 도입하여 상동성 재조합을 용이하게 하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 선택하는 단계(b) 및/또는 (e)는 원핵 세포 또는 만능 세포에 선택가능한 제제를 적용함으로써 수행된다. 일 실시형태에서, 선택하는 단계 (b) 및/또는 (e)는 본 명세서에 기재된 바와 같은 대립유전자(MOA) 분석의 변형을 통해 수행된다.

[0212]

일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 표적 게놈 좌위의 다양한 유전자 변형은 벨로시젠(VELOCIGENE)(등록상표) 유전자 공학 기법을 이용하여 박테리아 인공 염색체(BAC) DNA로부터 유래된 LTVEC를 이용하여 박테리아 세포에서 일련의 상동성 재조합 반응(BHR)에 의해 수행될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,586,251호 및 문헌 [Valenzuela, D. M. et al. (2003), *Nature Biotechnology* 21(6): 652-659] 참조, 본 명세서에 그들의 전문이 참고로 포함됨).

[0213]

일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 다양한 유전자 변형을 포함하는 lncRNA 표적화된 만능 및/또는 전능 세포는 삽입 공여세포로서 사용되고, 벨로시마우스(VELOCIMOUSE)(등록상표) 방법을 통해 대응하는 유기체, 예를 들어, 8-세포 단계 마우스 배아로부터의 상실배 단계 전에 도입된다(예를 들어, 미국 특허 제7,576,259호, 미국 특허 제7,659,442호, 미국 특허 제7,294,754호 및 미국 특허 제2008-0078000 A1호, 이들 모두 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 포함됨). 유전자 변형된 만능 및/또는 전능 세포를 포함하는 비인간 동물 배아는 배반포 단계까지 인큐베이션되고, 이어서, 대리모에 이식되어 F0 세대를 생성한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 다양한 유전자 변형을 포함하는 표적화된 포유류 ES 세포는 포배낭 단계 배아 내로 도입된다. 유전자 변형된 게놈 좌위(즉, lncRNA 좌위)를 보유하는 비인간 동물은 본 명세서에 기재된 바와

같은 대립유전자(MOA)의 변형을 통해 동정될 수 있다. 유전자 변형된 만능 및/또는 전능 세포로부터 유래된 얻어진 F0 세대 비인간 동물은 야생형 비인간 동물에 대해 교배되어 F1 세대 새끼를 얻는다. 특이적 프라이머 및/또는 프로브에 의한 유전형질분석(유전형질분석) 후에, 유전자 변형된 게놈 좌위에 대해 이형 접합적인 F1 비인간 동물은 서로 교배되어 유전자 변형된 게놈 좌위에 대해 동형 접합성인 F2 세대 비인간 동물 새끼를 생산한다.

[0214] 일 실시형태에서, 적어도 하나의 lncRNA 좌위에서 유전자 변형을 포함하는 비인간 동물의 제조방법이 제공된다. 이러한 방법은: (a) 만능 세포를 5' 및 3' 상동성 암에 측접되는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 작제물과 접촉시키는 단계; (b) 변형된 만능 세포를 숙주 배아 내로 도입하는 단계; 및 (c) 대리모에서 숙주 배아를 임신시키는 단계를 포함하되, 상기 표적화 작제물은 세포의 게놈 내 lncRNA 좌위에 의한 상동성 재조합을 겪어서 변형된 만능 세포를 형성하고, 상기 대리모는 변형된 lncRNA 좌위를 포함하는 자손을 생산하며, 상기 유전자 변형은 적어도 하나의 lncRNA의 기능상실을 초래한다.

#### IV. 세포

[0215] 본 명세서에 기재된 다양한 방법은 세포 내에서 lncRNA 좌위를 변형시키기 위한 게놈 좌위 표적화 시스템을 사용한다. 이러한 세포는 이콜라이, 또는 진핵 세포, 예컨대 효모, 곤충, 양서류, 식물 또는 포유류 세포(마우스 세포, 래트 세포, 햄스터 세포, 토끼 세포, 돼지 세포, 소 세포, 사슴 세포, 양 세포, 염소 세포, 닭 세포, 고양이 세포, 개 세포, 페럿 세포, 영장류(예를 들어, 마모셋, 레서스 원숭이) 세포 등 및 애완 포유류로부터의 세포 또는 농업 포유류로부터의 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않음)를 포함하는 박테리아 세포와 같은 원핵 세포를 포함한다. 일부 세포는 비인간, 특히 비인간 포유류 세포이다. 일부 실시형태에서, 적합한 유전자 변형가능한 만능 세포를 용이하게 이용가능하지 않은 해당 포유류에 대해, 예를 들어, Oct3/4, Sox2, KLF4, Myc, Nanog, LIN28, 및 Gli1을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 전능 유도 인자의 조합의 체세포 내로 도입을 통해 만능 세포 내로 체세포를 재프로그래밍하기 위한 다른 방법이 사용된다. 이러한 방법에서, 세포는 또한 포유류 세포, 인간 세포, 비인간 포유류 세포, 비인간 세포, 설치류, 래트, 마우스, 햄스터로부터의 세포, 섬유아세포 또는 임의의 다른 숙주 세포일 수 있다. 다른 실시형태에서, 세포는 만능 세포, 유도 만능 줄기(iPS) 세포, 비인간 배아 줄기(ES) 세포이다. 이러한 세포는, 예를 들어, 유도 만능 줄기(iPS) 세포, 인간 iPS 세포, 마우스 배아 줄기(ES) 세포, 래트 배아 줄기(ES) 세포, 인간 배아(ES) 세포, 또는 발생적으로 제한된 인간 전구 세포, 설치류 배아 줄기(ES) 세포, 마우스 배아 줄기(ES) 세포 또는 래트 배아 줄기(ES) 세포를 포함하는, 만능 세포를 포함한다.

[0216] 비제한적 실시형태는 하기를 포함한다:

[0217] 1. 게놈 내에 적어도 하나의 변형된 긴 비암호화 RNA(lncRNA) 좌위를 포함하는 비인간 동물로서, 적어도 하나의 변형된 lncRNA 좌위는 lncRNA를 암호화하는 핵산 서열 내 기능상실 돌연변이를 포함하는, 비인간 동물.

[0218] 2. 실시형태 1에 있어서, lncRNA는 거대 유전자간 비암호화 RNA(lncRNA)인, 비인간 동물.

[0219] 3. 실시형태 1 또는 실시형태 2 중 임의의 하나에 있어서, 상기 기능상실 돌연변이는 적어도 하나의 lncRNA 기능의 파괴 또는 넉아웃을 특징으로 하는, 비인간 동물.

[0220] 4. 실시형태 3에 있어서, 상기 변형된 lncRNA 좌위는 lncRNA 또는 이의 일부를 암호화하는 하나 이상의 엑손의 결실을 포함하는, 비인간 동물.

[0221] 5. 실시형태 4에 있어서, 상기 파괴 또는 넉아웃은 (a) lncRNA 좌위의 제2 엑손에서 시작하는 lncRNA 좌위 내의 하나 이상의 엑손의 결실; (b) lncRNA 좌위의 제1 엑손에서 시작하는 lncRNA 좌위 내의 하나 이상의 엑손의 결실; 또는 (c) lncRNA 좌위의 전체 RNA 암호화 영역의 결실을 포함하는, 비인간 동물.

[0222] 6. 실시형태 3에 있어서, 상기 파괴 또는 넉아웃은 lncRNA 좌위 또는 이의 일부의 삽입 핵산으로의 치환을 포함하는, 비인간 동물.

[0223] 7. 실시형태 6에 있어서, 상기 삽입 핵산은 리포터를 암호화하는 제1 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 유전자 변형된 비인간 동물.

[0224] 8. 실시형태 7에 있어서, 상기 제1 뉴클레오타이드 서열은 상기 리포터의 발현을 유발시키는 프로모터에 조작가능하게 연결된, 유전자 변형된 비인간 동물.

[0225] 9. 실시형태 7에 있어서, 리포터를 암호화하는 상기 제1 뉴클레오타이드 서열은 내인성 lncRNA 프로모터에

작동가능하게 연결된 lncRNA 좌위 내에 위치되되, 상기 내인성 lncRNA 프로모터는 상기 뉴클레오파이드 서열의 발현을 유발시키는, 유전자 변형된 비인간 동물.

[0227] 10. 실시형태 9에 있어서, 상기 핵산 서열의 발현은 상기 lncRNA의 발현 패턴을 따르는, 변형된 비인간 동물.

[0228] 11. 실시형태 7에 있어서, 상기 제1 뉴클레오파이드 서열은 코작 공통서열을 포함하는, 유전자 변형된 비인간 동물.

[0229] 12. 실시형태 6 내지 실시형태 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 치환은 (a) lncRNA 좌위의 제2 엑손에서 시작하는 lncRNA 좌위 내의 하나 이상의 엑손의 삽입 핵산으로의 치환; (b) lncRNA 좌위의 제1 엑손에서 시작하는 lncRNA 좌위 내의 하나 이상의 엑손의 삽입 핵산으로의 치환; 또는 (c) lncRNA 좌위의 전체 RNA 암호화 영역의 삽입 핵산으로의 치환을 포함하는, 비인간 동물.

[0230] 13. 실시형태 6 내지 실시형태 12 중 어느 하나에 있어서, 상기 리포터는  $\beta$ -갈락토시다제, 녹색 형광 단백질(GFP), 증강된 녹색 형광 단백질(eGFP), 앰플럼, 앰체리, 티디토마토, 앰스트로베리, 제이-레드, 디에스레드, 앰오렌지, mKO, 앰시트린, 비너스, YPet, 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 애메랄드, CyPet, 시안 형광 단백질(CFP), 세루리안, 티-사파이어, 루시퍼라제, 알칼린 포스파타제, 또는 이들의 조합 중 어느 것인가인, 비인간 동물.

[0231] 14. 실시형태 6 내지 실시형태 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 삽입 핵산은 선택가능한 마커를 암호화하는 제2 핵산 서열을 추가로 포함하되, 제2 핵산 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 비인간 동물.

[0232] 15. 실시형태 14에 있어서, 상기 삽입 핵산은 리포터를 암호화하는 세그먼트 및/또는 선택가능한 마커를 암호화하는 세그먼트에 측접하는 부위-특이적 재조합 부위를 포함하는, 비인간 동물.

[0233] 16. 실시형태 1 내지 실시형태 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 lncRNA는 *Pint*, *Celrr*, *Crnde*, *Eldr*, *Fendrr*, *Halrl*, *Hotair*, *Hottip*, *Hoxallos*, *Pantr1*, *Pantr2*, *Ptgs2os2*, *lincenc1*, *Trp53cor1*, *lincppara*, *Mannr*, *Haglr*, *Peril*, *Kantr*, *Tug1* 또는 이들의 조합을 포함하는, 비인간 동물.

[0234] 17. 실시형태 1 내지 실시형태 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 비인간 동물은 하나 이상의 다음의 표현형: (a) 조로-관련 표현형; (b) 출산전후 치사; (c) 폐 발달의 결함; (d) 꼬리 및 뒷다리의 형태적 기형; (e) 하나 이상의 조직에서 근육량의 손실; 또는 (f) 상기 (a) 내지 (e)의 임의의 조합을 갖는 것을 특징으로 하는, 비인간 동물.

[0235] 18. 실시형태 1에 있어서, 상기 lncRNA는 *Pint*이고, 상기 비인간 동물은 (a) 야생형 대조군보다 더 느린 성장 속도; (b) 근육 강도의 감소; (c) 섬유증; (d) 야생형 대조군보다 더 낮은 체지방 함량; (e) 야생형 대조군보다 더 낮은 대퇴골 골 무기질 밀도 및 골량; (f) 야생형 대조군에 비해 감소된 근육량; (g) 중앙값 수명의 감소; (h) 척추변형; (i) 장기 위축; 또는 (j) 상기 (a) 내지 (i)의 임의의 조합을 포함하는 조로-관련 표현형을 특징으로 하는, 비인간 동물.

[0236] 19. 실시형태 1 내지 실시형태 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 비인간 동물은 뇌 발생에서 결함을 나타내는, 비인간 동물.

[0237] 20. 실시형태 19에 있어서, 상기 lncRNA는 *Pantr2*, *Kantr*, *Peril*, *Celrr*, *Pantr1*, *Crnde*, *lincenc1*, *Pint*, *lincppara* 또는 *Tug1*인, 비인간 동물.

[0238] 21. 실시형태 1 내지 실시형태 20 중 어느 하나에 있어서, 상기 비인간 동물은 포유류인, 비인간 동물.

[0239] 22. 실시형태 21에 있어서, 상기 포유류는 설치류인, 유전자 변형된 비인간 동물.

[0240] 23. 실시형태 22에 있어서, 상기 포유류는 마우스, 래트 또는 햄스터인, 유전자 변형된 비인간 동물.

[0241] 24. 실시형태 1 내지 실시형태 23 중 어느 하나의 비인간 동물로부터 유래된 세포, 조직, 또는 배아.

[0242] 25. 관심 대상의 lncRNA 좌위에 의한 상동성 재조합을 겪을 수 있는 5' 및 3' 상동성 암에 의해 측접되는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터.

[0243] 26. 실시형태 25에 있어서, 상기 삽입 핵산은 리포터를 암호화하는 제1 핵산 서열을 포함하는, 표적화 벡터.

[0244] 27. 실시형태 26에 있어서, 관심 대상의 lncRNA 좌위에 의한 상동성 재조합 후에, 상기 관심 대상의 lncRNA

좌위, 리포터를 암호화하는 제1 핵산 서열은 lncRNA 좌위에서 lncRNA의 발현을 유발시키는 내인성 프로모터에 작동가능하게 연결된, 표적화 벡터.

[0245] 28. 실시형태 26 또는 실시형태 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 리포터는  $\beta$ -갈락토시다제, 녹색 형광 단백질(GFP), 증강된 녹색 형광 단백질(eGFP), 앰플럼, 엠체리, 티디토마토, 앰스트로베리, 제이-레드, 디에스레드, 앰오렌지, mKO, 앰시트린, 비너스, YPet, 증강된 황색 형광 단백질(EYFP), 에메랄드, CyPet, 시안 형광 단백질(CFP), 세루리안, 티-사파이어, 루시퍼라제, 알칼린 포스파타제, 또는 이들의 조합 중 어느 것인가인, 표적화 벡터.

[0246] 29. 실시형태 25 내지 실시형태 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 삽입 핵산은 선택가능한 마커를 암호화하는 제2 핵산 서열을 더 포함하되, 제2 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결되는, 표적화 벡터 자체물.

[0247] 30. 실시형태 29에 있어서, 리포터를 암호화하는 세그먼트 및/또는 선택가능한 마커를 암호화하는 세그먼트 핵산에 측접하는 부위-특이적 재조합 부위를 더 포함하는, 표적화 벡터.

[0248] 31. 실시형태 26 또는 실시형태 29에 있어서, 상기 제1 핵산 서열 및/또는 제2 핵산 서열은 코작 공통서열을 더 포함하는, 표적화 벡터.

[0249] 32. 실시형태 25 내지 실시형태 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 삽입 핵산은 리포터의 발현을 유발시키는 프로모터를 더 포함하는, 표적화 벡터.

[0250] 33. 적어도 하나의 lncRNA 좌위에서 유전자 변형을 포함하는 비인간 동물의 제조방법으로서, (a) 만능 세포를 5' 및 3' 상동성 암에 측접하는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 자체물과 접촉시키는 단계로서, 상기 표적화 자체물은 상동성 재조합은 세포의 계놈 내 lncRNA 좌위를 겪어서 변형된 만능 세포를 형성하는, 상기 접촉시키는 단계; (b) 변형된 만능 세포를 숙주 배아 내로 도입하는 단계; 및 (c) 상기 숙주 배아를 대리모에 임신시키는 단계로서, 상기 대리모는 변형된 lncRNA 좌위를 포함하는 자손을 생산하며, 상기 유전자 변형은 적어도 하나의 lncRNA의 기능상실을 초래하는, 비인간 동물의 제조방법.

[0251] 34. 실시형태 33에 있어서, 상기 lncRNA은 lincRNA인, 방법.

[0252] 35. 실시형태 33 또는 실시형태 34 중 어느 하나에 있어서, 상기 유전자 변형은 적어도 하나의 lncRNA 기능의 파괴 또는 넉아웃을 포함하는, 방법.

[0253] 36. 실시형태 33 내지 실시형태 35 중 어느 하나에 있어서, 상기 lncRNA는 *Pint*, *Celrr*, *Crnde*, *Eldr*, *Fendrr*, *HaIr1*, *Hotair*, *Hottip*, *Hoxa11os*, *Pantr1*, *Pantr2*, *Ptgs2os2*, *lincenc1*, *Trp53cor1*, *lincppara*, *Mannr*, *Haglr*, *Peril*, *Kantr*, *Tug1* 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

[0254] 37. 만능 세포 내 lncRNA 좌위를 변형시키는 방법으로서, (a) lncRNA 좌위에 의해 상동성 재조합을 겪을 수 있는 5' 및 3' 상동성 암에 측접하는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 자체물을 만능 세포 내로 도입하는 단계; 및 (b) lncRNA 좌위에서 표적화된 유전자 변형을 포함하는 변형된 만능 세포를 동정하는 단계를 포함하되, 상기 유전자 변형은 lncRNA 기능의 기능상실을 초래하는, 방법.

[0255] 38. 실시형태 37에 있어서, 상기 만능 세포는 인간 iPS 세포인, 방법.

[0256] 39. 실시형태 37에 있어서, 상기 만능 세포는 마우스 또는 래트 배아 줄기 (ES) 세포인, 방법.

[0257] 40. 실시형태 37 내지 실시형태 39 중 어느 하나에 있어서, 상기 lncRNA는 *Pint*, *Celrr*, *Crnde*, *Eldr*, *Fendrr*, *HaIr1*, *Hotair*, *Hottip*, *Hoxa11os*, *Pantr1*, *Pantr2*, *Ptgs2os2*, *lincenc1*, *Trp53cor1*, *lincppara*, *Mannr*, *Haglr*, *Peril*, *Kantr*, *Tug1* 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

[0258] 41. 유전자 변형된 비인간 동물로서, 상기 유전자 변형은 *Pint*의 넉아웃을 포함하는, 방법.

[0259] 42. 실시형태 41에 있어서, 설치류인, 유전자 변형된 비인간 동물.

[0260] 43. 실시형태 42에 있어서, 설치류는 마우스 및 래트로부터 선택되는, 유전자 변형된 설치류.

[0261] 44. 조로-관련 표현형을 나타내는 마우스로서, 상기 마우스는 *Pint*의 넉아웃을 포함하는, 마우스.

[0262] 45. 실시형태 44에 있어서, 상기 마우스는 느린 체중증가, 더 조기의 체중 정체기, 조기 성장 정지, 약 12 주령까지의 척추변형, 약 26주령까지의 중증의 척추변형, 약 6개월에 털의 상실, 약 6개월에 뒷다리 근육의 상실 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 표현형을 나타내는, 마우스.

- [0263] 46. *HOTAIR*, *HOTTIP*, *Hoxa11os*, *Pantr1*, *Pantr2*, *Ptgs2os2*, *Eldr*, *Lincenc1*, *Mannr*, *Fendrr*, *Ha1r1*, *Haglr*, *Celrr*, *Crnde*, *Kantr*, *Pint*, *Trp53cor1*, *lincppara*, *Haglr*, *Tug1* 및 이들의 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 lincRNA의 넉아웃을 포함하는, 유전자 변형된 비인간 동물.
- [0264] 47. 실시형태 46에 있어서, 설치류인, 유전자 변형된 마우스.
- [0265] 48. 실시형태 47에 있어서, 마우스 또는 래트인, 유전자 변형된 설치류.
- [0266] **실시예**
- [0267] **실시예 1: 표적화 벡터의 구성**
- [0268] 마우스에서 관습적 유전자 돌연변이의 빠른 그리고 고속대량 생성을 가능하게 하는 앞서 기재한 바와 같은 벨로시젠(VelociGene)(등록상표) 방법을 사용하였다(Valenzuela, D.M., et al. (2003b), *Nat Biotechnol* 21:652-659). 간략하게, 마우스 bMQ(129S7/SvEv Brd-Hprt b-m2) 또는 RP23 BAC 라이브러리로부터의 BAC 클론을 이용하여 BacVec 거대 표적화 벡터(LTVEC)를 생성하였다(Adams, D.J., et al. (2005), *Genomics* 86:753-758). *lacZ* 부분에서  $\beta$ -글락토시다제 암호화 서열의 아미노 말단 단부가 ATG 시작 코돈 및 코작 공통서열을 포함하도록 변형된 것을 제외하고 *lacZ/neo*<sup>r</sup> 리포터/선택 카세트(도 1)는 NIH KOMP([www.velocigene.com/komp/detail/10020](http://www.velocigene.com/komp/detail/10020)에서 입수가능한 서열)에 대해 사용한 ZEN-Ub1과 동일하였다(Kozak, M. (1987) *Nucleic acids research* 15: 8125-8148)).
- [0269] **실시예 2: ES 세포 표적화**
- [0270] LTVEC를 멀티웰 전기천공법 장치(Harvard Apparatus, Boston, MA)를 이용하여 전기천공법 완충제(밀리포어(Millipore))  $3.3 \times 10^6$  개 세포,  $0.67\mu\text{g}$  DNA 중에서  $0.125\text{ml}$  용적으로 VGF1 F1 혼성체(129S6SvEvTac/C57BL6NTac) ES 세포 내에 도입한 후(Poueymirou et al. (2007); Valenzuela et al. (2003a)) 15cm 젤라틴화시킨 플레이트 상에서 배양시켰다. 전기천공법 후 48시간에 G418을 포함하는 선택 배지를 첨가하고 이후에 매일 바꾸었다. 약물 내성 콜로니를 전기천공법 후 10일에 선별하고 나서, 트립신으로 처리하고 DNA 추출 및 정제 전 적어도 3일 동안 젤라틴화된 96웰 플레이트에서 배양시켰다. 정확하게 표적화한 ES 세포 클론을 대립유전자 상실 분석에 의해 동정하였다(Frendewey et al. (2010), *Methods in enzymology* 476:295-307; Valenzuela et al. (2003a), *Nat. Biotechnol.* 21:652-659).
- [0271] **실시예 3: LincRNA 마우스 제조**
- [0272] 표적화한 ES 세포를 조밀하지 않은 8-세포 단계 스위스 웨스터(Swiss Webster) 배아 내로 주사하여 lincRNA 넉아웃 돌연변이를 운반하는 완전한 ES 세포 유래 F0 세대 마우스를 생성하는 벨로시마우스(등록상표) 방법(Dechiara, T.M., (2009), *Methods Mol Biol* 530:311-324; Poueymirou et al. (2007), *Nat. Biotechnol.* 25:91-99)을 사용하였다. 수컷 벨로시마우스(등록상표)를 *lacZ* 발현 프로파일링에 대해 직접 사용하거나 또는 C57BL/6NTac 암컷과 짹지어서 *lacZ* 분석을 위해 배아 또는 성체를 생성하거나 또는 F1 브리더(breeder)를 생성하였고, 표현형 연구를 N2F1 마우스 상에서 수행하였다. 0.5일(E0.5)로 질전(vaginal plug)의 오전 동정을 부여함으로써 시기적절한 교배를 수행하였다.
- [0273] **실시예 4: LacZ 발현 프로파일링**
- [0274] 전총(whole mount) 염색을 위해, E9.5 및 E14.5 배아를 수집하고, PBS 중에서 세척하고 나서 새로운 0.2% 글루타르알데하이드 용액 중에서 15 분 내지 60분 동안 인큐베이션시켰다. 유전형질분석을 위해 배아 난황낭을 취하였다. 고정시킨 후에, 배아를 세척 완충제 중에서 세척하고 나서, 37°C에서 1 내지 24시간 동안 X-gal(1mg/ml) 중에서 인큐베이션시켰다. 염색 후에, 조직을 세척 완충제 중에서 린스하고 나서, 4% 파라폼알데하이드 중에 사후고정시키고, 70% 에탄올 중에서 적어도 24시간 동안 인큐베이션시켰다. E9.5-e11.5 배아를 즉시 사진촬영하는 한편, e12.5 이상의 배아를 글라이세롤이 증가되고 ddH<sub>2</sub>O 중의 1% KOH가 감소된 일련의 용액 중에서 깨끗하게 하였다. 니콘(Nikon) SMZ800 실체 현미경으로 사진을 촬영하였다. 세정 후 사진촬영을 위해 Fendrr e13.5 배아로부터 폐를 절단하였다.
- [0275] 성체 마우스를 이용한 연구를 위해, 6 내지 8주령 F0 세대 완전한 ES 세포 유래 벨로시마우스(등록상표)를 깊게 마취시키고, 0.2% 글루타르알데하이드/4% 파라폼알데하이드 용액을 이용하여 심장관류에 의해 고정시켰다. 뇌, 흉곽, 심장, 폐, 간, 비장, 위, 신장, 장, 비뇨생식기, 근육 및 뒷다리 근육을 절단하고, PBS 중에서 린스하고 나서, 0.2% 글루타르알데하이드/4% 파라폼알데하이드 용액 중에서 30분 동안 사후 고정시켰다. 이어서, 조직을

세척하고 나서, 37°C에서 1 내지 24시간 동안 X-gal(1mg/ml) 염색 용액 중에서 인큐베이션시켰다. 염색 후에, 조직을 세척 완충제 중에서 린스하고 나서, 4% 파라폼알데하이드 중에서 사후 고정시키고, 일련의 50%, 70% 및 100% 글라이세롤 중에서 깨끗하게 하고, 배아에 대해서와 같이 사진을 촬영하였다.

[0276] **실시예 5: 동물 관리 및 실험 절차**

N2F1 마우스의 표현형 연구를 6 내지 8주령에 시작하였다. 시기 적절한 교배를 위해, 본 발명자들은 배아 0.5일 (E0.5)로 질전의 오전의 동정을 부여하였다. 그들을 연구를 위해 69 내지 74F에서 1일당 12시간의 광 및 40 내지 60% 습도에 수용하였을 때, LincRNA KO 및 야생형 한배 새끼를 다양한 발생 단계(발육부전, 호흡, 안면 및 사지 이상, 피부색, 자세, 직립 및 개안반응)를 위해 출생으로부터 약 6주령 내지 8주령까지 관찰하였다. 6 내지 8주령에 모든 실험을 시작하였고, 모든 동물 절차를 리제네론 파마슈티컬스 동물실험 관련 위원회(Regeneron Pharmaceuticals Institutional Animal Care and Use Committee)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0278] **실시예 6:  $\mu$ CT 분석**

퀀텀 FX 마이크로CT 전임상 생체내 영상화 시스템(Quantum FX microCT Pre-clinical In-Vivo Imaging System) (퍼킨 엘머(Perkin Elmer))을 이용하여 3D 골격 영상화를 시작화하였다. 아이소플루오란 유속 2.5 l /분 및 산소 유속 1.5 l /분으로 산소/아이소플루오란 흡입을 이용하여 마우스를 마취시켰다. 스캔 동안, 마취를 노즈콘을 통해 0.25 l /분 산소 유속에서 유지하였다. 뒷다리에 대해 30mm 관측 시야 및 척추뼈에 대해 60mm 관측 시야로 스캔을 90kV 및 160  $\mu$ A에서 수행하였다. 골 무기질 밀도, 전체 뼈, 구부러짐 및 지방 용적 분석을 위해, 두부를 제외한 전신에 대해 60mm 관측 시야로 2회 연속 스캔을 수행하였다. 골 무기질 밀도 측정을 위해 우측 대퇴부를 수동으로 단리시켰다. 우측 대퇴부, 총 구부러짐 및 총 지방 용적을 어날라이즈 11.0(Analyze 11.0) 소프트웨어 (마요 클리닉(Mayo Clinic))를 이용하여 모두 측정하고 나서, 확립된 밀도를 기준으로 질량으로 전환시켰다. 스캔 후에, 마우스를 그들의 우리에 돌려보내고, 리제네론 IACUC 프로토콜에 따라 회복에 대해 모니터링하였다.

[0280] **실시예 7: 꼬리 매달기 검사**

꼬리로 매달았을 때, 마우스는 그들의 뒷다리를 펼침으로써(종종 "뒷다리 펼침"으로 지칭함) 안전하게 착지하기 위한 준비를 하였다. 마우스를 10초 동안 그들의 꼬리로 매달았고, 임의의 비정상적인 웅크리는 표현에 대해 관찰하였다.

[0282] **실시예 8: 악력 검사**

마우스를 5, 7 및 10주령에 와이어 그리드(와이어 두께는 대략 2mm)로부터 뒤집혀서 매달리는 그들의 능력에 의한 근육 결핍 징후에 대해 평가하였다. 그리드가 위아래로 돌아감에 따라 마우스가 잡는 것을 유도하기 위해 부드럽게 흔들리는 와이어 그리드 상에 마우스를 개별적으로 두었다. 마우스가 움직이는데 걸린 시간(최대 60초까지)을 기록하였다. 마우스가 가능한 길게 잡도록 3회의 시도를 제공하였고, 통계적인 비교를 위해 최대 시간을 기록하였다.

[0284] **실시예 9: 근육 조직학 및 조직 폐사**

마우스를 CO<sub>2</sub> 흡입 다음에 경추파열법에 의해 안락사시켰다. 전경골근(TA), 사두근 및 비복근(GA) 근육을 절단하고 칭량하였다. 모든 수집한 근육 및 기관을 냉동시키고, 장래 시험을 위해 -80°C에서 유지하였다. 조직학을 위해, OCT에서 근육을 냉동시키고, 측면의 그리고 안쪽의 두부, 비장근 및 발바닥을 나타내기 위해 12  $\mu$ m 두께로 비스듬히 동결절편화하였다. 인접한 절편을 H&E, 라미닌 및 MHC 슬로우 염색을 이용하여 염색하였다. 염색을 아페리오 스캔스코프(Aperio Scanscope)를 이용하여 디지털 영상화하였다. 스펙트라(Spectra) 소프트웨어를 이용하여 섬유 크기 및 계수를 결정하였다. 모든 데이터를 평균 +/- 평균의 표준 오차(오차막대로 나타냄)로서 표현한다. 프로그램 스탠드류(STATVIEW) 및/또는 프리즘(PRISM)을 이용하여 수행하였다. 통계학적 유의도를 0.05 미만의 P값으로 설정하였다. 피부 조직학에 대해, 등 및 복부 피부 면적을 면도하고 나서, 절단하고, 적어도 24시간 동안 4% 파라폼알데하이드(PFA) 중에 고정시키고, 70% 에탄올에 옮겼다. 피부 절편에 대한 파라핀 포매, 절편화 및 해마톡실린 및 에오신 염색을 메릴랜드주 게르만타운에 소재한 히스토서브 랩스, 인코포레이티드(Histoserv Labs, Inc.)에 의해 수행하였다.

[0286] **실시예 10: 카플란-마이어 생존 곡선 분석**

52주의 기간 동안 동물을 관찰하고 나서, 리제네론 IACUC 프로토콜에 따라 이환 징후에 대해 모니터링하였다. 이 연구에서 이환 가이드라인에 기반하여 52주 시점 전에 희생시킬 필요가 있는 마우스는 없었다. 그래프패드

프리즘 6(Graphpad PRISM 6) 소프트웨어를 이용하여 생존 곡선 및 로그 랭크 시험을 결정하였다.

**[0288] 실시예 11: 제거한 lincRNA를 이용한 20마리의 마우스 계통에서의 다양한 표현형 및 특이적 전사 패턴**

거대 유전자간 비암호화 RNA(lincRNA)의 생물학적 기능을 시험하기 위해 설계한 20마리 네아웃 마우스 계통의 측량에서, 본 발명자들은 출산전화 치사로부터 폐, 골격 및 근육의 형태적 및 기능적 이상 및 조로와 관련된 결함까지의 범위에 있는 다양한 표현형을 발견하였다. 각각의 돌연변이체 대립유전자는 발현 프로파일은 본 발명자들의 표현형 분석에 영향을 미치고 이들 유전자의 장래의 연구를 위한 가이드 역할을 하는 배아 및 성체에서의 넓은 범위의 시공간적 및 조직 특이적 전사 패턴을 강조한 *lacZ* 리포터를 운반하였다. 본 발명자들의 연구는 lincRNA가 단백질과 같이 포유류 내 매우 다수의 조직 및 기관의 배아 발생, 생리학 및 항상성에서 필수적이고 중요한 기능적 역할을 하는 새로운 부류의 암호화된 분자라는 것을 나타낸다.

최근에 포유류 내 유전자형과 표현형 사이의 관계의 깊은 이해는 본 발명자들이 계놈의 비암호화 부분을 포함하는 단백질 암호화 유전자 이상으로 본 발명자들의 조사를 확장할 필요가 있다는 것이 분명하게 하였다(Mattick JS (2009) *PLoS genetics* 5: e1000459). 포유류 세포에서 대규모 전체 계놈 발현 연구는 계놈의 거의 3/4이 RNA로서 발현될 수 있고(Kapranov P, et al. (2007) *Science* 316: 1484-1488; Carninci P, et al. (2005) *Science* 309: 1559-1563; Djebali S, et al. (2012) *Nature* 489: 101-108), 대부분의 전사체는 단백질을 암호화하지 않는다는 것을 나타내었다. 비암호화 전사체 중에서 긴 비암호화 RNA(lncRNA)로서 알려진 다양한 부류가 있다. 인간 세포(Derrien, T., et al. (2012), *Genome Res* 22:1775-1789), lncRNA 및 거대 유전자간 비암호화 RNA(lincRNA)로서 알려진 하위 부류(Guttman M, et al. (2009) *Nature* 458: 223-227; Khalil AM, et al. (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 11667-11672)에서 거의 10,000개의 계놈 좌위로부터의 대략 15,000개 전사체를 나타내는 것은 그들의 유전자의 구조, 합성 및 염색질 특징에서 단백질 암호화 mRNA와 유사하다. 이 구조적 유사성이 매칭되는 기능적 다양성에 대해 확장되든 아니든, 단백질은 미결문제로 남아있다.

거의 25년 전의 첫 번째 네아웃 균주의 생성 이후로, 마우스는 포유류 유전자 기능 연구를 위한 최고의 시스템이 되었다(Capecchi MR (2001) *Nat Med* 7: 1086-1090; Evans MJ (2001) *Nat Med* 7: 1081-1083; Smithies O (2001) *Nat Med* 7: 1083-1086). 몇 가지를 제외하고, 개개 유전자 연구뿐만 아니라 대규모 국제 프로젝트에서 네아웃 마우스 기법의 적용([www.knockoutmouse.org](http://www.knockoutmouse.org))은 단백질 암호화 유전자에 중점을 두었지만, 최근의 노력은 비암호화 RNA에 기법을 적용하는 가치를 입증하는 마이크로RNA에 대한 전반적인 네아웃 마우스 자원을 생성하는데 중점을 두었다(Prosser HM, et al. (2011) *Nature biotechnology* 29: 840-845) ([mcmansuslab.ucsf.edu/microrna\\_knockout](http://mcmansuslab.ucsf.edu/microrna_knockout)). 마우스에서 유전자 과괴에 의한 개개 lncRNA의 소수의 기능적 연구가 있었지만, 거의 절반은 단일의 관련된 생물학적 형상(X 염색체 불활성화 (Marahrens Y, et al. (1997) *Genes & Development* 11: 156-166; Sado T, et al. (2001) *Development* 128: 1275-1286) 및 체세포 염색체 임프린팅 (Leighton PA, et al. (1995) *Nature* 375: 34-39; Mohammad F, et al. (2010) *Development* 137: 2493-2499; Sleutels F, et al. (2002) *Nature* 415: 810-813; Takahashi N, et al. (2009) *Human Molecular Genetics* 18: 1879-1888))에 수반되는 잘 연구된 lncRNA에 중점을 두었다.

최근에, 마우스 *Fendrr* lncRNA의 과괴는 심장 및 체벽 발생에서의 결함과 관련된 배아 치사를 초래하였다(Grote P, et al. (2013) *Developmental Cell* 24: 206-214). 그러나, lncRNA-암호화 Gt(ROSA)26Sor (Zambrowicz BP, et al. (1997) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 3789-3794) 또는 Malat1(Zhang B, et al. (2012) *Cell Reports* 2: 111-123) 유전자에서 결실 또는 삽입 돌연변이는 식별할 수 있는 표현형을 생성할 수 없었다. lncRNA 유전자의 구조, 발현 및 기능의 최근의 이해는 이 새로운 부류의 유전자와 관련된 생물학적 기능을 나타내기 위해 마우스 분자 유전자를 사용하는 새로운 기회를 제공한다.

그러나 lncRNA에 네아웃 마우스 기법을 적용하는 것은 일부 기술적 도전을 제공한다. 대부분의 단백질은 기능적 적절함을 갖는 것으로 알려지거나 또는 적어도 예측된 구성요소 또는 도메인을 가진다. 이들 필수 부분에 대해 암호화 서열을 결실시키는 것은 종종 삭제 대립유전자를 생성하는데 충분하다. 마찬가지로, 조직 특이적 재조합 부위의 작용에 의한 이후의 결실을 위한 결정적 액손 또는 액손들을 단리하는 조건적 대립유전자가 설계될 수 있다. 구조-기능 관계는 아직 모두에 대해서는 아니지만 소수의 lncRNA에 대해 확립되었고, 가이드로서 오픈 리딩 프레임이 없기 때문에, 단백질-암호화 유전자에 대해 이용가능한 네아웃 전략은 lncRNA를 암호화하는 계놈 좌위에 적용가능하지 않을 수도 있다. lncRNA 유전자의 주석은 개선되었지만(Derrien T, et al. (2012) *Genome Research* 22: 1775-1789), 일부 유전자의 정확한 경계가 여전히 애매하게 남아있을 수 있는데, 이는 네아웃 대

립유전자 설계를 복잡하게 할 수 있다. 단백질-암호화 유전자에 대한 넉아웃 마우스에 적용되는 강력한 도구는 발현이 표적 유전자 프로모터에 의해 제어됨으로써 마우스에서 발현의 공간적 및 시간적 패턴을 보고하는 리포터, 예컨대  $\beta$ -갈락토시다제 또는 형광 단백질에 대한 암호화 서열로 표적 유전자의 치환이다. 리포터 유전자 치환은 lncRNA를 암호화하는 잘 연구된 Gt(ROSA)26Sor 좌위(Zambrowicz BP, et al. (1997) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 3789-3794), 및 짧은 비암호화 RNA miR-155에 대한 유전자(Thai TH, et al. (2007) *Science* 316: 604-608)와 같은 비암호화 RNA에 대해 성공적으로 적용되었지만, lncRNA에 대해 이러한 대립유전자를 생성하기 위한 규칙이 개발될 필요가 있을 수 있다. 동정된 수천의 lncRNA에 의한 이들 자격에도 불구하고, 시간은 새로운 부류의 유전자에 넉아웃 마우스 기법의 힘을 적용하는 것을 탐구하는데 적합하다. 이 목표를 유념해 두고, 본 발명자들은 넉아웃 마우스 계통의 생성에 의한 20개의 lincRNA(각각  $\beta$ -갈락토시다제 리포터 치환을 지니는 유전자-제거 결실 대립유전자를 운반함)의 기능을 설명하기 위한 통일된 유전자 접근을 기재한다.

#### [0294] 리포터 유전자 치환에 의한 20개의 lincRNA-결실 마우스 계통의 생성

표 1은 본 연구에서 표적화한 10개의 상이한 염색체에 대한 20개의 lincRNA 및 생성된 26 넉아웃 결실 대립유전자를 열거한다. 정의에 의해 lincRNA 유전자는 이웃하는 단백질 암호화 유전자로부터 단리되며, 그들의 전사체는 중복되지 않기 때문에 본 발명자들은 거대 유전자간 비암호화 RNA 부류의 구성원을 돌연변이 시키는 것을 선택하였다(Guttman M, et al. (2009) *Nature* 458: 223-227). 이 특징은 본 발명자들이 가까운 유전자의 발현을 방해하는 최소의 기회를 갖는 결실 대립유전자의 설계하게 한다. 본 발명자들은 신경 발현 그리고 유전자 발현의 발생 및 조절에 대한 그들의 잠재적 연구에 중점을 두고 다양한 발현 패턴을 반영하도록 표적화된 lincRNA 유전자를 선택하였다(Khalil AM, et al. (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106: 11667-11672; Cabili MN, et al. (2011) *Genes & Development* 25: 1915-1927).

[0296] lincRNA 넉아웃 돌연변이를 위한 본 발명자들의 설계 전략은 두 가지 목표에 의해 가이드되었다. 첫째로, 본 발명자들은 lincRNA 유전자의 전사 활성을 정확하게 보고하는 대립유전자를 생성하는 것을 목표로 하였다. 조직 특이적 lincRNA 발현을 위한 세포에 기반한 그리고 선택된 조직 절단 연구가 있지만(Cabili MN, et al. (2011) *Genes & Development* 25: 1915-1927), 본 발명자들은 공간적으로 그리고 시간적으로 조직과 장기 발현을 해결함으로써 서브도메인 그리고 일부 경우에 조직 절단 실험에 의해 해결되지 않는 세포 유형 특이성을 드러내는 lacZ 발현 프로파일링에 의해 얻어지는 더 고정밀도의 발현 패턴을 생성함으로써 이 지식 기반을 보완하기를 원하였다. 둘째로, 본 발명자들은 돌연변이와 관련된 임의의 표현형이 표적화된 RNA의 중요한 기능에 관해 정보를 제공하도록 lincRNA의 합성 및 기능을 제거한 유전자 제거 결실을 생성하기 위한 노력을 하였다.

[0297] 넉아웃 결실은 크기가 약 400 bp 내지 50kb의 범위에 있었고, 절반은 모든 주석이 달린 엑손이 결실되었다. 대부분의 남아있는 대립유전자에 대해, 결실은 제2 엑손에서 시작되었다. 박테리아 인공 염색체(LTVEC)에 기반한 거대 표적화 벡터의 구성 및 사용을 위한 벨로시젠(등록상표) 방법의 적용(Valenzuela DM, et al. (2003) *Nature Biotechnology* 21: 652-659)은 본 발명자들이 새로운 부류의 거대 기능성 RNA에 대해 삭제 대립유전자를 보장하는데 필요한 거대한 유전자 제거 결실을 생성할 수 있게 하는데 중요하였다.

[0298] 대립유전자 설계를 가이드하는 lincRNA 유전자에 대한 구조와 기능 사이의 상관관계는 거의 알려지지 않고 있다. Gt(ROSA)26Sor((Zambrowicz BP, et al. (1997) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 3789-3794) 및 BIC(miR-155)(Thai TH, et al. (2007) *Science* 316: 604-608) 유전자의 파괴에 의한 경험은 제1 엑손 다음의 결실 및 결실이  $\beta$ -갈락토시다제 또는 다른 수용체의 신뢰 가능하고 조직 특이적인 발현을 생성할 수 있다는 것을 확립하였다. 그러나, 이 전략은 변형된 대립유전자로부터의 융합 전사체가 제1 엑손에서 암호화된 5' 부분으로부터의 lincRNA의 기능성 부분을 보유한다면 완전한 삭제 돌연변이를 달성하지 못할 수 있었다(Tsai MC, et al. (2010) *Science* 329: 689-693). 따라서 표 1에 나타낸 넉아웃 대립유전자 설계는 lincRNA 기능을 없애는 가장 높은 확률을 갖는 완전히 제거되는 돌연변이에 대한 바람과  $\beta$ -갈락토시다제 리포터로부터 정확하고 정보적인 유전자 발현 프로파일을 생성한 대립유전자를 생성하는 목적 간의 결충이었다. 예를 들어, HOTAIR 유전자에 대해, 두 대립유전자는 전체 RNA 암호화 서열 근처에서 결실된 하나 그리고 결실이 제2 엑손에서 시작된 두 번째에 의해 생성되었다. 대립유전자는 둘 다 동일한 표현형을 생성하였지만(이하에 기재), 두 번째만이 유전자 발현의 리포터로서 기능하였다.

[0299] 단백질-암호화 유전자에 매우 가깝게 존재하고 갈라지는 프로모터를 공유할 수 있는 lincRNA에 대해, 본 발명자들은 이웃하는 유전자의 전사를 파괴하는 기회를 회피하기 위해 제2 엑손에서 결실 시작점을 설정하였다. 도

1은 *Fendrr* 유전자에 대한 이러한 예를 나타낸다. 다이어그램은 모든 대립유전자에 대해 공통적인 설계 구성요소의 예를 나타낸다: lincRNA에 대한 모든 또는 대부분의 서열 암호화의 표적화된 결실 및 G418-내성 ES 세포 콜로니의 선택을 위한 네오마이신 포스포트랜스페라제를 발현시키는  $\beta$ -갈락토시다제 및 카세트( $neo^r$ )를 암호화하는 이콜라이(*E. coli*) *lacZ* 유전자로부터의 서열을 함유하는 카세트로 치환. 표현형 분석 전에 Cre-매개 절단을 가능하게 하는 *LoxP* 재조합 부위 인식 부위는 약물 선택 카세트에 측접한다. *lacZ* 서열에 융합하는 기능성 오픈 리딩 프레임이 없기 때문에, 각각의 대립유전자는  $\beta$ -갈락토시다제 리포터의 효율적인 번역을 위한 시작 코돈 및 코작 공통서열을 운반할 수 있다(Kozak, M (1987), *Nucleic Acids Res* 15, 8125-8148).

[0300]

#### *LacZ* 리포터 프로파일링에 의해 나타나는 특이적이고 다양한 lincRNA 유전자 발현

[0301]

20개의 표적화된 lincRNA 유전자를 측량하기 위해, 본 발명자들은 중기 임신 배아 및 성체 전층 조직 및 기관에 대해  $\beta$ -갈락토시다제 활성에 대해 X-gal 염색을 적용하였다. 표적화한 lincRNA 유전자는 배아와 성체 둘 다에서 다양한 독특한 리포터 유전자 발현 패턴을 나타내었는데, 이는 대부분의 주된 장기 계통 및 조직 유형을 나타낸다(도 11에서 표 2). 예를 들어, 성체 조직에서, *Pantr2*, *Kantr* 및 *Peril*의 발현은 뇌로 제한되었고; *Mannr* 및 *Fendrr*을 폐에서 발현시켰으며; *Eldr*을 비뇨기관계에서 발현시켰고; *Halr1*을 흉곽에서 발현시켰다. 하나의 lincRNA 유전자는 *Pint*는 모든 조직에서 편재한 발현을 나타내었다. 본 발명자들은 본 발명자들이 시험한 임의의 성체 조직에서 *Hotair*, *Ptgs2os2* 및 *Hag1r* 유전자의 발현을 검출하지 못하였다.

[0302]

배아 발현은 lincRNA의 공통의 특징인 것으로 나타났다. 배아 12.5일(E12.5)에 또는 근처에서 이형 접합적 배아에서  $\beta$ -갈락토시다제 리포터 발현의 시험은 모든 20개의 표적화된 lincRNA 유전자에 대해 다양한 특이적 패턴을 나타내었다(도 11에서 표 2, 도 2a). 발현 프로파일은 *Eldr*에 대해 상피, *Trp53cor1*에 대해 수염 기원판(도 9) 또는 *Lincenc1*에 대해 유방눈(도 9)과 같이 편재한(*Tug1*) 내지 고도로 제한된 범위에 있다. *Hottip* 및 *Hoxa11os*에 대해 상이한 정도의 지아 및 꼬리에서 보이는 시공간적 패턴은 HoxA 클러스터에서 인접한 단백질 암호화 유전자에 대해 보고한 것과 매우 유사하다(Hostikka SL, Capecchi MR (1998) *Mechanisms of Development* 70: 133-145; Lu P, et al. (2008) *Development* 135: 1395-1405).  $\beta$ -갈락토시다제 리포터에 대해 관찰한 후부 꼬리싹 및 생식결절에서 *HOTAIR*의 발현은 현장 혼성화에 의해 결정된 것과 동일하다(Schorderet, P., and Duboule, D (2011), *PLoS Genet* 7:e1002071). 배아 발생 동안 상이한 시점에 X-gal 염색의 분석은 일부 lincRNA 유전자에 대해, 발현이 제한된 부위에서 초기에 시작하며, 이어서 이후의 단계에서 이 초기 좌위를 지나서 연장되고(도 2b), 또한, Hox 단백질 발현을 연상시킨다(Nagy A (2003) *Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. x, 764 p.). 예를 들어, *Hottip* 및 *Hoxa11os* 유전자의 발현은 E9.5 배아의 극단 후부에서 시작하며, 이어서, 이후의 시간에 지아 내로 연장된다. 유사하게, E9.5에 배아의 전방 말단 근처의 부위에서 *Celrr*에 대한 초기 발현을 유지하였고, 다음 2일에 걸쳐 신경관으로 연장된다.

[0303]

인간 조직 특이적 lncRNA 중에 보이는 빈번한 뇌 발현과 일치되게(Derrien T, et al. (2012) *Genome Research* 22: 1775-1789), 본 발명자들은 20개의 표적화된 마우스 lincRNA 유전자의 절반인 뇌에서 전사적으로 활성이다는 것을 발견하였다. 배아 lincRNA 발현에 의해, 뇌 패턴(도 3)은 독특하였고 편재한 것으로부터(*Lincppara* 및 *Pint*) 고도로 제한된 것(*Peril*, *Crnde* 및 *Kantr*)까지 다양하였다.

[0304]

#### 연령에 따른 *Pint*의 독특한 증가된 발현은 노화-유사 표현형과 상관관계가 있다

[0305]

표적화된 20개의 lincRNA 유전자 중에서, *Pint*만이 대체로 출생 후 삶으로 제한되는 전반적인 전신 발현 패턴을 나타내었다(도 11에서 표 2). *Pint*에 대해 독특하게, 본 발명자들은 연령에 따라 그의 발현에서 증가를 관찰하였다(도 4). 3일령 신생아에서, *Pint* 전사 활성은 낫거나(뇌) 또는 검출가능하지 않지만(흉곽근), 그 다음에 3주령 마우스에서 점진적으로 나타났고, 8주령까지 강하고 편재하게 되었다. *Pint* 발현의 강도 및 시간은 상이한 기관 및 조직 중에서 변하지만, 일반적 경향은 출생 후 성체의 정체기까지 발현이 꾸준히 증가된다. 본 발명자들의 지식에 대해, 이 연령관련 동적 발현 패턴은 신규하다. 본 발명자들은 수백의 단백질-암호화 유전자에 대한 *lacZ* 프로파일링 실험의 본 발명자들의 경험에서 유사한 프로파일을 관찰하지 못하였다(Valenzuela DM, et al. (2003) *Nature Biotechnology* 21: 652-659).

[0306]

*lacZ* 프로파일링에 의해 나타나는 전신 *Pint* 발현에서 현저한 연령-관련 증가(도 4)는 마우스가 노화됨에 따른 정상 건강상태의 유지에서 *Pint*에 대한 전반적인 항상성을 시사하였다. 이 가설을 시험하기 위해, 본 발명자들은 *Pint* 네아웃 마우스 계통을 동형접합성으로 번식시키고, 야생형(WT) 및 이형 접합성(*Pint*<sup>+/−</sup>) 한배 새끼 대조군을 이용한 동형 접합성(*Pint*<sup>−/−</sup>) 마우스에 비해 종단적 연구를 수행하였다. *Pint*<sup>−/−</sup> 마우스는 출생 시 건강하고

정상인 것으로 나타났지만; 그러나, 3개월령에, 그들은 조기 개시 노화 유사 표현형의 징후를 나타내기 시작하였다. 체중 측정은 수컷과 암컷 *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스가 둘 다 그들의 WT 한배 새끼에 비해 더 느린 성장 속도를 나타내었지만, 그것은 수컷에서 더 분명하다는 것을 나타내었다(도 5A). 1세까지, 수컷 *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스는 30% 초과로 더 가벼웠고, *Pint*<sup>+/+</sup> 마우스는 그들의 WT 한배 새끼보다 15% 더 가벼웠던 반면, *Pint*<sup>-/-</sup> 암컷은 27% 더 가벼웠다(데이터 미제시). 동형 접합적 수컷 마우스를 이형접합적 수컷 마우스 및 WT 수컷 마우스와 비교하는 카플란-마이어 분석(도 5B)은 *Pint*의 상실이 불량한 생존 결과와 관련된다는 것을 입증하였다. 본 발명자들은 돌연변이체 마우스에서 그들이 노화됨에 따른 종양 또는 병변의 징후를 발견하지 못 하였지만, 일부 *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스는 복벽의 박화와 관련된 흉부 상에서의 칼돌기 돌출을 포함하는 탈장이 발생되었다(데이터 미제시). 마우스를 그들의 꼬리로 매달았을 때 연령에 따른 비정상적 뒷다리 웅크림 자세가 있었다(데이터 미제시). 이 표현형의 중증도는 다르지만, 그의 빈도는 연령에 따라 계속해서 증가되었는데, 이는 근육 강도의 감소를 시사한다(*Hottip* 네아웃 계통에서의 다른 예에 대해 도 8 참조). 본 발명자들은 또한 수컷과 암컷 마우스 둘 다에서 탈모를 관찰하였다(데이터 미제시). *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스의 배쪽 및 등쪽 신체로부터 수집한 피부 절편의 조직학적 분석은 피하 지방층 두께의 극적인 감소와 함께 모낭 발생의 현저한 차이 및 섬유증을 나타내었다(도 5C).

[0307]

마우스가 노화됨에 따라 개개 마우스 신체의 X-선 마이크로 단층촬영법(마이크로CT)에 의한 비침습적 전신 분석은 수컷(도 5D) 및 암컷(도 5E) *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스에서 그들의 WT 한배 새끼에 비해 상당히 더 낮은 지방 함량을 나타내었다. 총 체지방의 상실은 그들이 노화됨에 따른 체중 감소에 대한 주된 기여자일 가능성이 있었다(도 5A). *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스는 또한 WT보다 상당히 더 낮은 대퇴골 골 무기질 밀도를 가졌다(도 5F 및 도 5G). 수컷 마우스는 52주령에 제지방이 상당히 감소되었다. 수컷과 암컷은 둘 다 26주령에 시작해서 비복근 복합체(GA)와 전경골근(TA)에 대해 상당히 감소된 근육량을 나타내었다(미제시). 골격 영상화는 수컷과 암컷 *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스 둘 다에서 WT에 비해 중증의 척추변형의 외관을 나타내었다(도 5H). 대략 70%의 12주령 *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스는 척추변형을 나타내었고, 52주령까지 100%가 나타내었다(도 5I). 대조적으로, 단지 10 내지 20%의 26주령 WT 마우스는 약간의 척추변형을 나타내었고, 이 빈도는 연령에 따라 증가되지 않았다. *Pint*<sup>+/+</sup> 마우스는 26주령까지 상당한 척추변형이 발생하지 않았는데, 이는 *Pint*에 대한 연령 의존적 반수체기능부전을 나타낸다. *Pint* 네아웃 마우스에서 연령 관련 병리의 범위는 *Pint*가 마우스의 정상적인 수명 동안 건강상태의 유지 및 조기 노화의 회피에 중요할 수 있다는 것을 시사한다.

[0308]

*Fendrr*의 상실은 호흡곤란증후군의 결과로서 출산전후 치사를 야기한다

[0309]

20마리의 lincRNA 네아웃 마우스 계통 중에서, *Peril*<sup>-/-</sup> 및 *Fendrr*<sup>-/-</sup> 마우스는 출산전후 치사를 나타내었다. 본 발명자들의 *Fendrr* 네아웃 대립유전자는 엑손 2부터 마지막에 주석이 달린 엑손까지 26kb 결실을 가진다(도 1). E12.5 동형 접합성 배아의 X-gal 염색은 전비 돌기, 상부 호흡관, 폐에서 그리고 이형 접합성(나타내지 않음)과 동형 접합성 배아 둘 다에서 동일한 후부 대동맥-생식용기-중신(AGM) 영역(도 6A)에서 *lacZ* 발현을 나타내었는데, 이는 극도로 정상적인 기관형성을 나타낸다. E13.5에 발생 중인 폐에서 단리된 외양은 네아웃 배아에서 결합을 나타내었다: 폐는 작았고, 엽은 구형으로 나타났으며, 파괴되었다(도 6B). *Fendrr* 유전자의 결실에 대한 마우스 동형 접합형은 출생 후에 생존하였지만, 분명한 호흡 문제 후에 얼마 안 되어 죽었다. *Fendrr* 돌연변이체 출산전후 치사 표현형은 마우스에서 2개의 상이한 유전자 배경에 대해 동일하였다: 본 명세서에서 C57BL/129 혼성체가 보고되었고, 마우스에서 별개의 변식 프로그램에서 C57BL/6 배경에 대해 추가로 역교배되었다(Sauvageau M, et al. (2013) *Elife* 2: e01749).

[0310]

*Hotair* 및 *Hottip*의 상실은 골격 및 근육에서 형태적 및 기능적 결함을 야기한다

[0311]

*Hotair* 및 *Hottip* 유전자에 대한 배아 X-gal 염색은 후부 및 말단 지아에서 제한된 발현을 나타내었다(도 2a). 이를 발생적으로 제한된 발현 패턴과 일치되게, *Hotair* 및 *Hottip* 유전자의 결실은 성체 마우스의 꼬리 및 뒷다리에서 형태적 기형을 야기하였다. *Hotair*<sup>-/-</sup> 마우스에서, 본 발명자들은 3번째 미추골과 해부학적으로 유사한 4번째 미추골의 명확한 호메오틱 변형을 관찰하였다(도 7). *Hotair*<sup>-/-</sup> 마우스는 그들의 꼬리로 매달았을 때 야생형 한배 새끼에 비해 비정상적 웅크림 자세를 나타내었다(도 8A). 이 거동 이상은 마우스가 뒤집힌 와이어 케이지 상에서 매달린 채로 남아있도록 도전한 시험에 의해 측정된 바와 같이 악력의 상실을 수반하였다. 야생형 및 *Hotair*<sup>+/+</sup> 돌연변이체는 대략 1분 동안 보유되는 반면 그들의 동형 접합성 한배 새끼는 10 내지 20초 내에 그들

의 움켜짐을 풀었다(도 8B). 악력의 이러한 분명한 감소는 비복근에 대한 근육량의 상실과 관련되지만, 전경골 근 또는 사두근에 대해서는 그렇지 않다(도 8C). 본 발명자들은 비복근에서 섬유 수의 대략 40% 감소를 관찰하였지만, 그들의 평균 섬유 크기는 감소되지 않았다(도 8D 및 도 8E). *Hottip* 넉아웃 마우스에서 근육 결합에 추가로, 본 발명자들은 또한 골격 기형(뒷다리 발꿈치뼈 길이의 단축)을 발견하였다(도 10).

[0312] 과거 수년간, 특히 포유류에서 계놈의 비단백질 암호화 구성성분의 본 발명자들의 이해에서 폭발적인 증가가 있었다. 비암호화 기능성 RNA의 오래 인식된 부류, 예컨대 리보솜, 전달, 소핵, 혼소체내 저분자, 소세포질 RNA 및 RNase P의 RNA 성분, RNase MRP 및 텔로미라제 효소 및 더 최근에 발견된 마이크로RNA 및 PIWI-관련 piRNA에 추가로, 본 발명자들은 이제 긴 비암호화 RNA 부류의 적어도 15,000개 구성원을 포함할 수 있다(Kapranov P, et al. (2007) *Science* 316: 1484-1488; Carninci P, et al. (2005) *Science* 309: 1559-1563; Djebali S, et al. (2012) *Nature* 489: 101-108; Derrien T, et al. (2012) *Genome Research* 22: 1775-1789; Guttman M, et al. (2009) *Nature* 458: 223-227). 본 발명자들은 lncRNA 유전자의 계놈 존재 및 발현을 이해하기 시작하였기 때문에, 다음의 목표는 그들의 생물학적 기능을 발견하는 것이다. 이 도전을 방해하는 첫 번째 단계로서, 본 발명자들은 포유류 유전자 기능의 결정을 위한 가장 강력한 도구인 마우스 유전자 표적화 기법을 적용하여 20개의 lncRNA 유전자에 대한 넉아웃 마우스 계통의 자원을 생성하였다(Sauvageau M, et al. (2013) *Elife* 2: e01749).

[0313] lncRNA에 대한 구조-기능 관계는 부족하게 이해되고 있다. 이런 이유로, 초기 연구에서는 모든 lncRNA가 기능 상실 돌연변이를 생성하는 가장 높은 확률을 가질 가능성이 있는 것이 아니라면, 대부분이 제거된 결실을 지니는 넉아웃 대립유전자를 생성하는 것이 중요하였다. 대안의 스플라이싱 또는 전사 개시 부위에 의해 생성될 가능성이 있는 전사체를 여러번 보고한 다수의 lncRNA 좌위의 애매모호하고 복잡한 주석은 넉아웃 대립유전자 설계의 곤란함을 더한다. lncRNA 기능에 중요한 문자 특징의 새로운 이해는 진행중이며 유연한 조건적 전략으로 작용하고 또한 허용하는데 중요한 서열의 더 분명하게 관련된 변형을 지니는 lncRNA 대립유전자의 차세대 설계의 정보를 제공하여야 한다.

[0314] 본 발명자들의 lncRNA 넉아웃 측량의 중요한 목표는 제거 기능에 추가로 유전자의 시공간적 발현 패턴을 또한 보고하는 대립유전자를 생성하는 것이다. 가이드로서 단백질 암호화 오픈 리딩 프레임을 갖지 않음에도 불구하고, 본 발명자들은 모두 20개의 표적화된 유전자에 대해 유전자 발현을 보고하는 대립유전자를 설계함에 있어서 성공적이었다. 성체기에 *lacZ* 발현을 생성하지 않은 대립유전자 중 하나는 염증 신호에 의해 가장 강하게 유도된 lncRNA 중 하나로 알려진 *Ptgs2os2*(배아 발현에 대해 도 2a 및 도 9A 참조)였다(Guttman M, et al. (2009) *Nature* 458: 223-227; Carpenter S, et al. (2013) *Science* 341(6147): 789-92). *Ptgs2os2* 넉아웃 계통은 lncRNA의 발현이 감염 또는 다른 염증 발작에 반응하는 방법 및 그것이 과정에서 하는 생물학적 역할의 연구를 위한 가치있는 자원을 증명하여야 한다.

[0315] 기준 중 하나를 본 발명자들의 선택에 적용하였고, 이 중에서 본 측량을 위해 표적화한 lncRNA 유전자는 신경 조직 내 발현이 예상되었다. 표적화한 유전자 중 10개는 성체 뇌에서 *lacZ* 리포터 발현을 나타내었고, 각각은 강한 전체 뇌 발현(*Pint*)으로부터 대부분의 구조에서 가벼운 회백질 발현(*Tug1*), 상부 소구(*Crnde*) 또는 시상하부 중간(*Peril*)을 제외하고 고도로 제한된 발현의 범위에 있는 독특한 패턴을 나타내었다(도 3). 뇌에서 유전자 발현 패턴의 다양성 및 특이성은 또한 다른 조직에서 분명하였고, 본 발명자들이 단백질 암호화 유전자에 대해 리포터 대립유전자에 의해 알 수 있는 것과 유사하였다. 본 발명자들의 lncRNA 유전자 *lacZ* 발현 프로파일링 패턴은 야생형 마우스 조직에서 RNA 정량화 실험에 의해 발견한 조직 특이적 패턴과 일치하였다(Sauvageau M, et al. (2013) *Elife* 2: e01749). 그러나, 이 연구 전에, lncRNA 유전자 발현의 예민한 조직 및 세포 유형은 인식되지 않았는데, 이전의 정량화 방법은 *lacZ* 리포터 프로파일링의 고정밀도 및 세포 유형 분해능을 전달할 수 없었기 때문이다(도 2a).

[0316] 배아 발현은 본 발명자들이 시험한 모든 lncRNA 유전자에 의해 공유되는 특징이다. *LacZ* 프로파일링은 각각의 lncRNA에 독특한 넓은 범위의 특이적 패턴을 나타내는 전체 배아의 고정밀도 사진을 전달하였다. 예를 들어, 이형접합체 *Hotair* 및 *Hottip* 배아에 대해 고도로 제한된 후부 발현 패턴은 본 발명자들이 후부 신체 부분에서 넉아웃 표현형을 발견할 수 있다는 것을 시사하였다. 이 예상과 일치되게, 본 발명자들은 *Hotair*<sup>-/-</sup> 마우스

[0317] *lacZ* 프로파일링의 다른 가치는 그것이 표현형 연구의 설계를 가이드하고 중점을 둘 수 있다는 것이다. 예를 들어, 이형접합체 *Hotair* 및 *Hottip* 배아에 대해 고도로 제한된 후부 발현 패턴은 본 발명자들이 후부 신체 부분에서 넉아웃 표현형을 발견할 수 있다는 것을 시사하였다. 이 예상과 일치되게, 본 발명자들은 *Hotair*<sup>-/-</sup> 마우스

에서 4번째 미추골의 명백한 호메오텍 변형을 관찰하였고(도 6), 본 발명자들은 *Hotair*<sup>-/-</sup> 마우스에서 근육 약화 및 골격 기형을 포함하는 뒷다리의 이상을 발견하였다(도 8 및 도 10). 또한 상이한 *Hotair* 넉아웃 대립유전자를 지니는 마우스에서 *Hotair* 호메오 표현형을 관찰하였다(H. Chang, personal communication). 본 발명자들은 이형접합체에서 *Fendrr*의 발현이 성체 마우스에서 폐로 제한되고(도 11에서 표 2) 배아에서 발생 중인 호흡관에서 현저하다는 것을 발견하였다(도 2a). 놀랍지 않게도, *Fendrr* 동형접합체는 호흡 스트레스 및 폐의 결합 구조적 성숙에 기인하는 후속적 출산전후 사망을 나타내었다. 본 발명자들의 *Fendrr* 넉아웃 표현형은 환자가 폐엽 발생에서 결함을 나타내고 출생 후 수분 내에 출생 후 호흡곤란으로 고통받는 폐정맥의 어긋남(misalignment)에 의한 희귀 인간 치사 폐 발달 장애 폐포 모세혈관 이형성증(ACD/MPV)과 유사하다(Bishop NB, et al. (2011) *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184: 172-179). 적어도 하나의 ACD/MPV 환자는 정상 신생아 인간 폐에서 발현되는 마우스 *Fendrr*의 인간 상동체인 *FOXF1-AS1* 유전자 내에서 11kb 결실을 갖는 것으로 보고되었고(Szafrański P, et al. (2013), *Genome Research* 23: 23-33). 그로트(Grote) 등(Grote P, et al. (2013), *Developmental Cell* 24: 206-214)은 대략 E13.75에 돌출된 배꼽류, 복부 체벽 두께의 감소 및 우심방에서 혈액 축적을 야기하는 심장 결함과 관련된 치사를 만드는 *Fendrr* 유전자의 변형을 지니는 돌연변이체 마우스를 보고하였다. 본 발명자들은 임의의 이들 표현형을 관찰하지 않았다. 표현형 사이의 차이는 상이한 대립유전자 설계에 의해 설명될 수 있다. 본 발명자들의 대립유전자는 말단까지 *Fendrr* 엑손 2가 결실되었고, 인접한 *Foxf1* 단백질-암호화 유전자와 공유될 수 있는 프로모터의 파괴를 회피하도록 설계되었다. 그로트 등(Grote P, et al. (2013), *Developmental Cell* 24: 206-214)의 *Fendrr* 대립유전자는 제1 엑손에서 전사 정지 구성요소의 삽입으로 이루어졌고, 리포터 유전자를 유도하지 않았다.

[0318]

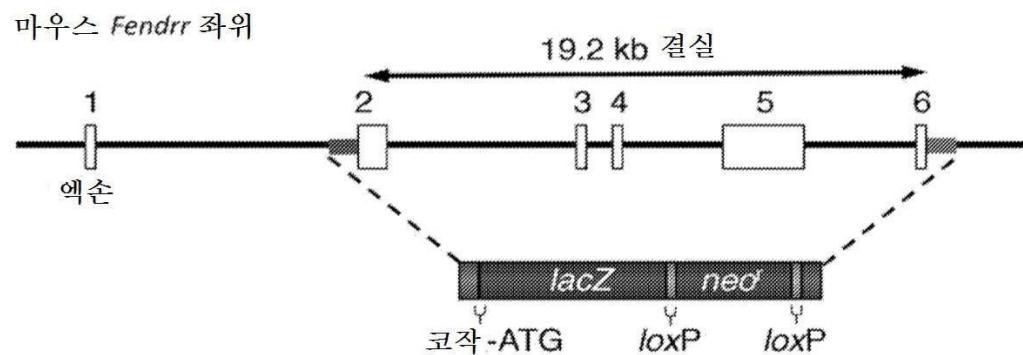
본 발명자들이 관찰한 대부분의 주목할 만한 성체 발현 패턴은 마우스가 신생 마우스로부터 성숙 성체까지 노화됨에 따라 X-gal 염색의 정도 및 강도의 증가를 나타내는 *Pint*에 대한 것이다(도 4). 이 두드러진 연령 관련 패턴은 본 발명자들이 성장을 및 비정상적 건강상태의 공공연한 징후에 대해 종단 분석을 수행하는 것을 촉구하였다. WT 마우스에 비해, 본 발명자들은 *Pint*<sup>-/-</sup> 마우스가 노화함에 따라, 그들이 진행성 탈모 및 근육 약화의 징후, 중증의 척추변형, 감소된 체지방 및 골 무기질 밀도, 더 느린 성장을 및 감소된 생존을 나타내었다는 것을 발견하였다. 놀랍게도, 이들 결과는 이형 접합적 마우스에서 되풀이되었지만, 정도는 더 약하였다. 연령에 따른 유전자 발현의 보통이 아닌 증가와 함께 연령 관련 표현형의 이런 범위는 마우스가 정상 수명 동안 건강상태의 일반적 유지 및 조직 기능을 위해 그리고 생리적 노화에서 lincRNA의 잠재적 역할에 대한 제1 시점 동안 *Pint*의 임계 용량을 필요로 한다는 것을 암시한다. 최근의 연구는 *Pint*가 p53 경로와 폴리콤 억제 복합체 2(PRC2)에 의한 후생적 침묵 사이의 연결을 제공하는 p53에 대한 직접적인 표적이라는 것을 나타내었다(Marin-Bejar et al., 2013). 신체 성장의 증거는 세포의 노쇠 및 노화의 제어에서 p53의 중요한 역할에 연루되었다. 이는 p53-의존적 세포 노쇠 및 유기체 노화에서 *Pint*의 조절 및 그의 잠재적 연루를 조사하는데 큰 관심을 가질 것이다. 이는 노화 및 암과 관련된 것을 포함하는 인간 질환에서 잠재적 임상 연루를 지니는 포유류에서 생리적 노화 과정의 중요한 메커니즘을 나타낼 수 있었다.

[0319]

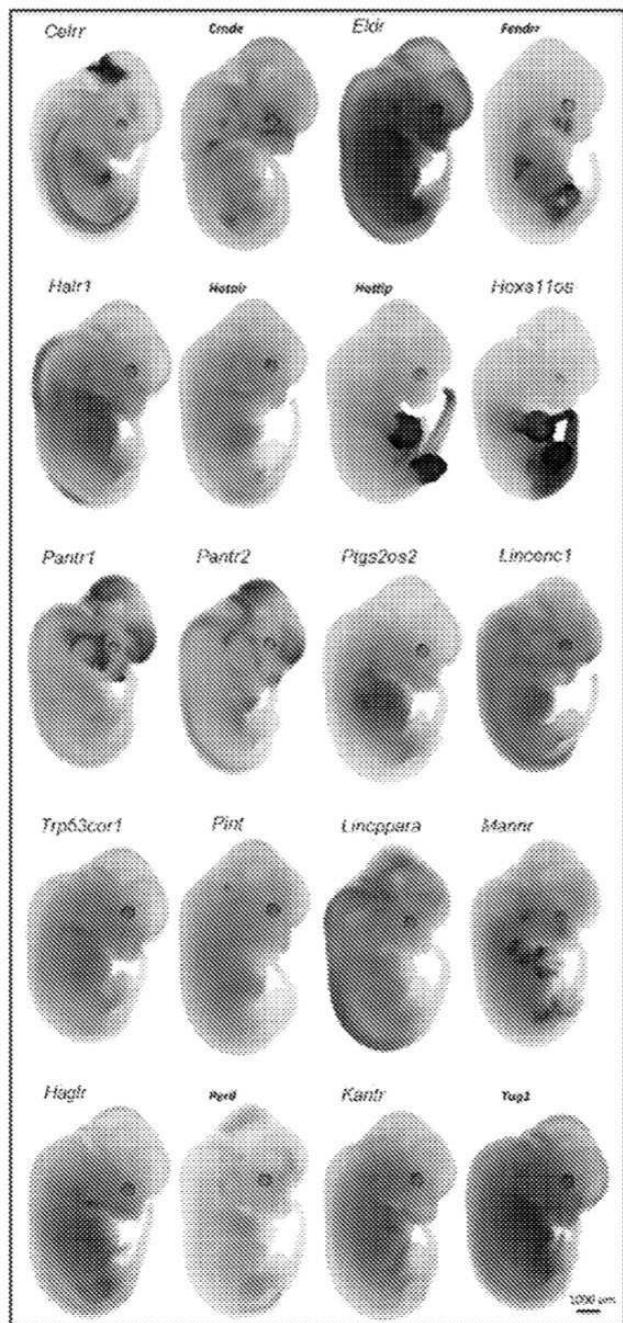
이 작업에서 시작하는 본 발명자들의 목적은 20개의 특정 lincRNA의 기능을 밝힐뿐만 아니라 부류로서 lincRNA의 일반적 특성의 더 양호한 이해를 얻는 것이다. 이 수집은 lincRNA 유전자 패밀리의 다수의 더 많은 구성원을 돌연변시키기 위한 더 큰 규모의 노력을 위한 종자로서 역할을 할 수 있었다. 다수의 lincRNA는 염색질 수준에서 전사의 조절에 참여하는 단백질과 관련되는 것으로 나타났다. 이는 전사후 수준에서의 조직 특이적 유전자 프로파일의 유지에서 miRNA의 상호작용과 매우 유사하게 유전자 발현에서 넓고, 일반적이며, 흔한 기능을 제시할 수 있었다. 그러나, 본 발명자들의 결과는 상이한 방향에서 지적하는 것으로 나타난다. 본 명세서 및 소바고(Sauvageau) 등(Sauvageau M, et al. (2013) *Elife* 2: e01749)에서 기재한 독특한 표현형 및 절묘하게 특이적인 발현 패턴은 lincRNA에 대한 특이적이고, 직접적이며 결정적인 기능을 주장한다. 인 연구는 단지 넉아웃 마우스의 이런 수집의 분석을 시작하고 있지만, 이는 단백질과 같이 포유류 내 매우 다수의 조직 및 기관의 배아 발생, 생리학 및 항상성에서 다양한 역할을 하는 새로운 부류의 기능적 암호화 분자로서의 lincRNA를 나타낸다.

도면

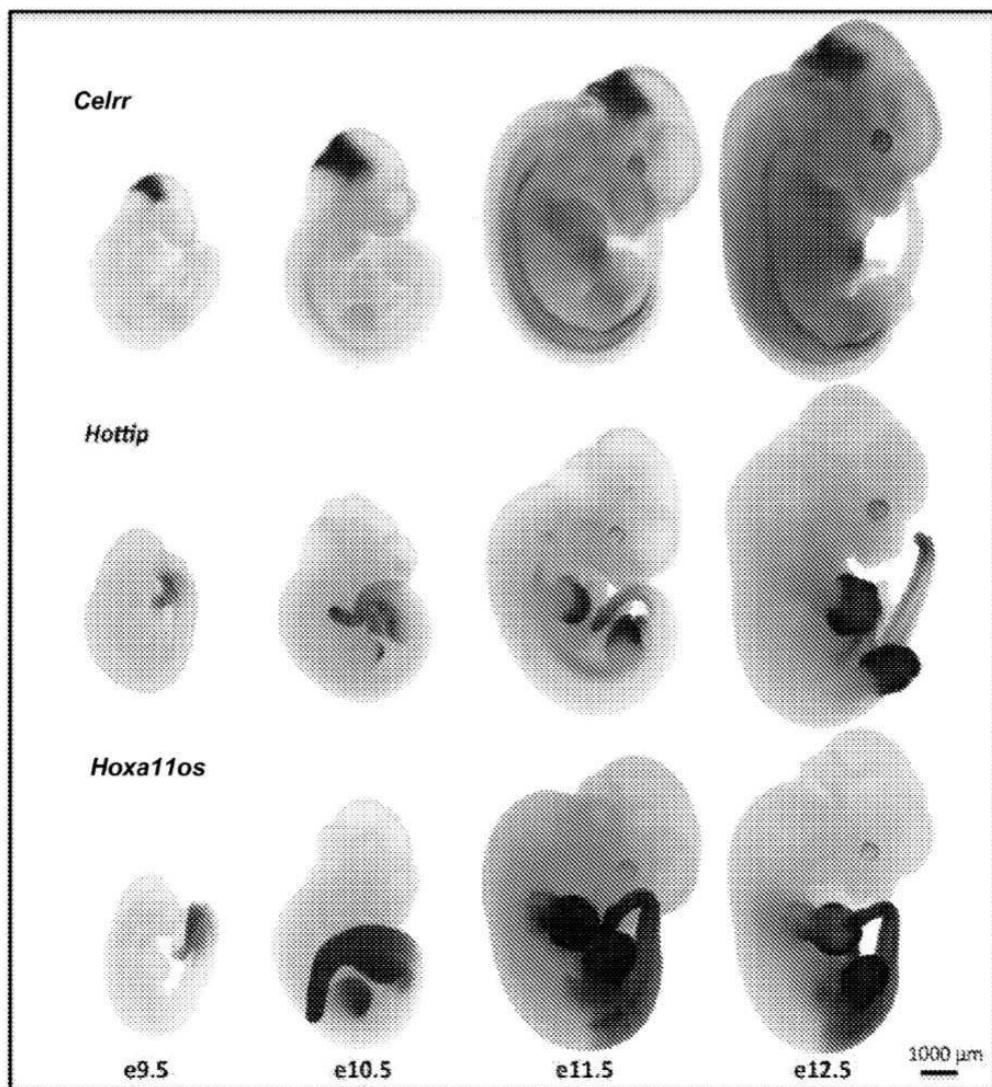
도면1



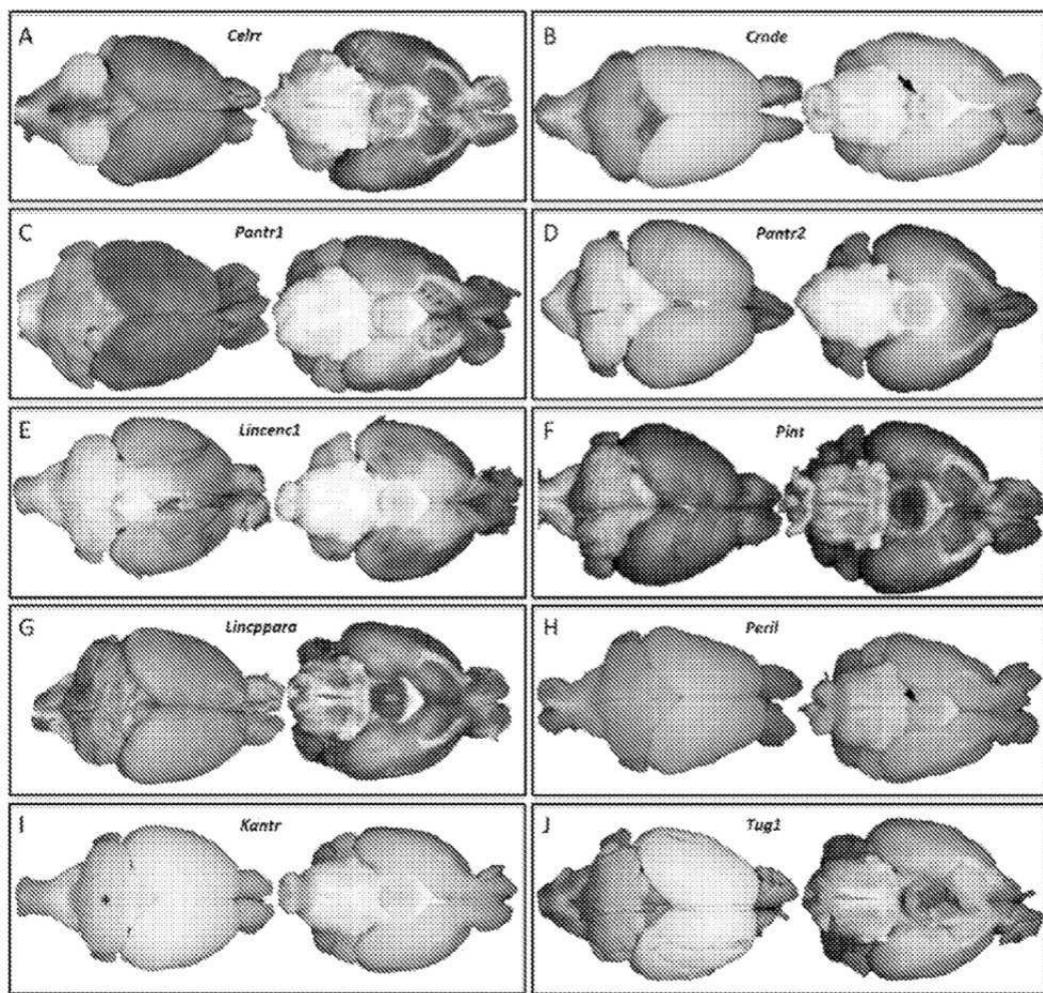
도면2a



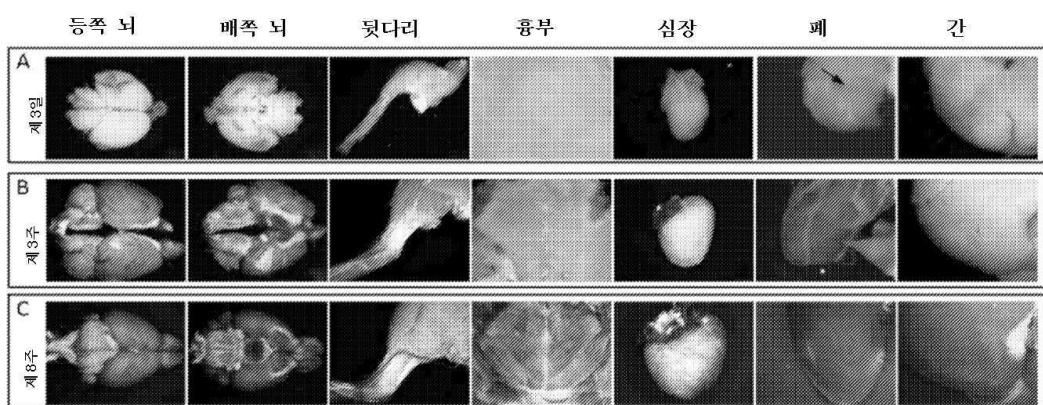
도면2b



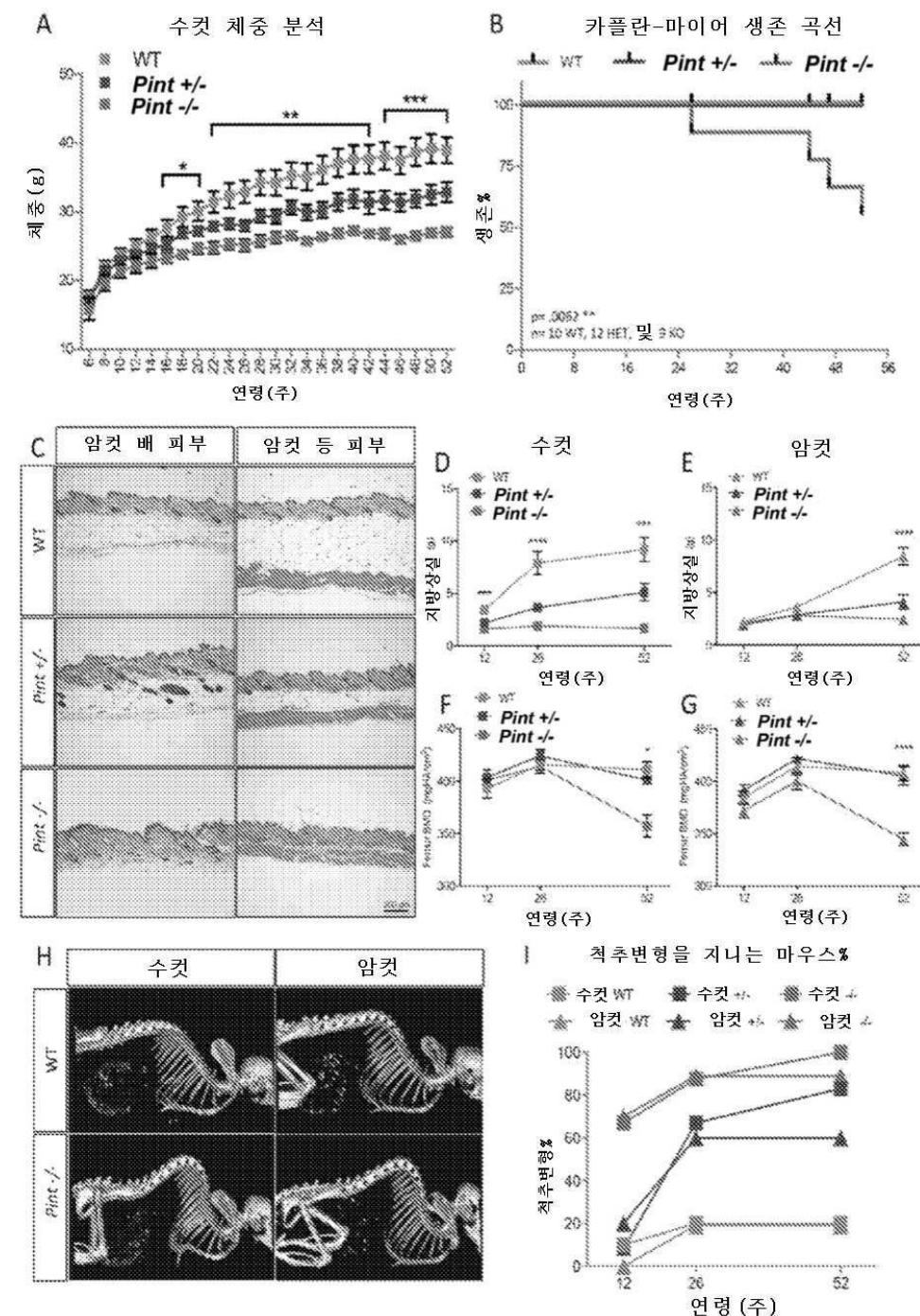
## 도면3



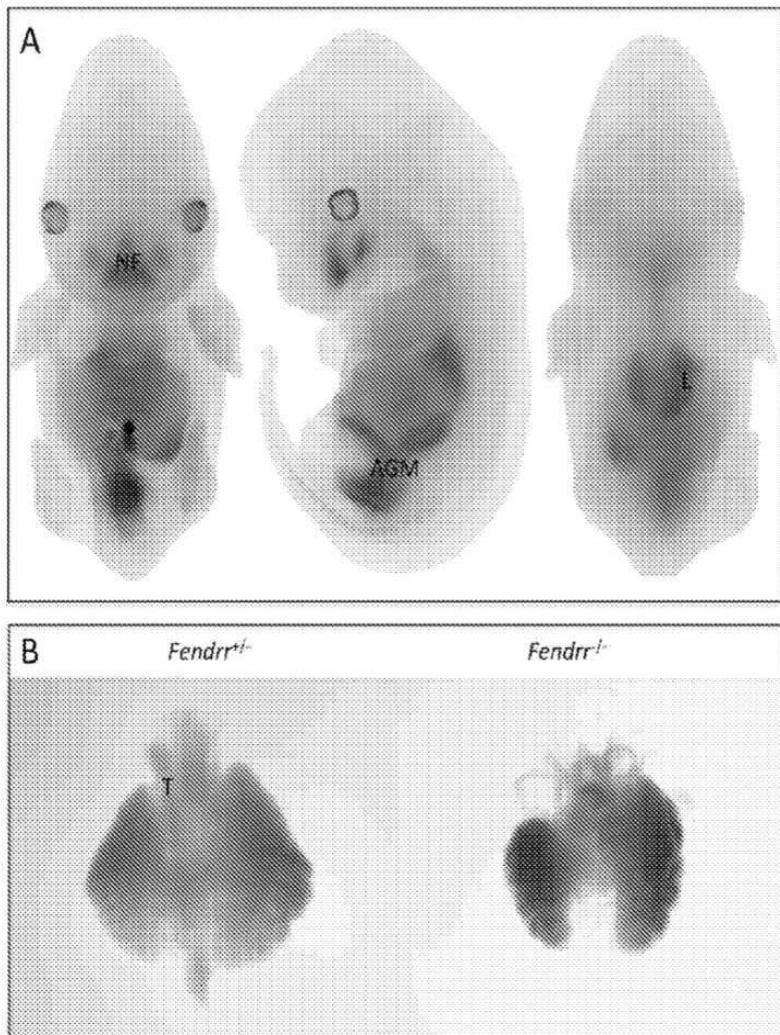
## 도면4



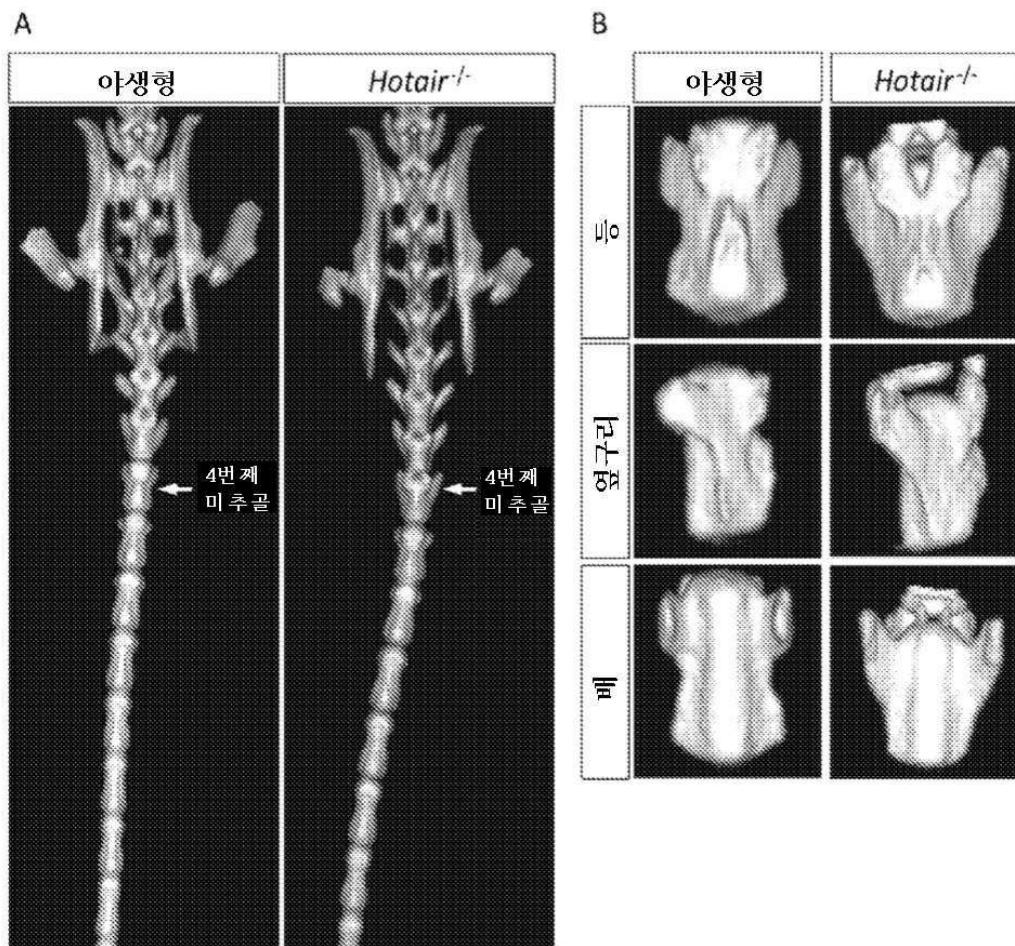
## 도면5



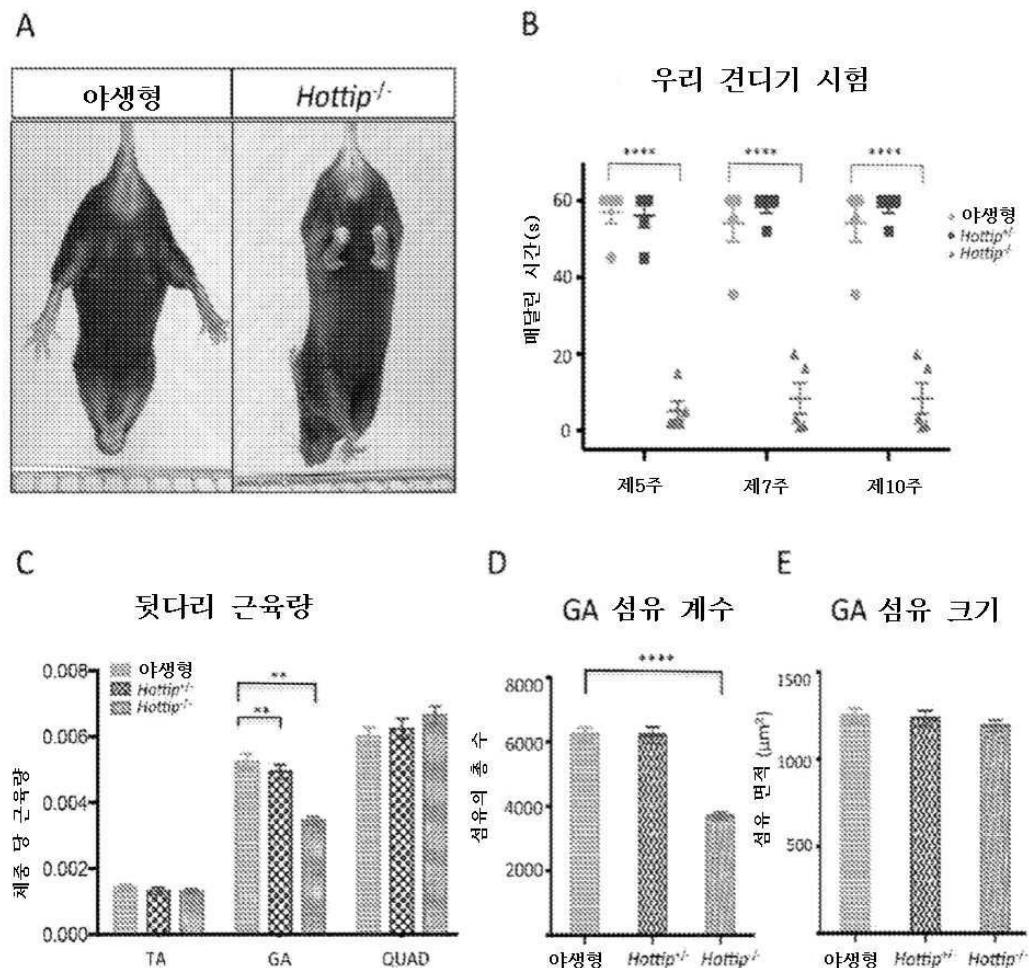
도면6



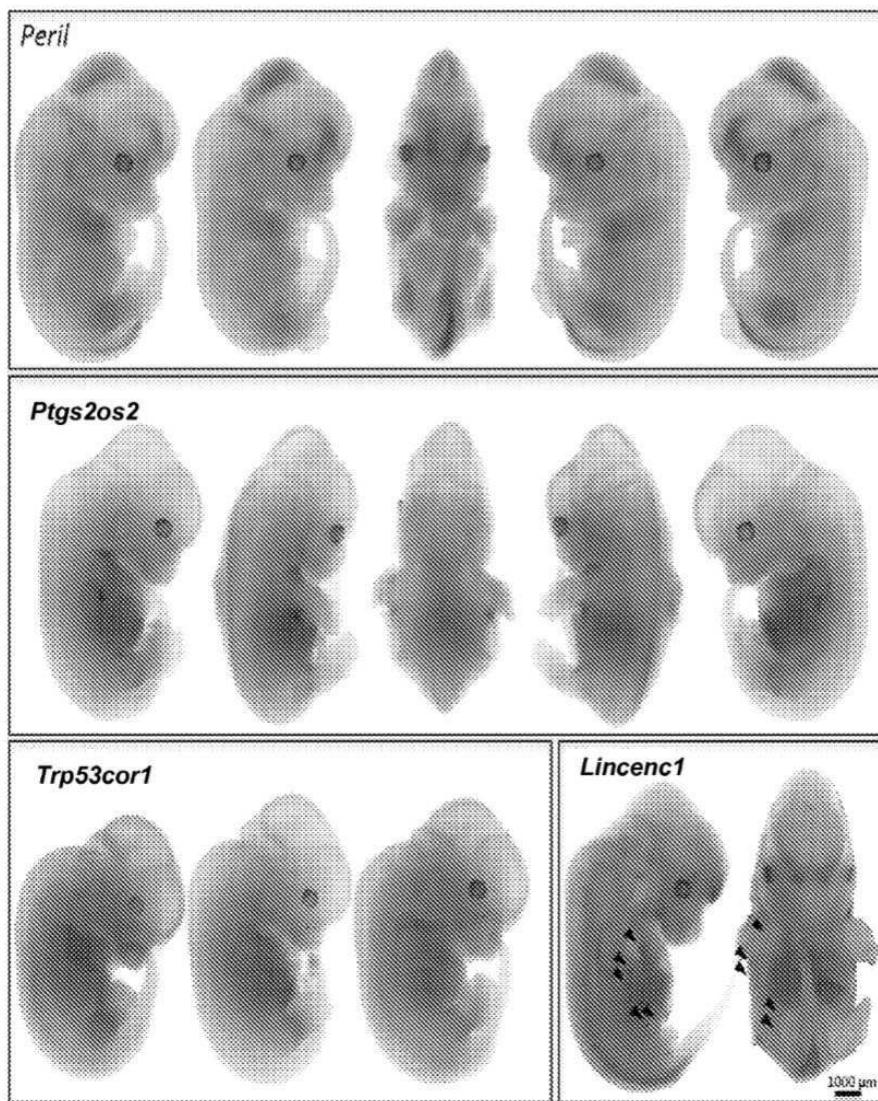
## 도면7



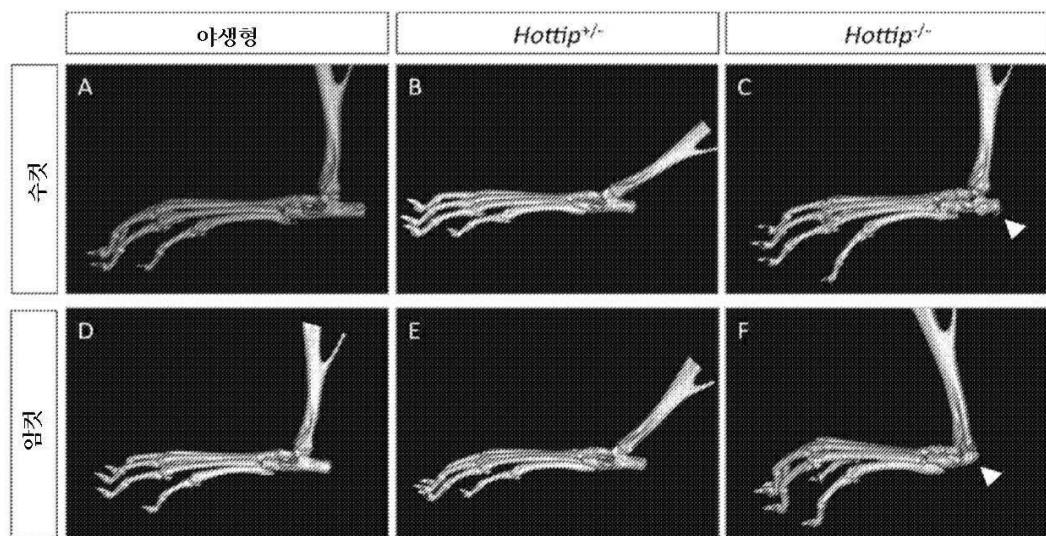
## 도면8



도면9



도면10



## 도면11

배아 및 성체 조직에서 <i>lacZ</i> 리포터 발현의 요약	배아	뇌	심장	폐	간	갈비뼈	비장	장	위	신장	비뇨생식기	뒷다리
<i>Celrr</i>	+	+				+						+
<i>Cmde</i>	+	+		+		+						+
<i>Eldr</i>	+											+
<i>Fendrr</i>	+			+								
<i>Hair1</i>	+				+							
<i>Hotair</i>	+											
<i>Hottip</i>	+						+			+		+
<i>Hoxe11os</i>	+					+	+		+	+		+
<i>Pantr1</i>	+	+				+			+			
<i>Pantr2</i>	+	+										
<i>Ptgs2os2</i>	+											
<i>lincencf1</i>	+	+										+
<i>Trp53cor1</i>	+											+
<i>Pint</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>lincppara</i>	+	+		+		+			+		+	+
<i>Mannr</i>	+				+							
<i>Haglr</i>	+											
<i>Peni</i>	+	+										
<i>Kantr</i>	+	+										
<i>Tug1</i>	+	+	+			+			+			

## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Lai, Ka-Man Venus

Gong, Guochun

Rinn, John

Frendewey, David

Valenzuela, David M.

&lt;120&gt; lincRNA-Deficient Non-Human Animals

&lt;130&gt; 57766-448071

&lt;150&gt; 61/863,147

&lt;151&gt; 2013-08-07

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 4.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 10

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Kozak consensus sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; 1, 4

&lt;223&gt; R is A or G

<400	
> 1	
rccrccatgg	10
<210> 2	
<211> 13	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Kozak consensus sequence	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> 7	
<223> R is A or G	
<400> 2	
gccgcccrrcca tgg	13

**【심사관 직권보정사항】**

**【직권보정 1】**

**【보정항목】** 청구범위

**【보정세부항목】** 청구항 14

**【변경전】**

제13 항에 있어서, 표현형은

- (a) 조로-관련 표현형;
- (b) 치사;
- (c) 폐 발달의 결함;
- (d) 골격 및/또는 근육 조직의 형태적 또는 기능적 기형;
- (e) 하나 이상의 조직에서 근육량의 손실;
- (f) 뇌 발생에서의 결함; 또는
- (g) 감염 또는 다른 염증 발작 결함; 또는
- (h) 상기 (a) 내지 (g)의 임의의 조합

인 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.

**【변경후】**

제13 항에 있어서, 표현형은

- (a) 조로-관련 표현형;
- (b) 치사;
- (c) 폐 발달의 결함;

- (d) 골격 및/또는 근육 조직의 형태적 또는 기능적 기형;
- (e) 하나 이상의 조직에서 근육량의 손실;
- (f) 뇌 발생에서의 결함;
- (g) 감염 또는 다른 염증 발작 결함; 또는
- (h) 상기 (a) 내지 (g)의 임의의 조합

인 것을 특징으로 하는 비-인간 동물.