(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0136508
(43) 공개일자 2020년12월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/8509 (2013.01)
A01K 67/0278 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7034258(분할)
(22) 출원일자(국제) 2014년04월16일
심사청구일자 2020년11월27일
(62) 원출원 특허 10-2015-7031609
원출원일자(국제) 2014년04월16일
심사청구일자 2019년04월08일
(85) 번역문제출일자 2020년11월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2014/034412
(87) 국제공개번호 WO 2014/172489
국제공개일자 2014년10월23일
(30) 우선권주장
61/812,319 2013년04월16일 미국(US)
61/914,768 2013년12월11일 미국(US)

(71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 울드 소우 밀 리버 로드 777
(72) 발명자
리 제프리 디.
미국 뉴욕 10025 뉴욕 웨스트 엔드 애비뉴 865 # 2에이
뮤지카 알렉산더 오.
미국 뉴욕 10523 엘름스포드 비버 힐 로드 42
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인와이에스장

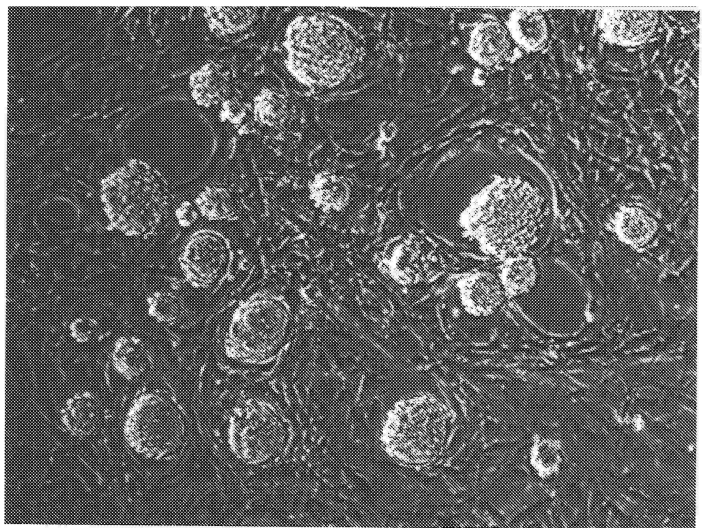
전체 청구항 수 : 총 79 항

(54) 발명의 명칭 **랫트 게놈의 표적화된 변형**

(57) 요 약

본원에 기재된 바와 같은 다양한 내인성 또는 외인성 핵산 서열을 포함하는 큰 표적 벡터 (LTVEC)를 사용하여 관심 랫트 유전자 좌위를 변형시키는 조성물 및 방법이 제공된다. 그것의 생식계열에서 1 이상의 표적화된 유전자 변형을 포함하는 유전적으로 변형된 랫트를 만들어내는 조성물 및 방법이 또한 제공된다. 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, 랫트 ApoE 좌위, 랫트 Rag2 좌위, 랫트 Rag1 좌위 및/또는 랫트 Rag2/Rag1 좌위에서 표적화된 유전자 변형을 포함하는 유전적으로 변형된 랫트 또는 랫트 세포를 포함하는 조성물 및 방법이 제공된다. 본원에서 제공된 다양한 방법 및 조성물은 이들 변형된 좌위가 생식계열을 통해 전해질 수 있도록 한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/03 (2013.01)
C12N 2015/8527 (2013.01)
(72) 발명자
아워바흐 보이테크
미국 뉴저지 07450 릿지우드 싸우스 플레즌트 애비뉴 320
라이 카-만 비너스
미국 뉴욕 10591 테리타운 웨스트 메인 스트리트 127 유닛 201
발렌주엘라 데이빗 엠.
미국 뉴욕 10598 요크타운 하이츠 지오다노 드라이브 529
얀코폴로스 죠지 디.
미국 뉴욕 10598 요크타운 하이츠 밥티스트 처치 로드 1519

명 세 서

청구범위

청구항 1

만능 랫트 세포 중 관심 유전자 좌위의 표적화된 변형 방법으로서,

(a) 상기 만능 랫트 세포에, 5' 랫트 상동성 아암 및 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 큰 표적 벡터 (LTVEC)을 도입하는 단계로서, 상기 상기 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 적어도 10 kb이지만 150kb 미만인 단계; 및

(b) 상기 관심 유전자 좌위에서 상기 표적화된 유전자 변형을 포함하는 유전적으로 변형된 만능 랫트 세포를 확인하는 단계를 포함하고,

상기 표적화된 유전자 변형은 생식계열을 통해 전달될 수 있는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 표적화된 유전자 변형은 2 개의 대립유전자인 방법.

청구항 3

청구항 1 또는 2에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 랫트 배아 줄기 (ES) 세포인 방법.

청구항 4

청구항 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 DA 균주 또는 ACI 균주로부터 유도되는 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 Dnmt3L, Eras, Err-베타, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF 수용체, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1, 또는 이들의 조합을 포함하는 적어도 하나의 만능분화능 마커의 발현을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 하기 특성 중 하나 이상을 특징으로 하는 방법:

(a) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음;

(b) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 중배엽 마커의 발현 없음;

(c) Gata6, Sox17 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현 없음; 또는

(d) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음.

청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 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 150kb인 방법.

청구항 8

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 약 16Kb 내지 약 150Kb인 방법.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 방법:

(a) 상동성 또는 이종상동성 핵산 서열에 의한 내인성 랫트 핵산 서열의 치환;

(b) 내인성 랫트 핵산 서열의 결실;

(c) 내인성 랫트 핵산 서열의 결실로서,

상기 결실은 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 또는 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 약 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 또는 약 2.5Mb 내지 약 3Mb 범위인 결실;

(d) 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb 범위의 외인성 핵산 서열;

(e) 상동성 또는 이종상동성 핵산 서열를 포함하는 외인성 핵산 서열;

(f) 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 키메라성 핵산 서열;

(g) 부위-특이적인 재조합효소 표적 서열로 플랭킹된 조건적 대립유전자; 또는

(h) 랫트 세포에서 프로모터 활성에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 유전자 좌위는 (i) 5' 랫트 상동성 아암에 대해 상보적인 제1 핵산 서열; 및 (ii) 3' 랫트 상동성 아암에 대해 상보적인 제2 핵산 서열을 포함하는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 제1 및 제2 핵산 서열은 적어도 5kb이지만 3Mb 미만까지 분리되는 방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서, 상기 제1 및 제2 핵산 서열은 적어도 5kb이지만 10kb 미만, 적어도 10kb이지만 20kb 미만, 적어도 20kb이지만 40kb 미만, 적어도 40kb이지만 60kb 미만, 적어도 60kb이지만 80kb 미만, 적어도 약 80kb이지만 100kb 미만, 적어도 100kb이지만 150kb 미만, 또는 적어도 150kb이지만 200kb 미만, 적어도 약 200kb이지만 약 300kb 미만, 적어도 약 300kb이지만 약 400kb 미만, 적어도 약 400kb이지만 약 500kb 미만, 적어도 약 500kb이지만 약 1Mb 미만, 적어도 약 1Mb이지만 약 1.5Mb 미만, 적어도 약 1.5Mb이지만 약 2Mb 미만, 적어도 약 2Mb이지만 약 2.5Mb 미만, 또는 적어도 약 2.5Mb이지만 약 3Mb 미만까지 분리되는 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 도입은 추가로, 만능 랫트 세포에서 표적화 작제물과 관심 유전자 좌위 사이의 상동 재조합을 촉진하는 뉴클레아제를 인코딩하는 제2 핵산을 도입하는 것을 포함하는 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 뉴클레아제는 하기를 포함하는 방법:

(a) FokI 엔도뉴클레아제에 융합된 아연 핑거-기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라성 단백질; 또는,

(b) FokI 엔도뉴클레아제에 융합된 전사 활성제-유사 효과기 뉴클레아제 (TALEN)을 포함하는 키메라성 단백질.

청구항 15

청구항 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 도입은 추가로, 만능 랫트 세포에 하기:

(i) 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR)-연관된 (Cas) 단백질를 인코딩하는 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 제1 발현 작제물,

(ii) RNA (gRNA)를 안내하기 위해 연결된 게놈 표적 서열에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 제2 발현 작제물을 도입하는 것을 포함하고,

상기 게놈 표적 서열은 프로토스페이서 인접한 모티프 (PAM) 서열에 의해 3' 말단 상에 즉시 플랭킹되는 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 관심 유전자 좌위는 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

청구항 17

청구항 15 또는 16에 있어서, 상기 gRNA는 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR) RNA (crRNA) 및 트랜스-활성화 CRISPR RNA (tracrRNA)을 인코딩하는 제3 핵산 서열을 포함하는 방법.

청구항 18

청구항 15, 16 또는 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 Cas9인 방법.

청구항 19

청구항 15, 16, 17, 또는 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 gRNA은 하기를 포함하는 방법:

(a) 하기의 핵산 서열의 키메라성 RNA: 서열번호: 2; 또는,

(b) 하기의 핵산 서열의 키메라성 RNA: 서열번호: 3.

청구항 20

청구항 17에 있어서, 상기 crRNA는 서열번호: 4; 서열번호: 5; 또는 서열번호: 6을 포함하는 방법.

청구항 21

청구항 17에 있어서, 상기 tracrRNA는 서열번호: 7 또는 서열번호: 8을 포함하는 방법.

청구항 22

하기를 포함하는 변형된 랫트 유전자 좌위로서,

(i) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열의 삽입;

(ii) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 내인성 랫트 핵산 서열의 치환; 또는

(iii) 이들의 조합을 포함하고,

상기 변형된 랫트 유전자 좌위는 생식계열을 통해 전달될 수 있는, 변형된 랫트 유전자 좌위.

청구항 23

청구항 22에 있어서, 상기 삽입 또는 치환의 크기는 약 5kb 내지 약 400kb인 변형된 랫트 유전자 좌위.

청구항 24

청구항 22에 있어서, 상기 삽입 또는 치환의 크기는 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb인 랫트 유전자 좌위.

청구항 25

인간화된 랫트를 만드는 방법으로서, 상기 방법은,

(a) 만능 랫트 세포 중 관심 유전자 좌위를 인간 핵산을 포함하는 표적화 작제물로 표적화하여 유전적으로 변형

된 만능 랫트 세포를 형성하는 단계;

(b) 상기 유전적으로 변형된 만능 랫트 세포를 숙주 랫트 배아에 도입하는 단계; 및

(c) 대리모에서 상기 숙주 랫트 배아를 잉태하는 단계로서; 상기 대리모는 하기를 포함하는 변형된 유전자 좌위를 포함하는 랫트 자손을 생산하는 단계:

(i) 인간 핵산 서열의 삽입;

(ii) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 관심 유전자 좌위에 있는 랫트 핵산 서열의 치환;

(iii) 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 키메라성 핵산 서열; 또는

(iv) 이들의 조합을 포함하고,

상기 변형된 유전자 좌위는 생식계열을 통해 전달될 수 있는 방법.

청구항 26

청구항 25에 있어서, 상기 표적화 작제물은 큰 표적 벡터 (LTVEC)이고, 그리고 상기 LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 적어도 10 kb이지만 150kb 미만인 방법.

청구항 27

청구항 26에 있어서, 상기 표적화 작제물의 5' 및 3' 상동의 총계는 약 10kb 내지 약 30kb, 약 20kb 내지 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 또는 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 120kb, 또는 약 120kb 내지 150kb인 방법.

청구항 28

청구항 25, 26 또는 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 핵산 서열은 적어도 5kb이지만 400kb 미만인 방법.

청구항 29

청구항 25, 26, 또는 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 핵산 서열은 적어도 5kb이지만 10kb 미만, 적어도 10kb이지만 20kb 미만, 적어도 20kb이지만 40kb 미만, 적어도 40kb이지만 60kb 미만, 적어도 60kb이지만 80kb 미만, 적어도 약 80kb이지만 100kb 미만, 적어도 100kb이지만 150kb 미만, 적어도 150kb이지만 200kb 미만, 적어도 200kb이지만 250kb 미만, 적어도 250kb이지만 300kb 미만, 적어도 300kb이지만 350kb 미만, 또는 적어도 350kb이지만 400kb 미만인 방법.

청구항 30

청구항 25 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 랫트 배아 줄기 (ES) 세포인 방법.

청구항 31

청구항 25 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 DA 균주 또는 ACI 균주로부터 유도되는 방법.

청구항 32

청구항 25 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 Dnmt3L, Eras, Err-베타, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF 수용체, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1, 또는 이들의 조합을 포함하는 적어도 하나의 만능분화능 마커의 발현을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

청구항 25 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 하기 특징 중 하나 이상을 특징으로 방법:

(a) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음;

(b) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 1 이상 중배엽 마커의 발현 없음;

(c) Gata6, Sox17, 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현의 없음; 또는

(d) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음.

청구항 34

인간화된 유전자 좌위를 포함하는 변형된 랫트로서, 상기 인간화된 유전자 좌위은 하기:

(i) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열의 삽입;

(ii) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 내인성 유전자 좌위에 있는 랫트 핵산 서열의 치환;

(iii) 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 키메라성 핵산 서열, 또는

(iv) 이들의 조합을 포함하고,

상기 인간화된 유전자 좌위는 생식계열을 통해 전달될 수 있는 변형된 랫트.

청구항 35

그것의 유전자 좌위에서, 표적화된 유전자 변형을 포함하는 랫트 또는 랫트 세포로서,

상기 유전자 좌위는 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, ApoE 좌위, Rag1 좌위, Rag2 좌위, 또는 Rag2/Rag1 좌위이고,

상기 표적화된 유전자 변형은 하기:

(a) 유전자 좌위에서 내인성 랫트 핵산 서열의 결실;

(b) 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 상동 핵산, 이종상동성 핵산, 또는 키메라성 핵산의 삽입, 또는

(c) 이들의 조합을 포함하고,

상기 표적화된 유전자 변형은 랫트, 또는 랫트 세포로부터 전파된 랫트의 생식계열을 통해 전달가능한 랫트 또는 랫트 세포.

청구항 36

청구항 35에 있어서,

(a) 상기 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산의 결실은 적어도 약 10kb이거나; 또는,

(b) 상기 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산의 결실은 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 또는 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 약 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 또는 약 2.5Mb 내지 약 3Mb이고;

(c) 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 적어도 약 5 kb이거나; 또는,

(d) 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb인 랫트 또는 랫트 세포.

청구항 37

청구항 35 또는 36에 있어서,

(a) 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 인터루킨-2 수용체 감마 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고;

(b) 상기 ApoE 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 ApoE 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고;

(c) 상기 Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag1 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고;

(d) 상기 Rag2 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag2 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되거나; 또는,

(e) 상기 Rag2/Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag2 단백질 활성 및 Rag1 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되는 랫트 또는 랫트 세포.

청구항 38

청구항 35, 36, 또는 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 랫트 또는 랫트 세포:

(a) 전체 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실;

(b) 인간 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분에 의한 전체 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분의 치환;

(c) 인간 인터루킨-2 수용체 감마의 엑토-도메인에 의한 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역의 엑토-도메인의 치환; 또는,

(d) 인터루킨-2 수용체 감마 좌위의 적어도 3 kb 결실.

청구항 39

청구항 35 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ApoE 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 랫트 또는 랫트 세포:

(a) 전체 ApoE 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는,

(b) ApoE 코딩 영역을 포함하는 ApoE 좌위의 적어도 1.8 kb 결실.

청구항 40

청구항 35 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Rag2 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 랫트 또는 랫트 세포:

(a) 전체 Rag2 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실;

(b) Rag2 코딩 영역을 포함하는 Rag2 좌위의 적어도 5.7 kb 결실.

청구항 41

청구항 35 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Rag2/Rag1 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 랫트 또는 랫트 세포:

(a) 전체 Rag2 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실 및 전체 Rag1 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는,

(d) Rag2 코딩 영역을 포함하는 Rag2/Rag1 좌위의 적어도 16 kb의 결실.

청구항 42

청구항 35 내지 41 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화된 유전자 변형은 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, ApoE 좌위, Rag1 좌위, Rag2 좌위, 또는 Rag2/Rag1 좌위에서 선택적 마커를 포함하는 발현 카세트의 삽입을 포함하는 랫트 또는 랫트.

청구항 43

청구항 42에 있어서, 상기 발현 카세트는 유전자 좌위에서 내인성 프로모터에 작동가능하게 연결된 lacZ 유전자 및 선택적 마커에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 포함하는 랫트 또는 랫트 세포.

청구항 44

청구항 35 내지 43 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, ApoE 좌위, Rag1 좌위, Rag2 좌위 또는 Rag2/Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 자가-결실 선택 카세트의 삽입을 포함하는 랫트 또는

랫트 세포.

청구항 45

청구항 44에 있어서, 상기 자가-결실 선택 카세트는 랫트 세포에서 프로모터 활성에 작동가능하게 연결된 선택적 마커 유전자 및 수컷 생식 세포 특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 재조합효소 유전자를 포함하고, 상기 자가-결실 카세트는 재조합효소에 의해 인식된 재조합 인식 부위에 의해 플랭킹되는 랫트 또는 랫트 세포.

청구항 46

청구항 45에 있어서,

(a) 상기 수컷 생식 세포 특이적 프로모터는 프로타민-1 프로모터이거나; 또는,

(b) 상기 재조합효소 유전자는 Cre를 인코딩하고, 상기 재조합 인식 부위는 loxP 부위인 랫트 또는 랫트 세포.

청구항 47

청구항 35 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 내인성 인터루킨-2 수용체 감마 프로모터, 내인성 ApoE 프로모터, 내인성 Rag1 프로모터, 또는 내인성 Rag2 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 핵산을 포함하는 랫트 또는 랫트 세포.

청구항 48

청구항 47에 있어서, 상기 리포터 핵산은 하기를 포함하는 리포터를 인코딩하는 랫트 또는 랫트 세포: β-갈락토시다아제, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, 증대된 황색 형광성 단백질 (EYFP), 에메랄드, 증대된 녹색 형광 단백질 (EGFP), CyPet, 청록색 형광 단백질 (CFP), 셀루리안, T-사파이어, 루시퍼라아제, 알칼리성 포스파타제, 또는 이들의 조합.

청구항 49

청구항 35 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 랫트 세포는 만능 랫트 세포 또는 랫트 배아 줄기 (ES) 세포인 랫트 세포.

청구항 50

청구항 49에 있어서, 상기 만능 랫트 세포 또는 상기 랫트 배아 줄기 (ES) 세포는,

(a) DA 균주 또는 ACI 균주로부터 유도되고;

(b) Dnmt3L, Eras, Err-베타, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF 수용체, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1, 또는 이들의 조합을 포함하는 적어도 하나의 만능분화능 마커의 발현을 특징으로 하거나; 또는

(c) 하기 특성 중 하나 이상을 특징으로 하는 방법:

(i) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음;

(ii) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 중배엽 마커의 발현 없음;

(iii) Gata6, Sox17 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현 없음; 또는

(iv) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음.

청구항 51

만능 랫트 세포에서 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, ApoE 좌위, Rag1 좌위, Rag2 좌위 또는 Rag2/Rag1 좌위 중 표적 유전자 좌위를 변형시키는 방법으로서, 상기 방법은,

(a) 상기 만능 랫트 세포에 표적 유전자 좌위와 상동인 5' 및 3' 랫트 상동 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터를 도입하는 단계,

(b) 표적 유전자 좌위에서 표적화된 유전자 변형을 포함하는 유전적으로 변형된 만능 랫트 세포를 확인하는 단계를 포함하고,

상기 표적화된 유전자 변형은 만능 랫트 세포로부터 전파된 랫트의 생식계열을 통해 전달될 수 있는 방법.

청구항 52

청구항 51에 있어서, 상기 표적화 벡터는 큰 표적 벡터 (LTVEC)이고, 상기 5' 및 3' 랫트 상동성 아암의 총계는 적어도 약 10kb이지만, 약 150kb 미만인 방법.

청구항 53

청구항 51 또는 52에 있어서, 표적화 벡터의 만능 랫트 세포로의 도입은 하기를 초래하는 방법: (i) 표적 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산 서열의 결실; (ii) 표적 유전자 좌위에서의 외인성 핵산 서열의 서열; 또는 (iii) 이들의 조합.

청구항 54

청구항 53에 있어서,

(a) 상기 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산의 결실은 적어도 약 10 kb이거나; 또는,

(b) 상기 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산의 결실은 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 또는 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 약 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 또는 약 2.5Mb 내지 약 3Mb이고;

(c) 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 적어도 약 5 kb이거나; 또는,

(d) 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb인 방법.

청구항 55

청구항 51 내지 54 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 인터루킨-2 수용체 감마 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고;

(b) 상기 ApoE 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 ApoE 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고;

(c) 상기 Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag1 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고;

(d) 상기 Rag2 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag2 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되거나; 또는,

(e) 상기 Rag2/Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag2 단백질 활성 및 i Rag1 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되는 방법.

청구항 56

청구항 51 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 방법:

(a) 전체 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실;

(b) 인간 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분에 의한 전체 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분의 치환;

(c) 인간 인터루킨-2 수용체 감마의 엑토-도메인에 의한 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역의 엑토-도메인의 치환; 또는,

(d) 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역을 포함하는 인터루킨-2 수용체 감마 좌위의 적어도 3 kb 결실.

청구항 57

청구항 51 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ApoE 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 방법:

(a) 전체 ApoE 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는,

(b) ApoE 코딩 영역을 포함하는 ApoE 좌위의 적어도 1.8 kb 결실.

청구항 58

청구항 51 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Rag2 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 방법:

(a) 전체 Rag2 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는,

(b) Rag2 코딩 영역을 포함하는 Rag2 좌위의 적어도 5.7 kb 결실.

청구항 59

청구항 51 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Rag1/Rag2 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 방법:

(a) 전체 Rag2 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실 및 전체 Rag1 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는,

(b) Rag2 및 Rag1 코딩 영역을 포함하는 Rag2/Rag1 좌위의 적어도 16 kb의 결실.

청구항 60

청구항 51 내지 59 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입 핵산은 선택적 마커를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 방법.

청구항 61

청구항 60에 있어서, 상기 발현 카세트는 유전자 좌위에서 내인성 프로모터에 작동가능하게 연결된 lacZ 유전자 및 선택적 마커 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 포함하는 방법.

청구항 62

청구항 51 내지 60 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입 핵산은 자가-결실 선택 카세트를 포함하는 방법.

청구항 63

청구항 62에 있어서, 상기 자가-결실 선택 카세트 랫트 만능 세포에서 프로모터 활성에 작동가능하게 연결된 선택적 마커 및 수컷 생식 세포 특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 재조합효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 자가-결실 카세트는 재조합효소에 의해 인식된 재조합 인식 부위에 의해 플랭킹되는 방법.

청구항 64

청구항 63에 있어서,

(a) 상기 수컷 생식 세포 특이적 프로모터는 프로타민-1 프로모터이거나; 또는,

(b) 상기 재조합효소 유전자는 Cre을 인코딩하고 상기 재조합 인식 부위는 loxP 부위인 방법.

청구항 65

청구항 53에 있어서, 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 내인성 인터루킨-2 수용체 감마 프로모터, 내인성 ApoE 프로모터, 내인성 Rag1 프로모터, 또는 내인성 Rag2 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 핵산 서열을 포함하는 방법.

청구항 66

청구항 65에 있어서, 상기 리포터 핵산 서열은 하기를 포함하는 리포터를 인코딩하는 방법: β-갈락토시다아제, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, 증대된 황색 형광성 단백질 (EYFP), 에메랄드, 증대된 녹색 형광 단백질 (EGFP), CyPet, 청록색 형광 단백질 (CFP), 셀루리안, T-사파이어, 루시퍼라아제, 알칼리성 포스파타제, 또는 이들의 조합.

청구항 67

청구항 51 내지 66 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 랫트 배아 줄기 (ES) 세포인 방법.

청구항 68

청구항 51 내지 67 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는,

(a) DA 균주 또는 ACI 균주로부터 유도되거나; 또는,

(b) Oct-4, Sox-2, 알칼리성 포스파타제, 또는 이들의 조합을 포함하는 만능분화능 마커의 발현을 특징으로 하거나; 또는,

(c) 하기 특성 중 하나 이상을 특징으로 하는 방법:

(i) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음;

(ii) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 중배엽 마커의 발현 없음;

(iii) Gata6, Sox17 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현 없음; 또는

(iv) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음.

청구항 69

청구항 51 내지 68 중 어느 한 항에 있어서, 표적 유전자 좌위에서 표적화된 유전자 변형을 확인하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 확인 단계는 표적 유전자 좌위에서 대립유전자 (MOA)의 변형을 평가하는 정량적 검정을 이용하는 방법.

청구항 70

청구항 51 내지 69 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 도입은 추가로, 만능 랫트 세포에서 표적화 벡터와 표적 유전자 좌위 사이의 상동 재조합을 촉진하는 뉴클레아제를 인코딩하는 제2 핵산을 포함하는 방법.

청구항 71

청구항 70에 있어서, 상기 뉴클레아제는 FokI 엔도뉴클레아제에 융합된 아연 핑거-기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라성 단백질을 포함하는 방법.

청구항 72

청구항 71에 있어서, 상기 방법은 표적 유전자 좌위의 2 개의 대립유전자 변형을 생기게 하는 방법.

청구항 73

청구항 51 내지 70 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 도입은 추가로, 만능 랫트 세포에 하기:

(i) 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR)-연관된 (Cas) 단백질를 인코딩하는 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 제1 발현 작제물,

(ii) RNA (gRNA)를 안내하기 위해 연결된 게놈 표적 서열에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 제2 발현 작제물을 도입하는 것을 포함하고,

상기 게놈 표적 서열은 프로토스페이서 인접한 모티프 (PAM) 서열에 의해 3' 말단 상에 즉시 플랭킹되는 방법.

청구항 74

청구항 73, 상기 관심 유전자 좌위는 서열번호: 1의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법.

청구항 75

청구항 73 또는 74에 있어서, 상기 gRNA는 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR) RNA (crRNA) 및 트랜스-활성화 CRISPR RNA (tracrRNA)을 인코딩하는 제3 핵산 서열을 포함하는 방법.

청구항 76

청구항 73에 있어서, 상기 Cas 단백질은 Cas9인 방법.

청구항 77

청구항 73, 74, 또는 75 중 어느 한 항에 있어서, 상기 gRNA은 하기를 포함하는 방법:

(a) 하기의 핵산 서열의 키메라성 RNA: 서열번호: 2; 또는,

(b) 하기의 핵산 서열의 키메라성 RNA: 서열번호: 3.

청구항 78

청구항 75에 있어서, 상기 crRNA는 서열번호: 4; 서열번호: 5; 또는 서열번호: 6을 포함하는 방법.

청구항 79

청구항 75에 있어서, 상기 tracrRNA는 서열번호: 7 또는 서열번호: 8을 포함하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] EFS 웹을 통한 텍스트 파일로서 제출된 서열 목록 참조

[0002] 서열 목록의 공식 사본은 2014년 4월 16일자로 작성되고 15킬로바이트의 크기를 가지며 본원 명세서와 함께 제출된, 파일명 444701SEQLIST.TXT의 ASCII 포맷된 서열 목록으로서 EFS-웹을 통해 전자적으로 제출되었다. 상기 ASCII 포맷된 서류에 포함된 서열 목록은 본원 명세서의 일부이고 이의 전체가 본원에 참조로 인용된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] *시험관내* 하나 이상의 일련의 유전자 변형 후 만능성을 지속할 수 있고 상기 표적화된 변형을 생식선을 통해 후속 세대로 전달할 수 있는 단리된 비-인간 분화전능 또는 만능 줄기 세포, 특히 랫트 배아 줄기 세포. 원핵 세포에서 세균 상동성 재조합(BHR)을 통해 목적하는 랫트 게놈 유전자 좌위를 변형시키기 위한 조성물 및 방법. 엔도뉴클레아제와 조합하여 대형 표적화 벡터(LTVEC)를 사용하는 목적하는 랫트 게놈 유전자 좌위를 유전학적으로 변형시키기 위한 조성물 및 방법. 하나 이상의 표적화된 유전학적 변형을 포함하는 유전학적으로 변형된 랫트를 제조하기 위한 조성물 및 방법.

배 경 기 술

[0005] 랫트는 심혈관 질환 (*예를 들어*, 고혈압), 대사적 질환 (*예를 들어*, 비만, 당뇨병), 신경학적 질환 (*예를 들어*, 통증 병리학), 및 다양한 암을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 인간 질환의 병리학을 나타낼 수 있는 중요한 동물 모델 시스템으로서 간주되어 왔지만, 인간 질환을 모델링하는데 있어서 랫트의 용도는 *시험관내* 일련의 유전학적 변형, *예를 들어* 하나 이상의 일련의 전기천공 후 이들의 만능성을 지속할 수 있는 부분적으로 생식선-전달가능한 만능 랫트 세포의 비가용성, 및 부분적으로 대형 게놈 DNA 서열의 도입 또는 결실을 가능하게 하거나 만능 랫트 세포에서 대형 내인성 게놈 DNA 서열의 외인성 핵산 서열로의 치환를 가능하게 하는 효율적인 표적화 기술의 부재로 인해 마우스와 비교하여 제한되어 있었다.

[0006] 본 기술 분야에서는 현재 분야의 표적 발견을 가능하게 하거나 확장할 수 있고 보다 신속하고 용이하게 치료학적 제제를 입증할 수 있는, 랫트의 게놈내 정확하게 표적화된 변화를 가능하게 하는 조성물 및 방법이 요구된다.

발명의 내용

[0007] 표적화된 유전자 변형을 통해 만능 세포에서 관심 유전자 좌위를 변형시키는 방법이 제공된다. 그와 같은 방법

은 (a) 상기 만능 세포에 5' 상동성 아암 및 3' 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 큰 표적 벡터(LTVEC)을 도입하는 단계; 및 (b) 관심 유전자 좌위에서, 표적화된 유전자 변형을 포함하는 유전적으로 변형된 만능 세포를 확인하는 단계를 포함하고, 상기 표적화된 유전자 변형은 생식계열을 통해 전달될 수 있다.

[0008] 일 구현예에서, 만능 세포는 비-인간 동물로부터 유도되고, 이 동물은, 비제한적으로, 하기를 포함한다: 설치류, 인간, 랫트, 마우스, 햄스터, 토끼, 돼지, 소, 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 흰담비, 영장류 (예를 들면, 마모셋, 붉은털원숭이), 사육된 포유동물 또는 농업적 포유동물, 또는 관심의 임의의 다른 유기체.

[0009] 하나의 구현예에서, 만능 세포는 비-인간 만능 세포이다. 하나의 구현예에서, 비-인간 만능 세포는 포유동물 만능 세포이다. 일 구현예에서, 포유동물 만능 세포는 설치류 만능 세포이다. 일 구현예에서, 설치류 만능 세포는 랫트 또는 마우스 만능 세포이다. 하나의 구현예에서, 만능 세포는 인간 유도된 만능 줄기(iPS) 세포이다.

[0010] 하나의 구현예에서, 만능 세포는 단일 세포 단계에서 비-인간 수정란이다. 하나의 구현예에서, 비-인간 수정란은 포유동물 수정란이다. 하나의 구현예에서, 포유동물 수정란은 단일 세포 단계에서 설치류 수정란이다. 하나의 구현예에서, 포유동물 수정란은 단일 세포 단계에서 랫트 또는 마우스 수정란이다.

[0011] 일부 구현예에서, LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 적어도 10 kb이다. 일부 구현예에서, LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 적어도 10 kb이지만 100kb 미만이거나 LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 적어도 10 kb이지만 150kb 미만이다. 다른 구현예에서, LTVEC의 총 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 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. 하나의 구현예에서, 결실 크기는 LTVEC의 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 크기와 동일하거나 유사하다.

[0012] 일부 그와 같은 구현예에서, 표적화된 유전자 변형은 2 개의 대립유전자이다.

[0013] 일부 구현예에서, 만능 세포는 만능 랫트 세포이다. 일 구현예에서, 만능 랫트 세포는 랫트 배아 줄기 세포이다. 일 구현예에서, 만능 랫트 세포는 DA 균주 또는 ACI 균주로부터 유도된다. 일부 구현예에서, 만능 랫트 세포는 Dnmt3L, Eras, Err-베타, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF 수용체, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1, 또는 이들의 조합을 포함하는 적어도 하나의 만능분화능 마커의 발현을 특징으로 한다. 일부 그와 같은 방법에서, 만능 랫트 세포는 하기 특성 중 하나 이상을 특징으로 한다: (a) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음; (b) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 중배엽 마커의 발현 없음; (c) Gata6, Sox17 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현 없음; 또는 (d) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음. 그와 같은 방법은, LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계가 약 10kb 내지 약 30kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 또는 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 120kb, 약 120kb 내지 약 150kb, 또는 약 10 kb이지만 약 150kb 미만인 것을 제공한다. 일부 구현예에서, LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 약 16Kb 내지 약 100Kb이다. 다른 구현예에서, LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계의 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, 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. 하나의 구현예에서, 결실 크기는 LTVEC의 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 크기와 동일하거나 유사하다.

[0014] 본 방법은 추가로, 표적화된 유전자 변형아 (a) 내인성 랫트 핵산 서열의 상동성 또는 이종상동성 포유동물 핵산 서열에 의한 치환을 포함하고; (b) 내인성 랫트 핵산 서열의 결실을 포함하고; (c) 내인성 랫트 핵산 서열의 결실을 포함하고, 상기 결실은 그 범위가 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 또는 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 약 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 또는 약 2.5Mb 내지 약 3Mb이고; (d) 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지

약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb 범위의 외이성 핵산을 포함하고; (e) 상동성 또는 이종상동성 핵산 서열를 포함하는 외인성 핵산 서열을 포함하고; (f) 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 키메라성 핵산 서열을 포함하고; (g) 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb인 것을 제공한다. (h) 부위-특이적인 재조합효소 표적 서열로 플랭킹된 조건적 대립유전자를 포함하거나; 또는, (i) 랫트 세포에서 프로모터 활성에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함한다.

[0015] 추가로, 표적화된 유전자 변형을 통해 만능 랫트 세포 중 관심 유전자 좌위를 변형시키는 방법이 제공되고, 상기 관심 유전자 좌위는 (i) 5' 랫트 상동성 아암에 대해 상보적인 제1 핵산 서열; 및 (ii) 3' 랫트 상동성 아암에 대해 상보적인 제2 핵산 서열을 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 제1 및 제2 핵산 서열은 적어도 5kb까지 분리된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 핵산 서열은 적어도 5kb이지만 3Mb 미만까지 분리된다. 일부 그와 같은 방법에서, 제1 및 제2 핵산 서열은 하기까지 분리된다: 적어도 5kb이지만 10kb 미만, 적어도 10kb이지만 20kb 미만, 적어도 20kb이지만 40kb 미만, 적어도 40kb이지만 60kb 미만, 적어도 60kb이지만 80kb 미만, 적어도 약 80kb이지만 100kb 미만, 적어도 100kb이지만 150kb 미만, 또는 적어도 150kb이지만 200kb 미만, 적어도 약 200kb이지만 약 300kb 미만, 적어도 약 300kb이지만 약 400kb 미만, 적어도 약 400kb이지만 약 500kb 미만, 적어도 약 500kb이지만 약 1Mb 미만, 적어도 약 1Mb이지만 약 1.5Mb 미만, 적어도 약 1.5Mb이지만 약 2Mb 미만, 적어도 약 2Mb이지만 약 2.5Mb 미만, 적어도 약 2.5Mb이지만 약 3Mb 미만, 적어도 약 1Mb이지만 약 2Mb 미만, 적어도 약 2Mb이지만 약 3Mb 미만.

[0016] 일부 구현예에서, 도입 단계는 만능 랫트 세포에서 표적화 작제물과 관심 유전자 좌위 사이의 상동 재조합을 촉진하는 뉴클레아제를 인코딩하는 제2 핵산을 도입하는 것을 추가로 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 뉴클레아제는 (a) FokI 엔도뉴클레아제에 융합된 아연 핑거-기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라성 단백질; 또는, (b) FokI 엔도뉴클레아제에 융합된 전사 활성제-유사 효과기 뉴클레아제 (TALEN)을 포함하는 키메라성 단백질을 포함한다.

[0017] 그와 같은 방법에서, 도입 단계는 추가로, 만능 랫트 세포에 하기를 도입하는 것을 포함한다: (i) 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR)-연관된 (Cas) 단백질을 인코딩하는 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 제1 발현 작제물, (ii) 안내 RNA (gRNA)에 작동가능하게 연결된 게놈 표적 서열을 인코딩하는 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 제2 발현 작제물로서, 상기 게놈 표적 서열은 프로토스페이서 인접한 모티프 (PAM) 서열에 의해 3' 말단 상에 즉시 플랭킹되는 제2 발현 작제물. 일 구현예에서, 관심 유전자 좌위는 하기의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다: 서열번호: 1. 일 구현예에서, gRNA는 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR) RNA (crRNA) 및 트랜스-활성화 CRISPR RNA (tracrRNA)을 인코딩하는 제3 핵산 서열을 포함한다. 또 하나의 구현예에서, 만능 랫트 세포의 게놈은 게놈 표적 서열에 대해 상보적인 표적 DNA 영역을 포함한다. 일부 그와 같은 방법에서, Cas 단백질은 Cas9이다. 일부 그와 같은 방법에서 gRNA는 하기를 포함한다: (a) 하기의 핵산 서열의 키메라성 RNA: 서열번호: 2; 또는, (b) 하기의 핵산 서열의 키메라성 RNA: 서열번호: 3. 일부 그와 같은 방법에서, crRNA는 아래에서 제시된 서열을 포함한다: 서열번호: 4, 서열번호: 5, 또는 서열번호: 6. 일부 그와 같은 방법에서, tracrRNA는 아래에서 제시된 서열을 포함한다: 서열번호: 7 또는 서열번호: 8.

[0018] 추가로, (i) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열의 삽입; (ii) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 내인성 랫트 핵산 서열의 치환; 또는 (iii) 이들의 조합을 포함하는 랫트 유전자 좌위가 제공되고, 상기 랫트 유전자 좌위는 생식계열을 통해 전달될 수 있다. 일부 그와 같은 랫트에서 유전자 좌위, 삽입 또는 치환의 크기는 약 5kb 내지 약 400kb이다. 일부 그와 같은 랫트에서 유전자 좌위, 삽입 또는 치환의 크기는 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 약 350kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 800kb, 약 800kb 내지 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb, 내지 약 2.5Mb, 약 2.5Mb 내지 약 2.8Mb, 약 2.8Mb 내지 약 3Mb, 적어도 약 200kb이지만 약 300kb 미만, 적어도 약 300kb이지만 약 400kb 미만, 적어도 약 400kb이지만 약 500kb 미만, 적어도 약 500kb이지만 약 1Mb 미만, 적어도 약 1 1Mb이지만 약 2Mb 미만, 적어도 약 2Mb이지만 약 3Mb 미만이다.

[0019] 인간화된 랫트를 제조하기 위한 방법이 추가로 제공되고, 상기 방법은: (a) 만능 랫트 세포 중 관심 유전자 좌

위를 인간 삽입 핵산을 포함하는 표적화 작제물로 표적화하여 유전적으로 변형된 만능 랫트 세포를 형성하는 단계; (b) 상기 유전적으로 변형된 만능 랫트 세포를 숙주 랫트 배아에 도입하는 단계; 및 (c) 대리모에서 상기 숙주 랫트 배아를 잉태하는 단계로서; 상기 대리모는 하기를 포함하는 변형된 유전자 좌위를 포함하는 랫트 자손을 생산하는 단계: (i) 인간 핵산 서열의 삽입; (ii) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 관심 유전자 좌위에 있는 랫트 핵산 서열의 치환; (iii) 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 키메라성 핵산 서열; 또는 (iv) 이들의 조합, 상기 변형된 유전자 좌위는 생식계열을 통해 전달될 수 있다.

[0020] 일부 그와 같은 방법에서, 표적화 작제물은 큰 표적 벡터 (LTVEC)이고, 그리고 상기 LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 적어도 10 kb이지만 100kb 미만이거나 LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 적어도 10 kb이지만 150kb 미만이다. 일부 그와 같은 방법에서, 표적화 작제물의 5' 및 3' 상동의 총계는 약 10kb 내지 약 30kb, 약 20kb 내지 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. 일부 그와 같은 방법에서, 인간 핵산 서열은 적어도 5kb이지만 400kb 미만이다. 일부 그와 같은 방법에서, 인간 핵산 서열은 적어도 5kb이지만 10kb 미만, 적어도 10kb이지만 20kb 미만, 적어도 20kb이지만 40kb 미만, 적어도 40kb이지만 60kb 미만, 적어도 60kb이지만 80kb 미만, 적어도 약 80kb이지만 100kb 미만, 적어도 100kb이지만 150kb 미만, 적어도 150kb이지만 200kb 미만, 적어도 200kb이지만 250kb 미만, 적어도 250kb이지만 300kb 미만, 적어도 300kb이지만 350kb 미만, 또는 적어도 350kb이지만 400kb 미만이다. 다른 구현예에서, LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계의 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, 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. 하나의 구현예에서, 결실 크기는 LTVEC의 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 크기와 동일하거나 유사하다.

[0021] 인간화된 랫트를 만드는 일부 방법에서, 만능 랫트 세포는 랫트 배아 줄기 (ES) 세포이다. 일부 그와 같은 방법에서, 만능 랫트 세포는 DA 균주 또는 ACI 균주로부터 유도된다. 일부 그와 같은 방법에서, 만능 랫트 세포는 Dnmt3L, Eras, Err-베타, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF 수용체, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1, 및/또는 이들의 조합을 포함하는 적어도 하나의 만능분화능 마커의 발현을 특징으로 한다. 일부 그와 같은 방법에서, 만능 랫트 세포는 하기 특징 중 하나 이상을 특징으로 한다: (a) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음; (b) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 1 이상 중배엽 마커의 발현 없음; (c) Gata6, Sox17, 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현의 없음; 또는 (d) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음.

[0022] 추가로, 인간화된 유전자 좌위를 포함하는 유전적으로 변형된 랫트가 제공되고, 상기 유전적으로 변형된 랫트는 하기를 포함한다: (i) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열의 삽입; (ii) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열을 갖는 내인성 유전자 좌위에서 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 랫트 핵산 서열의 치환; (iii) 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 키메라성 핵산 서열; 또는, (iv) 이들의 조합, 상기 인간화된 유전자 좌위는 생식계열을 통해 전달될 수 있다. 일부 그와 같은 유전적으로 변형된 랫트에서, 인간화된 유전자 좌위는 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 키메라성 핵산 서열을 포함한다.

[0023] 박테리아 상동 재조합 (BHR)를 통해 랫트의 표적 유전자 좌위를 변형시키는 방법이 또한 제공되고 5' 랫트 상동성 아암 및 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 큰 표적 벡터 (LTVEC)을 도입하는 것을 포함하고, 상기 원핵 세포는 랫트 핵산을 포함하고 표적 좌위에서 BHR를 매개하는 재조합효소를 발현시킬 수 있고, 그리고 상기 LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 적어도 10kb이지만 100kb 미만이거나 LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 적어도 10 kb이지만 150kb 미만이다. 다른 구현예에서, LTVEC의 총 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 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. 하나의 구현예에서, 결실 크기는 LTVEC의 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 크기와 동일하거나 유사하다.

[0024] 일부 그와 같은 방법에서, 랫트 핵산의 표적 좌위는 5' 상동성 아암에 대해 상보적인 제1 핵산 서열 및 3' 상동

성 아암에 대해 상보적인 제2 핵산 서열을 포함한다. 일부 그와 같은 방법에서, 제1 및 제2 핵산 서열은 하기까지 분리된다: 적어도 5kb이지만 10kb 미만, 적어도 10kb이지만 20kb 미만, 적어도 20kb이지만 40kb 미만, 적어도 40kb이지만 60kb 미만, 적어도 60kb이지만 80kb 미만, 적어도 약 80kb이지만 100kb 미만, 적어도 100kb이지만 150kb 미만, 또는 적어도 150kb이지만 200kb 미만, 적어도 약 200kb이지만 약 300kb 미만, 적어도 약 300kb이지만 약 400kb 미만, 적어도 약 400kb이지만 약 500kb 미만, 적어도 약 500kb이지만 약 1Mb 미만, 적어도 약 1 1Mb이지만 약 2Mb 미만, 적어도 약 2Mb이지만 약 3Mb 미만.

[0025] 일부 그와 같은 방법에서, 표적화 벡터를 원핵 세포에 도입하면 하기와 같이 된다: (i) 표적 유전자 좌위로부터 내인성 랫트 핵산 서열의 결실; (ii) 표적 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 부가; (iii) 표적 좌위에서 외인성 핵산 서열에 의한 내인성 랫트 핵산 서열의 치환; 또는 (iv) 이들의 조합. 일부 그와 같은 방법에서, 삽입 핵산은 하기를 포함한다: (a) 표적 유전자 좌위에서 랫트 핵산 서열에 대해 상동성 또는 이종상동성인 폴리뉴클레오타이드; 또는 (b) 부위-특이적인 재조합 인식 서열로 플랭킹된 조건적 대립유전자.

[0026] 추가로, 5' 랫트 상동성 아암 및 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 표적화 핵산을 포함하는 숙주 원핵 세포가 제공되고, 상기 삽입 핵산 범위 약 5k 내지 약 400kb이다. 일부 숙주 원핵 세포에서 삽입 핵산의 크기는 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 350kb 내지 약 400kb이다. 일부 숙주 원핵 세포에서 원핵 세포는 항시적 활성 프로모터 또는 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된 재조합효소 유전자를 포함한다.

[0027] 표적화된 유전자 변형을 통해 세포에서 관심 유전자 좌위를 변형시키는 방법이 또한 제공되고, 이 방법을 하기를 포함한다: 세포에

[0028] (a) 5' 상동성 아암 및 3' 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 큰 표적 벡터 (LTVEC)로서, 상기 LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 적어도 10kb인 상기 벡터; 및

[0029] (b) (i) 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR)-연관된 (Cas) 단백질을 인코딩하는 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 제1 발현 작제물, (ii) 안내 RNA (gRNA)에 작동가능하게 연결된 게놈 표적 서열을 인코딩하는 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 제2 발현 작제물을 도입하는 단계; 및 관심 유전자 좌위에서, 표적화된 유전자 변형을 포함하는 유전적으로 변형된 만능 세포를 확인하는 단계.

[0030] 일 구현예에서, 관심 유전자 좌위는 아래에서 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다: 서열번호: 1, 상기 gRNA는 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR) RNA (crRNA) 및 트랜스-활성화 CRISPR RNA (tracrRNA)을 인코딩하는 제3 핵산 서열을 포함하고, 그리고 상기 세포의 게놈은 게놈 표적 서열에 대해 상보적인 표적 DNA 영역을 포함한다. 일부 그와 같은 방법에서, Cas 단백질은 Cas9이다. 그와 같은 방법에서, 세포는 만능 세포 (예컨대 배아 줄기 세포) 또는 원핵 세포일 수 있다. 일 구현예에서, 만능 세포는 하기로부터 유래한다: 비-인간 동물, 비-인간 포유동물, 설치류, 인간, 랫트, 마우스, 햄스터, 토끼, 돼지, 소, 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 흰담비, 영장류 (예를 들면, 마모셋, 붉은털원숭이), 사육된 포유동물 또는 농업적 포유동물 또는 관심의 임의의 다른 유기체. 또 하나의 구현예에서, 원핵 세포는 박테리아, 예컨대, *E. 콜라이*로부터 유래한다.

[0031] 다른 구현예에서, LTVEC의 총 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 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. 하나의 구현예에서, 결실 크기는 LTVEC의 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 크기와 동일하거나 유사하다.

[0032] 하나의 구현예에서, 만능 세포는 비-인간 만능 세포이다. 하나의 구현예에서, 비-인간 만능 세포는 포유동물 만능 세포이다. 일 구현예에서, 포유동물 만능 세포는 설치류 만능 세포이다. 일 구현예에서, 설치류 만능 세포는 랫트 또는 마우스 만능 세포이다. 하나의 구현예에서, 만능 세포는 인간 유도된 만능 줄기(iPS) 세포이다.

[0033] 하나의 구현예에서, 만능 세포는 단일 세포 단계에서 비-인간 수정란이다. 하나의 구현예에서, 비-인간 수정란

은 포유동물 수정란이다. 하나의 구현예에서, 포유동물 수정란은 단일 세포 단계에서 설치류 수정란이다. 하나의 구현예에서, 포유동물 수정란은 단일 세포 단계에서 랫트 또는 마우스 수정란이다.

[0034] 추가로, 그것의 유전자 좌위에서 표적화된 유전자 변형을 포함하는 랫트 또는 랫트 세포가 제공되고, 상기 유전자 좌위는 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, ApoE 좌위, Rag1 좌위, Rag2 좌위, 또는 Rag2/Rag1 좌위이고, 상기 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함한다: (a) 유전자 좌위에서 내인성 랫트 핵산 서열의 결실; (b) 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 상동 핵산, 이종상동성 핵산, 또는 키메라성 핵산의 삽입; 또는 (c) 이들의 조합. 그와 같은 랫트 또는 랫트 세포에서, 표적화된 유전자 변형은 랫트, 또는 랫트 세포로부터 전파된 랫트의 생식계열을 통해 전달가능하다.

[0035] 일부 그와 같은 랫트 또는 랫트 세포에서 상기 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산의 결실은 적어도 약 10kb이거나, 또는 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 적어도 약 5 kb이다.

[0036] 추가로, 랫트 또는 랫트 세포가 제공되고, 여기서 (a) 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 인터루킨-2 수용체 감마 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고; (b) 상기 ApoE 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 ApoE 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고; (c) 상기 Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag1 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고; (d) 상기 Rag2 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag2 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되거나; 또는, (e) 상기 Rag2/Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag2 단백질 활성 및 Rag1 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 된다.

[0037] 일부 구현예에서, 인터루킨-2 수용체 감마 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함한다: (a) 전체 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; (b) 인간 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분에 의한 전체 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분의 치환; (c) 인간 인터루킨-2 수용체 감마의 엑토-도메인에 의한 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역의 엑토-도메인의 치환; 또는, (d) 인터루킨-2 수용체 감마 좌위의 적어도 3 kb 결실. 다른 그와 같은 랫트 또는 랫트 세포에서 ApoE 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함한다: (a) 전체 ApoE 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는, (b) ApoE 코딩 영역을 포함하는 ApoE 좌위의 적어도 1.8 kb 결실.

[0038] 추가로, 랫트 또는 랫트 세포가 제공되고, 상기 Rag2 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함한다: (a) 전체 Rag2 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는 (b) Rag2 코딩 영역을 포함하는 Rag2 좌위의 적어도 5.7 kb 결실. 일부 구현예에서, Rag2/Rag1 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함한다: (a) 전체 Rag2 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실 및 전체 Rag1 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는, (b) Rag2 코딩 영역을 포함하는 Rag2/Rag1 좌위의 적어도 16 kb의 결실.

[0039] 추가로, 랫트 또는 랫트 세포가 제공되고, 상기 표적화된 유전자 변형은 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, ApoE 좌위, Rag1 좌위, Rag2 좌위, 또는 Rag2/Rag1 좌위에서 선택적 마커를 포함하는 발현 카세트의 삽입을 포함한다. 일부 그와 같은 랫트 또는 랫트 세포에서 발현 카세트는 유전자 좌위에서 내인성 프로모터에 작동가능하게 연결된 lacZ 유전자 및 선택적 마커에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 포함한다.

[0040] 추가로, 랫트 또는 랫트 세포가 제공되고, 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, ApoE 좌위, Rag1 좌위, Rag2 좌위 또는 Rag2/Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 자가-결실 선택 카세트의 삽입을 포함한다. 일부 그와 같은 랫트에서 또는 랫트 세포, 자가-결실 선택 카세트는 랫트 세포에서 프로모터 활성에 작동가능하게 연결된 선택적 마커 유전자 및 수컷 생식 세포 특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 재조합효소 유전자를 포함하고, 상기 자가-결실 카세트는 재조합효소에 의해 인식된 재조합 인식 부위에 의해 플랭킹된다. 일부 그와 같은 랫트에서 또는 랫트 세포, 상기 수컷 생식 세포 특이적 프로모터는 프로타민-1 프로모터이고; 상기 재조합효소 유전자는 Cre를 인코딩하고, 상기 재조합 인식 부위는 loxP 부위이다. 일 구현예에서, 프로타민-1 프로모터는 마우스 또는 랫트 프로타민-1 프로모터이다.

[0041] 추가로, 랫트 또는 랫트 세포가 제공되고, 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 내인성 인터루킨-2 수용체 감마 프로모터, 내인성 ApoE 프로모터, 내인성 Rag1 프로모터, 또는 내인성 Rag2 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 핵산을 포함한다. 일부 그와 같은 랫트에서 또는 랫트 세포, 리포터 핵산은 하기를 포함하는 리포터를 인코딩한다: β-갈락토시다아제, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, 증대된 황색 형광성 단백질 (EYFP), 에메랄드, 증대된 녹색 형광 단백질 (EGFP), CyPet, 청록색 형광 단백질 (CFP), 셀루리안, T-사파이어, 루시퍼라아제, 알칼리성 포스파타제, 또는 이들의 조합.

[0042] 추가로, 랫트 세포가 제공되고, 상기 랫트 세포는 만능 랫트 세포 또는 랫트 배아 줄기 (ES) 세포이다. 일부 그와 같은 랫트 세포에서, 만능 랫트 세포 또는 랫트 배아 줄기 (ES) 세포는, (a) DA 균주 또는 ACI 균주로부터 유도되고; (b) Dnmt3L, Eras, Err-베타, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF 수용체, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1, 또는 이들의 조합을 포함하는 적어도 하나의 만능분화능 마커의 발현을 특징으로 하거나; 또는 (c) 하기 특성 중 하나 이상을 특징으로 하고: (i) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음; (ii) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 중배엽 마커의 발현 없음; (iii) Gata6, Sox17 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현 없음; 또는 (iv) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음.

[0043] 추가로, 만능 랫트 세포에서 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, ApoE 좌위, Rag1 좌위, Rag2 좌위 또는 Rag2/Rag1 좌위에서 표적 유전자 좌위를 변형시키는 방법이 제공되고, 상기 방법은 하기를 포함한다: (a) 상기 만능 랫트 세포에 표적 유전자 좌위와 상동인 5' 및 3' 랫트 상동 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터를 도입하는 단계; 및 (b) 표적 유전자 좌위에서 표적화된 유전자 변형을 포함하는 유전적으로 변형된 만능 랫트 세포를 확인하는 단계로서, 상기 표적화된 유전자 변형은 만능 랫트 세포로부터 전파된 랫트의 생식계열을 통해 전달될 수 있는 단계. 일부 그와 같은 방법에서, 표적화 벡터는 큰 표적 벡터 (LTVEC)이고, 상기 5' 및 3' 랫트 상동성 아암의 총계는 적어도 약 10kb이다. 일부 구현예에서, 5' 및 3' 랫트 상동성 아암의 총계는 적어도 10kb이지만 150kb 미만이다. 일부 구현예에서, 5' 및 3' 랫트 상동성 아암의 총계는 적어도 약 10kb이지만 약 100kb 미만이다. 일부 구현예에서, 표적화 벡터의 만능 랫트 세포로의 도입은 하기를 초래한다: (i) 표적 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산 서열의 결실; (ii) 표적 유전자 좌위에서의 외인성 핵산 서열의 서열; 또는 (iii) 이들의 조합.

[0044] 일부 구현예에서, 상기 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산의 결실은 적어도 약 10 kb; 유전자 좌위에서 내인성 랫트 핵산 서열의 결실은 그 범위가 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 또는 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 약 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 또는 약 2.5Mb 내지 약 3Mb이고; 유전자 좌위에서의 외인성 핵산 서열의 삽입은 적어도 약 5 kb이거나; 또는 외인성 핵산 서열의 삽입은, 그 범위가 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb이다.

[0045] 일부 구현예에서, (a) 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 인터루킨-2 수용체 감마 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고; (b) 상기 ApoE 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 ApoE 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고; (c) 상기 Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag1 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고; (d) 상기 Rag2 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag2 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되거나; 또는, (e) 상기 Rag2/Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag2 단백질 활성 및 Rag1 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 된다.

[0046] 일부 구현예에서, 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함한다: (a) 전체 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; (b) 인간 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분에 의한 전체 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분의 치환; (c) 인간 인터루킨-2 수용체 감마의 엑토-도메인에 의한 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역의 엑토-도메인의 치환; 또는, (d) 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역을 포함하는 인터루킨-2 수용체 감마 좌위의 적어도 3 kb 결실.

[0047] 일부 구현예에서, 상기 ApoE 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함한다: (a) 전체 ApoE 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는, (b) ApoE 코딩 영역을 포함하는 ApoE 좌위의 적어도 1.8 kb 결실.

[0048] 일부 구현예에서, 상기 Rag2 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함한다: (a) 전체 Rag2 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는 (b) Rag2 코딩 영역을 포함하는 Rag2 좌위의 적어도 5.7 kb 결실. 다른 방법에서, Rag1/Rag2 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함한다: (a) 전체 Rag2 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실 및 전체 Rag1 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는, (b) Rag2 및 Rag1 코딩 영역을 포함하는 Rag2/Rag1 좌위의 적어도 16 kb의 결실.

[0049] 표적 유전자 좌위를 변형시키는 일부 그와 같은 구현예에서, 삽입 핵산은 선택적 마커를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 발현 카세트는 유전자 좌위에서 내

인성 프로모터에 작동가능하게 연결된 lacZ 유전자 및 선택적 마커 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 포함한다.

[0050] 일부 구현예에서, 삽입 핵산은 자가-결실 선택 카세트를 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 자가-결실 선택 카세트는 랫트 만능 세포에서 프로모터 활성에 작동가능하게 연결된 선택적 마커 및 수컷 생식 세포 특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 재조합효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 자가-결실 카세트는 재조합효소에 의해 인식된 재조합 인식 부위에 의해 플랭킹된다. 일부 그와 같은 구현예에서, 상기 수컷 생식 세포 특이적 프로모터는 프로타민-1 프로모터이거나; 또는, 상기 재조합효소 유전자는 Cre을 인코딩하고 상기 재조합 인식 부위는 loxP 부위이다. 일부 구현예에서, 프로타민-1 프로모터는 마우스 또는 랫트 프로타민-1 또는 프로모터이다.

[0051] 다른 방법에서, 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 내인성 인터루킨-2 수용체 감마 프로모터, 내인성 ApoE 프로모터, 내인성 Rag1 프로모터, 또는 내인성 Rag2 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 핵산 서열을 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 리포터 핵산 서열은 하기를 포함하는 리포터를 인코딩한다: β-갈락토시다아제, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, 증대된 황색 형광성 단백질 (EYFP), 에메랄드, 증대된 녹색 형광 단백질 (EGFP), CyPet, 청록색 형광 단백질 (CFP), 셀루리안, T-사파이어, 루시퍼라아제, 알칼리성 포스파타제, 또는 이들의 조합.

[0052] 표적 유전자 좌위를 변형시키는 일부 구현예에서, 만능 랫트 세포는 랫트 배아 줄기 (ES) 세포이다. 일부 그와 같은 구현예에서, 만능 랫트 세포는 (a) DA 균주 또는 ACI 균주로부터 유도되고; (b) Oct-4, Sox-2, 알칼리성 포스파타제, 또는 이들의 조합을 포함하는 만능분화능 마커의 발현을 특징으로 하거나; 또는, (c) 하기 특성 중 하나 이상을 특징으로 하고: (i) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음; (ii) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 중배엽 마커의 발현 없음; (iii) Gata6, Sox17 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현 없음; 또는 (iv) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음.

[0053] 일부 구현예에서, 본 방법은 추가로, 표적 유전자 좌위에서 표적화된 유전자 변형을 확인하는 것을 포함하고, 상기 확인 단계는 표적 유전자 좌위에서 대립유전자 (MOA)의 변형을 평가하는 정량적 검정을 이용한다.

[0054] 일부 구현예에서, 도입 단계는 추가로, 만능 랫트 세포에서 표적화 벡터와 표적 유전자 좌위 사이의 상동 재조합을 촉진하는 뉴클레아제를 인코딩하는 제2 핵산을 도입하는 것을 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, 뉴클레아제는 FokI 엔도뉴클레아제에 융합된 아연 핑거-기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라성 단백질을 포함한다. 일부 그와 같은 방법으로 표적 유전자 좌위의 2 개의 대립유전자 변형이 생긴다.

[0055] 일부 구현예에서, 방법의 도입 단계는 추가로, 만능 랫트 세포에 하기를 도입하는 것을 포함한다: 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR)-연관된 (Cas) 단백질을 인코딩하는 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 제1 발현 작제물, 및 안내 RNA (gRNA)에 작동가능하게 연결된 게놈 표적 서열을 인코딩하는 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 제2 발현 작제물로서, 상기 게놈 표적 서열은 프로토스페이서 인접한 모티프 (PAM) 서열에 의해 3' 말단 상에 즉시 플랭킹되는 제2 발현 작제물. 일 구현예에서, 게놈 표적 서열은 아래에서 제시된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다 서열번호: 1. 일 구현예에서 gRNA는 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR) RNA (crRNA) 및 트랜스-활성화 CRISPR RNA (tacrRNA)을 인코딩하는 제3 핵산 서열을 포함한다. 일부 그와 같은 구현예에서, Cas 단백질은 Cas9이다. 일부 그와 같은 구현예에서, (a) gRNA은 아래에서 제시된 핵산 서열의 키메라성 RNA이고: 서열번호: 2; (b) gRNA은 아래에서 제시된 핵산 서열의 키메라성 RNA이고: 서열번호: 3; (c) crRNA는 아래에서 제시된 서열을 포함하고: 서열번호: 4, 서열번호: 5, 서열번호: 6; 또는, (d) tracrRNA는 아래에서 제시된 서열을 포함한다: 서열번호: 7 및/또는 서열번호: 8.

도면의 간단한 설명

[0056] 특허 또는 특허 출원 파일은 컬러로 나타낸 하나 이상의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)과 함께 상기 특허 또는 특허 출원의 사본은 요구되는 비용 청구 및 지불시 사무소에 의해 제공된다.

도 1은 통상적으로 디쉬에서 탈착하여 부유하는 촘촘한 구형 콜로니로서 성장하는 랫트 ESC를 도시한다.

도 2a 내지 d는 랫트 ESC에 의해 발현되는 다양한 만능 마커를 도시한다: a는 Oct-4 (녹색)을 도시하고; b는 Sox-2 (적색)을 도시하고; c는 DAPI (청색)을 도시하고; d는 rESC에 의해 발현되는 만능 마커의 오버레이를 도

시한다.

도 3은 랫트 ESC가 알칼린 포스파타제(만능 마커)(좌측)을 발현하고 계통 DA.2B에 대한 핵형은 42X,Y (우측)임을 도시한다. 핵형 분류는 랫트 ESC가 흔히 사배체가 되기 때문에 수행하였고; 따라서 계통은 중기 염색체 분산을 계수함에 의해 사전에 스크리닝하였고 이어서 대부분 정상 계수를 갖는 계통이 정식적인 핵형으로 분류되었다.

도 4a-b는 ACI.G1 랫트 ES 세포주의 염색체 수의 분석을 보여주는 사진을 제공한다.

도 5a-b는 DA.2B 랫트 ES 세포주의 염색체 수의 분석을 보여주는 사진을 제공한다.

도 6a-b는 DA.C2 랫트 ES 세포주의 염색체 수의 분석을 보여주는 사진을 제공한다.

도 7은 도 1의 랫트 ESC의 보다 가까운 사진을 도시한다.

도 8은 생식선을 통한 랫트 ESC 게놈의 낭포 주사 및 전달에 의한 키메라의 제조, 모 ACI.G1 랫트 ESC를 사용한 낭포 주사에 의해 제조된 키메라를 도시하고, 높은 비율의 키메라는 일반적으로 알비노 코를 갖는다.

도 9는 도 8에서 별표(*)로 표시된 ACI/SD 키메라가 모친인 알비노 한배 새끼와 함께 F1 아구티 새끼를 도시한다.

도 10은 랫트 ApoE 유전자 좌위의 도식을 제공하고 회색 막대로 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN1 및 ZFN2)에 대한 절단 부위를 나타낸다. 5' 및 3' 상동성 아암에 상응하는 게놈성 영역(각각 5 kb 및 5.4 kb) 암 갈색 박스로 나타낸다. ApoE 유전자의 엑손 1은 비암호화이고 5' 상동성 아암에 가장 인접한 개방 박스로 나타낸다. ApoE의 3개의 인트론은 선으로 나타낸다. 엑손 2 및 3은 점묘 회색 박스로 나타낸다. 엑손 4는 암호화 및 비암호화 서열 둘다를 함유하고 점묘 회색 음영 및 개방 박스로 나타낸다.

도 11은 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN1 또는 ZFN2)의 존재하에 수행되는 경우, ApoE 표적화 효능의 개요를 제공한다.

도 12는 동일한 공간과 함께, 마우스에서와 같이 Setd5와 Thumpd3 유전자들 사이에 위치하는 랫트 Rosa 26 유전자 좌위의 표적화를 도시한다. 패널 A는 마우스 Rosa 26 유전자 좌위의 구조를 보여준다. 마우스 Rosa 26 전사체는 2개 또는 3개의 엑손으로 이루어진다. 패널 B는 랫트 Rosa 26 유전자 좌위의 구조를 도시하고; 상기 랫트 유전자 좌위는 마우스 엑손 1(Ex1a)에 대한 상동성 엑손 뿐만 아니라 제2 엑손 1(Ex1b)를 함유하고; 제3 엑손은 랫트에서 동정되지 않았다. 패널 C는 표적화된 랫트 Rosa26 대립형질유전자를 도시하고, 각각 5kb의 상동성 아암은 DA rESC 기원의 게놈 DNA를 사용하는 PCR에 의해 클로닝하고; 상기 표적화된 대립형질유전자는 랫트 Rosa 26 인트론에서 117bp 결실을 치환하는 스플라이싱 수용체 (SA)-lacZ-hUB-neo 카세트를 함유한다.

도 13a는 X-gal로 염색된, 14주령 야생형 랫트의 대조군 뇌를 도시한다. 상기 대조군 뇌는 LacZ에 대한 저수준의 배경 염색(등 측면)을 보여주었다.

도 13b는 rRosa26 이종접합성 랫트(14주령)의 뇌에서 LacZ 발현을 도시한다. 상기 lacZ 리포터는 rRosa26 이종접합체의 뇌 전반 도처에서 발현되었다.

도 13c는 X-gal로 처리된, 14주령 야생형 랫트의 대조군 심장 및 흉선(삽화)을 도시한다. 상기 대조군 심장 및 흉선은 LacZ에 대해 저수준의 배경 염색을 보여주었다.

도 13d는 14주령 rRosa26 이종접합성 랫트의 심장 및 흉선(삽화)에서 LacZ 발현을 도시한다. 상기 lacZ 리포터는 rRosa26 이종접합체의 심장 및 흉선 전반 도처에서 발현되었다.

도 13e는 X-gal로 처리된, 14주령 야생형 랫트의 대조군 폐를 도시한다. 상기 대조군 폐는 LacZ에 대해 저수준의 배경 염색을 보여주었다.

도 13f는 14주령 rRosa26 이종접합체 랫트의 폐에서 LacZ 발현을 도시한다. 상기 lacZ 리포터는 rRosa26 이종접합체의 폐 전반 도처에서 발현되었다.

도 13g 및 h는 E12.5 랫트 배아에서 LacZ 발현을 도시한다. 저수준의 배경 LacZ 염색을 보여주는 야생형 대조군 배아(H)와는 대조적으로, rRosa26 이종접합성 배아는 배아 전반에 걸쳐 LacZ 리포터의 편재된 발현을 나타냈다.

도 13i 및 j는 E14.5 랫트 배아에서 LacZ 발현을 도시한다. 저수준의 배경 LacZ 염색을 보여주는 야생형 대조군 배아(J)와는 대조적으로, rRosa26 이종접합성 랫트 배아는 배아 전반에 걸친 LacZ 리포터의 편재된 발현을 나타

냈다.

도 14는 선택 카세트(lacZ-neo 카세트)를 포함하는 표적화 벡터의 전기천공 후 랫트 ES 세포 내부에 존재하는 상동성 또는 비-상동성 재조합 반응을 설명한다.

도 15는 게놈-편집 엔도뉴클레아제(예를 들어, ZFN 및 TALEN)가 표적 게놈 서열에서 이중가닥 절단(DSB)을 도입하여 ES 세포에서 비-상동성 말단-연결(NHEJ)을 활성화시키는 기작을 도해한다.

도 16은 표적화 벡터의 상동성 재조합의 효능을 개선시키기 위해 ZFN/TALEN을 사용하는 유전자 표적화 기술을 도해한다. DSB는 이중가닥 절단을 나타낸다.

도 17은 변형된 랫트 ApoE 유전자 좌위의 키메라 제조 및 생식선 전달의 개요를 제공한다. 상기 표적화된 변형은 아연 핑거 뉴클레아제가 도와주었다.

도 18은 ZFN U 및 ZFN D를 표적화하는 아연 핑거 뉴클레아제와 조합된 IL2r-γ 표적화 반응의 도식을 제공한다. ZFN 절단 부위는 도면에 나타낸다.

도 19는 CRISPR/Cas9 시스템과 조합하여 IL2r-γ를 표적화하는 경우의 표적화 효능을 제공한다.

도 20은 랫트 ApoE 유전자 좌위 및 표적화 플라스미드의 도식을 제공한다. 상부 도식은 랫트 ApoE 유전자 좌위의 게놈 구조 및 5' 및 3' 상동성 아암(각각 5kb 및 5.4kb; 암회색 박스)에 상응하는 게놈 영역을 보여준다. ApoE 유전자의 엑손 1은 비암호화이고 5' 상동성 아암에 가장 인접한 개방 박스로 나타낸다. ApoE의 3개의 인트론은 선으로 나타낸다. 엑손 2 및 3은 점묘 회색 박스로 나타낸다. 엑손 4는 암호화 및 비암호화 서열 둘다를 함유하고 점묘 회색 음영 및 개방 박스로 나타낸다. 하부 패널은 표적화 플라스미드를 보여준다. 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 5 kb 및 5.4 kb)은 암회색 박스로 나타낸다. 표적화 벡터는 리포터 유전자(lacZ) 및 loxP 부위에 의해 플랭킹된 자가 결실 카세트(개방 화살표)를 포함한다. 자가-결실 카세트는 Crei 유전자에 작동가능하게 연결된 마우스 Prm1 프로모터 및 네오마이신 내성 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 포함하는 약물 선택 카세트를 포함한다.

도 21은 아연 핑거-뉴클레아제, 및 리포터 유전자(LacZ) 및 Crei 유전자에 작동가능하게 연결된 마우스 Prm1 프로모터를 포함하는 자가-결실 카세트 및 네오마이신 내성 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 포함하는 약물 선택 카세트를 포함하는 표적화 벡터를 사용하여 랫트 ES 세포에서 ApoE 유전자 좌위를 표적화하기 위한 도식을 제공한다.

도 22는 랫트 ApoE 유전자 좌위 및 대형 표적화 벡터(LTVEC)의 도식을 제공한다. 상부 패널은 랫트 ApoE 유전자 좌위, 및 5' 및 3' 상동성 아암(각각 45kb 및 23kb; 암회색 박스)에 상응하는 게놈 영역의 게놈 구성을 보여준다. ApoE의 엑손 1은 비-암호화이고 5' 상동성 아암에 가장 인접한 개방 박스로 나타낸다. ApoE 유전자의 3개의 인트론은 선으로 나타내고 엑손 2 및 3은 점묘 회색 박스로서 나타낸다. 엑손 4는 암호화 및 비암호화 서열 둘다를 함유하고 점묘 회색 음영 및 개방 박스로 나타낸다. 하부 패널은 랫트 ApoE 유전자 좌위를 변형시키기 위한 LTVEC를 보여준다. 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 45 kb 및 23 kb)은 암회색 박스로 나타낸다. 상기 LTVEC는 리포터 유전자(LacZ), 및 Crei 유전자에 작동가능하게 연결된 마우스 Prm1 프로모터를 포함하는, loxP 부위(개방 화살표)에 의해 플랭킹된 자가-결실 카세트, 및 네오마이신 내성 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 포함하는 약물 선택 카세트를 포함한다.

도 23은 랫트 ApoE 유전자 좌위의 도식을 제공하고, 표적화 벡터와 표적 유사 염색체 영역간의 상동성 재조합을 증진시키기 위해 대형 표적화 벡터(LTVEC)와 함께 사용되는 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN1 및 ZFN2)에 대한 절단 부위를 회색 막대로 나타낸다.

도 24는 3.2kb 결실, 및 리포터 유전자(eGFP), 및 약물 선택 카세트(hUb-neo)를 포함하는 자가-결실 카세트 및 마우스 Prm1 프로모터에 작동가능하게 연결된 Crei 유전자를 포함하는 자가-결실 카세트의 삽입에 의해 붕괴된 랫트 IL2r-γ 유전자 좌위를 도시한다.

도 25는 생식선 전달의 표적가능한 랫트 배아 줄기 세포주의 개요를 제공한다.

도 26은 3.2kb 결실, 및 리포터 유전자(eGFP), 및 마우스 Prm1 프로모터에 작동가능하게 연결된 Crei 유전자를 포함하는 자가-결실 카세트 및 약물 선택 카세트(hUb-Neo)를 포함하는 자가-결실 카세트의 삽입에 의해 붕괴된 랫트 IL2r-γ 유전자 좌위를 추가로 도시한다.

도 27은 랫트 Rag2 유전자 좌위, 및 랫트 Rag2 유전자 좌위를 변형시키기 위한 대형 표적화 백터(LTVEC)의 도식

을 제공한다. 상부 패널은 랫트 Rag2 유전자 좌위, 및 5' 및 3' 상동성 아암(각각 48 kb 및 15 kb; 암회색 박스)에 상응하는 유사 게놈 영역의 게놈 구성을 보여준다. Rag2는 점묘 회색 음영에 의해 나타낸 단일 엑손을 포함한다. 하부 패널은 LTVEC이다. 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 48 kb 및 15 kb)은 암회색 박스로 나타낸다. 상기 LTVEC는 리포터 유전자(lacZ), 및 Crei 유전자에 작동가능하게 연결된 랫트 Prm1 프로모터를 포함하는, loxP 부위(개방 화살표)에 의해 플랭킹된 자가-결실 카세트, 및 네오마이신 내성 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 포함하는 약물 선택 카세트를 포함한다.

도 28은 랫트 Rag1/Rag2 유전자 좌위, 및 Rag2 표적화 (Rag2 결실) 또는 Rag2/Rag1 이중 표적화 결실 (Rag2/Rag1 결실)에 의해 결실된 게놈 영역의 게놈 구조를 제공한다.

도 29는 랫트 Rag2 및 Rag1 유전자 좌위 및 상기 유전자 좌위를 변형시키기 위해 사용된 대형 표적화 벡터 (LTVEC)의 도식을 제공한다. 상부 패널은 Rag1 및 Rag2 유전자 좌위 및 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 48 kb 및 84 kb; 암회색 박스)에 상응하는 유사 게놈 영역의 게놈 구성을 보여준다. Rag2 및 Rag1 각각은 점묘 회색 음영에 의해 나타낸 단일 엑손을 포함한다. 하부 패널은 LTVEC이다. 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 48 kb 및 84 kb)은 암회색 박스로 나타낸다. 상기 LTVEC는 리포터 유전자(lacZ), 및 Crei 유전자에 작동가능하게 연결된 랫트 Prm1 프로모터를 포함하는, loxP 부위(개방 화살표)에 의해 플랭킹된 자가-결실 카세트, 및 네오마이신 내성 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 포함하는 약물 선택 카세트를 포함한다.

도 30은 I12rg-/y PBMC가 성숙한 림프구 마커를 발현하지 않음을 보여준다. GFP-양성 림프구는 3개의 키메라 중 2개의 말초 혈액 중에서 검출되었다.

도 31은 랫트 IL-2rg 유전자 좌위, 및 상기 랫트 IL-2rg 유전자 좌위의 완전 인간화를 위한 표적화 플라스미드의 도식을 제공한다. 상부 패널은 랫트 IL-2rg 유전자 좌위, 및 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 4.4 kb 5.0 kb; 암갈색 박스)에 상응하는 유사 게놈 영역의 게놈 구성을 보여준다. 하부 패널은 표적화 플라스미드이다. 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 4.4 kb 및 5.0 kb)은 암회색 박스로 나타낸다. 상기 표적화 플라스미드는 인간 IL-2rg 게놈 영역, 리포터 유전자 (GFP), 및 Crei 유전자에 작동가능하게 연결된 마우스 Prm1 프로모터를 함유하는 loxP 부위(개방 화살표)에 의해 플랭킹된 자가 결실 카세트 및 네오마이신 내성 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 함유하는 약물 선택 카세트를 포함한다.

도 32는 랫트 IL-2rg 유전자 좌위, 및 상기 랫트 IL-2rg 유전자 좌위의 엑토(ecto)-도메인 인간화를 위한 표적화 플라스미드의 도식을 제공한다. 상부 패널은 랫트 IL-2rg 유전자 좌위, 및 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 4.4 kb 5.0 kb; 암갈색 박스)에 상응하는 유사 게놈 영역의 게놈 구성을 보여준다. 하부 패널은 표적화 플라스미드이다. 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 4.4 kb 및 5.0 kb)은 암회색 박스로 나타낸다. 상기 표적화 플라스미드는 IL-2rg 게놈 영역의 인간 엑토-도메인, 리포터 유전자 (GFP), 및 Crei 유전자에 작동가능하게 연결된 마우스 Prm1 프로모터를 함유하는 loxP 부위(개방 화살표)에 의해 플랭킹된 자가 결실 카세트 및 네오마이신 내성 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 함유하는 약물 선택 카세트를 포함한다.

도 33은 랫트 IL-2rg 단백질의 나머지에 융합된 IL-2rg의 인간 엑토-도메인을 포함하는, 인간 IL-2rg 단백질 (서열번호 20; NP_000197.1); 랫트 IL-2rg 단백질 (서열번호 21; NP_543165.1); 및 키메라 IL-2rg 단백질 (서열번호 22)의 서열 정렬을 제공한다. 인간과 랫트 IL-2rg간의 접합은 수직선으로 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0057] *용어*

[0058] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "배아 줄기 세포" 또는 "ES 세포"는 배아로의 도입시 발육 배아의 임의의 조직에 기여할 수 있는 배아 유래된 분화전능 또는 만능 세포를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "만능 세포"는 하나 이상의 분화된 세포 유형으로 발육하는 능력을 소유하는 미분화된 세포를 포함한다.

[0059] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상동성 핵산"은 공지된 표준 서열과 동일하거나 실질적으로 유사한 핵산 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 상기 용어 "상동성 핵산"은 공지된 표준 서열과 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상, 또는 심지어 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는 서열을 특징화하기 위해 사용된다.

[0060] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이종상동성 핵산"은 또 다른 종에서의 공지된 표준 서열과 기능적으로 동등한, 하나의 종으로부터 기원하는 핵산 서열을 포함한다.

[0061] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "대형 표적화 벡터" 또는 "LTVEC"는 진핵 세포에서 상동성 유전자 표적화를 수행하기 위해 의도된 다른 방법에 의해 전형적으로 사용되는 것들 보다 큰 클로닝된 게놈 DNA의 단편으로부터 유래된 진핵 세포에 대한 대형 표적화 벡터를 포함한다. LTVEC의 예는 세균 상동성 염색체(BAC) 및 효모 인공 염색체(YAC)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0062] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "대립형질유전자의 변형" (MOA)은 게놈에서 유전자(들) 또는 염색체 유전자 좌위(유전자 좌위)의 하나의 대립형질유전자의 정확한 DNA 서열의 변형을 포함한다. 본원에 기재된 바와 같은 "대립형질유전자의 변형(MOA)"의 예는 또는 단일 뉴클레오타이드 정도의 적은 뉴클레오타이드의 결실, 치환 또는 삽입, 또는 유전자(들) 또는 염색체 유전자 좌위(유전자 좌위)에 걸쳐있는 많은 킬로베이스의 결실 뿐만 아니라 이들 2개의 최극단 사이의 임의의 모든 가능한 변형을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0063] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재조합 부위"는 부위 특이적 리컴비나제에 의해 인지되고 재조합 반응을 위한 기질로서 작용할 수 있는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0064] "일련의" 유전학적 변형은 *예를 들어*, 랫트 ES 세포에 대해 독립적으로 수행된 2개 이상의 변형을 포함한다. 예를 들어, 제1 변형은 적합한 제1 핵산 작제물을 사용하여 랫트 ES 세포 게놈에 가해진다. 상기 제1 변형은 전기천공, 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법에 의해 성취될 수 있다. 이어서, 제2 변형은 적합한 제2 핵산 작제물을 사용하여 동일한 랫트 ES 세포 게놈에 가해진다. 상기 제2 변형은 제2 전기천공 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 방법에 의해 성취될 수 있다. 다양한 구현예에서, 동일한 랫트 ES 세포의 제1 및 제2 유전학적 변형 후, 제3, 제4, 제5, 제6 등의 일련의 유전학적 변형(차례대로)은 *예를 들어*, 일련의 전기천공 또는 당업계에 공지된 임의의 다른 적합한 방법(연속적으로)을 사용하여 성취될 수 있다.

[0065] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "부위-특이적 리컴비나제"는 2개의 재조합 부위가 단일 핵산 분자내에서 또는 별도의 핵산 분자상에서 물리적으로 분리되어 있는 "재조합 부위" 사이의 재조합을 촉진시킬 수 있는 효소 그룹을 포함한다. "부위-특이적 리컴비나제"의 예는 Cre, Flp, 및 Dre 리컴비나제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0066] 핵산 서열과 함께 언급되는 용어 "생식선"은 후손으로 전달될 수 있는 핵산 서열을 포함한다.

[0067] 용어 "중쇄" 또는 "면역글로불린 중쇄"는 임의의 유기체 기원의 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열을 포함하는, 면역글로불린 중쇄 서열을 포함한다. 중쇄 가변 도메인은 달리 특정되지 않는 경우 3개의 중쇄 CDR 및 4개의 FR 영역을 포함한다. 중쇄의 단편은 CDR, CDR 및 FRs, 및 이의 조합을 포함한다. 전형적인 중쇄는 가변 도메인(N-말단에서 C-말단까지) 후, C_H1 도메인, 힌지, C_H2 도메인 및 C_H3 도메인을 갖는다. 중쇄의 기능성 단편은 특이적으로 에피토프를 인지할 수 있고(*예를 들어*, 마이크로몰, 나노몰 또는 피코몰 범위의 K_D로 에피토프를 인지하는), 세포로부터 발현하고 분비할 수 있고 하나 이상의 CDR을 포함하는 단편을 포함한다. 중쇄 가변 도메인은 일반적으로 생식선에 존재하는 V_H, D_H, 및 J_H 절편의 레퍼토리로부터 유래된 V_H, D_H 및 J_H 절편을 포함하는 가변 영역 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다. 다양한 유기체에 대한 V, D, 및 J 중쇄 절편의 서열, 위치 및 명명은 URL "imgt.org"에서 월드 와이드 웹(www) 기반의 인터넷을 통해 접근할 수 있는 IMGT 데이터베이스에서 발견될 수 있다.

[0068] 용어 "경쇄"는 임의의 유기체 기원의 면역글로불린 경쇄 서열을 포함하고 달리 특정되지 않는 경우 인간 카파(κ) 및 람다(λ) 경쇄 및 VpreB, 및 대용 경쇄를 포함한다. 경쇄 가변 도메인은 달리 특정되지 않는 경우, 전형적으로, 3개의 경쇄 CDR 및 4개의 골격(FR) 영역을 포함한다. 일반적으로, 전장 경쇄는 아미노 말단에서 카복실 말단으로, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, 및 경쇄 불변 영역 아미노산 서열을 포함하는 가변 도메인을 포함한다. 경쇄 가변 도메인은 일반적으로, 생식선에 존재하는 경쇄 V 및 J 유전자 절편의 레퍼토리로부터 유래된 경쇄 V_L 및 경쇄 J_L 유전자 절편들을 포함하는 경쇄 가변 영역 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다. 다양한 유기체에 대한 경쇄 V 및 J 유전자 절편의 서열, 위치 및 명명은 URL "imgt.org"에서 월드 와이드 웹(www) 기반의 인터넷을 통해 접근할 수 있는 IMGT 데이터베이스에서 발견될 수 있다. 경쇄는 *예를 들어*, 이들이 나타나는 에피토프-결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 제1 또는 제2 에피토프 둘다와 선택적으로 결합하지 않는 것들을 포함한다. 경쇄는 또한 이들이 나타나는 에피토프 결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 하나 이상의 에피토프에결합하고 이를 인지하는 것과 함께 중쇄에 결합하고 인지하거나 원조하는 것들을 포함한다.

[0069] 상기 용어 "작동가능하게 연결된"은 성분들이 이들의 의도된 방식으로 작동가능하게 연결되어 기능하는 관계를 포함한다. 하나의 예에서, 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 적당한 전사 조절을 유지하도록 조절 서열(예를들어, 프로모터, 인핸서, 사일런서 서열 등)에 작동가능하게 연결될 수 있다. 한 경우에, 면역글로불린 가변 영역

(또는 V(D)J 절편들)의 핵산 서열은 서열간에 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 서열로 적당히 재조합되도록 하기 위해 면역글로불린 불변 영역의 핵산 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0070] 1. 랫트 핵산을 포함하는 표적 유전자 좌위

[0071] 표적 유전자 좌위에서 하나 이상의 삽입 핵산의 통합을 가능하게 하는 다양한 방법 및 조성물이 제공된다. 본원에 사용된 바와 같은 "목적하는 게놈 유전자 좌위"는 삽입 핵산을 통합하고자 하는 게놈내 DNA의 임의의 절편 또는 영역을 포함한다. 상기 용어 "목적하는 게놈 유전자 좌위" 및 "목적하는 표적 게놈 유전자 좌위"는 상호교환하여 사용될 수 있다. 목적하는 게놈 유전자 좌위는 세포에 고유한 것일 수 있거나 대안적으로 세포의 게놈내에 통합된DNA의 이종성 또는 외인성 절편을 포함할 수 있다. DNA의 상기 이종성 또는 외인성 절편은 전이유전자, 발현 카세트, 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 게놈 DNA의 이종성 또는 외인성 영역을 포함할 수 있다. 상기 용어 "유전자 좌위"는 게놈 DNA내에 DNA의 절편으로서 본원에 정의된다. 본원에 기재된 유전학적 변형은 목적하는 유전자 좌위로부터 하나 이상의 결실, 목적하는 유전자 좌위로의 부가, 목적하는 유전자 좌위의 치환 및/또는 이의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 목적하는 유전자 좌위는 암호화 영역 또는 비-암호화 조절 영역을 포함할 수 있다.

[0072] 목적하는 게놈 유전자 좌위는 예를 들어, 인지 부위, 선택 마커, 이전에 통합된 삽입 핵산, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 프로모터 등을 포함하는 표적화된 통합 시스템의 임의의 성분을 추가로 포함할 수 있다. 대안적으로, 목적하는 상기 게놈 유전자 좌위는 효모 인공 염색체 (YAC), 세균 인공 염색체 (BAC), 인간 인공 염색체, 또는 적당한 숙주 세포에 함유된 임의의 다른 가공된 게놈 영역내에 위치할 수 있다. 다양한 구현예에서, 상기 표적화된 유전자 좌위는 고유하거나, 원핵 세포, 진핵 세포, 효모, 세균, 비-인간 포유동물, 비-인간 세포, 설치류, 인간, 랫트, 마우스, 햄스터, 토끼, 돼지, 소, 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 페렛, 영장류(*예를 들어,* 마머셋, 레서스 원숭이), 애완 포유동물 또는 농업용 포유동물 또는 목적하는 임의의 다른 유기체 또는 이의 조합으로부터의 이종성 또는 외인성 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0073] 구체적 구현예에서, 목적하는 게놈 유전자 좌위는 "랫트 핵산"의 표적 유전자 좌위를 포함한다. 상기 영역은 세포 게놈내에 통합되는, 랫트 기원의 핵산을 포함한다.

[0074] 표적 유전자 좌위의 비제한적인 예는 B 세포에서 발현되는 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위, 미성숙 B 세포에서 폴리펩타이드를 발현하는 게놈 유전자 좌위, 성숙한 B 세포에서 폴리펩타이드를 발현하는 게놈 유전자 좌위, 면역글로불린(Ig) 유전자 좌위 또는 예를 들어, T 세포 수용체 알파 유전자 좌위를 포함하는 T 세포 수용체 유전자 좌위를 포함한다. 표적 게놈 유전자 좌위의 추가의 예는 예를 들어, IL2 수용체 감마 (IL2Rg) 유전자 좌위, ApoE 유전자 좌위, Rag1 유전자 좌위, Rag2 유전자 좌위, Rag1/Rag2 유전자 좌위, 및 ERBB4 유전자 좌위를 포함하는, FcER1a 유전자 좌위, TLR4 유전자 좌위, PRLR 유전자 좌위, Notch4 유전자 좌위, Accn2 유전자 좌위, Adamts5 유전자 좌위, TRPA1 유전자 좌위, Fo1H1 유전자 좌위, LRP5 유전자 좌위, IL2 수용체 유전자 좌위를 포함한다. 임의의 상기 표적 유전자 좌위는 랫트로부터 기원할 수 있다.

[0075] 일 구현예에서, 표적 좌위는 포유동물 면역글로불린 중쇄 가변/변수 영역 아미노산 서열을 인코딩한다. 일 구현예에서, 표적 좌위는 랫트 면역글로불린 중쇄 가변/변수 영역 아미노산 서열을 인코딩한다. 일 구현예에서, 표적 좌위는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 재배열되지 않은 랫트, 마우스, 또는 인간 면역글로불린 중쇄 가변/변수 영역 핵산 서열을 포함하는 게놈 DNA 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열은 CH1, 힌지, CH2, CH3, 및 이들의 조합로부터 선택된 랫트, 마우스, 또는 인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열이다. 하나의 구현예에서, 중쇄 불변 영역 핵산 서열은 CH1-힌지-CH2-CH3을 포함한다. 일 구현예에서, 표적 좌위는 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 재배열된 랫트, 마우스, 또는 인간 면역글로불린 중쇄 가변/변수 영역 핵산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열은 CH1, 힌지, CH2, CH3, 및 이들의 조합로부터 선택된 랫트, 마우스, 또는 인간 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열이다. 하나의 구현예에서, 중쇄 불변 영역 핵산 서열은 CH1-힌지-CH2-CH3을 포함한다.

[0076] 일 구현예에서, 표적 좌위는 게놈 DNA 서열을 포함하고, 이 서열은 포유동물 면역글로불린 경쇄 가변/변수 영역 아미노산 서열을 인코딩한다. 일 구현예에서, 게놈 DNA 서열은 재배열되지 않은 포유동물 λ 및/또는 κ 경쇄 가변/변수 영역 핵산 서열을 포함한다.

[0077] 일 구현예에서, 게놈 DNA 서열은 재배열된 포유동물 λ 및/또는 κ 경쇄 가변/변수 영역 핵산 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 재배열되지 않은 λ 또는 κ 경쇄 가변/변수 영역 핵산 서열은 λ 경쇄 불변 영역 핵산 서열 및

κ 경쇄 불변 영역 핵산 서열로부터 선택된 포유동물 면역글로불린 경쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다. 일 구현예에서, 포유동물 면역글로불린 경쇄 불변 영역 핵산 서열은 랫트 면역글로불린 경쇄 불변 영역 핵산 서열이다. 일 구현예에서, 포유동물 면역글로불린 경쇄 불변 영역 핵산 서열은 마우스 면역글로불린 경쇄 불변 영역 핵산 서열이다. 일 구현예에서, 포유동물 면역글로불린 경쇄 불변 영역 핵산 서열은 인간 면역글로불린 경쇄 불변 영역 핵산 서열이다.

[0078] 본원에서 사용된 바와 같이, 랫트 ApoE 좌위, 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 (I1-2rg) 좌위, 랫트 Rag2 좌위, 랫트 Rag1 좌위 및/또는 랫트 Rag2/Rag1 좌위는 랫트 게놈의 각 영역을 포함하고, 여기서 각각의 이들 유전자 또는 유전자 조합이 위치한다. 랫트 ApoE 좌위, 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, 랫트 Rag2 좌위, 랫트 Rag1 좌위 및/또는 조합된 랫트 Rag2/Rag1 좌위 중 임의의 하나의 변경은 주어진 좌위에 대한 임의의 원하는 변경을 포함할 수 있다. 주어진 랫트 좌위에 대한 변형의 비-제한적인 예는 본원에서 추가로 상세히 논의된다.

[0079] 예를 들면, 특정한 구현예에서, 랫트 ApoE 좌위, 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, Rag2 좌위, 및/또는 Rag2/Rag1 좌위 중 하나 이상은 변형되고, 이로써 Rag1 및 Rag2 단백질의 인코딩된 ApoE 단백질 또는 인터루킨-2 수용체 감마 단백질 또는 Rag1 단백질 또는 Rag2 단백질 또는 조합의 활성 및/또는 수준은 감소된다. 다른 구현예에서, Rag1 및 Rag2 단백질의 ApoE 단백질, 인터루킨-2 수용체 감마 단백질, Rag1 단백질, 또는 Rag2 단백질, 또는 조합의 활성은 없다.

[0080] "감소된"이란, 관심 좌위에서 인코딩된 유전자/단백질의 수분 또는 활성의 임의의 감소인 것으로 의도된다. 예를 들면, 활성의 감소는 (1) 적절한 대조군과 비교할 때, 예를 들면, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120% 또는 그 초과의 감소된 수준 또는 활성을 포함하는 주어진 단백질 (즉, Rag1 및 Rag2의 ApoE, 인터루킨-2 수용체 감마, Rag2, Rag2 또는 조합)의 전체 수준 또는 활성의 통계적으로 유의미한 감소를 포함할 수 있다. ApoE, 인터루킨-2 수용체 감마, Rag1 및 Rag2 중 어느 것의 농도 및/또는 활성의 감소에 대한 검정 방법은 당해기술에서 공지되어 있다.

[0081] 다른 구현예에서, 랫트 ApoE 좌위, 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, 랫트 Rag2 좌위, 랫트 Rag1 좌위 및/또는 랫트 Rag2/Rag1 좌위 중 하나 이상은 변형을 포함하고, 이로써 인코딩된 ApoE 폴리펩타이드, 인터루킨-2 수용체 감마 폴리펩타이드, Rag2 폴리펩타이드, Rag1 폴리펩타이드, 또는 Rag1 및 Rag2 폴리펩타이드 둘 모두의 활성 및/또는 수준은 증가된다. "증가된"이란, 관심 좌위에서 인코딩된 유전자/폴리펩타이드의 수준 또는 활성의 임의의 증가인 것으로 의도된다. 예를 들면, 활성의 증가는 (1) 적절한 대조군과 비교할 때, 예를 들면, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 120% 또는 그 초과의 증가된 수준 또는 활성을 포함하는 주어진 단백질 (즉, ApoE, 인터루킨-2 수용체 감마, Rag1, Rag2 또는 Rag1 및 Rag2)의 전체 수준 또는 활성의 통계적으로 유의미한 증가를 포함할 수 있다. ApoE, Rag1, Rag2 및 인터루킨-2 수용체 감마 단백질의 어느 것의 농도 및/또는 활성의 증가에 대한 검정 방법은 당해기술에 공지되어 있다.

[0082] 랫트 ApoE 좌위, 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, 랫트 Rag2 좌위, 랫트 Rag1 좌위 및/또는 랫트 Rag2/Rag1 좌위에 대한 유전자 변형은 유전자 좌위에서 내인성 랫트 핵산 서열의 결실, 유전자 좌위에서의 외인성 핵산의 삽입, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 결실 및/또는 삽입은 본원의 다른 곳에서 논의된 바와 같이 주어진 좌위 내의 어디에서도 일어날 수 있다.

[0083] 본원에서 제공된 추가 구현예는 또 하나의 유기체로부터 ApoE 좌위, 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, Rag2 좌위, Rag1 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 좌위의 상응하는 상동성 또는 이종상동성 부분에 의한 랫트 ApoE 좌위, 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, Rag2 좌위, Rag1 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 좌위의 부분의 치환을 통해 랫트 ApoE 좌위, 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, 랫트 Rag2 좌위, 랫트 Rag1 좌위 및/또는 랫트 Rag2/Rag1 좌위 중 하나 이상의 변형을 포함한다.

[0084] 또 다른 구현예에서, 랫트 ApoE 좌위, 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, Rag2 좌위, Rag1 좌위, 및/또는 Rag2/Rag1 좌위 중 하나 이상의 변형은 치환되는 ApoE 좌위, 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, Rag2 좌위, Rag1 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 좌위의 부분에 대해 그것의 전장 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%를 가로지르는 삽입 폴리뉴클레오타이드 공유에 의한 랫트 ApoE 좌위, 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 좌위 및/또는 랫트 Rag2 좌위, 및/또는 Rag1 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 좌위의 부분의 치환을 통해 수행된다.

[0085] 결실된 랫트 좌위의 주어진 삽입 폴리뉴클레오타이드 및/또는 상응하는 영역은 코딩 영역, 인트론, 엑손, 미번역된 영역, 조절 영역, 프로모터, 또는 인핸서 또는 임의의 이들의 조합 또는 이것의 임의의 부분일 수 있다. 게다가, 결실될 랫트 좌위의 주어진 삽입 폴리뉴클레오타이드 및/또는 영역은 임의의 원하는 길이일 수 있고,

그 길이의 예는 10-100 뉴클레오타이드 길이, 100-500 뉴클레오타이드 길이, 500-1kb 뉴클레오타이드 길이, 1Kb 내지 1.5kb 뉴클레오타이드 길이, 1.5kb 내지 2kb 뉴클레오타이드 길이, 2kb 내지 2.5kb 뉴클레오타이드 길이, 2.5kb 내지 3kb 뉴클레오타이드 길이, 3kb 내지 5kb 뉴클레오타이드 길이, 5kb 내지 8kb 뉴클레오타이드 길이, 8kb 내지 10kb 뉴클레오타이드 길이 또는 그 초과를 포함한다. 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 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 약 350kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 800kb, 약 800kb 내지 1Mb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 약 2.5Mb 내지 약 2.8Mb, 약 2.8Mb 내지 약 3Mb이다. 다른 구현예에서, 결실될 랫트 좌위의 주어진 삽입 폴리뉴클레오타이드 및/또는 영역은 적어도 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 또는 900 뉴클레오타이드 또는 적어도 1 kb, 2kb, 3kb, 4kb, 5kb, 6kb, 7kb, 8kb, 9kb, 10kb, 11kb, 12kb, 13kb, 14 kb, 15kb, 16kb 또는 그 초과이다.

[0086] 주어진 삽입 폴리뉴클레오타이드는 임의의 유기체로부터 유래할 수 있고, 그 예는 설치류, 랫트, 마우스, 햄스터, 포유동물, 비-인간 포유동물, 인간, 농업적 동물 또는 가축을 포함한다.

[0087] 본원에서 추가 상세히 논의된 바와 같이, 다양한 방법은 임의의 랫트 관심 좌위의 표적화된 변형을 생성하도록 제공되고, 그 변형의 예는 랫트 ApoE 좌위, 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, 랫트 Rag2 좌위, 랫트 Rag1 좌위, 및/또는 랫트 Rag2/Rag1 좌위에서의 표적화된 변형을 포함한다. 추가로, 유전적으로 변형된 랫트 또는 유전적으로 변형된 만능 랫트 세포 (예를 들면, 랫트 ES 세포)가 제공되고, 이 세포는 인터루킨-2 수용체 감마 좌위에서, ApoE 좌위에서, 랫트 Rag2 좌위에서, 랫트 Rag1 좌위에서, 및/또는 랫트 Rag2/Rag1 좌위에서 결실, 삽입, 치환 및/또는 임의의 이들의 조합을 포함한다. 그와 같은 유전자 변형 (표적 좌위의 활성 부재, 감소, 증가 또는 조절을 야기하는 것들 포함)은 생식계열을 통해 또한 이동될 수 있다. 특정한 구현예에서, 유전자 변형은 원하는 표적 좌위의 녹아웃을 야기한다. 그와 같은 랫트는 본원의 다른 곳에서 논의되 바와 같이 다양한 실험적인 시스템에서 사용한다.

[0088] 예를 들면, 랫트에서의 ApoE (아포지질단백질 E) 녹아웃은 플라크 형성, 전사 변화 (전체의 전사체 샷건 서열분석 (RNA-Seq), 및 *생체외* 기능을 비제한적으로 포함하는 내피을 연구하기 위해 동물 모델을 제공한다. 게다가, 더 큰 크기의 랫트는 모든 이들 검정을 쉽게 하고 잠재적으로 RNA-Seq 데이터의 품질을 개선한다. ApoE는 중요한 수송 분자이고 혈류를 통해 수송 지질, 예컨대 콜레스테롤을 수송할 수 있다. ApoE는, 예를 들면, 뇌로부터 β-아밀로이드를 맑게 하기 위해 신경계에서 또한 기능할 수 있다. ApoE의 변형은, 예를 들면, 죽상동맥경화증, 고지혈증, 및 알츠하이머병을 포함하는 다양한 병태와 연루되었다. ApoE 녹아웃 동물은 혈액으로부터 지질단백질의 손상된 클리어링을 나타내고 죽상동맥경화증을 발달시킨다. 따라서, ApoE 녹아웃 동물은 병태 및/또는 과정 예를 들면, 내피 기능, 플라크 형성, 전사 변화 (RNA-Seq), 고지혈증, 죽상동맥경화증 및 알츠하이머병을 연구하기 위해 모델을 제공한다. ApoE 활성을 측정하는 검정은 당해기술에 공지되어 있다. 예를 들면, ApoE 활성의 감소는 면역검정, 예컨대 ELISA 또는 면역블로팅 기술에 의해 대상체로부터 수득된 혈액 샘플에서 ApoE 수준의 감소에 대한 검정에 의해 측정될 수 있다. 게다가, 큰 크기의 랫트는 모든 이들 검정을 쉽게 하고 데이터의 품질을 개선한다.

[0089] RAG1 (재조합-활성화 유전자 1) 및 RAG2 (재조합-활성화 유전자 2)은 VDJ 재조합 활성을 갖는 다중-서브유닛 복합물의 일부이고 림프구에서면역글로불린 및 T-세포 수용체 유전자의 재배열 및 재조합에서 중요한 역할을 하는 효소이다. RAG1 및 RAG2는 재조합을 쉽게 하고 T 세포 수용체 및 B 세포 수용체 (즉 면역글로불린) 유전자의 분절을 연결하기 위해 이중가닥 DNA 절단을 유도한다. RAG1 및/또는 RAG2의 녹아웃은 중증 면역결핍이 있는 동물에서 B 세포 및 T 세포의 손실을 야기한다. RAG1 및/또는 RAG2 녹아웃 동물은, 예를 들면, 이종이식 (즉 랫트에서 인간 세포 이종이식), 암, 백신 개발, 자가면역 질환, 감염성 질환 및 이식편 대 숙주 질환 (GVHD)의 연구를 사용한다. RAG1 및/또는 RAG2 활성을 측정하는 다양한 검정은 당해기술에 공지되어 있고, 예를 들면, 대상체에서 B 세포 및/또는 T 세포의 존재 또는 부재에 대한 재조합 효율 또는 검정을 측정하는 것을 포함한다. 게다가, 큰 크기의 랫트는 모든 이들 검정을 쉽게 하고 잠재적으로 데이타의 품질을 개선한다.

[0090] IL-2 수용체 (IL-2R)는 어떤 면역 세포의 표면 상에서 발현되고 사이토카인 인터루킨-2 (IL-2)에 결합한다. IL-2R는 알파 사슬 (IL-2Ra, CD25), 베타 사슬 (IL-2Rb, CD122) 및 감마 사슬 (IL2-Rg, CD132)을 포함하는 적어도 3 개의 별개의 서브유닛 사슬을 포함하는 내재성 막 단백질이다. IL-2 수용체 감마 (또한 일명 IL2r-ɣ 또는 IL2Rg) 사슬은, 예를 들면, IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 및 IL-21에 대한 수용체를 포함하는 다양한 사이토카인 수용체에 의해 공유된 공통의 감마 사슬이다. IL-2Rg는 리간드의 결합에 기여하는 세포의 세포외 표면 상

의 엑토도메인, 막통과 도메인, 및 세포내 신호 전달 경로을 유도하기 위해 다양한 분자와 상호작용할 수 있는 세포내 도메인을 포함한다. I12rg 유전자는 포유동물에서 X-염색체 상에서 발견되고 인간에서 감마 사슬 유전자에서의 어떤 돌연변이는 엄청난 T-세포 결함을 특징으로 하는 인간 X-연결된 중증 복합성 면역결핍 (XSCID)을 야기할 수 있다. 또한, 감마 사슬 엑토-도메인은 막통과 수용체에서 나올 수 있고 가용성 감마 사슬 수용체로서 방출된다. 가용성 감마 사슬 수용체는 대상체의 혈액에서 검출될 수 있고 사이토카인 신호전달을 조절하기 위해 기능할 수 있다.

[0091] 일부 구현예에서, 랫트 IL-2Rg 사슬은 인간 IL2-Rg 사슬로 치환되고, 이로써 랫트는 완전 인간 IL-2Rg 사슬을 발현시킨다. 다른 예에서, 랫트 IL-2Rg 사슬의 엑토도메인만을 인간 IL-2Rg 사슬의 엑토도메인으로 치환하는 것을 유용할 수 있다. 그와 같은 경우에, 랫트에서 발현된 수득한 인간화된 IL-2Rg 사슬은 인간 엑토도메인을 포함하고, 분자의 나머지는 랫트로부터 유래한다.

[0092] IL-2Rg의 전장 인간화가 유용한 것은, 이러한 변형된 좌위를 갖는 랫트가 인간 IL-2Rg을 생산할 것이기 때문이다. 이것은 인간 IL-2Rg에 대해 특이적인 항체를 갖는 랫트에서 인간 IL-2Rg의 검출을 허용할 것이다. 엑토-인간화 (즉, IL-2Rg의 랫트 엑토-도메인을 IL-2Rg의 인간 엑토-도메인으로 치환하는 것)는 IL2-Rg에 대한 인간 리간드에 결합할 IL-2Rg 폴리펩타이드를 생기게 할 것이지만, 세포질 도메인이 여전히 랫트이기 때문에, 그것의 엑토-인간화된 형태의 IL-2Rg는 랫트 신호전달 기계와 또한 상호작용할 것이다.

[0093] 2. 랫트 표적 좌위의 변형

[0094] A. 벡터 및 삽입 핵산의 표적화

[0095] i. 삽입 핵산

[0096] 본원에서 사용된 바와 같이, "삽입 핵산"은 표적 좌위에서 통합하기를 바라는 DNA의 분절을 포함한다. 일 구현예에서, 삽입 핵산은 1 이상의 관심 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 구현예에서, 삽입 핵산은 1 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있다. 주어진 발현 카세트는 관심 폴리뉴클레오타이드, 선택 마커를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 리포터 유전자를 발현에 영향을 미치는 다양한 조절 성분과 함께 포함할 수 있다. 삽입 핵산에 포함될 수 있는 관심 폴리뉴클레오타이드, 선택 마커, 및 리포터 유전자의 비-제한적인 예는 본원의 다른 곳에서 상세히 논의된다.

[0097] 특정한 구현예에서, 삽입 핵산은 게놈 DNA, cDNA, 조절 영역, 또는 임의의 부분 또는 이들의 조합의 분절을 포함할 수 있는, 랫트로부터의 핵산을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 삽입 핵산은 하기로부터의 핵산을 포함할 수 있다: 비-인간 포유동물, 설치류, 인간, 랫트, 마우스, 햄스터, 토끼, 돼지, 소, 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 흰담비, 영장류 (예를 들면, 마모셋, 붉은털원숭이), 사육된 포유동물 또는 농업적 포유동물 또는 관심의 임의의 다른 유기체. 본원에서 추가로 상세히 개괄된 바와 같이, 다양한 방법 및 조성물에서 이용된 삽입 핵산은 랫트 핵산을 포함하는 표적 좌위의 "인간화"를 야기할 수 있다.

[0098] 일 구현예에서, 삽입 핵산은 내인성 유전자의 적어도 하나의 엑손의 녹-인 대립유전자를 포함한다. 일 구현예에서, 삽입 핵산은 전체 내인성 유전자의 녹-인 대립유전자 (즉, "유전자-스왑 녹-인")을 포함한다.

[0099] 일 구현예에서, 삽입 핵산은 예를 들면, 프로모터, 인핸서, 또는 전사 억제인자-결합 요소를 포함하는 조절 인자를 포함한다.

[0100] 추가 구현예에서, 삽입 핵산은 조건적 대립유전자를 포함한다. 일 구현예에서, 조건적 대립유전자는 아래에서 기재된 바와 같은 다작용성 대립유전자이다: US 2011/0104799(이것은 그 전체가 참고로 편입되어 있음). 특정한 구현예에서, 조건적 대립유전자는 하기를 포함한다: (a) 표적 유전자의 전사에 대한 센스 방향의 액추에이팅 서열, 및 센스 또는 안티센스 방향의 약물 선택 카세트; (b) 안티센스 방향에서 관심 뉴클레오타이드 서열 (NSI) 및 조건적 반전 모듈 (엑손-스플릿팅 인트론 및 가역 유전자올가미-유사 모듈을 이용하는 COIN; 참고, 예를 들면, US 2011/0104799, 이것은 그 전체가 참고로 편입되어 있음); 및 (c) (i) 액추에이팅 서열 및 DSC가 없고, 그리고 (ii) NSI를 센스 방향으로 그리고 COIN을 안티센스 방향으로 함유하는 조건적 대립유전자를 형성하기 위해 제1 재조합효소에 대한 노출시 재조합하는 재조합가능 단위.

[0101] 삽입 핵산은, 그 범위가 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb이다.

[0102] 일 구현예에서, 삽입 핵산은 약 1kb 내지 약 200kb, 약 2kb 내지 약 20kb, 또는 약 0.5kb 내지 약 3Mb 범위의

랫트 게놈 DNA 서열의 결실을 포함한다. 일 구현예에서, 게놈 DNA 서열의 결실의 정도는 5' 상동성 아암 및 3' 상동성 아암의 총 길이보다 더 크다. 일 구현예에서, 게놈 DNA 서열의 결실의 정도는, 그 범위가 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 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, 약 190kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 약 350kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 800kb, 약 800kb 내지 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb, 내지 약 2.5Mb, 약 2.5Mb 내지 약 2.8Mb, 약 2.8Mb 내지 약 3Mb, 약 200kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 약 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 또는 약 2.5Mb 내지 약 3Mb이다.

[0103] 일 구현예에서, 삽입 핵산은 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 랫트 핵산 서열의 삽입 또는 치환을 포함한다. 일 구현예에서, 삽입 핵산은 상응하는 랫트 DNA 서열을 포함하는 내인성 랫트 좌위에서 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 랫트 DNA 서열의 삽입 또는 치환을 포함한다.

[0104] 일 구현예에서, 유전자 변형은 핵산 서열의 부가이다. 일 구현예에서, 부가된 뉴클레오타이드 서열은 5kb 내지 200 kb의 범위이다.

[0105] 일 구현예에서, 삽입 핵산은 코딩 서열에서 유전자 변형을 포함한다. 일 구현예에서, 유전자 변형은 코딩 서열의 결실 돌연변이를 포함한다. 하나의 구현예에서, 상기 유전학적 변형은 2개의 내인성 암호화 서열의 융합을 포함한다.

[0106] 일 구현예에서, 삽입 핵산은 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 랫트 핵산 서열의 삽입 또는 치환을 포함한다. 일 구현예에서, 삽입 핵산은 상응하는 랫트 DNA 서열을 포함하는 내인성 랫트 좌위에서 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 랫트 DNA 서열의 삽입 또는 치환을 포함한다.

[0107] 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 비단백질 암호화 서열의 결실을 포함하지만 단백질 암호화 서열의 결실을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, 비단백질 암호화 서열의 결실은 조절 요소의 결실을 포함한다. 일 구현예에서, 유전자 변형은 프로모터의 결실을 포함한다. 일 구현예에서, 유전자 변형은 프로모터 또는 조절 인자의 부가를 포함한다. 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 프로모터 또는 조절 요소의 치환를 포함한다.

[0108] 일 구현예에서, 표적화 벡터의 핵산 서열은, 게놈에 통합될 때 랫트 ApoE 좌위의 영역의 유전자 변형을 생산할 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 상기 ApoE 좌위에서의 유전자 변형은 ApoE 활성의 감소, ApoE 활성의 증가, 또는 ApoE 활성의 조절을 야기한다. 일 구현예에서, ApoE 녹아웃 ("무반응 대립유전자)이 산출된다.

[0109] 일 구현예에서, 표적화 벡터의 핵산 서열은 게놈에 통합될 때 랫트 인터루킨-2 수용체 좌위의 영역의 유전자 변형을 생산할 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 인터루킨-2 수용체 좌위에서의 유전자 변형은 인터루킨-2 수용체 활성의 감소를 야기한다. 일 구현예에서, 인터루킨-2 수용체 녹아웃 ("무반응 대립유전자")이 산출된다.

[0110] 추가 구현예에서, 삽입 핵산은, 또 하나의 유기체로부터 ApoE 좌위, 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, Rag2 좌위, Rag1 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 좌위의 상응하는 상동성 또는 이종상동성 부분에 의해 랫트 ApoE 좌위, 인터루킨-2 수용체 감마 좌위 및/또는 Rag2 좌위, 및/또는 Rag1 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 좌위의 부분이 치환된다.

[0111] 여전히 다른 구현예에서, 삽입 핵산은 이의 전체 길이에 걸쳐 치환되는 ApoE 유전자 좌위, 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위, Rag2 유전자 좌위, Rag1 유전자 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 유전자 좌위의 일부와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%를 공유하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0112] 소정의 삽입 폴리뉴클레오타이드 및 치환되는 랫트 유전자 좌위의 상응하는 영역은 암호화 영역, 인트론, 엑손, 비해독 영역, 조절 영역, 프로모터 또는 인핸서 또는 이의 조합일 수 있다. 게다가, 결실될 랫트 좌위의 주어진 삽입 폴리뉴클레오타이드 및/또는 영역은 임의의 원하는 길이일 수 있고, 그 길이의 예는 10-100 뉴클레오타이드 길이, 100-500 뉴클레오타이드 길이, 500-1kb 뉴클레오타이드 길이, 1Kb 내지 1.5kb 뉴클레오타이드 길이, 1.5kb 내지 2kb 뉴클레오타이드 길이, 2kb 내지 2.5kb 뉴클레오타이드 길이, 2.5kb 내지 3kb 뉴클레오타이드 길이, 3kb 내지 5kb 뉴클레오타이드 길이, 5kb 내지 8kb 뉴클레오타이드 길이, 8kb 내지 10kb 뉴클레오타이드 길이 또는 그 초과를 포함한다. 다른 경우에, 삽입 또는 치환 크기는 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약

20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 약 350kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 800kb, 약 800kb 내지 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb, 내지 약 2.5Mb, 약 2.5Mb 내지 약 2.8Mb, 약 2.8Mb 내지 약 3Mb이다. 다른 구현예에서, 결실될 랫트 좌위의 주어진 삽입 폴리뉴클레오타이드 및/또는 영역은 적어도 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 또는 900 뉴클레오타이드 또는 적어도 1 kb, 2kb, 3kb, 4kb, 5kb, 6kb, 7kb, 8kb, 9kb, 10kb, 11kb, 12kb, 13kb, 14 kb, 15kb, 16kb 또는 그 초과이다.

[0113] 일 구현예에서, 프로모터는 항시적 활성 프로모터이다.

[0114] 하나의 구현예에서, 상기 프로모터는 유도성 프로모터이다. 일 구현예에서, 유도성 프로모터는 화학적으로-조절된 프로모터이다. 일 구현예에서, 화학적으로-조절된 프로모터는 알코올-조절된 프로모터이다. 일 구현예에서, 알코올-조절된 프로모터는 알코올 탈수소효소 (alcA) 유전자 프로모터이다. 일 구현예에서, 화학적으로-조절된 프로모터는 테트라사이클린-조절된 프로모터이다. 일 구현예에서, 테트라사이클린-조절된 프로모터는 테트라사이클린-반응성 프로모터이다. 일 구현예에서, 테트라사이클린-조절된 프로모터는 테트라사이클린 오퍼레이터 서열 (tetO)이다. 일 구현예에서, 테트라사이클린-조절된 프로모터는 tet-On 프로모터이다. 일 구현예에서, 테트라사이클린-조절된 프로모터는 tet-Off 프로모터이다. 일 구현예에서, 화학적으로- 조절된 프로모터는 스테로이드 조절된 프로모터이다. 일 구현예에서, 스테로이드 조절된 프로모터는 랫트 글루코코르티코이드 수용체의 프로모터이다. 일 구현예에서, 스테로이드 조절된 프로모터는 에스트로겐 수용체의 프로모터이다. 일 구현예에서, 스테로이드-조절된 프로모터는 엑디손 수용체의 프로모터이다. 일 구현예에서, 화학적으로-조절된 프로모터는 금속-조절된 프로모터이다. 일 구현예에서, 금속-조절된 프로모터는 메탈로단백질 프로모터이다. 일 구현예에서, 유도성 프로모터는 물리적으로-조절된 프로모터이다. 일 구현예에서, 물리적으로-조절된 프로모터는 온도-조절된 프로모터이다. 일 구현예에서, 온도-조절된 프로모터는 열충격 프로모터이다. 일 구현예에서, 물리적으로-조절된 프로모터는 광-조절된 프로모터이다. 일 구현예에서, 광-조절된 프로모터는 광-유도성 프로모터이다. 일 구현예에서, 광-조절된 프로모터는 광-억제성 프로모터이다.

[0115] 일 구현예에서, 프로모터는 조직-특이적 프로모터이다. 일 구현예에서, 프로모터는 뉴런-특이적 프로모터이다. 일 구현예에서, 프로모터는 신경교-특이적 프로모터이다. 일 구현예에서, 프로모터는 근육 세포 특이적 프로모터이다. 일 구현예에서, 프로모터는 심장 세포 특이적 프로모터이다. 일 구현예에서, 프로모터는 신장 세포 특이적 프로모터이다. 일 구현예에서, 프로모터는 골 세포 특이적 프로모터이다. 일 구현예에서, 프로모터는 내피 세포 특이적 프로모터이다. 일 구현예에서, 프로모터는 면역 세포 특이적 프로모터이다. 일 구현예에서, 면역 세포 프로모터는 B 세포 프로모터이다. 일 구현예에서, 면역 세포 프로모터는 T 세포 프로모터이다.

[0116] 일 구현예에서, 프로모터는 발전적으로-조절된 프로모터이다. 일 구현예에서, 발전적으로-조절된 프로모터는 발달의 배아 단계 동안에서만 활성이다. 일 구현예에서, 발전적으로-조절된 프로모터는 성체 세포에서만 활성이 있다.

[0117] 일부 구현예에서, 상기 삽입 핵산은 부위-특이적 재조합 표적 서열로 플랭킹된 핵산을 포함한다. 전체 삽입 핵산은 상기 부위-특이적 재조합 표적 서열에 의해 플랭킹될 수 있지만, 삽입 핵산내 목적하는 임의의 영역 또는 개별 폴리뉴클레오타이드는 또한 상기 부위에 플랭킹될 수 있는 것으로 인지된다. 상기 부위-특이적 리컴비나제는 리컴비나제 폴리펩타이드를 세포에 도입함하거나 부위-특이적 리컴비나제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포로 도입함을 포함하는 임의의 수단에 의해 상기 세포에 도입될 수 있다. 부위-특이적 리컴비나제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 삽입 핵산내에 또는 별도의 폴리뉴클레오타이드내에 위치할 수 있다. 상기 부위-특이적 리컴비나제는 예를 들어, 유도성 프로모터, 세포에 대해 내인성 프로모터, 세포에 대해 이종성 프로모터, 세포-특이적 프로모터, 조직-특이적 프로모터 또는 발육 단계-특이적 프로모터를 포함하는 세포에 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 삽입 핵산에서 삽입 핵산 또는 목적하는 임의의 폴리뉴클레오타이드를 플랭킹할 수 있는 부위-특이적 재조합 표적 서열은 loxP, lox511, lox2272, lox66, lox71, loxM2, lox5171, FRT, FRT11, FRT71, attp, att, FRT, rox, 및 이의 조합을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0118] 일부 구현예에서, 상기 부위-특이적 재조합 부위는 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드및/또는 삽입 핵산내 함유된 리포터 유전자를 플랭킹한다. 상기 예에서, 표적화된 유전자 좌위에서 삽입 핵산의 통합 후, 부위-특이적 재조합 부위간의 서열은 제거될 수 있다.

[0119] 하나의 구현예에서, 상기 삽입 핵산은 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 상기 선택 마커는 선택 카세트에 함유될 수 있다. 상기 선택 마커는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 (neo^r), 하이그로마이신 B

포스포트랜스퍼라제 (hyg^r), 푸로마이신-N-아세틸트랜스퍼라제 (puro^r), 블라스티시딘 S 데아미나제 (bsr^r), 크산틴/구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (gpt), 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 (HSV-k), 또는 이의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 세포, 랫트 세포, 만능 랫트 세포 또는 ES 랫트 세포에 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다. 표적화된 유전자 좌위로 목적하는 폴리뉴클레오타이드를 연속적으로 스택킹하는 경우, 상기 선택 마커는 상기된 바와 같이 뉴클레아제 제제에 대한 인지 부위를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 상기 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 부위-특이적 재조합 표적 서열로 플랭킹된다.

[0120] 상기 삽입 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 추가로 포함할 수 있고, 여기서, 상기 리포터 유전자는 LacZ, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, 증진된 황색 형광성 단백질 (EYFP), 에머랄드(Emerald), 증진된 녹색 형광성 단백질 (EGFP), CyPet, 시안 형광성 단백질(cyan fluorescent protein) (CFP), 세룰레안(Cerulean), T-사파이어(Sapphire), 루시퍼라제, 알칼린 포스파타제 및/또는 이의 조합으로 이루어지거나 이들을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 리포터 단백질을 암호화한다. 상기 리포터 유전자는 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 상기 프로모터는 유도성 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 대한 내인성 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 대한 이종성 프로모터, 세포-특이적 프로모터, 조직-특이적 프로모터 또는 발육 단계-특이적 프로모터일 수 있다.

[0121] 하나의 구현예에서, 핵산 삽입은 포유동물 핵산을 포함할 수 있고, 이는 신경계, 골격계, 소화계, 순환계, 근육계, 호흡계, 심혈관계, 림프계, 내분비계, 비뇨계, 생식계 또는 이의 조합에서 발현되는 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위를 포함한다. 하나의 구현예에서, 포유동물 핵산은 골수 또는 골수 유래 세포에서 발현된 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위를 포함한다. 하나의 구현예에서, 핵산은 비장 세포에서 발현되는 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위를 포함한다.

[0122] 하나의 구현예에서, 포유동물 핵산은 신경계, 골격계, 소화계, 순환계, 근육계, 호흡계, 심혈관계, 림프계, 내분비계, 비뇨계, 생식계 또는 이의 조합에서 발현되는 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위를 포함한다. 하나의 구현예에서, 포유동물 핵산은 골수 또는 골수 유래 세포에서 발현된 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위를 포함한다. 하나의 구현예에서, 핵산은 비장 세포에서 발현되는 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위를 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 마우스 게놈 DNA 서열, 랫트 게놈 DNA 서열, 인간 게놈 DNA 서열 또는 이의 조합을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 임의의 순서로 랫트 및 인간 게놈 DNA 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 임의의 순서로 마우스 및 인간 게놈 DNA 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 임의의 순서로 마우스 및 랫트 게놈 DNA 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 임의의 순서로 랫트, 마우스 및 인간 게놈 DNA 서열을 포함한다.

[0123] 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 마우스 게놈 DNA 서열, 랫트 게놈 DNA 서열, 인간 게놈 DNA 서열 또는 이의 조합을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 임의의 순서로 랫트 및 인간 게놈 DNA 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 임의의 순서로 마우스 및 인간 게놈 DNA 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 임의의 순서로 마우스 및 랫트 게놈 DNA 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 임의의 순서로 랫트, 마우스 및 인간 게놈 DNA 서열을 포함한다.

[0124] 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 인간 유전자의 하나 이상의 인간 질환 대립형질유전자를 포함한다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 신경학적 질환이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 심혈관 질환이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 신장 질환이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 근육 질환이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 혈액 질환이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 암이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 면역계 질환이다.

[0125] 하나의 구현예에서, 인간 질환 대립형질유전자는 우성 대립형질유전자이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환 대립형질유전자는 열성 대립형질유전자이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환 대립형질유전자는 단일 뉴클레오타이드 다형(SNP) 대립형질유 전자를 포함한다.

[0126] 하나의 구현예에서, 상기 유전학적 변형은 변화된 결합 특성, 변화된 위치화, 변화된 발현 및/또는 변화된 발현 패턴을 갖는 돌연변이 형태의 단백질을 생성한다.

[0127] 하나의 구현예에서, 상기 삽입 핵산은 선택 카세트를 포함한다. 하나의 구현예에서, 선택 카세트는 선택 마커를 암호화하는 핵산 서열을 포함하고, 상기 핵산 서열은 랫트 ES 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 하나의 구현예에서, 선택 마커는 하이그로마이신 내성 유전자 또는 네오마이신 내성 유전자로부터 선택되거

나 이들을 포함한다.

[0128] 하나의 구현예에서, 핵산은 B 세포에서 발현된 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위를 포함한다. 하나의 구현예에서, 핵산은 미성숙 B 세포에서 발현되는 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위를 포함한다. 하나의 구현예에서, 핵산은 성숙한 B 세포에서 발현되는 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위를 포함한다.

[0129] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산은 조절 요소를 포함한다. 하나의 구현예에서, 조절 요소는 프로모터이다. 하나의 구현예에서, 조절 요소는 인핸서이다. 하나의 구현예에서, 조절 요소는 전사 리프레서-결합 요소이다.

[0130] 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 비단백질 암호화 서열의 결실을 포함하지만 단백질 암호화 서열의 결실을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, 비단백질 암호화 서열의 결실은 조절 요소의 결실을 포함한다. 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 조절 요소의 결실을 포함한다. 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 프로모터 또는 조절 요소의 첨가를 포함한다. 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 프로모터 또는 조절 요소의 치환를 포함한다.

[0131] ii. 발현 카세트

[0132] 본원에서는 본원에서 제공되는 표적화된 게놈 통합 시스템에 사용되는 다양한 성분들 (즉. 뉴클레아제 제제, 인지 부위, 삽입 핵산, 목적하는 폴리뉴클레오타이드, 표적화 벡터, 선택 마커 및 다른 성분들 중 임의의 하나 또는 조합)을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 또는 핵산 분자가 제공된다.

[0133] 용어 "폴리뉴클레오타이드", "폴리뉴클레오타이드 서열", "핵산 서열", 및 "핵산 단편"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이들 용어는 뉴클레오타이드 서열 등을 포괄한다. 폴리뉴클레오타이드는 임의로, 합성, 비-천연 또는 변화된 뉴클레오타이드 염기를 함유하는 단일 가닥 또는 이중 가닥인 RNA 또는 DNA의 중합체일 수 있다. DNA 중합체 형태의 폴리뉴클레오타이드는 cDNA, 게놈 DNA, 합성 DNA, 또는 이의 혼합물의 하나 이상의 절편으로 구성될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 데옥시리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있고 리보뉴클레오타이드는 천연 분자 및 합성 유사체 둘다, 및 이의 조합체를 포함한다. 본원에 제공된 폴리뉴클레오타이드는 또한 단일가닥 형태, 이중가닥 형태, 헤어핀, 스템 및 루프 구조, 등을 포함하지만 이에 제한되지 않는 모든 형태의 서열을 포괄한다.

[0134] 표적화된 게놈 통합 시스템의 다양한 성분들을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드가 추가로 제공된다. 상기 용어 "재조합 폴리뉴클레오타이드" 및 "재조합 DNA 작제물"은 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 재조합 작제물은 핵산 서열의 인공 또는 이종성 조합, 예를 들어, 천연에서 함께 발견되지 않는 조절 및 암호화 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 재조합 작제물은 상이한 공급원으로부터 유래된 조절 서열 및 암호화 서열, 또는 동일한 공급원으로부터 유래되지만 천연에서 발견되는 것과는 상이한 방식으로 정렬된 조절 서열 및 암호화 서열을 포함할 수 있다. 상기 작제물은 그 자체로 사용되거나 벡터와 연계하여 사용될 수 있다. 벡터가 사용되는 경우, 벡터의 선택은 당업자에게 널리 공지된 바와 같이 숙주 세포를 형질전환시키기 위해 사용되는 방법에 의존한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터가 사용될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 분리된 핵산 단편을 포함하는 숙주 세포를 성공적으로 형질전환시키고, 선택하고 증식시키기 위해 요구되는 유전학적 요소들이 또한 제공된다. 스크리닝은 무엇보다 DNA의 서던 분석, mRNA 발현의 노던 분석, 단백질 발현의 면역블롯팅 분석 또는 표현형 분석에 의해 성취될 수 있다.

[0135] 특이적 구현예에서, 본원에 기재된 표적화된 게놈 통합 시스템의 하나 이상의 성분들은 원핵 세포, 진핵 세포, 세균, 효모 세포 또는 포유동물 세포 또는 다른 유기체 또는 목적하는 세포 유형에서 발현을 위해 발현 카세트에 제공될 수 있다. 카세트는 본원에 제공된 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 5' 및 3' 조절 서열들을 포함할 수 있다. "작동가능하게 연결된"은 작동가능하게 연결된 성분들이 이들의 의도된 방식으로 기능하는 관계를 포함한다. 예를 들어, 목적하는 폴리뉴클레오타이드와 조절 서열(즉, 프로모터)간의 작동가능한 연결은 목적하는 폴리뉴클레오타이드의 발현을 가능하게 하는 기능성 연결이다. 작동가능하게 연결된 요소들은 연속성이거나 비-연속성일 수 있다. 2개의 단백질 암호화 영역들의 연결을 언급하기 위해 사용되는 경우, 작동가능하게 연결된은 암호화 영역이 동일한 판독 프레임에 있음을 의미한다. 또 다른 경우에, 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 적당한 전사 조절을 보유하도록 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 사일런서 서열 등)에 작동가능하게 연결될 수 있다. 한 경우에, 면역글로불린 가변 영역 (또는 V(D)J 절편들)의 핵산 서열은 서열간에 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 서열로 적당히 재조합되도록 하기 위해 면역글로불린 불변 영역의 핵산 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0136] 카세트는 유기체로 동시 형질도입되도록 하기 위해 목적하는 하나 이상의 추가의 폴리뉴클레오타이드를 추가로

함유할 수 있다. 대안적으로, 목적하는 추가의 폴리뉴클레오타이드는 다중 발현 카세트상에 제공될 수 있다. 상기 발현 카세트는 조절 영역의 전사 조절하에 있도록 재조합 폴리뉴클레오타이드의 삽입을 위해 다수의 제한 부위 및/또는 재조합 부위가 함께 제공된다. 발현 카세트는 선택 마커 유전자들을 추가로 함유할 수 있다.

[0137] 상기 발현 카세트는 5'-3'의 전사 방향으로 목적하는 포유동물 세포 또는 숙주 세포에서 기능성인 전사 및 해독 개시 영역(즉, 프로모터), 본원에 제공된 재조합 폴리뉴클레오타이드 및 전사 및 해독 종결 영역(즉, 종결 영역)을 포함할 수 있다. 조절 영역들(즉, 프로모터, 전사 조절 영역 및 해독 종결 영역) 및/또는 본원에 제공된 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포에 고유하고/유사하거나 서로에 대해 고유하고/유사할 수 있다. 대안적으로, 조절 영역 및/또는 본원에 제공된 폴리뉴클레오타이드는 숙주 세포에 또는 서로간에 이종성일 수 있다. 예를 들어, 이종성 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결된 프로모터는 상기 폴리뉴클레오타이드가 유래된 종과는 상이한 종으로부터 유래하거나 동일하고/유사한 종으로 부터 기원하는 경우, 하나 또는 둘다는 이들의 본래의 형태 및/또는 게놈 유전자 좌위로부터 실질적으로 변형되거나 프로모터는 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드에 대한 고유 프로모터가 아니다. 대안적으로, 조절 영역 및/또는 본원에 제공된 재조합 폴리뉴클레오타이드는 전반적으로 합성일 수 있다.

[0138] 종결 영역은 전사 개시 영역과 함께 고유하거나 작동가능하게 연결된 재조합 폴리뉴클레오타이드와 고유하거나, 숙주 세포와 고유하거나 프로모터, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 숙주 세포 또는 이의 임의의 조합에 대해 또 다른 공급원(즉, 외래 또는 이종성)으로부터 유래할 수 있다.

[0139] 발현 카세트를 제조하는데 있어서, 다양한 DNA 단편을 조작하여 적당한 배향의 DNA 서열을 제공할 수 있다. 상기 목적을 위해, 어답터 또는 링커를 사용하여 DNA 단편들을 연결하거나 다른 조작을 포함시켜 간편한 제한 부위, 피상적 DNA의 제거, 제한 부위의 제거 등을 제공할 수 있다. 상기 목적을 위해, 시험관내 돌연변이유발, 프라이머 복구, 제한, 어닐링, 재치환, 예를 들어, 전이 및 역위가 포함될 수 있다.

[0140] 다수의 프로모터는 본원에 제공된 발현 카세트에 사용될 수 있다. 프로모터는 목적하는 결과를 기준으로 선택될 수 있다. 상이한 적용은 목적하는 폴리뉴클레오타이드의 타이밍, 위치 및/또는 발현 수준을 조절하기 위해 발현 카세트에서 상이한 프로모터를 사용하여 증진될 수 있는 것으로 인지된다. 상기 발현 작제물은 또한 경우에 따라 프로모터 조절 영역(예를 들어, 유도성, 항상성, 환경적으로 또는 발육단계적으로 조절되거나, 세포- 또는 조직-특이적/선택적 발현을 부여하는 영역), 전사 개시 시작 부위, 리보솜 결합 부위, RNA 프로세싱 시그날, 전사 종결 부위 및/또는 폴리아데닐화 시그날을 함유할 수 있다.

[0141] 본원에 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 사용된다.

[0142] 적절한 경우, 상기 방법 및 조성물에 사용되는 서열(즉, 목적하는 폴리뉴클레오타이드, 뉴클레아제 제제 등)은 세포에서 증가된 발현을 위해 최적화될 수 있다. 즉, 유전자들은 개선된 발현을 위해 예를 들어, 포유동물-바람직한 코돈, 인간-바람직한 코돈, 설치류-바람직한 코돈, 마우스-바람직한 코돈, 랫트-바람직한 코든 등을 포함하는 목적하는 소정의 세포에 바람직한 코돈을 사용하여 합성될 수 있다.

[0143] 본원에 제공된 다양한 방법 및 조성물은 선택 마커를 사용할 수 있다. 다양한 선택 마커는 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 상기 선택 마커는 예를 들어, 항생제, 예를 들어, G418, 하이그로마이신, 블라스토시딘, 네오마이신 또는 푸로마이신에 내성을 부여할 수 있다. 상기 선택 마커는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 (neo^r), 하이그로마이신 B 포스포트랜스퍼라제 (hyg^r), 푸로마이신-N-아세틸트랜스퍼라제 ($puro^r$), 및 블라스티시딘 S 데아미나제 (bsr^r)를 포함한다. 여전히 다른 구현예에서, 선택 마커는 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결되고 선택 마커의 발현은 세포에 독성이다. 상기 선택 마커의 비제한적인 예는 크산틴/구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (gpt), 하하이폭산틴-구아민 포스포리보실트랜스퍼라제 (HGPRT) 또는 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 (HSV-TK)를 포함한다. 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된다.

[0144] iii. 표적화 벡터

[0145] 표적화 벡터는 랫트 핵산의 표적 유전자 좌위로 삽입 핵산을 도입하기 위해 사용된다. 표적화 벡터는 삽입 핵산을 포함하고 삽입 핵산을 플랭킹하는, 5' 및 3' 상동성 아암을 추가로 포함한다. 삽입 핵산을 플랭킹하는 상동성 아암은 랫트 핵산의 표적 유전자 좌위내 영역에 상응한다. 용이한 참조를 위해, 표적화된 게놈 유전자 좌위내 상응하는 동족 게놈 영역은 본원에서 "표적 부위"로서 본원에서 언급된다. 예를 들어, 표적화 벡터는 제1 및

제2 표적 부위에 상보적인 제1 및 제2 상동성 아암에 의해 플랭킹된 제1 삽입 핵산을 포함할 수 있다. 이와 같이, 표적화 벡터는 세포 게놈내 상동성 아암과 상보적 표적 부위들간에 일어나는 상동성 재조합 반응을 통해 삽입 핵산의 랫트 핵산의 표적 유전자 좌위로의 통합을 도와준다.

[0146] 하나의 구현예에서, 랫트 핵산의 표적 유전자 좌위는 5' 상동성 아암에 상보적인 제1 핵산 서열 및 3' 상동성 아암에 상보적인 제2 핵산 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 제1 및 제2 핵산 서열은 적어도 5kb에 의해 분리되어 있다. 또 다른 구현예에서, 제1 및 제2 핵산 서열은 적어도 5kb 그러나 200kb 미만으로 분리되어 있다. 하나의 구현예에서, 제1 및 제2 핵산 서열은 적어도 10kb에 의해 분리되어 있다. 하나의 구현예에서, 제1 및 제2 핵산 서열은 적어도 20kb, 적어도 30kb, 적어도 40kb, 적어도 50kb, 적어도 60kb, 적어도 70kb, 적어도 80kb, 적어도 90kb, 적어도 100kb, 적어도 110kb, 적어도 120kb, 적어도 130kb, 적어도 140kb, 적어도 150kb, 적어도 160kb, 적어도 170kb, 적어도 180kb, 적어도 190kb, 또는 적어도 200kb에 의해 분리되어 있다. 여전히 추가의 구현예에서, 제1 및 제2 핵산 서열은 적어도 5kb 그러나 10kb 미만, 적어도 5kb 그러나 3Mb 미만, 적어도 10kb 그러나 20kb 미만, 적어도 20kb 그러나 40kb 미만, 적어도 40kb 그러나 60kb 미만, 적어도 60kb 그러나 80kb 미만, 적어도 약 80kb 그러나 100kb 미만, 적어도 100kb 그러나 150kb 미만, 또는 적어도 150kb 그러나 200kb 미만, 적어도 약 200kb 그러나 약 300kb 미만, 적어도 약 300kb 그러나 약 400kb 미만, 적어도 약 400kb 그러나 약 500kb 미만, 적어도 약 500kb 그러나 약 1Mb 미만, 적어도 약 1.5 Mb 그러나 약 2Mb 미만, 적어도 약 1Mb 그러나 약 1.5Mb 미만, 적어도 약 2Mb 그러나 2.5Mb 미만, 적어도 약 2.5Mb 그러나 3Mb미만, 또는 적어도 약 2Mb 그러나 약 3Mb미만으로 분리되어 있다.

[0147] 표적화 벡터의 상동성 아암은 상응하는 표적 부위와 상동성 재조합 반응을 촉진시키기에 충분한 임의의 길이일 수 있고, 예를 들어, 적어도 5-10kb, 5-15kb, 10-20kb, 20-30kb, 30-40kb, 40-50kb, 50-60kb, 60-70kb, 70-80kb, 80-90kb, 90-100kb, 100-110kb, 110-120kb, 120-130kb, 130-140kb, 140-150kb, 150-160kb, 160-170kb, 170-180kb, 180-190kb, 190-200kb 길이 이상을 포함한다. 하기에서 추가로 상세히 명시된 바와 같이, 대형 표적화 벡터는 초과 길이의 표적화 아암을 사용할 수 있다. 특이적 구현예에서, 5' 상동성 아암 및 3' 상동성 아암의 총합은 적어도 10 kb이거나, 5' 상동성 아암 및 3' 상동성 아암의 총합은 적어도 약 16kb 내지 약 100 kb 또는 약 30kb 내지 약 100kb이다. 다른 구현예에서, LTVEC의 총 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 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. 하나의 구현예에서, 결실 크기는 LTVEC의 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 크기와 동일하거나 유사하다.

[0148] 뉴클레아제 제제가 사용되는 경우, 표적화 벡터의 5' 및 3' 상동성 아암에 상응하는 동족 게놈 영역은 뉴클레아제 표적 부위에 "충분히 인접하게 위치하여" 인지 부위에서 닉 또는 이중 가닥 절단시 동족 게놈 영역과 상동성 아암간에 상동성 재조합 반응의 발생을 촉진시킨다. 예를 들어, 상기 뉴클레아제 표적 부위는 5' 및 3' 상동성 아암에 상응하는 동족 게놈 영역간에 어디에도 위치할 수 있다. 특이적 구현예에서, 상기 인지 부위는 동족 게놈 영역 중 적어도 하나 또는 둘다에 바로 인접해 있다.

[0149] 본원에 사용된 바와 같이, 상동성 아암 및 표적 부위(즉, 동족 게놈 영역)은 2개의 영역이 상동성 재조합 반응을 위한 기질로서 작용하기 위해 서로에 대해 충분한 수준의 서열 동일성을 공유하는 경우 서로에 대해 "상보성"이거나 "상보적"이다. "상동성"이란 상응하거나 "상보적인" 서열과 동일하거나 서열 동일성을 공유하는 DNA 서열을 의미한다. 표적화 벡터상에서 발견되는 소정의 표적 부위와 상응하는 상동성 아암간의 서열 동일성은 상동성 재조합이 일어나도록 하는 임의의 정도의 서열 동일성일 수 있다. 예를 들어, 표적화 벡터(또는 이의 단편) 및 표적 부위(또는 이의 단편)의 상동성 아암에 의해 공유되는 서열 동일성의 양은 서열들이 상동성 재조합되도록 하는 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% 또는 100% 서열 동일성일 수 있다. 더욱이, 상동성 아암과 상보적 표적 부위간의 상동성의 상보적 영역은 절단된 인지 부위에서 상동성 재조합을 촉진시키기에 충분한 임의의 길이일 수 있다. 예를 들어, 소정의 상동성 아암 및/또는 상보적 표적 부위는 적어도 5-10kb, 5-15kb, 10-20kb, 20-30kb, 30-40kb, 40-50kb, 50-60kb, 60-70kb, 70-80kb, 80-90kb, 90-100kb, 100-110kb, 110-120kb, 120-130kb, 130-140kb, 140-150kb, 150-160kb, 160-170kb, 170-180kb, 180-190kb, 190-200kb 길이 초과 (예를 들어, 본원에 다른 곳에 기재된 LTVEC 벡터에 기재된 것과 같은)인 상동성의 상보적 영역을 포함하여 상동성 아암은 세포의 게놈내 상응하는 표적 부위와 상동성 재조합하도록 하기에 충분한 상동성을 가질 수 있다. 용이한

참조를 위해, 상동성 아암은 본원에서 5' 및 3' 상동성 아암으로 언급된다. 상기 용어는 표적화 벡터내 삽입 핵산에 대한 상동성 아암의 상대적 위치에 관한 것이다.

[0150] 따라서, 표적화 벡터의 상동성 아암은 표적화된 유전자 좌위와 함께 표적 부위에 상보적이도록 디자인한다. 따라서, 상동성 아암은 세포에 고유한 유전자 좌위에 상보적일 수 있거나, 대안적으로 이들은 전이유전자, 발현 카세트 또는 게놈 DNA의 이종성 또는 외인성 영역을 포함하지만 이에 제한되지 않는 세포의 게놈내로 통합되는 이종성 또는 외인성의 DNA 절편 영역에 상보적일 수 있다. 대안적으로, 표적화 벡터의 상동성 아암은 인간 인공 염색체의 영역 또는 적당한 숙주 세포에 함유된 다른 가공된 게놈 영역에 상보적일 수 있다. 여전히, 추가로, 표적화 벡터의 상동성 아암은 BAC 라이브러리, 코스미드 라이브러리, 또는 P1 파아지 라이브러리의 영역에 상보적이거나 이로부터 유래될 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 표적화 벡터의 상동성 아암은 소정의 세포에 고유하거나, 이종성이거나 외인성인 랫트 게놈 유전자 좌위에 상보적이다. 추가의 구현예에서, 상기 상동성 아암은 통상적인 방법을 사용하여 표적화할 수 없거나, 단지 부정확하거나 뉴클레아제 제제에 의해 유도되는 닉 또는 이중가닥 절단의 부재하에 상당히 낮은 효율로 표적화될 수 있는 랫트 게놈 유전자 좌위에 상보적이다. 하나의 구현예에서, 상기 상동성 아암은 합성 DNA로부터 유래한다.

[0151] 여전히 다른 구현예에서, 5' 및 3' 상동성 아암은 표적화된 게놈과 동일한 게놈에 상보적이다. 하나의 구현예에서, 상동성 아암은 관련된 게놈으로부터 기원하고, 예를 들어, 상기 표적화된 게놈은 제1 스트레인의 랫트 게놈이고 표적화 아암은 제2 스트레인의 랫트 게놈으로부터 기원하며, 여기서, 상기 제1 스트레인 및 제2 스트레인은 상이하다. 다른 구현예에서, 상동성 아암은 동일한 동물의 게놈으로부터 기원하거나 동일한 스트레인의 게놈으로부터 기원하고, 예를 들어, 표적화된 게놈은 제1 스트레인의 랫트 게놈이고 표적화 아암은 동일한 랫트 또는 동일한 스트레인 기원의 랫트 게놈으로부터 기원한다.

[0152] 표적화 벡터 (예를 들어, 대형 표적화 벡터)는 또한 본원의 다른 곳에서 논의된 바와 같이 선택 카세트 또는 리포터 유전자를 포함할 수 있다. 상기 선택 카세트는 선택 마커를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있고, 여기서, 상기 핵산 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다. 프로모터는 목적하는 원핵 세포에서 활성이고/이거나 목적하는 진핵 세포에서 활성일 수 있다. 상기 프로모터는 유도성 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 내인성인 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 이종성인 프로모터, 세포 특이적 프로모터, 조직 특이적 프로모터 또는 발육 단계-특이적 프로모터일 수 있다. 하나의 구현예에서, 선택 마커는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 (neo^r), 하이그로마이신 B 포스포트랜스퍼라제 (hyg^r), 푸로마이신-N-아세틸트랜스퍼라제 ($puro^r$), 블라스티시딘 S 데아미나제 (bsr^r), 크산틴/구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제 (gpt), 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제 (HSV-k), 및/또는 이의 조합으로부터 선택되거나 이들을 포함한다. 표적화 벡터의 선택 마커는 5' 및 3' 상동성 아암에 의해 플랭킹될 수 있거나 상기 상동성 아암에 대해 5'또는 3'에서 발견된다.

[0153] 하나의 구현예에서, 표적화 벡터(예를 들어, 대형 표적화 벡터)는 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하고, 여기서, 상기 리포터 유전자는 LacZ, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, 증진된 황색 형광 단백질 (EYFP), 에메랄드, 증진된 녹색 형광 단백질 (EGFP), CyPet, 시안 형광 단백질 (CFP), 세룰레안(Cerulean), T-사파이어(Sapphire), 루시퍼라제, 알칼린 포스파타제, 및/또는 이의 조합으로 이루어지거나 이들을 포함하는 그룹으로부터 선택되는 리포터 단백질을 암호화한다. 상기 리포터 유전자는 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 상기 프로모터는 유도성 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 내인성인 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 이종성인 프로모터, 세포 특이적 프로모터, 조직 특이적 프로모터 또는 발육 단계 특이적 프로모터일 수 있다.

[0154] 하나의 구현예에서, 뉴클레아제 제제와 표적화 벡터(예를 들어, 대형 표적화 벡터를 포함하는)의 조합 사용은 단독의 표적화 벡터의 사용과 비교하여 증가된 표적화 효율을 유도한다. 하나의 구현예에서, 상기 표적화 벡터가 뉴클레아제 제제와 연계하여 사용되는 경우, 표적화 벡터의 표적화 효율은 표적화 벡터가 단독으로 사용되는 경우와 비교하여 적어도 2배, 적어도 3배, 또는 적어도 4배 증가된다.

[0155] 표적화 벡터를 사용하는 경우, 상기 벡터 디자인은 본원에 기재된 바와 같이 약 5kb 내지 약 200kb인 소정의 서열의 삽입을 가능하게 하는 것일 수 있다. 하나의 구현예에서, 상기 삽입은 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 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 200kb, 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb

내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb이다.

[0156] 표적화 벡터를 사용하는 경우, 벡터 디자인은 본원에 기재된 바와 같이 약 5kb 내지 약 200kb 또는 약 5kb 내지 약 3.0Mb인, 소정의 서열의 치환를 가능하게 하는 것일 수 있다. 하나의 구현예에서, 상기 치환는 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 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, 약 190kb 내지 약 200kb, 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 150kb, 또는 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 약 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 또는 약 2.5Mb 내지 약 3Mb이다.

[0157] 하나의 구현예에서, 표적화 벡터는 부위-특이적 리컴비나제 유전자를 포함한다. 하나의 구현예에서, 부위 특이적 리컴비나제 유전자는 Cre 리컴비나제를 암호화한다. 하나의 구현예에서, Cre 리컴비나제 유전자는 Crei이고, 여기서, Cre 리컴비나제를 암호화하는 2개의 엑손은 원핵 세포에서 이의 발현을 차단하기 위해 인트론에 의해 분리되어 있다.

[0158] 하나의 구현예에서, Cre 리컴비나제 유전자는 Cre(또는 임의의 리컴비나제 또는 뉴클레아제 제제)의 핵(예를 들어, 상기 유전자는 NL-Cre 유전자이다)으로의 위치화를 촉진시키기 위해 핵 위치화 시그날을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, Cre 리컴비나제 유전자는 핵 위치화 시그날 및 인트론(예를 들어, NL-Crei)를 추가로 포함한다.

[0159] 다양한 구현예에서, 뉴클레아제 제제(상의 논의된 Cre 또는 Crei 리컴비나제를 포함하는)의 발현을 위해 적합한 프로모터는 Prm1, Blimp1, Gata6, Gata4, Igf2, Lhx2, Lhx5, 및/또는 Pax3으로부터 선택되거나 이들을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 프로모터는 Gata6 또는 Gata4 프로모터이다. 다양한 프로모터는 예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류를 포함하는 임의의 유기체로부터 기원할 수 있다. 또 다른 특정 구현예에서, 프로모터는 Prm1 프로모터이다. 또 다른 특정 구현예에서, 상기 프로모터는 랫트 Prm1 프로모터이다. 또 다른 특정 구현예에서, 프로모터는 마우스 Prm1 프로모터이다. 또 다른 특정 구현예에서, 프로모터는 Blimp1 프로모터 또는 이의 단편, 예를 들어, Blimp1 프로모터의 1 kb 또는 2 kb 단편이다. 예를 들어, 문헌[미국 특허 제8,697,851호 및 미국 출원 공개공보 제2013-0312129호, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로서 인용된다]을 참조한다.

[0160] iv. 대형 표적화 벡터

[0161] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "대형 표적화 벡터" 또는 "LTVEC"는 세포에서 상동성 표적화를 수행하도록 의도된 다른 방법에 의해 전형적으로 사용된 것들 보다 큰 핵산 서열에 상응하고 이로부터 유래된 상동성 아암을 포함하고/하거나 세포에서 상동성 재조합 표적화를 수행하도록 의도된 다른 방법에 의해 전형적으로 사용되는 것들보다 큰 핵산 서열을 포함하는 삽입 핵산을 포함하는 대형 표적화 벡터를 포함한다. 예를 들어, LTVEC는 이들의 크기 제한 때문에 통상적인 플라스미드-기반 표적화 벡터에 의해 수용될 수 있는 대형 유전자 좌위의 변형을 가능하게 한다. 특정 구현예에서, LTVEC의 상동성 아암 및/또는 삽입 핵산은 진핵 세포의 게놈 서열을 포함한다. LTVEC의 크기는 너무 커서 통상적인 검정, 예를 들면, 서던 블롯팅 및 긴-범위 (예를 들면, 1kb-5kb) PCR에 의한 표적화 반응의 스크리닝을 수행할 수 없다. LTVEC의 예는 세균 인공 염색체(BAC), 인간 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체(YAC)로부터 유래된 벡터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. LTVEC 및 이들을 제조하기 위한 방법의 비제한적인 예는 *예를 들어,* 문헌[참조: 미국 특허 제6,586,251호, 제6,596,541호, 제7,105,348호, 및 WO 2002/036789 (PCT/US01/45375), 및 미국 공보 US 2013/0137101, 이의 각각은 본원에 참조로 인용된다]에 기재되어 있다.

[0162] LTVEC는 약 20kb 내지 약 400kb, 약 20kb 내지 약 30kb, 약 30kb 내지 40kb, 약 40kb 내지 약 50kb, 약 50kb 내지 약 75kb, 약 75kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 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 300kb, 약 200kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 약 350kb 내지 약 400kb, 약 350kb 내지 약 550kb를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 길이일 수 있다. 하나의 구현예에서, LTVEC는 약 100kb이다.

[0163] 하나의 구현예에서, LTVEC는 약 5kb 내지 약 200kb, 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 30kb, 약 0.5kb 내지 약 30kb, 약 0.5kb 내지 약 40kb, 약 30kb 내지 약 150kb, 약 0.5kb 내지 약 150kb, 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 200kb, 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb 범위의 삽입 핵산을 포함한다.

[0164] LTVEC를 사용하는 경우, 벡터 디자인은 본원에 기재된 바와 같이 약 5kb 내지 약 200kb 또는 약 5kb 내지 약 3Mb인 소정의 서열의 치환를 가능하게 하는 것일 수 있다. 하나의 구현예에서, 상기 치환는 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 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, 약 190kb 내지 약 200kb, 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 150kb, 또는 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 약 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 또는 약 2.5Mb 내지 약 3Mb이다.

[0165] 하나의 구현예에서, LTVEC의 상동성 아암은 BAC 라이브러리, 코스미드 라이브러리, 또는 P1 파아지 라이브러리로부터 유래한다. 다른 구현예에서, 상동성 아암은 세포의 표적화된 게놈 유전자 좌위로부터 유래하고 일부 경우에 LTVEC가 표적화하도록 디자인된 표적 게놈 유전자 좌위는 통상적인 방법을 사용하여 표적화할 수 없다. 여전히 다른 구현예에서, 상동성 아암은 합성 DNA로부터 유래한다.

[0166] 하나의 구현예에서, LTVEC에서 5' 상동성 아암 및 3' 상동성 아암의 총 합은 적어도 10kb이다. 다른 구현예에서, LTVEC의 5' 및 3' 상동성 아암의 총합은 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, 100kb 내지 약 120kb, 약 120kb 내지 약 140kb, 약 140kb 내지 약 160kb, 약 160kb 내지 약 180kb, 약 180kb 내지 약 200kb이다. 하나의 구현예에서, LTVEC의 5' 및 3' 상동성 아암의 총합은 약 30kb 내지 약 100kb이다. 다른 구현예에서, LTVEC의 총 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 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. 하나의 구현예에서, 결실 크기는 LTVEC의 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 크기와 동일하거나 유사하다.

[0167] 다른 구현예에서, 5' 상동성 아암은 약 5kb 내지 약 100kb 범위이다. 하나의 구현예에서, 3' 상동성 아암은 약 5kb 내지 약 100kb 범위이다. 다른 구현예에서, 5' 및 3' 상동성 아암의 총합은 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, 액 150kb 내지 약 160kb, 약 160kb 내지 약 170kb, 약 170kb 내지 약 180kb, 약 180kb 내지 약 190kb, 약 190kb 내지 약 200kb, 또는 약 30kb 내지 약 100kb, 약 10kb 내지 약 30kb, 약 20kb 내지 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.

[0168] 하나의 구현예에서, LTVEC는 LTVEC 상동성 아암에 의해 플랭킹된 랫트 핵산 서열과 상동성이거나 이종상동성인 삽입 핵산을 포함한다. 하나의 구현예에서, 상기 삽입 핵산 서열은 랫트외의 다른 종으로부터 기원한다. 하나의 구현예에서, 랫트 핵산 서열에 상동성이거나 이종상동성인 삽입 핵산은 포유동물 핵산이다. 하나의 구현예에서, 상기 포유동물 핵산은 마우스 핵산이다. 하나의 구현예에서, 포유동물 핵산은 인간 핵산이다. 하나의 구현예에

서, 상기 삽입 핵산은 게놈 DNA이다. 하나의 구현예에서, 삽입체는 상기된 바와 같이 5kb 내지 200kb이다.

[0169] 하나의 구현예에서, LTVEC는 선택 카세트 또는 리포터 유전자를 포함한다. 사용될 수 있는 다양한 형태의 선택 카세트 및 리포터 유전자는 본원의 기타 다른 곳에서 논의된다.

[0170] 본원의 기타 다른 곳에 기재된 바와 같이, LTVEC는 또한 만능 랫트 세포에서 표적 벡터와 랫트 핵산의 표적 유전자 좌위간의 상동성 재조합을 촉진시키는 뉴클레아제 제제와 조합되어 본원에 제공된 방법에 사용될 수 있다.

[0171] 하나의 구현예에서, 대형 표적화 벡터 (LTVEC)는 부위-특이적 리컴비나제 유전자를 포함한다. 하나의 구현예에서, 부위 특이적 리컴비나제 유전자는 Cre 리컴비나제를 암호화한다. 하나의 구현예에서, Cre 리컴비나제 유전자는 Crei이고, 여기서, Cre 리컴비나제를 암호화하는 2개의 엑손은 원핵 세포에서 이의 발현을 차단하기 위해 인트론에 의해 분리되어 있다. 하나의 구현예에서, Cre 리컴비나제 유전자는 Cre(또는 임의의 리컴비나제 또는 뉴클레아제 제제)의 핵(예를 들어, 상기 유전자는 NL-Cre 유전자이다)으로의 위치화를 촉진시키기 위해 핵 위치화 시그날을 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, Cre 리컴비나제 유전자는 핵 위치화 시그날 및 인트론(예를 들어, NL-Crei)를 추가로 포함한다.

[0172] 다양한 구현예에서, 뉴클레아제 제제(상의 논의된 Cre 또는 Crei 리컴비나제를 포함하는)의 발현을 위해 적합한 프로모터는 Prm1, Blimp1, Gata6, Gata4, Igf2, Lhx2, Lhx5, 및/또는 Pax3으로부터 선택되거나 이들을 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 프로모터는 Gata6 또는 Gata4 프로모터이다. 다양한 프로모터는 예를 들어, 마우스 또는 랫트와 같은 설치류를 포함하는 임의의 유기체로부터 기원할 수 있다. 또 다른 특정 구현예에서, 프로모터는 Prm1 프로모터이다. 또 다른 특정 구현예에서, 상기 프로모터는 랫트 Prm1 프로모터이다. 또 다른 특정 구현예에서, 프로모터는 마우스 Prm1 프로모터이다. 또 다른 특정 구현예에서, 프로모터는 Blimp1 프로모터 또는 이의 단편, 예를 들어, Blimp1 프로모터의 1 kb 또는 2 kb 단편이다. 예를 들어, 문헌[미국 특허 제8,697,851호 및 미국 출원 공개공보 제2013-0312129호, 이 둘다는 이의 전문이 본원에 참조로서 인용된다]을 참조한다.

[0173] 하나의 구현예에서, LTVEC는 본원에서 기타 다른 속에서 상세히 논의된 바와 같은 랫트 ApoE 유전자 좌위, IL-2Rg 유전자 좌위, Rag2 유전자 좌위, Rag1 유전자 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 유전자 좌위 영역의 결실, 첨가, 치환 또는 이의 조합을 생성할 수 있는 삽입 핵산을 포함한다. 특정 구현예에서, ApoE 유전자 좌위에서 유전학적 변형은 ApoE 활성, IL-2Rg 활성, Rag2 활성, Rag1 활성 및/또는 Rag2 및 Rag1 활성에서의 감소, 증가 또는 조절을 유도한다. 하나의 구현예에서, ApoE 녹아웃, 및 IL-2Rg 녹아웃, Rag2 녹아웃, Rag1 녹아웃, Rag2/Rag1 녹아웃이 생성된다. 하기에 논의된 바와 같이, 뉴클레아제 제제는 목적하는 임의의 게놈 유전자 좌위를 표적화하기 위해 임의의 LTVEC 표적화 시스템과 함께 사용될 수 있다.

[0174] v. 뉴클레아제 제제, 및 뉴클레아제 제제에 대한 인지 부위

[0175] 상기 상세히 기재된 바와 같이, 뉴클레아제 제제는 원핵세포에서 또는 만응 랫트 세포 둘다의 표적화 유전자의 변형을 돕기 위해 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 상기 뉴클레아제 제제는 표적화 벡터와 표적화 유전자 좌위간의 상동성 재조합을 촉진시킬 수 있다. 하나의 구현예에서, 상기 뉴클레아제 제제는 엔도뉴클레아제 제제를 포함한다.

[0176] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "뉴클레아제 제제를 위한 인지 부위"는 닉 또는 이중 가닥 절단이 뉴클레아제 제제에 의해 유도되는 DNA 서열을 포함한다. 뉴클레아제 제제에 대한 인지 부위는 세포에 대해 내인성(또는 고유한)일 수 있거나 인지 부위는 세포에 외인성일 수 있다. 특정 구현예에서, 상기 인지 부위는 세포에 대해 외인성이고 이에 의해 세포의 게놈에는 천연적으로 존재하지 않는다. 여전히 추가의 구현예에서, 인지 부위는 표적 게놈 유전자 좌위에서 위치시키고자 하는 목적하는 세포 및 폴리뉴클레오타이드에 외인성이다. 추가의 구현예에서, 외인성 또는 내인성 인지 부위는 숙주 세포의 게놈에 단지 1개 존재한다. 특정 구현예에서, 게놈내에 1개만 존재하는 내인성 또는 고유 부위가 동정된다. 이어서 상기 부위를 사용하여 내인성 인지 부위에서 닉 또는 이중 가닥 절단을 생성할 뉴클레아제 제제를 디자인할 수 있다.

[0177] 인지 부위의 길이는 다양할 수 있고, 예를 들어 적어도 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70개 이상의 길이인 인지 부위를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 뉴클레아제 제제의 각각의 단량체는 적어도 9개의 뉴클레오타이드의 인지 부위를 인지한다. 다른 구현예에서, 인지 부위는 약 9 내지 약 12개 뉴클레오타이드 길이, 약 12개 내지 약 15개 뉴클레오타이드 길이, 약 15개 내지 약 18개 뉴클레오타이드 길이, 또는 약 18개 내지 약 21개 뉴클레오타이드 길이, 및 상기 서브범위의 임의의 조합(예를 들어, 9개 내지 18개 뉴클레오타이드)이다. 인지 부

위는 팔린드롬, 즉, 상보적 가닥상의 반대 방향에서 동일한 가닥 판독상의 서열일 수 있다. 소정의 뉴클레아제 제제는 인지 부위에 결합하여 상기 결합 부위를 절단하거나, 대안적으로, 상기 뉴클레아제 제제는 인지 부위와는 상이한 서열에 결합할 수 있는 것으로 인지된다. 더욱이, 용어 인지 부위는 닉/절단 부위가 뉴클레아제 제제 결합 부위내에 있거나 외부에 있는지에 상관없이 뉴클레아제 제제 결합 부위 및 닉/절단 부위 둘다를 포함한다. 또 다른 변형에서, 뉴클레아제 제제에 의한 절단은 평활 말단 절단을 생성하기 위해 서로에 대해 바로 반대 방향의 뉴클레오타이드 위치에서 일어날 수 있거나 다른 경우, 절단은 또한 5' 오버행 또는 3' 오버행일 수 있는 "점착 말단"으로 불리우는 단일 가닥의 오버행을 생성하도록 비대칭 절단일 수 있다.

[0178] 목적하는 인지 부위로의 닉 또는 이중 가닥을 유도하는 임의의 뉴클레아제 제제는 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 천연 또는 고유 뉴클레아제 제제는 상기 뉴클레아제 제제가 목적하는 인지 부위에서 닉 또는 이중 가닥 절단을 유도하는 한 사용될 수 있다. 대안적으로, 변형되거나 가공된 뉴클레아제 제제가 사용될 수 있다. "가공된 뉴클레아제 제제"는 목적하는 인지 부위에서 닉 또는 이중 가닥 절단을 특이적으로 인지하고 유도하기 위해 이의 고유 형태로부터 가공된(변형되거나 유래된) 뉴클레아제를 포함한다. 따라서, 가공된 뉴클레아제 제제는 고유 천연 뉴클레아제 제제로부터 유래될 수 있거나 이것인 인공적으로 생성되거나 합성될 수 있다. 뉴클레아제 제제의 변형은 단백질 절단 제제에서 하나의 아미노산 또는 핵산 절단 제제에서 하나의 뉴클레오타이드 정도로 적을 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 가공된 뉴클레아제는 인지 부위에서 닉 또는 이중 가닥 절단을 유도하고, 여기서, 상기 인지 부위는 천연(비-가공되거나 비-변형된) 뉴클레아제 제제에 의해 인지된 서열이 아니다. 인지 부위 또는 다른 DNA에서 닉 또는 이중 가닥 절단을 생성하는 것은 본원에서 인지 부위 또는 다른 DNA를 "컷팅하는" 또는 "절단하는" 것으로서 언급될 수 있다.

[0179] 예시된 인지 부위의 활성 변이체 및 단편이 또한 제공된다. 상기 활성 변이체는 소정의 인지 부위에 대해 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 포함할 수 있고, 여기서, 활성 변이체는 생물학적 활성을 보유하고 따라서 서열 특이적 방식으로 뉴클레아제 제제에 의해 인지되고 절단될 수 있다. 뉴클레아제 제제에 의한 인지 부위의 이중 가닥 절단을 측정하기 위한 검정은 당업계에 공지되어 있고 일반적으로 상기 인지 부위를 컷팅하기 위한 뉴클레아제의 능력을 측정한다.

[0180] 뉴클레아제 제제의 인지 부위는 표적 유전자 좌위에서 또는 이의 근처의 임의의 위치에 위치할 수 있다. 상기 인지 부위는 유전자의 암호화 영역내, 또는 유전자의 발현에 영향을 미치는 조절 영역내 위치할 수 있다. 따라서, 뉴클레아제 제제의 인지 부위는 인트론, 엑손, 프로모터, 인핸서, 조절 영역 또는 임의의 비-단백질 암호화 영역에 위치할 수 있다.

[0181] 하나의 구현예에서, 뉴클레아제 제제는 전사 활성화인자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)이다. TAL 이펙터 뉴클레아제는 원핵 또는 진핵 유기체의 게놈에서 특이적 표적 서열에서 이중 가닥 절단을 생성하기 위해 사용될 수 있는 서열 특이적 뉴클레아제 부류이다. TAL 이펙터 뉴클레아제는 고유 또는 가공된 전사 활성화인자 유사(TAL) 이펙터 또는 이의 기능성 부분을 예를 들어, *FokI*와 같은 엔도뉴클레아제의 촉매 도메인에 융합시킴에 의해 생성된다. 독특한 모듈러 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인은 잠재적으로 임의의 소정의 DNA 인지 특이성을 갖는 단백질의 디자인을 가능하게 한다. 따라서, TAL 이펙터 뉴클레아제의 DNA 결합 도메인은 특이적 DNA 표적 부위를 인지하도록 가공될 수 있고 따라서 목적하는 표적 서열에서 이중 가닥 절단을 생성하기 위해 사용될 수 있다. *문헌* [WO 2010/079430; Morbitzer 등 (2010) *PNAS* 10.1073/pnas.1013133107; Scholze & Boch (2010) *Virulence* 1:428-432; Christian 등 *Genetics* (2010) 186:757-761; Li 등 (2010) *Nuc. Acids Res.* (2010) doi:10.1093/nar/gkq704; 및 Miller 등 (2011) *Nature Biotechnology* 29:143-148; 이 모두는 본원에서 참조로 인용된다]을 참조한다.

[0182] 적합한 TAL 뉴클레아제, 및 적합한 TAL 뉴클레아제를 제조하기 위한 방법의 예는 예를 들어, 문헌[미국 특허 출원 번호 제2011/0239315 A1호, 제2011/0269234 A1호, 제2011/0145940 A1호, 제2003/0232410 A1호, 제2005/0208489 A1호, 제2005/0026157 A1호, 제2005/0064474 A1호, 제2006/0188987 A1호, 및 제2006/0063231 A1호 (각각은 본원에 참조로 인용된다)]을 참조한다. 다양한 구현예에서, *예를 들어*, 목적하는 게놈 유전자 좌위의 표적 핵산 서열에서 또는 이의 근처에서 절단하는 TAL 이펙터 뉴클레아제를 가공하고, 여기서, 상기 표적 핵산 서열은 표적화 벡터에 의해 변형될 서열에 또는 이의 근처에 있다. 본원에 제공된 다양한 방법 및 조성물과 함께 사용하기 위해 적합한 TAL 뉴클레아제는 본원에 기재된 바와 같은 표적화 벡터에 의해 변형될 표적 핵산 서열에서 또는 이의 근처에서 결합하도록 특이적으로 디자인된 것들을 포함한다.

[0183] 하나의 구현예에서, TALEN의 각각의 단량체는 12-25개 TAL 반복체를 포함하고, 여기서, 각각의 TAL 반복체는 1bp 서브사이트에 결합한다. 하나의 구현예에서, 뉴클레아제 제제는 독립적 뉴클레아제에 작동가능하게 연결된

TAL 반복체 기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라 단백질이다. 하나의 구현예에서, 독립적 뉴클레아제는 FokI 엔도뉴클레아제이다. 하나의 구현예에서, 상기 뉴클레아제 제제는 제1 TAL-반복체-기반 DNA 결합 도메인 및 제2 TAL-반복체-기반 DNA 결합 도메인을 포함하고, 여기서, 제1 및 제2 TAL-반복체-기반 DNA 결합 도메인은 FokI 뉴클레아제에 작동가능하게 연결되어 있고, 여기서 상기 제1 및 제2 TAL-반복체-기반 DNA 결합 도메인은 약 6bp 내지 약 40bp 절단 부위에 의해 분리된 표적 DNA 서열의 각각의 가닥에서 2개의 연속 표적 DNA 서열을 인지하고, 여기서, 상기 FokI 뉴클레아제는 이량체화하고 표적 서열에서 이중 가닥 절단을 제조한다.

[0184] 하나의 구현예에서, 뉴클레아제 제제는 제1 TAL-반복체-기반 DNA 결합 도메인 및 제2 TAL-반복체-기반 DNA 결합 도메인을 포함하고, 여기서, 제1 및 제2 TAL-반복체-기반 DNA 결합 도메인 각각은 FokI 뉴클레아제에 작동가능하게 연결되고, 제1 및 제2 TAL-반복체-기반 DNA 결합 도메인은 5bp 또는 6bp 절단 부위에 의해 분리된 표적 DNA 서열의 각각의 가닥에서 2개의 연속 표적 DNA 서열을 인지하고, 여기서, 상기 FokI 뉴클레아제는 이량체화하고 이중 가닥 절단을 생성한다.

[0185] 본원에 기재된 다양한 방법 및 조성물에서 사용되는 뉴클레아제 제제는 아연-핑거 뉴클레아제(ZFN)을 추가로 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, ZFN의 각각의 단량체는 3개 이상의 아연 기반 DNA 결합 도메인을 포함하고, 여기서, 각각의 아연 핑거-기반 DNA 결합 도메인은 3bp 서브사이트에 결합한다. 다른 구현예에서, ZFN은 독립적 뉴클레아제에 작동가능하게 연결된 아연 핑거 기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라 단백질이다. 하나의 구현예에서, 독립적 엔도뉴클레아제는 FokI 엔도뉴클레아제이다. 하나의 구현예에서, 뉴클레아제 제제는 제1 ZFN 및 제2 ZFN을 포함하고, 여기서, 상기 제1 ZFN 및 제2 ZFN 각각은 FokI 뉴클레아제에 작동가능하게 연결되어 있고, 여기서, 상기 제1 및 제2 ZFN은 약 6bp 내지 약 40bp 절단 부위 또는 약 5bp 내지 약 6bp 절단 부위에 의해 분리된 표적 DNA 서열의 각각의 가닥에서 2개의 연속 표적 DNA 서열을 인지하고, 여기서, FokI 뉴클레아제는 이량체화하고 이중 가닥 절단을 생성한다. 예를 들어, 문헌[US20060246567; US20080182332; US20020081614; US20030021776; WO/2002/057308A2; US20130123484; US20100291048; 및, WO/2011/017293A2, 이의 각각은 본원에 참조로서 인용된다]을 참조한다.

[0186] 본원에 제공된 방법의 하나의 구현예에서, 상기 뉴클레아제 제제는 (a) FokI 엔도뉴클레아제에 융합된 아연 핑거 기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라 단백질 또는 (b) FokI 엔도뉴클레아제에 융합된 전사 활성화인자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)를 포함한다.

[0187] 여전히 또 다른 구현예에서, 뉴클레아제 제제는 메가뉴클레아제이다. 메가뉴클레아제는 보존된 서열 모티프를 기준으로 4개의 패밀리로 분류되었고, 상기 패밀리는 LAGLIDADG (서열번호 16), GIY-YIG, H-N-H, 및 His-Cys 박스 패밀리이다. 이들 모티프는 금속 이온의 배치 및 포스포디에스테르 결합의 가수분해에 관여한다. HEase는 이들의 긴 인지 부위 및 이들의 DNA 기질에서 일부 서열 다형성에 대한 내성 때문에 널리 알려져 있다. 메가뉴클레아제 도메인, 구조 및 기능은 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[Guhan and Muniyappa (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:199-248; Lucas 등, (2001) *Nucleic Acids Res* 29:960-9; Jurica and Stoddard, (1999) *Cell Mol Life Sci* 55:1304-26; Stoddard, (2006) *Q Rev Biophys* 38:49-95; 및 Moure 등, (2002) *Nat Struct Biol* 9:764]을 참조한다. 일부 예에서, 천연 변이체 및/또는 가공된 유도체 메가뉴클레아제가 사용된다. 역학, 조인자 상호작용, 발현, 최적의 조건 및/또는 인지 부위 특이성, 및 활성에 대한 스크리닝을 변형시키기 위한 방법은 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌[Epinat 등, (2003) *Nucleic Acids Res* 31:2952-62; Chevalier 등, (2002) *Mol Cell* 10:895-905; Gimble 등, (2003) *Mol Biol* 334:993-1008; Seligman 등, (2002) *Nucleic Acids Res* 30:3870-9; Sussman 등, (2004) *J Mol Biol* 342:31-41; Rosen 등, (2006) *Nucleic Acids Res* 34:4791-800; Chames 등, (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e178; Smith 등, (2006) *Nucleic Acids Res* 34:e149; Gruen 등, (2002) *Nucleic Acids Res* 30:e29; Chen and Zhao, (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e154; WO2005105989; WO2003078619; WO2006097854; WO2006097853; WO2006097784; 및 WO2004031346]을 참조한다.

[0188] 임의의 메가뉴클레아제가 본원에서 사용될 수 있고, I-SceI, I-SceII, I-SceIII, I-SceIV, I-SceV, I-SceVI, I-SceVII, I-CeuI, I-CeuAIIP, I-CreI, I-CrepsbIP, I-CrepsbIIP, I-CrepsbIIIP, I-CrepsbIVP, I-TliI, I-PpoI, PI-PspI, F-SceI, F-SceII, F-SuvI, F-TevI, F-TevII, I-AmaI, I-AniI, I-ChuI, I-CmoeI, I-CpaI, I-CpaII, I-CsmI, I-CvuI, I-CvuAIP, I-DdiI, I-DdiII, I-DirI, I-DmoI, I-HmuI, I-HmuII, I-HsNIP, I-LlaI, I-MsoI, I-NaaI, I-NanI, I-NcIIP, I-NgrIP, I-NitI, I-NjaI, I-Nsp236IP, I-PakI, I-PboIP, I-PcuIP, I-PcuAI, I-PcuVI, I-PgrIP, I-PobIP, I-PorI, I-PorIIP, I-PbpIP, I-SpBetaIP, I-ScaI, I-SexIP, I-SneIP, I-SpomI, I-SpomCP, I-SpomIP, I-SpomIIP, I-SquIP, I-Ssp6803I, I-SthPhiJP, I-SthPhiST3P, I-SthPhiSTe3bP, I-TdeIP, I-TevI, I-TevII, I-TevIII, I-UarAP, I-UarHGPAIP, I-UarHGPA13P, I-VinIP, I-ZbiIP, PI-MtuI, PI-MtuHIP PI-MtuHIIP, PI-PfuI, PI-PfuII, PI-PkoI, PI-PkoII, PI-Rma43812IP, PI-SpBetaIP, PI-SceI, PI-TfuI, PI-

TfuII, PI-ThyI, PI-TliI, PI-TliII, 또는 이의 임의의 활성 변이체 또는 단편을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0189] 하나의 구현예에서, 상기 메가뉴클레아제는 12 내지 40개 염기쌍의 이중 가닥 DNA 서열을 인지한다. 하나의 구현예에서, 상기 메가뉴클레아제는 게놈에서 하나의 바람직하게 매칭된 표적 서열을 인지한다. 하나의 구현예에서, 상기 메가뉴클레아제는 호밍(homing) 뉴클레아제이다. 하나의 구현예에서, 호밍 뉴클레아제는 호밍 뉴클레아제의 LAGLIDADG (서열번호 16) 패밀리이다. 하나의 구현예에서, 호밍 뉴클레아제의 LAGLIDADG (서열번호 16) 패밀리는 I-SceI, I-CreI, 및 I-Dmol로부터 선택된다.

[0190] 뉴클레아제 제제는 I 형, II 형, III 형, 및 IV 형 엔도뉴클레아제를 포함하는 제한 엔도뉴클레아제를 추가로 포함할 수 있다. I 형 및 III 형 제한 엔도뉴클레아제는 특이적 인지 부위를 인지하지만, 전형적으로 절단 부위(인지 부위)로부터 수백개의 염기쌍에 이격되어 있을 수 있는 뉴클레아제 결합 부위로부터 다양한 위치에서 절단한다. II형 시스템에서 제한 활성은 임의의 메틸라제 활성과는 무관하고 절단은 전형적으로 결합 부위내 또는 이의 근처의 특이적 부위에서 일어난다. 대부분의 II형 효소는 팔린드롬 서열을 컷팅하지만 IIa형 효소는 비-팔린드롬 인지 부위를 인지하고 인지 부위 외부 영역을 절단하고, IIb형 효소는 인지 부위의 외부 2개의 부위에서 2회 서열을 컷팅하고, IIs형 효소는 비대칭 인지 부위를 인지하고 하나의 측면상에 및 인지 부위로부터 약 1 내지 20개 뉴클레오타이드의 한정된 거리에서 절단한다. IV형 제한 효소는 메틸화된 DNA를 표적화한다. 제한 효소는 예를 들어, REBASE 데이타베이스에서 추가로 기재되고 분류되어 있다 (rebase.neb.com의 웹페이지; Roberts 등, (2003) *Nucleic Acids Res* 31:418-20), Roberts 등, (2003) *Nucleic Acids Res* 31:1805-12, 및 Belfort 등, (2002) in *Mobile DNA II*, pp. 761-783, Eds. Craigie 등, (ASM Press, Washington, DC).

[0191] 다양한 방법 및 조성물에 사용되는 뉴클레아제 제제는 또한 CRISPR/Cas 시스템을 포함할 수 있다. 상기 시스템은 예를 들어, Cas9 뉴클레아제를 사용할 수 있고, 일부 경우에 이는 이것이 발현되어야만 하는 목적하는 세포 유형을 위해 코돈 최적화되어 있다. 상기 시스템은 코돈 최적화된 Cas9와 기능하는 융합된 crRNA-tracrRNA 작제물을 추가로 사용한다. 상기 단일 RNA는 흔히 가이드 RNA 또는 gRNA로서 언급된다. gRNA내에서 crRNA 부분은 소정의 인지 부위에 대한 "표적 서열"로서 동정되고 tracrRNA는 흔히 "스캐폴드"로서 언급된다. 간략하게, 표적 서열을 함유하는 짧은 DNA 단편은 가이드 RNA 발현 플라스미드에 삽입된다. 상기 gRNA 발현 플라스미드는 진핵 세포에서 적당한 프로세싱을 위해 필요한 요소들 및 세포에서 활성인 적합한 프로모터 뿐만 아니라, tracrRNA 서열(스캐폴드)의 형태의 표적 서열(일부 구현예에서 약 20개 뉴클레오타이드)을 포함한다. 많은 시스템은 이중 가닥 DNA를 형성하기 위해 어닐링되고 이어서 gRNA 발현 플라스미드로 클로닝되는 커스텀 상보적 올리고스에 의존한다. gRNA 발현 카세트 및 Cas9 발현 카세트는 이어서 세포에 도입된다. 예를 들어, 문헌[Mali P 등 (2013) *Science* 2013 Feb 15;339(6121):823-6; Jinek M 등 *Science* 2012 Aug 17;337(6096):816-21; Hwang WY 등 *Nat Biotechnol* 2013 Mar;31(3):227-9; Jiang W 등 *Nat Biotechnol* 2013 Mar;31(3):233-9; 및 Cong L 등 *Science* 2013 Feb 15;339(6121):819-23, 이의 각각은 본원에서 참조로서 인용된다]을 참조한다.

[0192] 하나의 구현예에서, 만능 랫트 세포에서 목적하는 게놈 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법은 만능 랫트 세포로 다음을 도입함을 추가로 포함한다: (a) 클러스터 규칙적 산재된 짧은 팔린드롬 반복체(CRISPR)-관련된(Cas) 단백질을 암호화하는 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 제1 발현 작제물; (b) 가이드 RNA (gRNA)로 연결된 게놈 표적 서열(여기서, 상기 게놈 표적 서열은 프로토스페이서 인접 모티프(PAM) 서열에 의해 3' 말단상에 플랭킹되어 있다)에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 제2 발현 작제물. 하나의 구현예에서, 게놈 표적 서열은 GNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG (GN_{1-20} GG; 서열번호 1)의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 표적 서열은 N이 1 내지 20개 뉴클레오타이드 길이인 서열번호 23을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 상기 게놈 표적 서열은 서열번호 1의 14개 내지 20개 뉴클레오타이드 길이를 포함한다.

[0193] 하나의 구현예에서, 상기 gRNA는 클러스터 규칙적 산재된 짧은 팔린드롬 반복체 (CRISPR) RNA (crRNA) 및 트랜스 활성화 CRISPR RNA (tracrRNA)를 암호화하는 제3 핵산 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, Cas 단백질은 Cas9이다.

[0194] 일부 구현예에서, gRNA는 (a) 핵산 서열 5'-GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU-3' (서열번호 2)의 키메라 RNA; 또는 (b) 핵산 서열 5'-GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG-3' (서열번호 3)의 키메라 RNA를 포함한다.

[0195] 또 다른 구현예에서, 상기 crRNA는 5'-GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAU-3' (서열번호 4); 5'-GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAAG (서열번호 5); 또는 5'-GAGUCCGAGCAGAAGAAGAAGUUUUA-3' (서열번호 6)를 포

함한다.

[0196] 여전히 다른 구현예에서, tracrRNA는 5'-AAGGCUAGUCCG-3' (서열번호 7) 또는 5'-AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU-3' (서열번호 8)의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0197] 하나의 구현예에서, Cas 단백질은 I형 Cas 단백질이다. 하나의 구현예에서, Cas 단백질은 II형 Cas 단백질이다. 하나의 구현예에서, II형 Cas 단백질은 Cas9이다. 하나의 구현예에서, 제1 핵산 서열은 인간 코돈 최적화된 Cas 단백질을 암호화한다.

[0198] 하나의 구현예에서, 제1 핵산은 Cas 단백질에서 뉴클레아제 활성 부위의 하나 이상의 아미노산 잔기를 붕괴시키는 돌연변이를 포함하고. 여기서, 돌연변이체 Cas 단백질은 표적 DNA 영역의 단지 하나의 가닥에 절단을 생성시키고 상기 돌연변이체는 표적 DNA 영역에서 비상동성 재조합을 감소시킨다.

[0199] 하나의 구현예에서, Cas 단백질을 암호화하는 제1 핵산은 핵 위치화 시그날(NLS)을 추가로 포함한다. 하나의 구현예에서, 핵 위치화 시그날은 SV40 핵 위치화 시그날이다.

[0200] 하나의 구현예에서, 게놈 표적 서열 및 가이드 RNA(gRNA)의 발현을 구동시키는 제2 프로모터는 RNA 폴리머라제 III 프로모터이다. 하나의 구현예에서, RNA 폴리머라제 III 프로모터는 인간 U6 프로모터이다. 하나의 구현예에서, RNA 폴리머라제 III 프로모터는 랫트 U6 폴리머라제 III 프로모터이다. 하나의 구현예에서, RNA 폴리머라제 III 프로모터는 마우스 U6 폴리머라제 III 프로모터이다.

[0201] 하나의 구현예에서, crRNA 및 tracrRNA를 암호화하는 핵산 서열은 합성 루프에 연결되어 있고, 여기서, 발현시 crRNA 및 tracrRNA는 crRNA:tracrRNA 듀플렉스를 형성한다.

[0202] 하나의 구현예에서, 제1 발현 작제물 및 제2 발현 작제물은 동일한 플라스미드로부터 발현된다.

[0203] 하나의 구현예에서, 제1 및 제2 발현 작제물은 LTVEC와 함께 도입된다. 하나의 구현예에서, 제1 및 제2 발현 카세트는 일정 기간에 걸쳐 LTVEC와는 별도로 도입된다.

[0204] 하나의 구현예에서, 방법은 본원에 기재된 바와 같은 독특한 표적 유전자 좌위의 멀티플렉스 에디팅을 위해 다수의 제2 작제물 및 다수의 LTVEC를 도입함을 포함한다.

[0205] 뉴클레아제 제제(즉, 가공된 뉴클레아제 제제)의 활성 변이체 및 단편이 또한 제공된다. 상기 활성 변이체 는 고유 뉴클레아제 제제와 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 동일성을 포함할 수 있고, 상기 활성 변이체는 목적하는 인지 부위에서 컷팅하는 능력을 보유하고 따라서 닉 또는 이중가닥 절단 유도 활성을 보유한다. 예를 들어, 본원에 기재된 임의의 뉴클레아제 제제는 고유 엔도뉴클레아제 서열로부터 변형될 수 있고 고유 뉴클레아제 제제에 의해 인지되지 않았던 인지 부위에서 닉 또는 이중가닥 절단을 인지하고 유도하도록 디자인될 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 가공된 뉴클레아제는 상응하는 고유 뉴클레아제 제제 인지 부위와는 상이한 인지 부위에서 닉 또는 이중가닥 절단을 유도하기 위한 특이성을 갖는다. 닉 또는 이중가닥 절단 유도 활성을 위한 검정은 공지되어 있고 일반적으로 인지 부위를 함유하는 DNA 기질상에 엔도뉴클레아제의 전체 활성 및 특이성을 측정한다.

[0206] 뉴클레아제 제제는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 세포로 도입될 수 있다. 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리펩타이드는 직접 세포에 도입될 수 있다. 대안적으로, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 세포에 도입될 수 있다. 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 세포에 도입되는 경우, 뉴클레아제 제제는 세포내에서 일시적으로, 조건적으로 또는 항상성으로 발현될 수 있다. 따라서, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 발현 카세트에 함유될 수 있고 조건적 프로모터, 유도성 프로모터, 항상성 프로모터 또는 조직 특이적 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 목적하는 상기 프로모터는 본원의 기타 다른 곳에서 추가로 상세히 논의된다. 대안적으로, 뉴클레아제 제제는 뉴클레아제 제제를 암호화하거나 포함하는 mRNA로서 세포에 도입된다.

[0207] 하나의 구현예에서, cRNA 및 tracrRNA는 별도의 RNA 전사체로서 발현된다.

[0208] 특정 구현예에서, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 세포의 게놈으로 안정하게 통합되고 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다. 다른 구현예에서, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 삽입 핵산을 포함하는 동일한 표적화 벡터에 있고, 다른 경우에, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터로부터 분리되어 있는 벡터 또는 플라스미드에 있다.

[0209] 뉴클레아제 제제가 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 도입을 통해 세포에 제공되는 경우, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 상기 폴리뉴클레오타이드는 뉴클레아제 제제를 암호화하는 천연 폴리뉴클레오타이드 서열과 비교 하여 목적하는 세포에서 보다 높은 빈도의 용법을 갖는 코돈을 치환하기 위해 변형될 수 있다. 예를 들어, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 천연의 폴리뉴클레오타이드 서열과 비교하여, 세균 세포, 효모 세포, 인간 세포, 비-인간 세포, 포유동물 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 랫트 세포 또는 임의의 다른 목적하는 숙주 세포를 포함하는 소정의 목적하는 원핵 또는 진핵 세포에서 보다 높은 빈도의 용법을 갖는 코돈을 치환하기 위해 변형될 수 있다.

[0210] 하나의 구현예에서, 엔도뉴클레아제 제제는 LTVEC와 함께 도입된다. 하나의 구현예에서, 엔도뉴클레아제 제제는 일정 기간에 걸쳐 LTVEC로부터 별도로 도입된다. 하나의 구현예에서, 엔도뉴클레아제 제제는 LTVEC의 도입 전에 도입된다. 하나의 구현예에서, 엔도뉴클레아제 제제는 LTVEC의 도입 후 랫트 ES 세포에 도입된다.

[0211] 하나의 구현예에서, 엔도뉴클레아제 제제는 엔도뉴클레아제를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 작제물이고, 여기서, 상기 핵산 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 항상성 활성 프로모터이다. 하나의 구현예에서, 상기 프로모터는 유도성 프로모터이다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 만능 랫트 세포에서 활성이다. 하나의 구현예에서, 엔도뉴클레아제 제제는 엔도뉴클레아제를 암호화하는 mRNA이다.

[0212] B. 목적하는 폴리뉴클레오타이드를 표적 유전자 좌위로 통합하기 위한 방법

[0213] 목적하는 표적 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법이 제공된다. 하나의 구현예에서, 만능 랫트 세포에서 표적 유전자 좌위는 유전학적 변형을 위해 표적화된다. 상기 방법은 다음 단계를 포함한다 (a) 만능 랫트 세포에 5' 랫트 상동성 아암과 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터를 도입하는 단계; 및 (b) 표적 유전자 좌위에서 표적화된 유전학적 변형(여기서, 상기 표적화된 유전학적 변형은 생식선을 통해 전달될 수 있다)을 포함하는 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포를 동정하는 단계. 특정 구현예에서, 5' 상동성 아암 및 3' 상동성 아암의 총합은 적어도 10 kb이고/이거나 대형 표적화 벡터가 사용된다.

[0214] 다른 구현예에서, LTVEC의 총 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 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. 하나의 구현예에서, 결실 크기는 LTVEC의 5' 및 3' 상동성 아암의 총합의 크기와 동일하거나 유사하다.

[0215] 만능 랫트 세포는 랫트 배아 줄기 세포일 수 있다. 특정 구현예에서, (a) 랫트 ES 세포는 DA 스트레인 또는 ACI 스트레인으로부터 유래하거나; (b) 랫트 ES 세포는 Oct-4, Sox-2, 알칼린 포스파타제 또는 이의 조합을 포함하는 만능 마커의 발현을 특징으로 한다. 다른 경우에, 사용된 랫트 배아 줄기 세포는 이의 전문이 본원에 참조로서 인용된 2014년 2월 20일자로 출원된 미국 특허 출원 번호 제14/185,703호에 기재된 바와 같은 랫트 ES 세포를 포함한다.

[0216] 본원에서 기타 다른 곳에 기재된바와 같이, 삽입 핵산은 임의의 핵산 서열일 수 있다. 비제한적인 구현예에서, (a) 삽입 핵산은 내인성 랫트 핵산 서열의 상동성 또는 이종상동성 포유동물 핵산 서열로의 치환를 포함하거나; (b) 삽입 핵산은 내인성 랫트 핵산 서열의 결실을 포함하고; (c) 삽입 핵산은 내인성 랫트 핵산 서열의 결실을 포함하고, 여기서, 상기 결실은 5kb 내지 200kb 또는 5kb 내지 3Mb 범위이고(본원에 기타 다른 곳에서 상세히 논의된 바와 같이); (d) 삽입 핵산은 외인성 핵산 서열의 첨가를 포함하거나 (약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb 범위의 외인성 핵산 서열을 포함하는); (e) 삽입 핵산은 상동성 또는 이종상동성 핵산 서열을 포함하는 외인성 핵산 서열을 포함하거나; (f) (a)의 상동성 또는 이종상동성 핵산 서열은 인간 핵산 서열이거나; (g) 삽입 핵산은 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 키메라 핵산 서열인, (a)의 상동성 또는 이종상동성 핵산 서열을 포함하거나; (h) 삽입 핵산은 약 5kb 내지 약 200kb 범위인, (e)의 외인성 핵산 서열을 포함하거나; (i) 삽입 핵산은 부위 특이적 리컴비나제 표적 서열로 플랭킹된 조건적 대립형질유전자를 포함하거나; (j) 삽입 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하거나;

(k) 삽입 핵산은 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 V_H 유전자 절편, 하나 이상의 비배열된 인간 면역글로불린 중쇄 D 유전자 절편, 및 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 J_H 유전자 절편을 포함하고, 상기 절편들은 설치류 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결되어 있거나; (l) 삽입 핵산은 설치류 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 가변 핵산 서열을 포함하거나; (m) 삽입 핵산은 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 $V_κ$ 또는 $V_λ$ 유전자 절편 및 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 $J_κ$ 또는 $J_λ$ 유전자 절편을 포함하고, 이들은 포유동물 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결되어 있거나; (n) 삽입 핵산은 재배열된 인간 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 핵산 서열을 포함하고 이는 포유동물 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결되어 있거나; (o) (k) 및/또는 (l)의 포유동물 중쇄 불변 영역 핵산 서열은 랫트 불변 영역 핵산 서열, 인간 불변 영역 핵산 서열 또는 이의 조합을 포함하거나; (p) (m) 및/또는 (n)의 포유동물 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 불변 영역 핵산은 랫트 불변 영역 핵산 서열, 인간 불변 영역 핵산 서열 또는 이의 조합을 포함한다.

[0217] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산은 V_H1-2, V_H1-3, V_H1-8, V_H1-18, V_H1-24, V_H1-45, V_H1-46, V_H1-58, V_H1-69, V_H2-5, V_H2-26, V_H2-70, V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-15, V_H3-16, V_H3-20, V_H3-21, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-30-3, V_H3-30-5, V_H3-33, V_H3-35, V_H3-38, V_H3-43, V_H3-48, V_H3-49, V_H3-53, V_H3-64, V_H3-66, V_H3-72, V_H3-73, V_H3-74, V_H4-4, V_H4-28, V_H4-30-1, V_H4-30-2, V_H4-30-4, V_H4-31, V_H4-34, V_H4-39, V_H4-59, V_H4-61, V_H5-51, V_H6-1, V_H7-4-1, V_H7-81, 또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 기능성 인간 V_H 유전자 절편을 포함한다.

[0218] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산은 D1-1, D1-7, D1-14, D1-20, D1-26, D2-2, D2-8, D2-15, D2-21, D3-3, D3-9, D3-10, D3-16, D3-22, D4-4, D4-11, D4-17, D4-23, D5-12, D5-5, D5-18, D5-24, D6-6, D6-13, D6-19, D6-25, D7-27, 또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 기능성 인간 D유전자 절편을 포함한다.

[0219] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산은 J_H1, J_H2, J_H3, J_H4, J_H5, J_H6, 또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 기능성 J_H 유전자 절편을 포함한다. 하나의 구현예에서, 삽입 핵산은 Vκ4-1, Vκ5-2, Vκ 7-3, Vκ 2-4, Vκ1-5, Vκ1-6, Vκ3-7, Vκ1-8, Vκ1-9, Vκ2-10, Vκ3-11, Vκ1-12, Vκ1-13, Vκ2-14, Vκ3-15, Vκ1-16, Vκ1-17, Vκ2-18, Vκ2-19, Vκ3-20, Vκ6-21, Vκ1-22, Vκ1-23, Vκ2-24, Vκ3-25, Vκ2-26, Vκ1-27, Vκ2-28, Vκ2-29, Vκ2-30, Vκ3-31, Vκ1-32, Vκ1-33, Vκ3-34, Vκ1-35, Vκ2-36, Vκ1-37, Vκ2-38, Vκ1-39, Vκ2-40, 또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 인간 Vκ 유전자 절편을 포함한다.

[0220] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산은 Vλ3-1, Vλ4-3, Vλ2-8, Vλ3-9, Vλ3-10, Vλ2-11, Vλ3-12, Vλ2-14, Vλ3-16, Vλ2-18, Vλ3-19, Vλ3-21, Vλ3-22, Vλ2-23, Vλ3-25, Vλ3-27, 또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 인간 Vλ 유전자 절편을 포함한다.

[0221] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산은 Jκ1, Jκ2, Jκ3, Jκ4, Jκ5, 또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 인간 Jκ 유전자 절편을 포함한다.

[0222] 특정 구현예에서, 만능 랫트 세포에서 표적 유전자 좌위의 변형시, 상기 유전학적 변형 은 생식선을 통해 전달된다.

[0223] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산은 게놈으로 통합되는 경우 랫트 ApoE 유전자 좌위의 영역의 유전학적 변형을 생성할 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서, ApoE 유전자 좌위에서 상기 유전학적 변형은 ApoE 활성을 감소시키거나, ApoE 활성을 증가시키거나 ApoE 활성을 조절한다. 하나의 구현예에서, ApoE 녹아웃이 생성된다.

[0224] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산 서열은 게놈으로 통합되는 경우 랫트 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위의 영역의 유전학적 변형을 생성할 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위에서 상기 유전학적 변형은 인터류킨-2 수용체 활성을 감소시키거나 인터류킨-2 수용체 감마 활성을 증가시키거나 인터류킨-2 수용체 활성을 조절한다. 하나의 구현예에서, 인터류킨-2 수용체 녹아웃이 생성된다.

[0225] 여전히 또 다른 구현예에서, 삽입 핵산 서열은 게놈으로 통합되는 경우 랫트 Rag1 유전자 좌위, 랫트 Rag2 유전자 좌위 및/또는 랫트 Rag2/Rag1 유전자 좌위의 영역의 유전학적 변형을 생성할 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 랫트 Rag1, Rag2 및/또는 Rag2/Rag1 유전자 좌위에서 상기 유전학적 변형은 Rag1, Rag2 또는 Rag1 및 Rag2 단백질 활성을 감소시키거나, Rag1, Rag2 또는 Rag1 및 Rag2 단백질 활성을 증가시키거나, Rag1, Rag2

또는 Rag 1 및 Rag2 단백질 활성을 조절한다. 하나의 구현예에서, Rag1, Rag2 또는 Rag2/Rag1 녹아웃이 생성된다.

[0226] 추가의 구현예에서, 삽입 핵산은 랫트 ApoE 유전자 좌위, 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위 및/또는 Rag2 유전자 좌위, 및/또는 Rag1 유전자 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 유전자 좌위를 또 다른 유기체 기원의 ApoE 유전자 좌위, 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위, Rag2 유전자 좌위, Rag1 유전자 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 유전자 좌위의 상응하는 이종상동성 부분으로 치환시킨다.

[0227] 여전히 다른 구현예에서, 삽입 핵산은 이의 전체 길이에 걸쳐 치환되는 ApoE 유전자 좌위, 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위, Rag2 유전자 좌위, Rag1 유전자 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 유전자 좌위의 일부와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%를 공유하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0228] 소정의 삽입 폴리뉴클레오타이드 및 치환되는 랫트 유전자 좌위의 상응하는 영역은 암호화 영역, 인트론, 엑손, 비해독 영역, 조절 영역, 프로모터 또는 인핸서 또는 이의 조합일 수 있다. 더욱이, 소정의 삽입 폴리뉴클레오타이드 및/또는 치환되는 랫트 유전자 좌위의 영역은 예를 들어, 10 내지 100개 뉴클레오타이드 길이, 100 내지 500개의 뉴클레오타이드 길이, 500 내지 1kb 뉴클레오타이드 길이, 1Kb 내지 1.5kb 뉴클레오타이드 길이, 1.5kb 내지 2kb 뉴클레오타이드 길이, 2kb 내지 2.5kb 뉴클레오타이드 길이, 2.5kb 내지 3kb 뉴클레오타이드 길이, 3kb 내지 5kb 뉴클레오타이드 길이, 5kb 내지 8kb 뉴클레오타이드 길이, 8kb 내지 10kb 뉴클레오타이드 길이 이상을 포함하는 임의의 목적하는 길이를 가질 수 있다. 다른 경우에, 삽입 또는 치환 크기는 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 약 350kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 800kb, 약 800kb 내지 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb, 내지 약 2.5Mb, 약 2.5Mb 내지 약 2.8Mb, 약 2.8Mb 내지 약 3Mb이다. 다른 구현예에서, 소정의 삽입 폴리뉴클레오타이드 및/또는 치환되는 랫트 유전자 좌위의 영역은 적어도 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 또는 900개 뉴클레오타이드이거나 적어도 1 kb, 2kb, 3kb, 4kb, 5kb, 6kb, 7kb, 8kb, 9kb, 10kb, 11kb, 12kb, 13kb, 14 kb, 15kb, 16kb 초과이다.

[0229] i. 세균 상동성 재조합(BHR)을 통한 랫트 핵산의 표적 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법

[0230] 원핵 세포에서 세균 상동성 재조합 (BHR)을 통한 랫트 핵산의 표적 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 상기 방법은 표적 벡터를 작제하기 위해 랫트 핵산의 표적 유전자 좌위를 유전학적으로 변형시키기 위한 원핵 세포에서 세균 상동성 재조합을 사용하는 용도를 모색한다. 유전학적으로 변형된 표적 유전자 좌위를 포함하는 상기 표적화 벡터는 진핵 세포, 예를 들어, 만능 세포로 도입될 수 있다. "상동성 재조합"은 상동성 영역내 교차 부위에서 2개의 DNA 분자간의 DNA 단편의 교환을 포함한다. 따라서, "세균 상동성 재조합" 또는 "BHR"은 세균에 존재하는 상동성 재조합을 포함한다.

[0231] 세균 상동성 재조합(BHR)을 통해 랫트 핵산의 표적 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법이 제공되고, 이는 5' 랫트 상동성 아암 및 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터를 원핵 세포로 도입함을 포함하고, 여기서, 원핵 세포는 랫트 핵산을 포함하고 표적 유전자 좌위에서 BHR을 매개하는 리컴비나제를 발현할 수 있다. 상기 표적화 벡터는 본원에 기재된 임의의 대형 표적화 벡터를 포함할 수 있다.

[0232] 하나의 구현예에서, 방법은 하기에 기재된 것을 원핵 세포로 도입함을 포함한다: (i) 목적하는 DNA 서열을 갖는 랫트 핵산을 포함하는 제1 작제물; (ii) 랫트 5' 상동성 아암 및 랫트 3' 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 제2 표적화 작제물, 및 (iii) 세균 상동성 재조합을 매개하는 리컴비나제를 암호화하는 제3 작제물. 하나의 구현예에서, 제1, 제2 및 제3 작제물은 특정 기간에 걸쳐 별도로 원핵 세포에 도입된다. 하나의 구현예에서, 원핵 세포는 리컴비나제를 암호화하는 핵산을 포함하고, 상기 방법은 제3 작제물의 도입을 요구하지 않는다. 하나의 구현예에서, 리컴비나제는 유도성 프로모터의 제어하에 발현된다.

[0233] 하나의 구현예에서, 랫트 핵산을 포함하는 제1 작제물은 세균 인공 염색체 (BAC) 또는 효모 인공 염색체(YAC)로부터 유래된다.

[0234] 표적 게놈 유전자 좌위에서 삽입 핵산을 포함하는 원핵 세포가 선택될 수 있다. 상기 방법은 원핵 세포에서 표적화된 랫트 유전자 좌위에서 다중 삽입 핵산의 도입을 가능하게 하기 위해 본원에 기재된 바와 같이 연속으로 반복할 수 있다. 표적 랫트 핵산 유전자 좌위가 원핵 세포내에서 "설정"되면, 변형된 랫트 표적 유전자 좌위를 포함하는 표적화 벡터는 원핵 세포로부터 분리되고 포유동물 세포(즉, 랫트 세포, 만능 랫트 세포 또는 랫트 배아 줄기 세포)내 표적 게놈 유전자 좌위로 도입될 수 있다.

[0235] 표적화 벡터를 수용하기 위해 바람직한 랫트 세포는 이의 내용이 본원에 요약된, 2014년 2월 20일자로 출원된 미국 특허 출원 제14/185,703호에 기재되어 있다. 이들 랫트 세포는 *시험관내* 하나 이상의 표적화된 유전학적 변형 후 이들의 만능을 유지할 수 있는 만능 랫트 세포이고 표적화된 유전학적 변형을 생식선을 통해 전달할 수 있다.

[0236] 전기천공된 만능 랫트 세포는 표적화 벡터를 포함하는 약물 내성 세포의 선택을 위해 고밀도로 분주한다. 약물 선택 프로세싱은 대다수의 분주된 세포(~ 99%)를 제거하고 이의 각각이 단일 세포로부터 유래된 클론인 개별 콜로니를 잔류시킨다. 잔류하는 세포 중에서, 대부분의 세포 (~ 80-100%)는 게놈내 무작위 위치에서 통합되는 표적화 벡터(약물 선택 카세트를 포함하는)를 함유한다. 따라서, 콜로니는 개별적으로 집어내고 올바른 게놈 위치에서 표적화 벡터를 함유하는 랫트 ES 세포를 동정하기 위해 (예를 들어, 하기된 대립형질유전자 검정의 변법을 사용하여) 유전자형 분류하였다.

[0237] 고속 처리 정량 검정, 즉, 변형된 대립형질유전자 (MOA) 검정을 유전자형 분류를 위해 사용할 수 있다. 상기 검정은 유전학적 변형 후 모 염색체에서 변형된 대립형질유전자(들)의 대규모 스크리닝을 가능하게 한다. MOA 검정은 다양한 분석학적 기술을 통해 수행할 수 있고, 이는 정량적 PCR, 예를 들어, 실시간 PCR(qPCR)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 실시간 PCR은 표적 유전자 좌위를 인지하는 제1 프라이머 세트 및 비-표적화된 참조 유전자 좌위를 인지하는 제2 프라이머 세트를 포함한다. 추가로, 프라이머 세트는 증폭된 서열을 인지하는 형광성 프로브를 포함한다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 Invader Probes®를 통해 수행된다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 MMP assays®을 통해 수행된다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 TaqMan® Molecular Beacon을 통해 수행된다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 Eclipse™ 프로브 기술을 통해 수행된다. (문헌참조: 예를 들어, US2005/0144655, 이의 전문이 본원에 참조로서 인용된다).

[0238] 표적화된 유전학적 변형을 포함하는 선택된 만능 랫트 세포 또는 랫트 ES 세포는 이어서 숙주 렛트 배아, 예를 들어, 전-상실포배 단계 또는 낭포 단계 랫트 배아에 도입되고 시조 랫트(F0 랫트)를 생성하기 위해 대리모의 자궁으로 이식될 수 있다. 후속적으로, 시조 랫트는 유전학적 변형에 대해 이종접합성인 F1 후손을 생성하기 위해 야생형 랫트로 육종시킬 수 있다. 이종접합성 F1의 짝짓기는 유전학적 변형에 대해 이종접합성 후손을 제조할 수 있다. 이종접합성 F1의 짝짓기는 유전학적 변형에 대해 이종접합성 후손을 제조할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 표적 유전자 좌위의 다양한 유전학적 변형은 본원에 기타 다른 곳에서 기재된 바와 같은 대형 표적화 벡터(LTVEC)를 사용하여 수행될 수 있다. 예를 들어, LTVEC는 VELOCIGENE® 유전학적 가공 기술을 사용하여 박테리아 인공 염색체 (BAC) DNA로부터 유도될 수 있다 (문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 제6,586,251호 및 Valenzuela, D. M. 등 (2003), High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotechnology 21(6): 652-659, 이들의 전문이 본원에 참조로서 인용된다).

[0239] 대형 표적화 벡터(LTVEC)를 생성하기 위한 세균 상동성 재조합 (BHR)의 사용은 대형 게놈 DNA 단편을 수용하는 데 있어서의 플라스미드의 제한 및 이에 따른 만능 랫트 세포내 내인성 유전자 좌위로 표적화된 변형을 도입하기 위한 낮은 효율을 극복한다. 하나 이상의 표적화된 유전학적 변형은 LTVEC를 생성시키는데 수행될 수 있다. 원핵 세포에서 생성된 LTVEC의 예는 특이적 게놈 영역에 상보적인 랫트 상동성 아암에 의해 플랭킹된 하나 이상의 유전학적 변형 또는 외인성 핵산(예를 들어, 랫트 핵산의 상동체 또는 이종상동체)와 함께 랫트 게놈 서열을 갖는 삽입 핵산을 포함할 수 있다.

[0240] 본원에 기재된 다양한 표적화 벡터를 포함하는 숙주 원핵 세포가 또한 제공된다. 상기 원핵 세포는 *이. 콜라이(E. coli)*와 같은 세균을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 하나의 구현예에서, 숙주 원핵 세포는 5' 랫트 상동성 아암 및 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터를 포함하고, 여기서, 상기 삽입 핵산은 약 5 kb 내지 약 200 kb 범위이다.

[0241] 숙주 원핵 세포는 리컴비나제 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 추가로 포함할 수 있거나 상기 리컴비나제 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산은 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다.

[0242] 표적화된 유전학적 변형을 생성하기 위해 원핵 세포와 조합된 본원에 기재된 LTVEC를 사용하는 다양한 방법 및 조성물이 추가로 제공된다. 상기 조성물 및 방법은 본원에 기타 다른 곳에서 논의된다.

[0243] 세균 상동성 아암 재조합(BHR)을 통해 핵산의 표적 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법이 제공되고 상기 방법은 5' 및 3' 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터를 원핵 세포에 도입함을 포함하고, 여기서, 상기 원핵 세포는 5' 및 3' 상동성 아암에 상응하는 핵산을 포함하고 상기 원핵 세포는 표적 유전자 좌

위에서 BHR을 매개하는 리컴비나제를 발현할 수 있다. 상기 표적화 벡터는 본원에 기재된 임의의 대형 표적화 벡터를 포함할 수 있다. 상기 방법은 본원에서 상세히 논의된 바와 같은 LTVEC를 사용할 수 있고 본원에 기타 다른 곳에서 논의된 바와 같은 CRISPR/Cas 시스템을 추가로 사용한다.

[0244] ii. 만능 랫트 세포에서 목적하는 표적 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법

[0245] 표적화된 유전학적 변형을 통해 만능 랫트 세포에서 목적하는 표적 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법이 추가로 제공되고, 상기 방법은 (a) 5' 랫트 상동성 아암 및 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터를 만능 랫트 세포에 도입하고(여기서, 5' 상동성 아암 및 3' 상동성 아암의 총합은 적어도 10kb이다), (b) 목적하는 표적 유전자 좌위에서 표적화된 유전학적 변형을 포함하는 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포를 동정함을 포함한다. 하나의 구현예에서, 5' 상동성 아암 및 3' 상동성 아암의 총합은 적어도 약 16kb 내지 약 30kb이다. 특정 구현예에서, 표적화된 유전학적 변형은 생식선을 통해 전달될 수 있다. 상기 표적화 벡터는 본원에 기재된 임의의 대형 표적화 벡터를 포함할 수 있다.

[0246] 하나의 양상에서, 표적화된 유전학적 변형을 통해 만능 랫트 세포에서 목적하는 게놈 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법이 제공되고, 상기 방법은, 다음을 포함한다: (a) 이의 게놈의 적어도 하나의 표적화된 유전학적 변형 후 이의 만능을 지속할 수 있고 표적화된 변형을 F1 세대의 생식선으로 전달할 수 있는 만능 랫트 세포를 제공하는 단계; (b) 랫트 게놈 DNA 단편을 포함하는 5' 상동성 아암 및 3' 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 대형 표적화 벡터(LTVEC)를 만능 랫트 세포로 도입하는 단계; 및 (c) 표적화된 유전학적 변형을 포함하는 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포를 동정하는 단계.

[0247] 다양한 방법을 사용하여 목적하는 표적 유전자 좌위에서 통합된 삽입 핵산을 갖는 세포를 동정할 수 있다. 목적하는 표적 유전자 좌위에서 삽입 핵산의 삽입은 "대립형질유전자의 변형"을 유도한다. 용어 "대립형질유전자의 변형" 및 상기 변형된 대립형질유전자의 검출을 위한 방법은 본원에서 기타 다른 곳에서 상세하게 추가로 논의된다.

[0248] 하나의 양상에서, 엔도뉴클레아제 매개된 유전자 표적화를 통해 만능 랫트 세포로 목적하는 게놈 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법이 제공되고, 상기 방법은, (a) 유전학적으로 변형된 게놈을 F1 세대의 생식선으로 전달할 수 있는 분리된 만능 랫트 세포를 제공하는 단계; (b) 엔도뉴클레아제 제제를 만능 랫트 세포로 도입하는 단계(여기서, 상기 엔도뉴클레아제 제제는 목적하는 게놈 유전자내 위치된 표적 DNA 서열에서 닉 또는 이중가닥 절단을 생성하고 랫트 ES 세포내 표적 DNA 서열에서 상기 닉 또는 이중가닥 절단은: (i) 닉 또는 이중가닥 절단의 비-상동성 말단 연결 (NHEJ)-매개된 DNA 복구(여기서, NHEJ-매개된 DNA 복구는 표적 DNA 서열에서 핵산 서열의 삽입 또는 결실을 포함하는 돌연변이체 대립형질유전자를 생성시킨다); 또는 (ii) 야생형 핵산 서열을 복구시키는 상동성 재조합 매개된 DNA 복구를 유도한다); 및 (c) 목적하는 변형된 게놈 유전좌를 동정하는 단계를 포함한다.

[0249] 하나의 양상에서, 뉴클레아제 제제를 통해 분리된 랫트 배아 줄기 세포(ES)에서 목적하는 게놈 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법이 제공되고, 상기 방법은: (a) F1 세대의 생식선으로 표적화된 유전학적 변형을 전달할 수 있는 분리된 랫트 ES 세포를 제공하는 단계; (b) 랫트 ES 세포에: (i) 랫트 5' 상동성 아암 및 랫트 3' 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 대형 표적화 벡터 (LTVEC)(여기서, 상기 삽입체는 적어도 5kb인 핵산 서열이다); 및 (ii) 엔도뉴클레아제 제제(여기서, 상기 엔도뉴클레아제 제제는 목적하는 게놈 유전자 좌위에 위치한 표적 DNA 서열에서 닉 또는 이중가닥 절단을 생성시키고 상기 표적 서열은 삽입 핵산에 존재하지 않는다)를 도입하는 단계; 및 (c) 랫트 배아 줄기(ES) 세포에서 표적화된 유전학적 변형을 동정하는 단계를 포함한다.

[0250] 하나의 양상에서, RNA-가이드된 게놈 가공을 통해 만능 랫트 세포에서 목적하는 개놈 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법이 제공되고, 상기 방법은: (a) 유전학적 변형된 게놈을 F1 세대의 생식선으로 전달할 수 있는 만능 랫트 세포를 제공하는 단계; (b) 만능 랫트 세포에: (i) 클러스터 규칙적 산재된 짧은 팔린드롬 반복체 (CRISPR)-연합된 (Cas) 단백질을 암호화하는 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 제1 발현 작제물, (ii) 가이드 RNA(gRNA)에 연결된 게놈 표적 서열에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 제2 발현 작제물(여기서, 상기 게놈 표적 서열은 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM) 서열에 의해 3' 말단 상에 플랭킹되어 있다)를 도입하는 단계를 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 표적 서열은 GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG ($GN_{1-20}GG$; 서열번호 1)의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 상기 게놈 표적 서열은 서열번호 1를 포함하고, 여기서, N은 14 내지 20개 뉴클레오타이드 길이이다. 하나의 구현예에서, gRNA는 클러스터 규칙적 산재된 짧은 팔린드롬 반복체 (CRISPR) RNA (crRNA)를 암호화하는 제3 핵산 및

트랜스 활성화 CRISPR RNA (tracrRNA)를 암호화하는 제4 핵산을 포함한다. 하나의 구현예에서, 발현시, Cas 단백질은 crRNA 및 tracrRNA를 포함하는 CRISPR-Cas 복합체를 형성하고, 상기 CRISPR-Cas 복합체는 목적하는 게놈 유전자 좌위내 위치한 표적 DNA 서열에서 닉 또는 이중가닥 절단을 생성시키고, 여기서, 만능 랫트 세포내 표적 DNA 서열에서 닉 또는 이중가닥 절단은: (i) CRISPR-Cas 복합체에 의해 생성된 닉 또는 이중가닥 절단의 비상동성 말단 연결(NHEJ) 매개된 DNA 복구(여기서, NHEJ는 표적 DNA 서열에서 핵산 서열의 삽입 또는 결실을 포함하는 돌연변이 유전자 좌위를 생성시킨다); 또는 (ii) 야생형 핵산 서열을 복구시키는 상동성 재조합 매개된 DNA 복구를 유도하고; (c) 변형된 목적하는 게놈 유전자 좌위를 동정한다.

[0251] 하나의 구현예에서, 만능 랫트 세포는 유도된 랫트 만능 줄기 세포(iPS)이다. 하나의 구현예에서, 만능 랫트 세포는 발육적으로 제한된 선조체 세포이다.

[0252] 다양한 구현예에서, 선택 마커내 인지 부위에서 닉 또는 이중가닥 절단의 존재는 표적화 벡터(예를 들어, LTVEC)와 목적하는 표적화된 유전자 좌위간의 재조합 효율 및/또는 빈도수를 증가시킨다. 하나의 구현예에서, 재조합은 상동성 재조합이다. 또 다른 구현예에서, 재조합은 비상동성 말단 연결에 의한 삽입이다. 다양한 구현예에서, 닉 또는 이중가닥 절단의 존재하에, 표적 게놈 유전자 좌위에서 표적화 벡터(예를 들어, LTVEC)의 표적화 효율은 닉 또는 이중가닥 절단의 부재하에서도 적어도 약 2배 높거나, 적어도 약 3배 높거나 적어도 약 4배 높다(예를 들어, 닉 또는 이중가닥 절단을 생성시키는 첨가된 뉴클레아제 제제의 부재를 제외하고는 목적하는 게놈 유전자 좌위에서 동일한 표적화 벡터 및 동일한 상동성 아암 및 상응하는 표적 부위를 사용하는).

[0253] 하나의 구현예에서, 표적 유전자 좌위에서 표적화된 유전학적 변형은 이대립형질성이다. "이대립형질성"이란 유전자의 2개의 대립형질유전자가 표적화된 유전학적 변형을 포함함을 의미한다. 특정 구현예에서, 뉴클레아제 제제와 표적화 벡터(예를 들어, LTVEC를 포함하는)의 조합 사용은 단독의 표적화 벡터의 사용과 비교하여, 세포에서 목적하는 게놈 유전자 좌위의 이대립형질성 표적화된 유전학적 변형을 유도한다. 표적화 벡터가 뉴클레아제 제제와 함께 사용되는 경우, 이대립형질성 표적화 효율은 표적화 벡터가 단독으로 사용되는 경우 보다 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배 이상 증가한다. 추가의 구현예에서, 이대립형질성 표적화 효율은 적어도 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1%, 2%, 3%, 4% 또는 5% 이상이다.

[0254] 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위에서 또는 ApoE 유전자 좌위에서 표적화된 유전학적 변형을 갖는 유전학적으로 변형된 랫트를 포함하는 조성물이 제공된다. 본원에서 제공된 다양한 방법 및 조성물은 이들 변형된 좌위가 생식계열을 통해 전해질 수 있도록 한다.

[0255] 특정 구현예에서, 유전학적으로 변형된 랫트 또는 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포는 인터류킨-2 감마 수용체 유전자 좌위에서 표적화된 유전학적 변형을 갖거나 ApoE 유전자 좌위에서 표적화된 유전학적 변형을 갖는 게놈 유전자 좌위를 포함하고, 여기서, 상기 인터류킨-2 감마 수용체 게놈 유전자 좌위 또는 ApoE 유전자 좌위는: (i) 인터류킨-2 감마 수용체 유전자 좌위의 적어도 일부 또는 ApoE 유전자 좌위의 적어도 일부의 결실; (ii) ApoE 유전자 좌위 또는 인터류킨-2 감마 수용체 유전자 좌위로의 이종성 핵산 서열의 삽입; 또는 (iii) 이의 조합을 포함하고, 여기서, 유전학적으로 변형된 게놈 유전자 좌위는 생식선을 통해 전달될 수 있다.

[0256] 상기 유전학적으로 변형된 랫트 및 상기 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포가 제조되도록 하는 방법이 추가로 제공된다. 상기 방법은 표적화된 유전학적 변형을 통해 만능 랫트 세포에서 ApoE 게놈 유전자 좌위 또는 인터류킨-2 감마 수용체 유전자 좌위를 변형시키기 위한 방법을 포함한다. 방법은 (a) ApoE 유전자 좌위에 대한 5' 랫트 상동성 아암 및 ApoE 유전자 좌위에 대한 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터를 만능 랫트 세포에 도입하고, (b) 목적하는 ApoE 게놈 유전자 좌위에서 표적화된 유전학적 변형을 포함하는 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포를 동정함을 포함하고, 여기서, 상기 표적화된 유전학적 변형은 생식선을 통해 전달될 수 있다.

[0257] 추가의 방법은 (a) 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위에 대한 5' 랫트 아암 및 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위에 대한 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 표적 벡터를 만능 랫트 세포로 도입하고, (b) 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위에서 표적화된 유전학적 변형을 포함하는 유전학적으로 변형 만능 랫트 세포를 동정함을 포함하고, 여기서, 상기 표적화된 유전학적 변형은 생식선을 통해 전달될 수 있다.

[0258] iii. 표적화된 유전자 좌위에서 목적하는 다중 폴리뉴클레오타이드를 통합시키는 방법

[0259] 본원에 제공된 다양한 방법 및 조성물은 소정의 표적 유전자 좌위와 함께 목적하는 다중 폴리뉴클레오타이드의 표적화된 통합을 가능하게 한다. 상기 제시된 다양한 방법은 연속적으로 반복하여 임의의 수의 삽입 핵산을 소정의 표적화된 유전자 좌위로의 표적화된 통합을 가능하게 할 수 있다. 따라서, 다양한 방법은 적어도 1, 2, 3,

4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상의 삽입 핵산을 표적 유전자 좌위로 삽입하기 위해 제공한다. 특정 구현예에서, 상기 연속 스택킹 방법은 포유동물 세포(즉, 인간, 비-인간, 설치류, 마우스, 몽키, 랫트, 햄스터, 애완 포유동물 또는 농업적 동물)로부터 기원하는 대형 게놈 영역을 표적화된 유전자 좌위로 재구축할 수 있게 한다. 상기 경우에, 암호화 및 비암호화 영역 둘다를 포함하는 게놈 유전자의 전달 및 재구축은 적어도 부분적으로 암호화 영역, 비암호화 영역 및 고유 게놈 영역에서 발견되는 카피수 변화를 유지시킴에 의해 소정의 영역의 복잡성이 보존되도록 한다. 따라서, 다양한 방법, 예를 들어, 임의의 포유동물 세포 또는 목적하는 동물내, 특히 원핵 숙주 세포내 또는 만능 랫트 세포 또는 랫트 ES 세포내에 "이종성" 또는 "외인성" 게놈 영역을 생성시키는 방법을 제공한다. 하나의 비제한적인 예에서, 비-인간 동물(즉, 랫트내)내에서 "인간화된" 게놈 영역이 생성된다.

[0260] 3. 인간화된 게놈 유전자 좌위

[0261] 본원에서는 인간화된 랫트 유전자 좌위를 포함하는 다양한 방법 및 조성물이 제공된다. 본원에 사용된 바와 같이, "인간화된" 게놈 유전자 좌위는 하나 이상의 인간 핵산 서열을 포함하는 비-인간 게놈의 영역을 의미한다. "인간화된 랫트 유전자 좌위"는 본원에 삽입된 인간 DNA 서열을 갖는 랫트 DNA의 영역을 포함한다. 인간 DNA 서열은 천연의 인간 DNA 서열일 수 있거나 이의 고유 형태로부터 변형될 수 있다. 특정 구현예에서, 인간 DNA 서열은 고유 인간 서열에 대해 적어도 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 공유한다. 인간 서열이 고유 인간 서열이 아닌 경우, 이것이 이종상동성 랫트 서열에 대한 것 보다 고유 인간 서열에 대해 적어도 큰 서열 동일성을 갖는다. 더욱이, 인간 DNA 서열은 cDNA, 인간 게놈 DNA 영역, 비암호화 조절 영역 또는 인간 DNA의 암호화. 게놈성 또는 조절 영역의 임의의 부분을 포함할 수 있다. 랫트 유전자 좌위로 삽입된 인간 DNA 서열은 본원의 기타 다른 곳에 기재된 바와 같은 임의의 삽입 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 인간 DNA 서열은 랫트 표적 유전자 좌위에 이종상동성이고, 다른 경우에 인간 DNA 서열은 랫트 표적 유전자 좌위에 상동성이다.

[0262] 하나의 구현예에서, 상기 표적화된 유전학적 변형은 내인성 랫트 핵산 서열의 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열로의 삽입 또는 치환이다. 하나의 구현예에서, 표적화된 유전학적 변형은 상응하는 랫트 핵산 서열을 포함하는 내인성 랫트 유전자 좌위에서 내인성 랫트 핵산 서열의 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열로의 삽입 또는 치환를 포함한다.

[0263] 인간화된 랫트 유전자 좌위(또는 인간화된 랫트 유전자 좌위를 포함하는 랫트 또는 랫트 세포)를 제조하기 위한 방법은 랫트 핵산을 포함하는 표적 유전자 좌위로 인간 핵산 서열을 도입함을 포함한다. 하나의 구현예에서, 인간화된 랫트를 제조하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 (a) 공여자 세포를 형성하기 위해 인간 핵산 서열을 포함하는 삽입 핵산 서열을 포함하는 표적화 벡터로 만능 랫트 세포의 게놈을 변형시키고; (b) 상기 공여자 세포를 숙주 랫트 배아로 도입하고; (c) 대리모에서 숙주 랫트 배아를 생성시킴을 포함하고; 상기 대리모는 인간 핵산 서열을 포함하는 랫트 후손을 생성한다. 특정 구현예에서, 인간화된 랫트 유전자 좌위는 생식선을 통해 전달될 수 있다. 추가의 구현예에서, 표적화 벡터는 대형 표적화 벡터(LTVEC)를 포함하고, 인간 핵산 서열을 포함하는 삽입 핵산은 적어도 5 kb이다.

[0264] 다른 방법에서, 인간화된 랫트 유전자 좌위는 세균 상동성 재조합(BHR)을 통해 랫트 핵산의 표적 유전자 좌위를 변형시킴에 의해 제조된다. 상기 방법은 5' 랫트 상동성 아암 및 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터를 원핵 세포로 도입함을 포함하고, 상기 삽입 핵산은 인간 핵산 서열을 포함하고, 원핵 세포는 랫트 핵산을 포함하고 표적 유전자 좌위에서 BHR을 매개하는 리컴비나제를 발현할 수 있다.

[0265] 인간화된 랫트 게놈 유전자 좌위는 (a) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열의 삽입체; (b) 내인 랫트 핵산 서열의 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열로의 치환물 또는 (c) 이의 조합체를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 인간화된 랫트 게놈 유전자 좌위는 생식선을 통해 전달될 수 있다. 여전히 다른 구현예에서, 인간 이종상동성 서열은 랫트에서 발견되는 상응하는 서열을 치환한다.

[0266] 임의의 인간 핵산 서열은 본원에 제공된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 방법 및 조성물에 사용될 수 있는 인간 핵산 서열의 비제한적인 예는 본원에 기타 다른 곳에서 상세히 논의된 바와 같다.

[0267] 목적하는 랫트 유전자 좌위로의 삽입을 위한 인간 핵산 서열은 임의의 크기일 수 있다. 하나의 구현예에서, 인간 핵산 서열은 약 500 뉴클레오타이드 내지 약 200 kb, 약 500 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. 특정 구현예에서, 인간 핵산 서열은 적어도 5 kb이다.

[0268] 하나의 구현예에서, 랫트 게놈 유전자 좌위가 제공되고, 여기서, 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열은 (a) 포유동물 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된, 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 V_H 유전자 절편, 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 D 유전자 절편, 및 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 J_H 유전자 절편; (b) 포유동물 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열; (c) 포유동물 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 $V_κ$ 또는 $V_λ$ 유전자 절편 및 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 $J_κ$ 또는 $J_λ$ 유전자 절편; 또는 (d) 포유동물 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 재배열된 인간 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 핵산 서열을 포함한다.

[0269] 또 다른 구현예에서, 랫트 게놈 유전자 좌위가 제공되고, 여기서, (a) 포유동물 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열은 랫트 불변 영역 핵산 서열, 인간 불변 영역 핵산 서열, 또는 이의 조합이거나 (b) 포유동물 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 불변 영역 핵산 서열은 랫트 불변 영역 핵산 서열, 인간 불변 영역 핵산 서열 또는 이의 조합이다.

[0270] 특정 구현예에서, 랫트 게놈 유전자 좌위가 제공되고, 여기서, 상기 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열은 CH1, 힌지, CH2, CH3, 및/또는 이의 조합으로부터 선택되거나 이를 포함한다.

[0271] 하나의 구현예에서, 랫트 게놈 유전자 좌위는 V_H1-2, V_H1-3, V_H1-8, V_H1-18, V_H1-24, V_H1-45, V_H1-46, V_H1-58, V_H1-69, V_H2-5, V_H2-26, V_H2-70, V_H3-7, V_H3-9, V_H3-11, V_H3-13, V_H3-15, V_H3-16, V_H3-20, V_H3-21, V_H3-23, V_H3-30, V_H3-30-3, V_H 3-30-5, V_H3-33, V_H3-35, V_H3-38, V_H3-43, V_H3-48, V_H3-49, V_H3-53, V_H3-64, V_H3-66, V_H3-72, V_H3-73, V_H3-74, V_H4-4, V_H4-28, V_H4-30-1, V_H4-30-2, V_H4-30-4, V_H4-31, V_H4-34, V_H4-39, V_H4-59, V_H4-61, V_H5-51, V_H6-1, V_H7-4-1, V_H7-81, 또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 기능성 인간 V_H 유전자 절편을 포함한다.

[0272] 하나의 구현예에서, 랫트 게놈 유전자 좌위는 D1-1, D1-7, D1-14, D1-20, D1-26, D2-2, D2-8, D2-15, D2-21, D3-3, D3-9, D3-10, D3-16, D3-22, D4-4, D4-11, D4-17, D4-23, D5-12, D5-5, D5-18, D5-24, D6-6, D6-13, D6-19, D6-25, D7-27, 또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 기능성 인간 D 유전자 절편을 포함한다.

[0273] 하나의 구현예에서, 랫트 게놈 유전자 좌위는 J_H1, J_H2, J_H3, J_H4, J_H5, J_H6, 및/또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 기능성 J_H 유전자 절편을 포함한다. 하나의 구현예에서, 삽입 핵산은 Vκ4-1, Vκ5-2, Vκ 7-3, Vκ 2-4, Vκ1-5, Vκ1-6, Vκ3-7, Vκ1-8, Vκ1-9, Vκ2-10, Vκ3-11, Vκ1-12, Vκ1-13, Vκ2-14, Vκ3-15, Vκ1-16, Vκ1-17, Vκ2-18, Vκ2-19, Vκ3-20, Vκ6-21, Vκ1-22, Vκ1-23, Vκ2-24, Vκ3-25, Vκ2-26, Vκ1-27, Vκ2-28, Vκ2-29, Vκ2-30, Vκ3-31, Vκ1-32, Vκ1-33, Vκ3-34, Vκ1-35, Vκ2-36, Vκ1-37, Vκ2-38, Vκ1-39, Vκ2-40, 또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 인간 Vκ 유전자 절편을 포함한다.

[0274] 하나의 구현예에서, 랫트 게놈 유전자 좌위는 Vλ3-1, Vλ4-3, Vλ2-8, Vλ3-9, Vλ3-10, Vλ2-11, Vλ3-12, Vλ2-14, Vλ3-16, Vλ2-18, Vλ3-19, Vλ3-21, Vλ3-22, Vλ2-23, Vλ3-25, Vλ3-27, 또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 Vλ 유전자 절편을 포함한다.

[0275] 하나의 구현예에서, 랫트 게놈 유전자 좌위는 Jκ1, Jκ2, Jκ3, Jκ4, Jκ5, 또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 인간 Jκ 유전자 절편을 포함한다.

[0276] 또 다른 구현예에서, 랫트 게놈 유전자 좌위는 인간 인터류킨-2 수용체 (IL2R) 핵산 서열을 포함하는 인간화된 게놈 유전자 좌위를 포함하거나 이의 변이체 또는 단편이 제공된다. 특정 구현예에서, IL2R 핵산 서열은 인터류킨-2 수용체 알파, 인터류킨-2 수용체 베타, 또는 인터류킨-2 수용체 감마 핵산 서열 또는 이의 변이체 또는 단편을 포함한다.

[0277] 추가의 구현예에서, 랫트 게놈 유전자 좌위는 랫트 ApoE 유전자 좌위, 랫트 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위, 랫트 Rag2 유전자 좌위, 랫트 Rag1 유전자 좌위 및/또는 랫트 Rag2/Rag1 유전자 좌위의 상응하는 상동성 또는 이종상동성 부분을 치환하는 인간 ApoE 유전자 좌위, 인간 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위, 인간 Rag2

유전자 좌위, 인간 Rag1 유전자 좌위 및/또는 인간 Rag2/Rag1 유전자 좌위 부분을 포함하는 인간화된 게놈 유전자 좌위를 포함한다. 하나의 구현예에서, IL-2Rg의 랫트 엑토-도메인은 랫트로부터 기원하는 분자의 나머지 부분과 함께 인간 IL-2Rg의 엑토-도메인으로 치환한다.

[0278] 또 다른 구현예에서, 인간화된 게놈 유전자 좌위를 포함하는 유전학적으로 변형된 랫트가 제공된다. 상기 유전학적으로 변형된 랫트는 (a) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열의 삽입체; (b) 내인성 게놈 유전자 좌위에서 랫트 핵산 서열의 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열로의 치환물; 또는 (c) 이의 조합체를 포함하고, 여기서, 상기 인간화된 게놈 유전자 좌위는 생식선을 통해 전달될 수 있다.

[0279] 본원에 제공되고 상기된 임의의 다양한 인간화된 게놈 유전자 좌위를 포함하는 유전학적으로 변형된 랫트가 또한 제공된다.

[0280] 4. 목적하는 폴리뉴클레오타이드

[0281] 목적하는 임의의 폴리뉴클레오타이드는 다양한 삽입 핵산에 함유될 수 있고 이에 의해 표적 유전자 좌위에 통합된다. 본원에 기재된 방법은 표적화된 게놈 유전자 좌위로 통합될 목적하는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0282] 표적 게놈 유전자 좌위에 통합되는 경우 삽입 핵산내 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 유전학적 변형을 세포로 도입할 수 있다. 유전학적 변형은 내인성 핵산 서열의 결실 및/또는 외인성 또는 이종성 또는 이종상동성 폴리뉴클레오타이드의 표적 게놈 유전자 좌위로의 첨가를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 표적 게놈 유전자 좌위에서 내인성 핵산 서열의 목적하는 외인성 폴리뉴클레오타이드로의 치환물을 포함한다. 따라서, 본원에 제공된 방법은 녹아웃, 결실, 삽입, 치환 ("녹-인"), 점 돌연변이, 도메인 스왑, 엑손 스왑, 인트론 스왑, 조절 서열 스왑, 유전자 스왑 또는 이의 조합을 포함하는 유전학적 변형의 생성을 가능하게 한다. 상기 변형은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 또는 임의의 후속적인 삽입 핵산의 표적 게놈 유전자 좌위로의 통합시 일어날 수 있다.

[0283] 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에서 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 이것이 도입되는 세포에 고유한 서열을 포함할 수 있거나; 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 이것이 도입될 세포에 이종성일 수 있거나; 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 이것이 도입될 세포에 외인성일 수 있거나; 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 이것이 도입될 세포에 이종상동성이거나; 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 이것이 도입될 세포 이외의 상이한 종으로부터 기원할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 표적 유전자 좌위에 삽입된 서열을 언급할때 "고유한"은 표적 유전자 좌위를 갖는 세포에 고유하거나 표적 유전자 좌위가 유래된(즉, 랫트로부터 유래된) 세포에 고유한 서열이다. 본원에 사용된 바와 같이, 서열을 언급할때 "이종성"은 외래 종으로부터 기원하거나, 동일한 종으로부터 기원하는 경우, 의도적인 인간 중재에 의해 조성 및/또는 게놈 유전자 좌위에서 이의 고유 형태와는 실질적으로 상이하거나 변형된 서열을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 서열을 언급할때 "외인성"은 외래 종으로부터 기원하는 서열이다. 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 비-인간, 설치류, 햄스터, 마우스, 랫트, 인간, 몽키, 농업용 포유동물 또는 비-농업용 포유동물을 포함하지만 이에 제한되지 않는 목적하는 임의의 유기체로부터 기원할 수 있다. 목적하는 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 후속적인 삽입 핵산은 상기 서열을 포함할 수 있다.

[0284] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 마우스 핵산 서열, 인간 핵산, 비인간 핵산, 설치류 핵산, 랫트 핵산, 햄스터 핵산, 몽키 핵산, 농업용 포유동물 핵산 또는 비-농업용 포유동물 핵산에 고유하다. 여전히 추가의 구현예에서, 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 게놈 핵산의 단편이다. 하나의 구현예에서, 게놈 핵산은 마우스 게놈 핵산, 인간 게놈 핵산, 비인간 핵산, 설치류 핵산, 랫트 핵산, 햄스터 핵산, 몽키 핵산, 농업용 포유동물 핵산 또는 비농업용 포유동물 핵산 또는 이의 조합이다.

[0285] 하나의 구현예에서, 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 상기된 바와 같이 약 500 뉴클레오타이드 내지 약 200kb일 수 있다. 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 약 500 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 200kb, 약 5kb 내지 약

10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb일 수 있다.

[0286] 삽입 핵산내 및/또는 표적 게놈 유전자 좌위에 삽입되는 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 폴리펩타이드를 암호화할 수 있거나 miRNA를 암호화할 수 있거나, 이것은 예를 들어, 조절 서열, 프로모터 서열, 인핸서 서열, 전사 리프레서-결합 서열 또는 비단백질 암호화 서열을 포함하는 임의의 조절 영역 또는 목적하는 비암호화 영역을 포함할 수 있지만 단백질 암호화 서열의 결실을 포함하지 않는다. 추가로, 삽입 핵산내 및/또는 표적 게놈 유전자 좌위에 삽입된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 신경계, 골격계, 소화계, 순환계, 근육계, 호흡계, 심혈관계, 림프계, 내분비계, 비뇨계, 생식계 또는 이의 조합에서 발현되는 단백질을 암호화할 수 있다. 하나의 구현예에서, 삽입 핵산내 및/또는 표적 게놈 유전자 좌위에 삽입된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 골수 또는 골수 유래 세포에서 발현된 단백질을 암호화한다. 하나의 구현예에서, 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에서 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 비장 세포에서 발현되는 단백질을 암호화한다. 여전히 추가의 구현예에서, 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 B 세포에서 발현된 단백질을 암호화하거나, 미성숙 B 세포에서 발현된 단백질을 암호화하거나, 성숙 B 세포에서 발현된 단백질을 암호화한다.

[0287] 삽입 폴리뉴클레오타이드내 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 ApoE 유전자 좌위, IL-2-Rg 유전자 좌위, Rag1 유전자 좌위, Rag2 유전자 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 유전자 좌위의 일부를 포함할 수 있다. 사용될 수 있는 목적하는 임의의 유기체 기원의 다양한 상동성 및 이종상동성 영역으로서 상기 이들 소정의 유전자 좌위 부분은 본원에서 기타 다른 곳에서 논의된다.

[0288] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 암호화하는 게놈 핵산 서열을 포함한다. 용어 "중쇄" 또는 "면역글로불린 중쇄"는 본원에서 기타 다른 곳에 기재되어 있다.

[0289] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역 아미노산 서열을 암호화하는 게놈 핵산 서열을 포함한다.

[0290] 하나의 구현예에서, 게놈 핵산 서열은 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 V_H 유전자 절편, 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 D 유전자 절편, 및 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 J_H 유전자 절편들을 포함하고 이들은 포유동물 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결되어 있다. 하나의 구현예에서, 게놈 핵산 서열은 포유동물 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 비재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 상기 게놈 핵산 서열은 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 V_κ 또는 V_λ 유전자 절편 및 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 J_κ 또는 J_λ 유전자 절편을 포함하고, 이들은 포유동물 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결되어 있다. 하나의 구현예에서, 게놈 핵산 서열은 포유동물 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 비재배열된 인간 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 핵산 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 상기 중쇄 불변 영역 핵산 서열은 랫트 불변 영역 핵산 서열, 인간 불변 영역 핵산 서열 또는 이의 조합을 포함한다. 하나의 구현예에서, 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 불변 영역 핵산 서열은 랫트 불변 영역 핵산 서열, 인간 불변 영역 핵산 서열 또는 이의 조합을 포함한다.

[0291] 하나의 구현예에서, 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열은 CH1, 힌지, CH2, CH3, 및/또는 이의 조합으로부터 선택되거나 이들을 포함한다. 하나의 구현예에서, 중쇄 불변 영역 핵산 서열은 CH1-힌지-CH2-CH3을 포함한다.

[0292] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 면역글로불린 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 암호화하는 게놈 핵산 서열을 포함한다. 용어 "경쇄"는 임의의 유기체 기원의 면역글로불린 경쇄 서열을 포함하고 본원에서 기타 다른 곳에 기재되어 있다.

[0293] 하나의 구현예에서, 삽입 핵산내 및/또는 표적 게놈 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역 아미노산 서열을 암호화하는 게놈 핵산 서열을 포함한다.

[0294] 하나의 구현예에서, 게놈 핵산 서열은 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 V_κ 또는 V_λ 유전자 절편 및 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 J_κ 또는 J_λ 유전자 절편을 포함하고, 이들은 설치류 면역글로불린

λ 또는 κ 경쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결되어 있다. 하나의 구현예에서, 상기 게놈 핵산 서열은 설치류 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 비재배열된 인간 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 가변 영역 핵산 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 경쇄 불변 영역 핵산 서열은 랫트 불변 영역 핵산 서열, 인간 불변 영역 핵산 서열 또는 이의 조합을 포함한다. 하나의 구현예에서, 면역글로불린 λ 또는 κ 경쇄 불변 영역 핵산 서열은 랫트 불변 영역 핵산 서열, 인간 불변 영역 핵산 서열 또는 이의 조합을 포함한다.

[0295] 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 세포외 단백질 또는 수용체에 대한 리간드를 암호화할 수 있다. 특정 구현예에서, 암호화된 리간드는 사이토킨이다. 목적하는 사이토킨은 CCL, CXCL, CX3CL, 및/또는 XCL로부터 선택되거나 이들을 포함하는 케모킨을 포함한다. 사이토킨은 또한 종양 괴사 인자 (TNF)를 포함할 수 있다. 여전히 다른 구현예에서, 사이토킨은 인터류킨 (IL)이다. 하나의 구현예에서, 인터류킨은 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, IL-33, IL-34, IL-35, 및/또는 IL-36으로부터 선택되거나 이들을 포함한다. 하나의 구현예에서, 인터류킨은 IL-2이다. 특정 구현예에서, 삽입 핵산내 및/또는 표적 게놈 유전자 좌위에 통합된 목적하는 상기 폴리뉴클레오타이드는 인간 기원이고 보다 구체적인 구현예에서, 인간 게놈 서열을 포함할 수 있다.

[0296] 삽입 핵산내 및/또는 표적 게놈 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 아포지단백질(ApoE)를 암호화할 수 있다.

[0297] 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 세포질 단백질 또는 막 단백질을 암호화할 수 있다. 하나의 구현예에서, 막 단백질은 사이토킨 수용체, 인터류킨 수용체, 인터류킨 2 수용체-알파, 인터류킨-2 수용체 베타, 인터류킨-2 수용체 감마 또는 수용체 티로신 키나제와 같은 수용체이다. 다른 경우에, 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 표적 유전자 좌위의 이종상동성 또는 상동성 영역을 포함할 수 있다.

[0298] 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 T 세포 수용체 알파를 포함하는 T 세포 수용체의 적어도 특정 영역을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 특정 방법에서, 삽입 핵산 각각은 T 세포 수용체 유전자 좌위(즉, T 세포 수용체 알파 유전자 좌위)의 게놈 영역을 포함하여 연속 통합의 완료시 게놈 T 세포 수용체 유전자 좌위의 일부 또는 전체는 표적 유전자 좌위에 통합된다. 상기 삽입 핵산은 T 세포 수용체 유전자 좌위(즉, T 세포 수용체 알파 유전자 좌위)의 가변 분절 또는 연결 분절 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다. 여전히 추가의 구현예에서, T 세포 수용체의 영역을 암호화하는 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어, 돌연변이 단백질을 암호하하는 포유동물, 비-인간 포유동물, 설치류, 마우스, 랫트, 인간, 몽키, 농업용 포유동물 또는 가축 포유동물 폴리뉴클레오타이드로부터 기원할 수 있다.

[0299] 다른 구현예에서, 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 핵 단백질을 암호화한다. 하나의 구현예에서, 핵 단백질은 핵 수용체이다. 특정 구현예에서, 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 상기 폴리뉴클레오타이드는 인간 기원일 수 있고, 보다 특정 구현예에서 인간 게놈 서열을 포함할 수 있다.

[0300] 삽입 핵산내 및/또는 표적 게놈 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 암호화 서열에서 유전학적 변형을 포함할 수 있다. 상기 유전학적 변형은 암호화 서열의 결실 돌연변이 또는 2개의 암호화 서열의 융합을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0301] 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어, 인간 돌연변이 단백질을 포함하는 돌연변이 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 하나의 구현예에서, 돌연변이체 단백질은 변화된 결합 특성, 변화된 위치화, 변화된 발현 및/또는 변화된 발현 패턴을 특징으로 한다. 하나의 구현예에서, 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어, 신경학적 질환의 대립형질유전자, 심혈관 질환의 대립형질 유전자, 신장 질환의 대립형질유전자, 근육 질환의 대립형질유전자, 혈액 질환의 대립형질유전자, 발암 유전자의 대립형질유전자 또는 면역계 질환의 대립형질유전자를 포함하는, 하나 이상의 질환 대립형질유전자를 포함한다. 상기 경우에, 상기 질환 대립형질유전자는 우성 대립형질유전자일 수 있거나 질환 대립형질유전자는 열성 대립형질유전자이다. 더욱이, 질환 대립형질유전자는 단일 뉴클레오타이드 다형성(SNP) 대립형질유전자를 포함할 수 있다. 돌연변이 단백질을 암호화하는 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 돌연변이 단백질을 암호화하는 포유동물, 비인간 포유동물, 설치류, 마우스, 랫트,

인간, 몽키, 농업용 포유동물 또는 가축 포유동물을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 임의의 유기체로부터 기원할 수 있다.

[0302] 하나의 구현예에서, 상기 유전학적 변형은 변화된 결합 특성, 변화된 위치화, 변화된 발현 및/또는 변화된 발현 패턴을 갖는 돌연변이 형태의 단백질을 생성한다.

[0303] 하나의 구현예에서, 상기 유전학적 변형은 랫트 ApoE 유전자 좌위의 영역의 결실, 첨가, 치환 또는 이의 조합을 생성하고, 여기서, ApoE 유전자 좌위에서 유전학적 변형은 ApoE 활성을 감소시킨다. 하나의 구현예에서, ApoE 녹아웃이 생성된다.

[0304] 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 랫트 Rag1 유전자 좌위의 영역의 결실, 첨가, 치환 또는 이의 조합을 생성하고, 여기서, Rag1 유전자 좌위에서 유전학적 변형은 Rag1 활성을 감소시킨다. 하나의 구현예에서, Rag1 녹아웃이 생성된다. 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 랫트 Rag2 유전자 좌위의 영역의 결실, 첨가, 치환 또는 이의 조합을 생성하고, 여기서, Rag2 유전자 좌위에서 유전학적 변형은 Rag2 활성을 감소시킨다. 하나의 구현예에서, Rag2 녹아웃이 생성된다. 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 랫트 Rag1/Rag2 유전자 좌위의 영역의 결실, 첨가, 치환 또는 이의 조합을 생성하고, 여기서, Rag1/Rag2 유전자 좌위에서 유전학적 변형은 Rag1 활성을 감소시키고 Rag2 활성을 감소시킨다. 하나의 구현예에서, Rag1/Rag2 녹아웃이 생성된다.

[0305] 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 랫트 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위의 영역의 결실, 첨가, 치환 또는 이의 조합을 생성하고, 여기서, 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위에서 유전학적 변형은 인터류킨-2 수용체 감마를 감소시킨다. 하나의 구현예에서, 인터류킨-2 수용체 감마 놋아웃이 생성된다.

[0306] 본원의 기타 다른 곳에서 논의된바와 같이, 본원에 제공된 추가의 구현예는 랫트 ApoE 유전자 좌위, 랫트 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위, Rag2 유전자 좌위, Rag1 유전자 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 유전자 좌위 중 하나 이상이 랫트 ApoE 유전자 좌위, 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위, Rag2 유전자 좌위, Rag1 유전자 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 유전자 좌위의 일부가 또 다른 유기체 기원의 ApoE 유전자 좌위, 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위, Rag2 유전자 좌위, Rag1 유전자 좌위 및/또는 Rag2/Rag1 유전자 좌위의 상응하는 이종상동성 부분으로의 치환를 통해 변형된 것을 포함한다.

[0307] 하나의 구현예에서, 다중 유전학적 변형이 생성된다. 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 랫트 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위의 영역의 결실, 첨가, 치환 또는 이의 조합을 포함하고, 인터류킨-2 수용체 감마 유전자 좌위에서 유전학적 변형이 인터류킨-2 수용체 감마를 감소시키고, 제2 유전학적 변형은 랫트 Rag2 유전자 좌위의 영역의 결실, 첨가, 치환 또는 이의 조합을 생성하고, Rag2 유전자 좌위에서 유전학적 변형은 Rag2 활성을 감소시킨다. 하나의 구현예에서, 인터류킨-2 수용체 감마/Rag2 녹아웃이 생성된다. 상기 랫트는 SCID 표현형을 갖는다.

[0308] 하나의 구현예에서, 포유동물 핵산은 신경계, 골격계, 소화계, 순환계, 근육계, 호흡계, 심혈관계, 림프계, 내분비계, 비뇨계, 생식계 또는 이의 조합에서 발현되는 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위를 포함한다. 하나의 구현예에서, 포유동물 핵산은 골수 또는 골수 유래 세포에서 발현된 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위를 포함한다. 하나의 구현예에서, 핵산은 비장 세포에서 발현되는 단백질을 암호화하는 게놈 유전자 좌위를 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 마우스 게놈 DNA 서열, 랫트 게놈 DNA 서열, 인간 게놈 DNA 서열 또는 이의 조합을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 임의의 순서로 랫트 및 인간 게놈 DNA 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 임의의 순서로 마우스 및 인간 게놈 DNA 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 임의의 순서로 마우스 및 랫트 게놈 DNA 서열을 포함한다. 하나의 구현예에서, 게놈 유전자 좌위는 임의의 순서로 랫트, 마우스 및 인간 게놈 DNA 서열을 포함한다.

[0309] 하나의 구현예에서, 상기 삽입 핵산은 유전자의 암호화 서열에서 유전학적 변형을 포함한다. 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 암호화 서열에서 결실 돌연변이를 포함한다. 하나의 구현예에서, 상기 유전학적 변형은 2개의 내인성 암호화 서열의 융합을 포함한다.

[0310] 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 비단백질 암호화 서열의 결실을 포함하지만 단백질 암호화 서열의 결실을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, 비단백질 암호화 서열의 결실은 조절 요소의 결실을 포함한다. 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 프로모터의 첨가를 포함한다. 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 프로모터 또는 조절 요소의 치환를 포함한다. 하나의 구현예에서, 조절 요소는 인핸서이다. 하나의 구현예에서, 조절 요소는 전사 리프레서-결합 요소이다.

[0311] 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 돌연변이 인간 단백질을 암호화하는 인간 핵산 서열의 치환를 포함한다.

하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 인간 유전자의 하나 이상의 인간 질환 대립형질유전자를 포함한다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 신경학적 질환이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 심혈관 질환이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 신장 질환이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 근육 질환이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 혈액 질환이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 암이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환은 면역계 질환이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환 대립형질유전자는 우성 대립형질유전자이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환 대립형질유전자는 열성 대립형질유전자이다. 하나의 구현예에서, 인간 질환 대립형질유전자는 단일 뉴클레오타이드 다형(SNP) 대립형질유 전자를 포함한다.

[0312] 삽입 핵산내 및/또는 표적 유전자 좌위에 통합된 목저하는 폴리뉴클레오타이드는 또한, 예를 들어, 프로모터 서열, 인핸서 서열 또는 전사 리프레서 결합 서열을 포함하는 조절 서열을 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 삽입 핵산내 및/또는 표적 게놈 유전자 좌위에 통합된 목적하는 폴리뉴클레오타이드는 비단백질 암호화 서열의 결실을 갖는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지만 단백질 암호화 서열의 결실을 포함하지 않는다. 하나의 구현예에서, 비단백질 암호하 서열의 결실은 조절 서열의 결실을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 조절 요소의 결실은 프로모터 서열의 결실을 포함한다. 하나의 구현예에서, 조절 요소의 결실은 인핸서 서열의 결실을 포함한다. 목적하는 상기 폴리뉴클레오타이드는 돌연변이 단백질을 암호화하는 포유동물, 비인간 포유동물, 설치류, 마우스, 랫트, 인간, 몽키, 농업용 포유동물 또는 가축용 포유동물 폴리뉴클레오타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 유기체로부터 기원할 수 있다.

[0313] 5. 유전자전이 동물의 서열 및 생성을 도입하는 방법

[0314] 상기된 바와 같이, 표적 유전자 좌위로 목적하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드의 표적화된 통합을 가능하게 하는 방법 및 조성물이 제공된다. 상기 시스템은 다양한 성분을 사용하고 참조를 용이하게 위해, 본원에서 용어 "표적화된 통합 시스템"은 유전학적으로 통합 반응을 위해 요구되는 모든 성분들(즉, 비제한적인 예에서, 다양한 뉴클레아제 제제, 인지 부위, 삽입 DNA 폴리뉴클레오타이드, 표적화 벡터, 표적 게놈 유전자 좌위 및/또는 목적하는 폴리뉴클레오타이드)을 포함한다.

[0315] 본원에 제공된 방법은 표적화된 게놈 통합 시스템의 다양한 성분들을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 작제물을 세포로 도입함을 포함한다. "도입하는"은 서열이 세포 내부로의 접근을 얻는 방식으로 서열(폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드)을 세포에 제공함을 의미한다. 본원에 제공된 방법은 단지 폴리뉴클레오타이드가 하나 이상의 세포에 근접하도록 표적화된 게놈 통합 시스템의 임의의 성분을 세포에 도입하기 위한 특정 방법에 의존하지 않는다. 폴리뉴클레오타이드를 다양한 세포 유형에 도입하기 위한 방법은 당업계에 공지되어 있고 안정한 형질감염 방법, 일시적 형질감염 방법 및 바이러스 매개된 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0316] 일부 구현예에서, 방법 및 조성물에 사용된 세포는 이들의 게놈으로 안정하게 혼입된 DNA 작제물을 갖는다. "안정하게 혼입된" 또는 "안정하게 도입된"은 상기 뉴클레오타이드 서열이 세포의 게놈에 통합되어 이의 후손으로 유전될 수 있도록 세포에 폴리뉴클레오타이드가 도입됨을 의미한다. 임의의 프로토콜은 DNA 작제물 또는 표적화된 게놈 통합 시스템의 다양한 성분들의 안정한 혼입을 위해 사용될 수 있다.

[0317] 형질감염 프로토콜, 및 폴리펩타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 서열의 세포로의 도입을 위한 프로토콜은 다양할 수 있다. 비제한적인 형질감염 방법은 화학적 기반 형질감염 방법을 포함하고 리포좀, 나노입자, 인산칼슘 의 용도를 포함한다(문헌참조: Graham 등 (1973). Virology 52 (2): 456-67, Bacchetti 등 (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 폴리머, 예컨대 DEAE-텍스트란 또는 폴리에틸렌이민). 비화학적 방법은 전기천공; 음향-천공; 및 광학적 형질감염을 포함한다. 입자-기반 형질감염은 유전자 총, 자기 원조 형질감염의 사용을 포함한다 (문헌참조: Bertram, J. (2006) Current Pharmaceutical Biotechnology 7, 277-28). 바이러스 방법은 또한 형질감염을 위해 사용될 수 있다.

[0318] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 세포로 도입하는 것은 전기천공에 의해, 세포질내 주사에 의해, 바이러스 감염에 의해, 아데노바이러스에 의해, 렌티바이러스에 의해, 레트로바이러스에 의해, 형질감염에 의해, 지질 매개된 형질감염에 의해 매개되거나 Nucleofection™에 의해 매개된다.

[0319] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드의 세포로의 도입은: 프로모터에 작동가능하게 연결된 목적하는 핵산 서열을 포함하는 발현 작제물을 도입함을 추가로 포함한다. 하나의 구현예에서, 프로모터는 항상성 활성 프로모터이다. 하나의 구현예에서, 상기 프로모터는 유도성 프로모터이다. 하나의 구현예에서, 프로모터는

랫트 배아 줄기 세포에서 활성이다.

[0320] 하나의 구현예에서, 발현 작제물은 LTVEC와 함께 도입된다. 하나의 구현예에서, 발현 작제물은 일정 기간 동안 LTVEC와는 별도로 도입된다.

[0321] 하나의 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드의 세포로의 도입은 일정 기간 동안 수회 수행될 수 있다. 하나의 구현예에서, 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드의 세포로의 도입은 일정 기간 동안 2회 이상, 일정 기간 동안 3회 이상, 일정 기간 동안 4회 이상, 일정 기간 동안 5회 이상, 일정 기간 동안 6회 이상, 일정 기간 동안 7회 이상, 일정 기간 동안 8회 이상, 일정 기간 동안 9회 이상, 일정 기간 동안 10회 이상, 11회 이상, 일정 기간 동안 12회 이상, 일정 기간 동안 13회 이상, 일정 기간 동안 14회 이상, 일정 기간 동안 15회 이상, 일정 기간 동안 16회 이상, 일정 기간 동안 17회 이상, 일정 기간 동안 18회 이상, 일정 기간 동안 19회 이상, 또는 일정 기간 동안 20회 이상 수행된다.

[0322] 하나의 구현예에서, 뉴클레아제 제제는 표적화 벡터 또는 대형 표적화 벡터(LTVEC)와 동시에 세포로 도입된다. 대안적으로, 뉴클레아제 제제는 일정 기간 동안 표적화 벡터 또는 LTVEC와는 별도로 도입된다. 하나의 구현예에서, 뉴클레아제 제제는 표적화 벡터 또는 LTVEC의 도입전에 도입되고, 다른 구현예에서, 뉴클레아제 제제는 표적화 벡터 또는 LTVEC의 도입 후 도입된다.

[0323] 하나의 양태에서, 스크리닝 단계는 모 염색체의 대립형질유전자(MOA)의 변형을 평가하기 위한 정량적 검정을 포함한다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 정량적 PCR을 통해 수행된다. 하나의 구현예에서, 정량적 PCR은 실시간 PCR (qPCR)이다. 하나의 구현예에서, 실시간 PCR은 표적 유전자 좌위를 인지하는 제1 프라이머 세트 및 비-표적화된 표준 유전자 좌위를 인지하는 제2 프라이머 세트를 포함한다. 하나의 구현예에서, 제1 프라이머 세트는 증폭된 서열을 인지하는 형광성 프로브를 포함한다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 형광성 매개된 동일계 하이브리드화(FISH)를 통해 수행된다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 경쟁 게놈 하이브리드화를 통해 수행된다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 등온선 DNA 증폭을 통해 수행된다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 등온선 DNA 증폭을 통해 수행된다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 면역화된 프로브(들)에 대한 정량적 하이브리드화를 통해 수행된다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 Invader Probes®를 통해 수행된다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 MMP assays®을 통해 수행된다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 TaqMan® Molecular Beacon을 통해 수행된다. 하나의 구현예에서, 정량적 검정은 Eclipse™ 프로브 기술을 통해 수행된다. (문헌참조: 예를 들어, US2005/0144655, 이의 전문이 본원에 참조로서 인용된다).

[0324] 인간화된 랫트를 제조하기 위한 방법이 추가로 제공되고, 상기 방법은: (a) 공여자 세포를 형성하기 위해 인간 핵산 서열을 포함하는 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터로 만능 랫트 세포의 게놈을 변형시키는 단계; (b) 공여자 세포를 숙주 랫트 배아로 도입하는 단계; 및 (c) 숙주 랫트 배아를, 인간 핵산 서열을 포함하는 랫트 후손을 생성하는 대리모에 잉태시킴을 포함한다. 하나의 구현예에서, 공여자 세포는 낭포 단계에서 또는 전-상실포배 단계(즉, 4개 세포 단계 또는 8개 세포 단계)에 있는 숙주 랫트 배아로 도입된다. 더욱이, 단계 (a)는 또한 대형 표적화 벡터 (LTVEC) 및/또는 적어도 5kb 길이의 인간 핵산 서열과 함께 수행될 수 있다. 여전히 추가의 구현예에서, 유전학적 변형은 생식선을 통해 전달될 수 있다.

[0325] 유전학적으로 변형된 랫트는 본원에 기재된 다양한 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 상기 방법은 (1) 본원에 기재된 방법을 사용하는 표적화된 게놈 유전자 좌위에서 삽입 핵산을 포함하는 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포를 생성하기 위해 만능 랫트 세포의 표적 유전자 좌위에 목적하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 통합시키고; (2) 표적 게놈 유전자 좌위에서 목적하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 갖는 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포를 선택하고; (3) 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포를 랫트 숙주 배아에 도입하는고; (4) 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포를 포함하는 숙주 랫트 배아를 대리모에 이식시킴을 포함한다. 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포로부터의 후손이 생성된다. 하나의 구현예에서, 공여자 세포는 낭포 단계에서 또는 전-상실포배 단계(즉, 4개의 세포 단계 또는 8개 세포 단계)에서 랫트 숙주 배아로 도입된다. 생식선을 통해 유전학적 변형을 전달할 수 있는 후손이 생성된다. 만능 랫트 세포는 본원에 기타 다른 곳에 논의된 바와 같은 랫트 ES 세포일 수 있다.

[0326] 핵 전달 기술은 또한 유전학적으로 변형된 랫트를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 간략하게, 핵 전달을 위한 방법은: (1) 난모세포를 적출하는 단계; (2) 적출된 난모 세포와 조합될 공여자 세포 또는 핵을 분리하는 단계; (3) 세포 또는 핵을 적출된 난모세포에 삽입하여 재구성된 세포를 형성하는 단계; (4) 재구성된 세포를 동물의 자궁으로 이식시켜 배아를 형성하는 단계; 및 (5) 배아가 발육하도록 하는 단계를 포함한다. 상기 방법에서, 난모세포는 생존 동물의 난관 및/또는 난소로부터 분리될 수 있지만, 난모 세포는 일반적으로 사망한 동물로부터

회수된다. 난모세포는 적출 전에 당업자에게 공지된 다양한 배지에서 성숙화시킬 수 있다. 난모세포의 적출은 당업자에게 널리 공지된 다수의 방식으로 수행될 수 있다. 재구성된 세포를 형성하기 위한 공여자 세포 또는 핵의 적출된 난모세포로의 삽입은 일반적으로 융합 전 투명대하에 공여자 세포의 미세주사에 의해 수행된다. 융합은 접촉/융합 평판(전기융합)에 걸친 DC 전기 펄스의 적용, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 융합-촉진 화학물질로의 세포의 노출 또는 센다이 바이러스와 같은 불활성화된 바이러스에 의해 유도될 수 있다. 재구성된 세포는 전형적으로 핵 공여자 및 수용자 난모세포의 융합 전, 융합 동안에 및/또는 융합 후 전기 및/또는 비-전기 수단에 의해 활성화된다. 활성화 방법은 전기 펄스, 화학적으로 유도된 쇼크, 정자에 의한 침투, 난모세포에서 증가하는 수준의 2가 양이온 및 난모 세포에서 세포 단백질의 감소하는 인산화(키나제 억제제에 의한)를 포함한다. 활성화된 재구성된 세포 또는 배아는 전형적으로 당업자에게 널리 공지된 배지에서 배양하고 이어서 동물의 자궁으로 이전시킨다. 예를 들어, 문헌[US20080092249, WO/1999/005266A2, US20040177390, WO/2008/017234A1, 및 미국 특허 제7,612,250호, 이의 각각은 본원에 참조로 인용된다]을 참조한다.

[0327] 하나의 양상에서, 유전학적으로 변형된 랫트를 제조하기 위한 방법이 제공되고, 상기 방법은 목적하는 랫트 게놈 유전자 좌위에서 변형을 도입하기 위해 엔도뉴클레아제 매개된 유전자 표적화를 사용하여 만능 랫트 세포에서 목적하는 게놈 유전자 좌위를 변형시켜 변형된 만능 랫트 세포를 형성하고, 만능을 유지하기에 충분한 조건하에서 변형된 만능 랫트 세포를 유지하고, 랫트 숙주 배아에서 공여자 세포로서 변형된 만능 랫트 세포를 사용하고 대리모에서 상기 변형된 만능 랫트 세포를 포함하는 숙주 배아를 잉태시킴을 포함하고, 여기서, 숙주 배아는 대리모에 의해 잉태되고 유전학적으로 변형된 랫트 후손이 탄생된다.

[0328] 하나의 구현예에서, 표적 서열은 인트론에 위치한다. 하나의 구현예에서, 표적 서열은 엑손에 위치한다. 하나의 구현예에서, 표적 서열은 프로모터에 위치한다. 하나의 구현예에서, 표적 서열은 프로모터 조절 영역에 위치한다. 하나의 구현예에서, 표적 서열은 인핸서 영역에 위치한다.

[0329] 하나의 구현예에서, 도입 단계는 분명한 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하는 일정 기간 동안 수회 수행한다. 하나의 구현예에서, 단계는 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 2회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 3회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 4회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 5회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 6회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 7회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 8회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 9회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 10회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 11회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 12회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 13회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 14회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 15회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 16회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 17회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 18회 이상, 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 19회 이상, 또는 구분된 표적 서열을 인지하는 다수의 엔도뉴클레아제를 사용하여 일정 기간 동안 20회 이상 수행한다.

[0330] 하나의 구현예에서, 도입 단계는 전기천공, 세포질내 주사, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 형질감염, 지질 매개된 형질감염에 의해 매개되거나 Nucleofection™을 통해 매개된다.

[0331] 하나의 구현예에서, 상기 방법은 외인성 핵산을 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포로 도입함을 추가로 포함한다. 하나의 구현예에서, 외인성 핵산은 전이유전자이다. 하나의 구현예에서, 외인성 핵산은 내인성 유전자 좌위에 도입된다. 하나의 구현예에서, 외인성 핵산은 자궁외적으로 (예를 들어, 이의 내인성 유전자 좌위와는 상이한 유전자 좌위에서) 도입된다.

[0332] 하나의 양상에서, 유전학적으로 변형된 랫트를 제조하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 목적하는 랫트 게놈 유전자 좌위에서 변형을 도입하기 위해 RNA 가이드된 게놈 가공을 사용하여 만능 랫트 세포에서 목적하는 게놈 유전자 좌위를 변형시켜 변형된 만능 랫트 세포를 형성하고, 만능을 유지하기에 충분한 조건하에서 변형된 만능 랫트 세포를 유지시키고, 랫트 숙주 배아에서 공여자 세포로부터 변형된 만능 랫트 세포를 사용하고 대리모에서

상기 변형된 만능 랫트 세포를 포함하는 숙주 배아를 잉태시킴을 포함하고, 여기서, 상기 숙주 배아는 대리모에 의해 잉태되고 유전학적으로 변형된 랫트 후손이 탄생된다.

[0333] 하나의 구현예에서, 상기 방법은 약 2% 내지 약 80% 범위의 표적화율을 갖는다.

[0334] 하나의 구현예에서, 상기 방법은 구분된 게놈 유전자 좌위의 멀티플렉스 에디팅을 위해 구분된 게놈 표적 서열을 포함하는 다수의 제2 발현 작제물을 동시 도입함을 포함한다. 하나의 구현예에서, 상기 방법은 일정 기간 동안 구분된 게놈 유전자 좌위의 멀티플렉스 에디팅을 위해 구분된 게놈 표적 서열을 포함하는 다수의 제2 발현 작제물을 도입함을 포함한다.

[0335] 하나의 구현예에서, 도입 단계는 일정 기간 동안 수회 수행한다. 하나의 구현예에서, 도입 단계 (b)는 일정 기간 동안 2회 이상, 일정 기간 동안 3회 이상, 일정 기간 동안 4회 이상, 일정 기간 동안 5회 이상, 일정 기간 동안 6회 이상, 일정 기간 동안 7회 이상, 일정 기간 동안 8회 이상, 일정 기간 동안 9회 이상, 일정 기간 동안 10회 이상, 일정 기간 동안 11회 이상, 일정 기간 동안 12회 이상, 일정 기간 동안 13회 이상, 일정 기간 동안 14회 이상, 일정 기간 동안 15회 이상, 일정 기간 동안 16회 이상, 일정 기간 동안 17회 이상, 일정 기간 동안 18회 이상, 일정 기간 동안 19회 이상, 일정 기간 동안 20회 이상 수행된다.

[0336] 하나의 구현예에서, 제1 발현 작제물 및 제2 발현 작제물은 동일한 플라스미드로부터 발현된다.

[0337] 하나의 구현예에서, 도입 단계는 전기천공, 세포질내 주사, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 형질감염, 지질 매개된 형질감염에 의해 매개되거나 Nucleofection™을 통해 매개된다.

[0338] 하나의 구현예에서, 상기 방법은 외인성 핵산을 돌연변이 대립형질유전자를 포함하는 만능 랫트 세포에 도입함을 추가로 포함한다.

[0339] 하나의 구현예에서, 외인성 핵산은 전이유전자이다. 하나의 구현예에서, 외인성 핵산은 내인성 유전자 좌위에 도입된다. 하나의 구현예에서, 외인성 핵산은 자궁외적으로(예를 들어, 이의 내인성 유전자 좌위와는 상이한 유전자 좌위에서) 위치시킨다.

[0340] 하나의 구현예에서, 상기 방법은 외인성 핵산을 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포로 도입함을 추가로 포함한다. 하나의 구현예에서, 외인성 핵산은 전이유전자이다. 하나의 구현예에서, 외인성 핵산은 내인성 유전자 좌위에 도입된다. 하나의 구현예에서, 외인성 핵산은 자궁외적으로 (예를 들어, 이의 내인성 유전자 좌위와는 상이한 유전자 좌위에서) 도입된다.

[0341] 하나의 양상에서, 인간화된 랫트를 제조하기 위한 방법이 제공되고, 상기 방법은 적어도 5kb의 인간 서열을 포함하는 삽입체를 포함하는 LTVEC로 만능 랫트 세포의 게놈을 변형시키고, 공여자 세포로서 만능 랫트 세포를 사용하고, 공여자 세포를 숙주 배아에 도입하고 대리모에서 상기 숙주 배아를 잉태시킴을 포함하고, 여기서, 상기 대리모는 인간화를 포함하는 랫트 후손을 출산한다.

[0342] 이의 생식선에 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 유전학적 변형을 포함하는 유전학적으로 변형된 랫트를 제조하기 위한 다른 방법이 제공되고, 상기 방법은: (a) 본원에 기재된 다양한 방법을 사용하여 원핵 세포에 함유된 표적화된 랫트 유전자 좌위를 변형시키고; (b) 표적화된 랫트 유전자 좌위에서 유전학적 변형을 포함하는 변형된 원핵 세포를 선택하고; (c) 변형된 원핵 세포의 게놈으로부터 유전학적으로 변형된 표적화 벡터를 분리하고; (d) 표적화된 게놈 유전자 좌위에서 삽입 핵산을 포함하는 유전학적으로 변형된 만능 세포를 생성하기 위해 유전학적으로 변형된 표적화 벡터를 만능 랫트 세포에 도입하고; (e) 유전학적으로 변형된 랫트 만능 세포를 선택하고; (f) 전-상실포배 단계에서 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포를 숙주 랫트 배아로 도입하고; (g) 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포를 포함하는 숙주 랫트 배아를 유전학적으로 변형된 만능 랫트 세포로부터 유래된 F0 세대를 생성하기 위해 대리모에 이식시킴을 포함한다. 상기 방법에서, 상기 표적화 벡터는 대형 표적화 벡터를 포함할 수 있다. 상기 만능 랫트 세포는 랫트 ES 세포일 수 있다. 추가의 방법에서, 분리 단계 (c)는 (c1) 유전학적으로 변형된 표적화 벡터(즉, 유전학적으로 변형된 LTVEC)를 선형화함을 추가로 포함한다. 여전히 추가의 구현예에서, 도입 단계 (d)는 (d1) 본원에 기재된 바와 같은 뉴클레아제 제제를 만능 랫트 세포로 도입함을 추가로 포함한다. 하나의 구현예에서, 선택 단계 (b) 및/또는 (e)는 본원에 기재된 바와 같은 선택가능한 제제를 원핵 세포 또는 만능 랫트 세포에 적용함에 의해 수행된다. 하나의 구현예에서, 선택 단계 (b) 및/또는 (e)는 본원에 기재된 바와 같은 대립형질유전자의 변형 (MOA) 검정을 통해 수행한다.

[0343] 원핵 세포에서 세균 상동성 재조합(BHR)을 통해 포유동물 세포의 표적 게놈 유전자 좌위를 변형시키기 위한 추가의 방법이 제공되고: (a) 랫트 핵산을 포함하는 표적 유전자 좌위를 포함하는 원핵 세포를 제공하고, (b) 5'

랫트 상동성 아암 및 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 곤충 핵산(여기서, 곤충 핵산은 포유동물 영역(예를 들어, 인간 기원의 DNA 삽입체를 포함한다)을 포함하는 표적화 벡터를 원핵 세포에 도입하고, (c) 표적 랫트 유전자 좌위에 삽입 핵산을 포함하는 표적화된 원핵 세포(여기서, 상기 원핵 세포는 BHR을 매개하는 리컴비나제를 발현할 수 있다)를 선택함을 포함한다. 단계 (a1)은 제1 뉴클레아제 제제에 대한 제1 인지 부위를 포함하는 제1 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 랫트 핵산을 포함하는 표적 유전자 좌위를 포함하는 원핵 세포를 제공함을 포함할 수 있고, 단계 (b1)은 제1 인지 부위에서 또는 이의 근처에서 닉 또는 이중 가닥 절단을 생성하는 뉴클레아제 제제를 원핵 세포에서 발현시킴을 추가로 포함할 수 있다. 단계 (a)-(c)는 본원에 기재된 바와 같이 연속으로 반복하여 원핵 세포에서, 표적화된 랫트 유전자 좌위에서 다중 삽입 핵산의 도입을 가능하게 할 수 있다. 표적화된 게놈 유전자 좌위가 원핵 세포로 "설정"되면, 변형된 표적 랫트 유전자 좌위를 포함하는 표적화 벡터는 원핵 세포로부터 분리될 수 있고 만능 랫트 세포내 표적 게놈 유전자 좌위로 도입될 수 있다. 변형된 게놈 유전자 좌위를 포함하는 만능 랫트 세포 (즉, 랫트 ES 세포)는 이어서 유전학적으로 변형된 랫트로 도입될 수 있다.

[0344] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 표적 게놈 유전자 좌위의 다양한 유전학적 변형은 VELOCIGENE® 유전학적 가공 기술을 사용하는 세균 인공 염색체 (BAC) DNA로부터 유래된 LTVEC를 사용하여 세균 세포에서 일련의 상동성 재조합 반응(BHR)에 의해 수행될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 제 6,586,251호 및 Valenzuela, D. M. 등 (2003), High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotechnology 21(6): 652-659, 이들의 전문이 본원에 참조로서 인용된다).

[0345] 일부 구현예에서, 본원에 기재된 바와 같은 다양한 유전학적 변형을 포함하는 표적화된 랫트 ES 세포는 삽입 ES 세포로서 사용하고, VELOCIMOUSE® 방법 (문헌참조: 예를 들어, US 7,576,259, US 7,659,442, US 7,294,754, 및 US 2008-0078000 A1, 이 모두는 이들의 전문이 본원에 참조로서 인용된다)을 통해 상응하는 유기체 기원의 전-상실포배 단계 배아, 예를 들어, 8-세포 단계 마우스 배아로 도입된다. 유전학적으로 변형된 랫트 ES 세포를 포함하는 상기 랫트 배아는 낭포 단계때까지 배양하고 이어서 대리모에 이식하여 F0을 생성시킨다. 유전학적으로 변형된 게놈 유전자 좌위를 함유하는 랫트는 본원에 기재된 바와 같은 대립형질유전자 변형 (MOA) 검정을 통해 동정될 수 있다. 유전학적으로 변형된 ES 랫트 세포로부터 유래된 수득한 F0 세대는 야생형 랫트에 교배시켜 F1 세대 후손을 수득한다. 특이적 프라이머 및/또는 프로브를 사용한 유전자분류 후, 유전학적으로 변형된 게놈 유전자 좌위에 대해 이종접합성인 F1 랫트를 서로 교배시켜 유전학적으로 변형된 게놈 유전자 좌위에 대해 동종접합성인 랫트를 생성시킨다. 대안적으로, 유전학적 변형 을 갖는 각각의 F0 암컷 랫트 및 F0 수컷 래트를 교배시켜 유전학적 변형에 대해 이종접합성인 F1 랫트를 수득할 수 있다.

[0346] 하나의 양상에서, 유전학적으로 변형된 랫트 게놈이 제공되고, 상기 방법은 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열로 내인성 랫트 핵산 서열의 표적화된 변형을 포함한다.

[0347] 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 5kb 내지 약 200kb의 길이를 갖는다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 5kb 내지 약 10kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 10kb 내지 약 20kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 20kb 내지 약 30kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 30kb 내지 약 40kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 40kb 내지 약 50kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 50kb 내지 약 60kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 60kb 내지 약 70kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 70kb 내지 약 80kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 80kb 내지 약 90kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 90kb 내지 약 100kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 100kb 내지 약 110kb의 범위이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 110kb 내지 약 120kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 120kb 내지 약 130kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 140kb 내지 약 150kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 150kb 내지 약 160kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 160kb 내지 약 170kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 170kb 내지 약 180kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 180kb 내지 약 190kb이다. 하나의 구현예에서, 상동성 또는 이종상동성 비-랫트 핵산 서열은 약 190kb 내지 약 200kb이다. 삽입 핵산에서 사용될 수 있는 목적하는 다양한 폴리뉴클레오타이드는 본원에서 기타 다른 곳에 기재되어 있다.

[0348] 6. 세포

[0349] 본원에 기재된 다양한 방법 및 조성물은 세포에서 게놈 유전자 좌위 표적화 시스템을 사용한다. 하나의 구현예에서, 세포는 만능 세포이다. 하나의 구현예에서, 만능 세포는 비-인간 만능 세포이다. 하나의 구현예에서, 비-인간 만능 세포는 포유동물 만능 세포이다. 하나의 구현예에서, 만능 세포는 인간 유도된 만능 줄기(iPS) 세포이다.

[0350] 하나의 구현예에서, 만능 세포는 만능 랫트 세포이다. 하나의 구현예에서, 만능 랫트 세포는 랫트 배아 줄기(ES) 세포이다. 하나의 구현예에서, 만능 랫트 세포는 유도된 만능 줄기(iPS) 세포이거나 발육적으로 제한된 선조체 세포이다. 다른 구현예에서, 만능 랫트 세포는 이의 게놈의 하나 이상의 표적화된 유전학적 변형 후 이의 만능을 지속시킬 수 있고 표적화된 변형을 F1 세대의 생식선으로 전달할 수 있다.

[0351] 하나의 구현예에서, 만능 세포는 단일 세포 단계에서 비-인간 수정란이다. 하나의 구현예에서, 비-인간 수정란은 포유동물 수정란이다. 하나의 구현예에서, 포유동물 수정란은 단일 세포 단계에서 설치류 수정란이다. 하나의 구현예에서, 포유동물 수정란은 단일 세포 단계에서 랫트 또는 마우스 수정란이다.

[0352] 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용된 다양한 세포는 또한 *이. 콜라이*를 포함하는 세균 세포와 같은 원핵 세포를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 원핵 세포는 *이. 콜라이*의 재조합-적격 균주이다. 하나의 구현예에서, 원핵 세포는 리컴비나제를 암호화하는 핵산을 포함하고, 다른 경우에, 원핵 세포는 리컴비나제를 암호화하는 핵산을 포함하지 않고 리컴비나제를 암호화하는 핵산은 원핵 세포로 도입된다. 하나의 구현예에서, 리컴비나제를 암호화하는 핵산은 DNA 또는 mRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 리컴비나제를 암호화하는 핵산은 pABG이다. 하나의 구현예에서, 리컴비나제는 유도성 프로모터의 제어하에 발현된다. 하나의 구현예에서, 리컴비나제의 발현은 아라비노스에 의해 조절된다.

[0353] A. 랫트 배아 줄기 (ES)세포

[0354] 상기 상세히 명시된 바와 같이, 본원에 제공된 다양한 조성물 및 방법은 랫트로부터 배아 줄기(ES) 세포를 사용할 수 있다. 하나의 구현예에서, 만능 랫트 세포는 랫트 ES 세포이다. 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 랫트 스트레인으로부터 유래하고 위스타르(Wistar) 랫트, LEA 스트레인, 스프라그 돌리 스트레인(Sprague Dawley strain), 피셔 스트레인, F344, F6, 및 다크 아고우티 (Dark Agouti) 또는 ACI이다. 하나의 구현예에서, 상기 래트 스트레인은 위스타르, LEA, 스프라그 돌리, 피셔, F344, F6, 및 다크 아고우티로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 스트레인의 2개 이상의 혼종이다. 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 근친교배된 스트레인으로부터 유래한다. 하나의 구현예에서, 상기 랫트 ES 세포는 DA 스트레인 및 ACI 스트레인으로부터 선택되는 스트레인으로부터 유래한다. 특정 구현예에서, 랫트 ES 세포는 ACI 스트레인으로부터 유래한다. 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 랫트 낭포로부터 유래한다.

[0355] 다른 구현예에서, 랫트 ES 세포는 하나 이상의 만능 마커의 발현을 특징으로 한다. 특정 구현예에서, 랫트 ES 세포는 Oct-4, Sox-2, 알칼린 포스파타제 또는 이의 조합을 포함하는 만능 마커의 발현을 특징으로 한다. 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 수컷 (XY) 랫트 ES 세포 또는 암컷 (XX) 랫트 ES 세포이다.

[0356] 하나의 구현예에서, 1 내지 15 연속 유전학적 변형 후, 분화 배지에 노출시 유전학적으로 변형된 랫트 ES 세포는 다수의 세포 유형으로 분화할 수 있다.

[0357] 하나의 구현예에서, 1 내지 15 연속 유전학적 변형 후, 유전학적으로 변형된 랫트 ES 세포는 배양중에 미분화된 상태로 유지시킬 수 있다. 하나의 구현예에서, 랫트 숙주 배아에서 공여자 세포로서 사용되는 경우 미분화된 상태의 유전학적으로 변형되고 배양된 랫트 ES 세포는 배아에 군집하여 1 내지 15 유전학적 변형을 포함하는 낭포를 형성한다. 하나의 구현예에서, 잉태를 위해 적합한 조건하에서 대리모로 이식되는 경우 낭포는 1 내지 15 유전학적 변형을 포함하는 F0 랫트 후손으로 발육한다.

[0358] 하나의 양상에서, *시험관내* 하나 이상의 유전학적 변형 후 만능을 지속할 수 있고 F1 세대의 생식선으로 유전학적으로 변형된 게놈을 전달 할 수 있는 분리된 랫트 ES 세포가 제공된다.

[0359] 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 *시험관내* 하나 이상의 일련의 유전학적 변형(*예를 들어*, 2회, 3회, 4회, 5회 또는 6회 이상의 일련의 유전학적 변형) 후 다수의 세포 유형으로 발육하는 이의 만능을 유지한다. 하나의 구현예에서, 유전학적 변형은 전기천공, 세포내질 주사, 바이러스 감염, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 형질감염, 지질-매개된 형질감염 또는 Nucleofaction™에 의해 매개된다.

[0360] 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 외인성 핵산과 함께 1회의 전기천공 후 다수의 세포 유형으로 발육하는 이

의 만능을 유지한다. 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 외인성 핵산과 함께 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7, 제8, 제9, 제10, 제11, 제12, 제13, 제14, 또는 제15회의 전기천공 후 다수의 세포 유형으로 발육하는 이의 만능을 유지한다.

[0361] 다른 구현예에서, 사용되는 랫트 ES 세포는 2014년 2월 20일자로 출원되고 이의 전문이 본원에 참조로서 인용되는 미국 출원 번호 제14/185,703호에 기재된 것들이다.

[0362] 본원에 기재된 다양한 방법 및 조성물에 사용된 만능 랫트 세포는 Dnmt3L, Eras, Err-베타, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF 수용체, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1, 및/또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 만능 마커의 발현을 특징으로 할 수 있다. 다른 경우에, 본원에 기재된 다양한 방법 및 조성물에 사용된 만능 랫트 세포는 하기의 특징 중 하나 이상을 특징으로 한다: (a) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음; (b) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 1 이상 중배엽 마커의 발현 없음; (c) Gata6, Sox17, 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현의 없음; 또는 (d) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음. 본원에 사용된 바와 같이, 만능 마커의 발현에 관한 것으로서 "발현 부재"는 만능 마커의 발현이 상기 각각의 개별 실험에 대해 결정된 바와 같이 실험 배경에 또는 이의 이하에 있음을 의미한다.

[0363] 하나의 비제한적인 구현예에서, 본원에 제공된 랫트 ES 세포는 하기의 임의의 성질 중 하나 이상을 갖는다:

[0364] (a) 랫트 ES 세포가 랫트 숙주 배아로 이식되는 경우 랫트 ES 세포주의 게놈이 후손으로 전달됨을 의미하는 생식선 적격성을 갖고;

[0365] (b) 표적화된 유전학적 변형을 갖는 랫트 ES 세포가 랫트 숙주 배아로 이식되는 경우, 랫트 ES 세포주의 게놈내 표적화된 유전학적 변형이 후손으로 전달됨을 의미하는 하나 이상의 표적화된 유전학적 변형 후 생식선 적격성을 갖고;

[0366] (c) 시험관내 만능을 갖고;

[0367] (d) 시험관내 분화전능을 갖고;

[0368] (e) 시험관내 배양되는 경우 공급 세포 층에 느슨하게 부착되어 있고;

[0369] (f) 시험관내 배양되는 경우, 시험관내 공급 세포 층상에 분주될때 구형 콜로니를 형성하고;

[0370] (g) 백혈병 억제제 인자 (LIF)를 발현하도록 유전학적으로 변형되지 않은 공급 세포 층을 포함하는 조건하에서 *시험관내* 배양(상기 배양 배지는 충분한 농도의 LIF를 포함한다)되는 경우 만능을 유지하고;

[0371] (h) 공급 세포 층을 포함하는 조건하에서 *시험관내* 배양(여기서, 배양 배지는 마우스 LIF 또는 이의 활성 변이체 또는 단편을 포함한다)되는 경우 만능을 유지하고;

[0372] (i) 다음을 특징으로 하는 분자 징후를 포함하고

[0373] i) 접착 접합 연합 단백질 (Ajap1), 클라우딘 5 (Cldn5), Cdc42 구아닌 뉴클레오타이드 교환 인자 9 (Arhgef9), 칼슘/칼모듈린 의존성 단백질 키나제 IV (Camk4), 에프린-A1 (Efna1), EPH 수용체 A4 (Epha4), 갭 접합 단백질 베타 5 (Gjb5), 인슐린형 성장 인자 결합 단백질 1형 (Igfbpl1), 인터류킨 36 베타 (Il1f8), 인터류킨 28 수용체, 알파 (Il28ra), 좌우측 결정 인자 1 (Lefty1), 백혈병 억제 인자 수용체 알파 (Lifr), 리소포스파티드산 수용체 2 (Lpar2), 뉴런 펜트락신 수용체 (Ntm), 단백질 티로신 포스파타제 비-수용체 18형 (Ptpn18), 카우달형 호메오박스 2 (Cdx2), 피브로넥틴 III형 및 안키린 반복 도메인 1 (Fank1), 포크헤드 박스 E1 (갑상선 전사 인자 2) (Foxe1), YRPW 모티프 2 (Hey2)와 관련된 모발/증진제-오브-스플릿, 포크헤드 박스 E1 (갑상선 전사 인자 2) (Foxe1), YRPW 모티프 2 (Hey2)와 관련된 모발/증진제-오브-스플릿, 림프구성 증진제-결합 인자 1 (Lef1), Sal-3형 (드로소필라(Drosophila)) (Sall3), SATB 호메오박스 1 (Satb1), miR-632, 또는 이의 조합체를 포함하는 랫트 ES 세포-특이적 유전자들 중 하나 이상의 발현;

[0374] ii) 접착 접합 연합 단백질 (Ajap1), 클라우딘 5 (Cldn5), Cdc42 구아닌 뉴클레오타이드 교환 인자 9 (Arhgef9), 칼슘/칼모듈린 의존성 단백질 키나제 IV (Camk4), 에프린-A1 (Efna1), EPH 수용체 A4 (Epha4), 갭 접합 단백질 베타 5 (Gjb5), 인슐린형 성장 인자 결합 단백질 1형 (Igfbpl1), 인터류킨 36 베타 (Il1f8), 인터류킨 28 수용체, 알파 (Il28ra), 좌우측 결정 인자 1 (Lefty1), 백혈병 억제 인자 수용체 알파 (Lifr), 리소포스파티드산 수용체 2 (Lpar2), 뉴런 펜트락신 수용체 (Ntm), 단백질 티로신 포스파타제 비-수용체 18형 (Ptpn18), 카우달형 호메오박스 2 (Cdx2), 피브로넥틴 III형 및 안키린 반복 도메인 1 (Fank1), 포크헤드 박스

E1 (갑상선 전사 인자 2) (Foxe1), YRPW 모티프 2 (Hey2)와 관련된 모발/증진제-오브-스플릿, 포크헤드 박스 E1 (갑상선 전사 인자 2) (Foxe1), YRPW 모티프 2 (Hey2)와 관련된 모발/증진제-오브-스플릿, 림프구성 증진제-결합 인자 1 (Lef1), Sal-3형 (드로소필라(Drosophila)) (Sall3), SATB 호메오박스 1 (Satb1), miR-632, 또는 이의 조합체를 포함하는 랫트 ES 세포-특이적 유전자들의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 이상의 발현;

[0375] iii) F1H4 마우스 ES 세포와 비교하는 경우 표 9에 제시된 바와 같은 랫트 ES 세포 특이적 유전자들 중 하나 이상의 발현에서 적어도 20배 증가;

[0376] iv) F1H4 마우스 ES 세포와 비교하는 경우 표 9에 제시된 바와 같은 랫트 ES 세포 특이적 유전자들 중 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 이상의 발현에서 적어도 20배 증가;

[0377] v) 표 10에 제시된 바와 같은 랫트 ES 세포-특이적 유전자들 중 하나 이상의 발현;

[0378] vi) 표 10에 제시된 바와 같은 랫트 ES 세포 특이적 유전자들의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이상의 발현;

[0379] vii) F1H4 마우스 ES 세포와 비교하는 경우 표 10에 제시된 바와 같은 랫트 ES 세포 특이적 유전자들의 하나 이상의 발현에서 적어도 20배 증가;

[0380] viii) F1H4 마우스 ES 세포와 비교하는 경우 표 10에 제시된 바와 같은 랫트 ES 세포 특이적 유전자들의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 이상의 세포의 발현에서 적어도 20배 증가;

[0381] ix) F1H4 마우스 ES 세포와 비교하는 표 8에 제시된 바와 같은 랫트 ES 세포 특이적 유전자들 중 하나 이상의 발현에서 적어도 20배 감소;

[0382] x) F1H4 마우스 ES 세포와 비교하는 경우 표 8에 제시된 바와 같은 랫트 ES 세포 특이적 유전자들의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50개 이상의 발현에서 적어도 20배 감소;

[0383] xi) (i)-(x) 부분들의 랫트 ES 세포 특이적 유전자들의 발현의 임의의 조합;

[0384] xii) 열거된 만능 마커의 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개에 대한 표 11에 나타낸 바와 같은 만능 마커의 상대적 발현 수준. 상대적 발현 수준에 대해 표 11의 만능 등급 칼럼을 참조한다;

[0385] xiii) 열거된 중배엽 마커의 적어도 2, 3 또는 4개에 대해 표 11에 보여지는 바와 같은 중배엽 마커의 상대적 발현 수준. 상대적 발현 수준에 대해 표 11에서 중배엽 등급 칼럼을 참조한다;

[0386] xiv) 열거된 내배엽 마커의 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개에 대해 표 11에 나타낸 바와 같은 내배엽 마커의 상대적 발현 수준. 상대적 발현 수준에 대해 표 11에서 내배엽 등급 칼럼을 참조한다;

[0387] xv) 열거된 신경 마커의 적어도 2 및 3개에 대해 표 11에 나타낸 바와 같은 신경 마커의 생대적 발현 수준. 상대적 발현 수준에 대해 표 11에서 신경 등급 칼럼을 참조한다;

[0388] xvi) 열거된 영양외배엽 마커에 대해 표 11에 나타낸 바와 같은 영양외배엽 마커의 상대적 발현 수준. 상대적 발현 수준에 대해 표 11에서 영양외배엽 등급 칼럼을 참조한다;

[0389] xvii) 표 11에 제시된 만능 마커, 중배엽 마커, 내배엽 마커, 신경 마커 및/또는 영양외배엽 마커의 하나 이상 (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30개)의 임의의 상대적 발현;

[0390] xviii) 표 11에 제시된 마커들의 각각의 상대적 발현 수준;

[0391] xix) xii-xiix에 제시된 징후 세트의 임의의 조합; 및/또는

[0392] xx) i-xiix에 제시된 징후의 임의의 조합;

[0393] (j) F0 랫트를 생성하는 능력을 갖고;

[0394] (k) 계대배양될 수 있고 미분화된 상태를 유지하고;

[0395] (l) 정상 랫트 세포로서 동일한 수의 염색체를 갖고;

[0396] (m) 파라크린 LIF 시그날 전달을 요구하는 것 없이 시험관내 만능을 유지하고;

[0397] (n) 만능을 유지하면서 이들이 무한적으로 분열함을 의미하는 자가 재생을 갖고;

[0398] (o)상기 랫트 ES 세포는 Dnmt3L, Eras, Err-베타, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF 수용체, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1, 및/또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 만능 마커를 발현하고;

[0399] (p) 상기 랫트 ES 세포는 c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 하나 이상의 분화 마커를 발현하지 않고;

[0400] (q) 랫트 ES 세포는 Brachyury, Bmpr2, 및/또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 중배엽 마커를 발현하지 않고;

[0401] (r) 랫트 ES 세포는 Gata6, Sox17, Sox7, 및/또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 내배엽 마커를 발현하지 않고/않거나

[0402] (s) 랫트 ES 세포는 Nestin, Pax6, 및/또는 이의 조합을 포함하는 하나 이상의 신경 마커를 발현하지 않는다.

[0403] (a)-(s)에 명시된 특성 중 하나 이상은 본원에 제공된 방법 및 조성물에 사용되는 랫트 ES 세포, 랫트 ES 세포 집단 또는 랫트 ES 세포주에 존재할 수 있고, 여기서, 랫트 ES 세포는 표적화된 유전학적 변형을 겪지 않는다. 더욱이, 상기 상세히 기재된 바와 같은 랫트 표적 유전자 좌위에 대한 하나 이상의 유전학적 변형 후, (a)-(s)에 명시된 특성 중 하나 이상은 표적 유전자 좌위의 유전학적 변형 후 랫트 ES 세포에 보유될 수 있다.

[0404] 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 적어도 2%, 적어도 3%, 적어도 4%, 적어도 5%, 적어도 6%, 적어도 7%, 적어도 8%, 적어도 9%, 적어도 10%, 적어도 11%, 적어도 12%, 적어도 13%, 적어도 14%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 또는 적어도 80%의 상동성 재조합 효율을 나타낸다.

[0405] 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포를 사용하는 상동성 재조합 효율은 4% 초과이다.

[0406] 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 24시간 내지 36시간 범위의 배가 시간을 갖는다. 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 25시간의 배가 시간을 갖는다.

[0407] 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 2i 배지 (Millipore Cat. SF016-200)에서 적어도 15회까지 계대될 수 있다. 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 2i 배지(Millipore Cat. No. SF016-200)에서 적어도 14회까지 계대될 수 있다. 하나의 구현예에서, 랫트 ES 세포는 2i 배지에서 적어도 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 또는 5회 계대될 수 있다.

[0408] 하나의 구현예에서, 전-상실포배 단계 랫트 배아로 이식되는 경우, 랫트 ES 세포는 F0 세대에서 90% 이상의 세포에 기여할 수 있다. 하나의 구현예에서, 전-상실포배 단계 랫트 배아에 이식되는 경우, 랫트 ES 세포는 F0 세대에서 세포의 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 세포에 기여할 수 있다.

[0409] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 다양한 방법 및 조성물에 사용된 다양한 랫트 ES 세포 및 세포주를 사용하여 표적 유전자 좌위에서 표적화된 변형을 생성시킨다. 표적화된 유전학적 변형을 갖는 랫트 ES 세포는 생식선 적격일 수 있고, 이는 표적화된 유전학적 변형을 갖는 랫트 ES 세포가 랫트 숙주 배아에 이식되는 경우, 랫트 ES 세포의 표적화된 유전학적 변형이 후손(즉, F1 집단)으로 전달됨을 의미한다. 따라서, 다양한 양상에서, 다양한 방법 및 조성물에서 랫트 ES 세포를 사용하여 표적화된 유전학적 변형을 겪은 랫트 ES 세포 기원의 랫트 세포 게놈의 고빈도 또는 고효율의 생식선 전달을 수득하였다. 다양한 구현예에서, 생식선 전달 빈도는 1:600 초과, 1:500 초과, 1:400 초과, 1:300 초과, 1:200 초과, 및 1:100 초과이다. 다양한 구현예에서, 생식선 전달의 빈도는 1% 초과, 2% 초과, 3% 초과, 4% 초과, 5% 초과, 6% 초과, 7% 초과, 8% 초과, 9% 초과, 10% 초과, 약 16% 이하, 25% 초과, 50% 초과, 60% 초과, 65% 초과, 70% 초과, 75% 초과이다. 다양한 구현예에서, 생식선 전달의 빈도는 9% 내지 16% 범위이다. 다양한 양상에서, F1 세대에서 공여자 rESC-유래된 후손의 %는 1% 이상, 2% 이상, 3% 이상, 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 3% 내지 약 10% 이상; 3% 이상 내지 약 63%, 약 10% 내지 약 30%, 약 10% 내지 약 50%, 약 30% 내지 약 70%, 약 30% 내지 약 60%, 약 20% 내지 약 40%, 약 20% 내지 65%, 또는 약 40% 내지 70%이다. 따라서, 표적화된 유전학적 변형을 갖는 랫트 ES 세포는 이들의 게놈을 F1 집단으로 전달하는 능력을 갖는다.

[0410] 표적화된 유전학적 변형을 갖는 랫트 ES 세포는 만능 및/또는 분화전능일 수 있다. 다양한 방법을 사용하여 랫트 ES 세포가 만능인지의 여부를 결정할 수 있다. 예를 들어, ES 세포는 Oct-4, Sox2, 알칼린 포스파타제 또는 이의 조합을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 만능 마커의 발현에 대해 분석될 수 있다. 예를 들어, 상기 마커의 존재 또는 수준을 검정하는 다양한 방법에 대해 문헌[Okamoto, K. 등, *Cell,* 60: 461-472 (1990), Scholer, H. R. 등, *EMBO J.* 9: 2185-2195 (1990)) 및 Nanog (Mitsui, K. 등, *Cell,* 113: 631-642 (2003), Chambers, I. 등, *Cell,* 113: 643-655 (2003)]을 참조한다. 또한 본원에 제공된 도 2 및 3을 참조한다. 다른 만능 마커는 예를 들어, Nanog, Klf4, Dppa2, Fgf4, Rex1, Eras, Err-베타 및/또는 Sall3을 포함하는 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개의 만능 마커의 존재를 포함한다. 다른 만능 마커는 예를 들어, T/Brachyury, Flk1, Nodal, Bmp4, Bmp2, Gata6, Sox17, Hhex1, Sox7, 및/또는 Pax6을 포함하는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 만능 마커의 부재를 포함한다.

[0411] 특정 구현예에서, 이들 마커의 발현 및/또는 발현 수준은 RT-PCR을 사용하여 결정할 수 있다. 예를 들어, ALP 조직 염색 키트 (Sigma) 및 벡터 레드 알칼린 포스파타제 기질 키트 I (Funakoshi)등을 포함하는 다양한 키트가 알칼린 포스파타제의 수준 및/또는 존재를 결정하기 위해 가용하다. 추가의 검정은 동일계 하이브리드화, 면역조직화학, 면역형광성을 포함한다. 특정 구현예에서, 랫트 ES 세포는 예를 들어, Oct-4, Sox2, 알칼린 포스파타제, 또는 이의 조합 및 바람직하게는 이들 마커 3개 모두의 발현을 포함하는 하나 이상의 만능 마커의 발현을 특징으로 한다.

[0412] 본원에 제공된 방법 및 조성물에 사용되는 다양한 랫트 ES 세포는 시험관내 배양 조건에 유지되면서 만능 및/또는 분화전능을 유지할 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 다양한 랫트 ES 세포는 일부 구현예에서 미분화된 상태로 여전히 유지시키면서 계대될 수 있다. 랫트 ES 세포를 배양하는 다양한 방법은 본원의 기타 다른 곳에서 추가로 상세히 논의되어 있고, 전문이 본원에 참조로서 인용되는 2014년 2월 20일자로 출원된 미국 특허 출원 제14/185,703호에 논의되어 있다.

[0413] 일부 구현예에서, 본원에 사용된 랫트 배아 줄기 세포는 이의 전문이 본원에 참조로서 인용되는 2014년 2월 20일자로 출원된 미국 특허 출원 제14/185,703호에서 상세히 논의된 다양한 분리, 정제 및 배양 확장 기술을 사용하여 랫트 배아로부터 분리되었다.

[0414] "분리된" 랫트 ES 세포 또는 랫트 배아는 이의 천연 환경으로부터 제거되었다. 용어 "분리된"은 이의 천연 상태에서 발견되는 성분과 함께 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 구성 요소가 없음을 의미할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 랫트 ES "세포주"는 단일 랫트 ES 세포로부터 발육된 분리된 랫트 세포 집단을 포함하고 따라서, 소정의 세포주내 세포 집단은 증식 또는 표적화된 유전학적 변형 동안에 존재하는 돌연변이 또는 핵형 변화 이외의 균일한 유전학적 구성을 갖는다. 예를 들어, 랫트 ES 세포는 고수준의 정배수성을 특징으로 할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 일부 세포주에서, 정배수성 수준은 단일 세포로부터 세포주의 증식에서 핵형 변화로 인해 100% 미만이다. 더욱이, 랫트 ES 세포의 소정의 집단은 적어도 $1x10^{3,}$ $1x10^{4}$, $1x10^{5}$, $1x10^{6}$, $1x10^{7}$, $1x10^{8}$, $1x10^{9}$, 또는 $1x10^{10}$ 초과의 세포를 포함할 수 있다. 일부 세포 집단은 목적하는 변형된 세포의 선택을 허용하기에 충분하지만 세포주에서 돌연변이 또는 핵형 변화를 감소시키기 위해 과도한 초과의 수가 아닌 세포를 갖는다. 예를 들어, 일부 세포 집단은 $1x10^{3}$ 내지 $1x10^{6}$ 세포를 갖는다.

[0415] 본원에 기타 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 랫트 ES 세포주의 표적화된 유전학적 변형에 대한 다양한 방법이 제공된다. 상기 방법이 수행되는 경우, 랫트 ES 세포주내 하나 이상의 세포는 표적화된 유전학적 변형을 함유한다. 다양한 배양 및/또는 선택 기술을 통해, 하나 이상의 목적하는 표적화된 유전학적 변형을 갖는 랫트 ES 세포주가 생성된다.

[0416] 특정 구현예에서, 랫트 ES 세포, 랫트 ES 세포의 집단 또는 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)는 정배수체이고 따라서, 반수체 수의 정확한 배수인 염색체 수를 갖는다. 추가의 구현예에서, 랫트 ES 세포, 랫트 ES 세포 집단 또는 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)는 이배체이고 따라서 2개의 반수체 세트의 상동성 염색체를 갖는다. 랫트 ES 세포 집단, 또는 랫트 ES 세포 또는 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)의 소정의 집단으로부터 기원하는 세포 집단을 언급하는 경우, 소정의 집단과 함께 적어도 약 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 세포는 정배수체 및/또는 이배체이다. 다른 경우에, 랫트 ES 세포 집단 또는 소정의 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는) 기원의 세

포 집단을 언급하는 경우, 소정의 집단내 적어도 약 50% 내지 95%, 약 60% 내지 90%, 약 60% 내지 95%, 약 60% 내지 85%, 약 60% 내지 80%, 약 70% 내지 80%, 약 70% 내지 85%, 약 70% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 98%, 약 90% 내지 약 97%, 약 90% 내지 약 95%의 세포는 정배수체 및/또는 이배체이다.

[0417] 여전히, 추가의 구현예에서, 랫트 ES 세포, 랫트 ES 세포 집단 또는 랫트 ES 세포주 (표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)는 42개 염색체를 갖는다. 랫트 ES 세포 집단, 또는 소정의 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는) 기원의 세포 집단을 언급하는 경우, 상기 소정의 집단내 세포의 적어도 약 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%는 42개의 염색체를 갖는다. 다른 경우에, 랫트 ES 세포 집단, 또는 소정의 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는) 기원의 세포 집단을 언급하는 경우, 소정의 집단내 세포의 적어도 약 50% 내지 95%, 약 60% 내지 90%, 약 60% 내지 95%, 약 60% 내지 85%, 약 60% 내지 약 80%, 약 70% 내지 80%, 약 70% 내지 85%, 약 70% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 80% 내지 95%, 약 80% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 98%, 약 90% 내지 약 97%, 약 90% 내지 약 95%는 42개의 염색체를 갖는다.

[0418] 추가의 구현예에서, 본원에 제공된 랫트 ES 세포, 랫트 ES 세포 집단 또는 랫트 ES 세포주 (표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)은 *시험관내* 공급 세포층상에 분주되는 경우 구형 콜로니를 형성한다. "구형 " 형태는 개별 ES 세포의 형태 보다는 배양 중에 랫트 ES 세포 콜로니의 형태를 언급한다. 랫트 ES 세포 콜로니는 구형이다. 공급 세포 상에 느슨하게 부착된 콜로니는 환형(환형 형태를 갖는)으로 나타난다. 유리된-부유 콜로니는 구형이다. 랫트 ES 세포 콜로니는 구형이고 매우 촘촘하며 이는 세포간의 경계선을 보기가 매우 어려움을 의미한다. 콜로니의 엣지는 밝고 예리함한 것으로 나타난다. 개별 핵은 세포가 매우 작기 때문에(핵은 세포 용적의 대부분을 차지한다) 구분하기가 어렵다. 마우스 ES 세포는 연장된 콜로니를 형성하고 공급 세포에 강하게 부착한다. mESC 형태는 스트레인과 함께 다양할 수 있고; 예를 들어, B6 콜로니는 F1H4 콜로니 보다 둥근형태이고 보다 돔 형태이지만 여전히 rESC 보다 연장되어 있다. 인간 ES 세포 콜로니는 mESC 콜로니 보다 편평하고 확산되어 있다. 본 발명의 랫트 ES 콜로니는 편평하지 않고 인간 ES 세포 콜로니를 닮지 않았다.

[0419] 여전히 추가의 구현예에서, 랫트 ES 세포, 랫트 ES 세포 집단 또는 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)는 환형 형태를 갖는다. 환형에 대한 형태 스케일은 하기에 제공되고, 여기서, 10의 스코어는 완전한 환형을 나타내고 1의 스코어는 타원형을 나타낸다.

[0420] 환형의 형태 스케일:

[0421] 10= 구조의 중심을 관통하고 동등한 길이를 갖는 종축 및 수직축을 갖는 구조를 갖는 환형.

[0422] 9 = 구조의 중심을 관통하는 종축 및 수직축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 길이의 0.9999 내지 0.9357인 구조.

[0423] 8 = 구조의 중심을 관통하는 종축 및 수직축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 길이의 0.9357 내지 0.875인 구조.

[0424] 7 = 구조의 중심을 관통하는 종축 및 수직축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 길이의 0.875 내지 0.8125인 구조.

[0425] 6 = 구조의 중심을 관통하는 종축 및 수직축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 길이의 0.8125 내지 약 0.750인 구조.

[0426] 5 = 구조의 중심을 관통하는 종축 및 수직축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 길이의 0.750 내지 0.6875인 구조.

[0427] 4 = 구조의 중심을 관통하는 종축 및 수직축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 길이의 0.6875 내지 0.625인 구조.

[0428] 3 = 구조의 중심을 관통하는 종축 및 수직축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 길이의 0.625 내지 0.5625

인 구조.

[0429] 2= 구조의 중심을 관통하는 종축 및 수직축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 길이의 0.5625 내지 0.523인 구조.

[0430] 1= 구조의 중심을 관통하는 종축 및 수직축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 길이의 0.523 내지 0.500인 것으로 정의되는 타원형.

[0431] 하나의 비제한적인 구현예에서, 랫트 ES 세포 집단 또는 소정의 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)로부터 기원하는 세포 집단은 소정의 집단과 함께 적어도 약 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 세포를 갖고 환형 형태 스코어는 10, 9 또는 8이다. 다른 구현예에서, 랫트 ES 세포 집단 또는 소정의 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)기원의 소정의 세포 집단내 환형 형태 스코어가 10, 9, 또는 8인 세포는 적어도 약 50% 내지 95%, 약 60% 내지 90%, 약 60% 내지 95%, 약 60% 내지 85%, 약 60% 내지 80%, 약 70% 내지 80%, 약 70% 내지 85%, 약 70% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 95%, 약 70% 내지 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 98%, 약 90% 내지 약 97%, 약 90% 내지 약 95%이다.

[0432] 또 다른 비제한적인 구현예에서, 랫트 ES 세포 집단, 또는 소정의 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는) 기원의 소정의 세포 집단내에서 환형 형태 스코어가 7, 6, 5, 4 또는 3인 세포는 적어도 약 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%이다. 다른 비제한적인 구현예에서, 랫트 ES 세포 집단 또는 소정의 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는) 기원의 세포 집단내에서 환형 형태 스코어가 7, 6, 5, 4, 또는 3인 세포는 적어도 약 50% 내지 95%, 약 60% 내지 90%, 약 60% 내지 95%, 약 60% 내지 85%, 약 60% 내지 80%, 약 70% 내지 80%, 약 70% 내지 85%, 약 70% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 95%, 약 70% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 98%, 약 90% 내지 약 97%, 약 90% 내지 약 95%이다.

[0433] 여전히 추가의 구현예에서, 구형 콜로니는 랫트 ES 세포(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)가 시험관내 공급 세포 층상에 분주되는 경우 형성된다. 구형에 대한 형태 스케일은 하기에 제공되고, 여기서 10의 스코어는 완전한 구형을 나타내고 1의 스코어는 3차원 타원형 구조를 나타낸다.

[0434] 구형 구조의 형태 스케일:

[0435] 10=구형은 각각의 구조의 중심을 관통하는 X축 및 Y축 및 Z축을 갖고 동등한 길이를 갖는 구조이다.

[0436] 9 = 구조의 중심을 관통하는 X축 및 Y축 및 Z축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 하나 이상의 길이의 0.9999 내지 0.9357인 구조.

[0437] 8 = 구조의 중심을 관통하는 X축 및 Y축 및 Z축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 하나 이상 또는 둘다의 길이의 0.9357 내지 0.857인 구조.

[0438] 7 = 구조의 중심을 관통하는 X축 및 Y축 및 Z축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 하나 이상 또는 둘다의 길이의 0.875 내지 0.8125인 구조.

[0439] 6 = 구조의 중심을 관통하는 X축 및 Y축 및 Z축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 하나 이상 또는 둘다의 길이의 0.8125 내지 0.750인 구조.

[0440] 5 = 구조의 중심을 관통하는 X축 및 Y축 및 Z축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 하나 이상 또는 둘다의 길이의 0.750 내지 0.6875인 구조.

[0441] 4 = 구조의 중심을 관통하는 X축 및 Y축 및 Z축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 하나 이상 또는 둘다의 길이의 0.6875 내지 0.625인 구조.

[0442] 3 = 구조의 중심을 관통하는 X축 및 Y축 및 Z축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 하나 이상 또는 둘다의 길이의 0.625 내지 0.5625인 구조.

[0443] 2= 구조의 중심을 관통하는 X축 및 Y축 및 Z축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 하나 이상 또는 둘다의 길이의 0.5625 내지 0.523인 구조.

[0444] 1= 구조의 중심을 관통하는 X축 및 Y축 및 Z축을 갖고, 여기서, 축의 하나가 다른 축의 하나 이상 또는 둘다의 길이의 0.523 내지 0.500인 구조.

[0445] 하나의 비제한적인 구현예에서, 랫트 ES 세포 집단 또는 소정의 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)로부터 기원하는 세포 집단에서 세포가 시험관내 공급 세포 층상에 분주되는 경우 형성되는 콜로니의 적어도 약 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%가 10, 9 또는 8의 구형 형태를 갖는다. 다른 구현예에서, 랫트 ES 세포 집단 또는 소정의 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)기원의 세포 집단내에서 세포가 *시험관내* 공급 세포 층상에 분주되는 경우 형성되는 콜로니의 약 50% 내지 95%, 약 60% 내지 90%, 약 60% 내지 95%, 약 60% 내지 85%, 약 60% 내지 80%, 약 70% 내지 80%, 약 70% 내지 85%, 약 70% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 95%, 약 70% 내지 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 98%, 약 90% 내지 약 97%, 약 90% 내지 약 95%가 10, 9 또는 8의 구형 형태를 갖는다.

[0446] 하나의 비제한적인 구현예에서, 랫트 ES 세포 집단 또는 소정의 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)로부터 기원하는 세포 집단에서 세포가 시험관내 공급 세포 층상에 분주되는 경우 형성되는 콜로니의 적어도 약 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%가 7, 6, 5, 4 또는 3의 구형 형태를 갖는다. 다른 구현예에서, 랫트 ES 세포 집단 또는 소정의 랫트 ES 세포주(표적화된 유전학적 변형을 겪지 않고/않거나 표적화된 유전학적 변형을 갖는)기원의 세포 집단내에서 세포가 *시험관내* 공급 세포 층상에 분주되는 경우 형성되는 콜로니의 약 50% 내지 95%, 약 60% 내지 90%, 약 60% 내지 95%, 약 60% 내지 85%, 약 60% 내지 80%, 약 70% 내지 80%, 약 70% 내지 85%, 약 70% 내지 약 90%, 약 70% 내지 약 95%, 약 70% 내지 100%, 약 80% 내지 약 100%, 약 80% 내지 약 95%, 약 80% 내지 약 90%, 약 90% 내지 약 100%, 약 90% 내지 약 99%, 약 90% 내지 약 98%, 약 90% 내지 약 97%, 약 90% 내지 약 95%가 7, 6, 5, 4 또는 3의 구형 형태를 갖는다.

[0447] 본원에 제공된 다양한 방법 및 조성물에 사용되는 소정의 랫트 ES 세포는 수컷 (XY) 랫트 ES 세포, 랫트 ES 세포의 수컷 (XY) 집단, 또는 수컷 (XY) 랫트 ES 세포주일 수 있다. 다른 구현예에서, 본원에 사용되는 랫트 ES 세포 집단 또는 랫트 ES 세포주 집단은 암컷 (XX) 랫트 ES 세포, 랫트 ES 세포의 암컷 (XX) 집단, 또는 암컷 (XX) 랫트 ES 세포주일 수 있다. 임의의 상기 랫트 ES 세포, 랫트 ES 세포의 집단 또는 랫트 ES 세포주는 상기된 바와 같이 정배수체 및/또는 이배체를 포함할 수 있다.

[0448] 상기 방법 및 조성물에 사용되는 다양한 랫트 ES 세포는 임의의 랫트 스트레인으로 기원할 수 있고, ACI 랫트 스트레인, 다크 아고우티 (DA) 랫트 스트레인, 위스타르 랫트 스트레인, LEA 랫트 스트레인, 스프라그 돌리 (SD) 랫트 스트레인 또는 피셔 랫트 스트레인, 예를 들어, 피셔 F344 또는 피셔 F6을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다양한 랫트 ES 세포는 또한 상기된 2개 이상의 스트레인의 혼종으로부터 유래된 스트레인으로부터 수득할 수 있다. 하나의 구현예에서, 상기 랫트 ES 세포는 DA 스트레인 및 ACI 스트레인으로부터 선택되는 스트레인으로부터 유래한다. 특정 구현예에서, 랫트 ES 세포는 ACI 스트레인으로부터 유래한다. ACI 랫트 스트레인은 블랙 아고우티를 가짐을 특징으로 하고 백색 배꼽 및 발을 갖고 RT1av1 반수체 유형이다. 상기 스트레인은 연구소(Harlan Laboratories)을 포함하는 다양한 공급원으로부터 가용하다. 다른 구현예에서, 다양한 랫트 ES 세포는 다크 아고우티 (DA) 랫트 스트레인으로부터 기원하고 이는 아고우티 코트 및 RT1av1 반수체 유형을 가짐을 특징으로 한다. 상기 랫트는 연구소[Charles River and Harlan Laboratories]를 포함하는 다양한 공급원으로부터 가용하다. 추가의 구현예에서, 본원에 사용된 다양한 랫트 ES 세포는 근친교배된 랫트 스트레인으로부터 기원한다.

[0449] 특정 구현예에서, 랫트 ES 세포주는 ACI 랫트로부터 기원하고 2014년 2월 20일자로 출원되고 이의 전문이 본원에 참조로서 인용된 미국 특허 출원 제14/185,703호에 상세히 기재된 바와 같은 ACI.G1 랫트 ES 세포를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 랫트 ES 세포주는 DA 랫트로부터 기원하고, 2014년 2월 20일자로 출원되고 이의 전문이 본원에 참조로서 인용되는 미국 특허 출원 제14/185,703호에 상세히 기재된 바와 같은 DA.2B 랫트 ES 세포주 또는 DA.2C 랫트 ES 세포주로부터 기원한다.

[0450] 본원에 제공된 소정의 랫트 ES 세포는 랫트 배아 발육의 다양한 단계에서 랫트 배아로부터 수득될 수 있다. 랫트 ES 세포를 유도하기 위해 사용되는 랫트 배아는 상실포배-단계 배아, 낭포 단계 배아 또는 상실포배 단계 배아와 낭포 단계 배아 사이의 발육 단계에 있는 랫트 배아일 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 사용되는 상기 랫트 배아는 5 및 7의 Witschi 단계에 또는 이 사이의 단계에 있다. 다른 구현예에서, 사용되는 랫트 배아는

Witschi 단계 5, 6, 또는 7에 있다.

[0451] 하나의 구현예에서, 상기 랫트 ES 세포는 랫트 낭포로부터 수득한다. 다른 구현예에서, 랫트 ES 세포는 과잉 배란된 랫트 기원의 낭포로부터 수득된다. 다른 구현예에서, 랫트 ES 세포는 8-세포 단계 배아로부터 수득되고, 이어서 이것이 상실포배-단계, 낭포 단계, Witschi 단계 5 및 7 사이의 배아, 또는 Witschi 단계 5, 6, 또는 7에 있는 배아로 발육할때까지 *시험관내* 배양된다. 이 시점에서 배아를 분주한다. 상실포배-단계 배아는 어떠한 내부 공동을 갖지 않는 촘촘한 세포 볼을 포함한다. 낭포-단계 배아는 가시적 내부 공동(포배강)을 갖고 내부 세포 매쓰(ICM)을 함유한다. ES 세포 기원의 ICM 세포.

[0452] B. 랫트 배아 줄기(ES) 세포의 유도 및 증식

[0453] 랫트 배아 줄기 세포의 유도 및 증식 방법은 예를 들어, 2014년 2월 20자로 출원되고 이의 전문이 본원에 참조로서 인용되는 미국 특허 출원 제14/185,703호에 기재돼어 있다. 특정 구현예에서, 상기 방법은 (a) 공급 세포층 및 분리된 랫트 배아 줄기 (ES) 세포를 포함하는 *시험관내* 배양물을 제공하고; (b) 분리된 랫트 ES 세포의 만능 및/또는 분화전능을 유기하기에 충분한 조건하에서 *시험관내* 배양함을 포함한다. 이로써 상기 방법은 랫트 ES 세포 집단 및/또는 랫트 ES 세포주의 증식을 가능하게 한다.

[0454] 랫트 배아 줄기 세포주를 배양하기 위한 방법이 제공된다. 상기 방법은 공급 세포 층 및 ES 세포주를 *시험관내* 배양함을 포함하고, 여기서, 상기 배양 조건은 랫트 ES 세포의 만능을 유지하고 마우스 백혈병 억제제 인자 (LIF) 또는 이의 활성 변이체 또는 단편을 갖는 배지를 포함한다. 상기 방법은 랫트 ES 세포주의 세포를 *시험관내* 계대하고 배양함을 추가로 포함할 수 있고, 여기서, 각각의 후속적 *시험관내* 배양은 랫트 ES 세포의 만능을 유지하는 조건하에서 공급 세포 층 상에서 랫트 ES 세포를 배양함을 포함하고 마우스 LIF 또는 이의 활성 변이체 또는 단편을 포함한다.

[0455] 다양한 방법 및 조성물에 사용되는 배양 배지는 랫트 ES 세포를 유지할 수 있다. 용어 "유지하는" 및 "유지"는 본원에 명시된 랫트 ES 세포의 특징 또는 표현형 중 하나 이상의 안정한 보존을 언급한다. 상기 표현형은 본원에 기재된 랫트 줄기 세포의 만능 및/또는 분화전능, 세포 형태, 유전자 발현 프로필 및 다른 기능성 특징을 유지함을 포함할 수 있다. 용어 "유지하다"는 또한 줄기 세포의 증식 또는 배양된 줄기 세포 수의 증가를 포함할 수 있다. 용어는 추가로 줄기 세포가 만능을 유지하도록 하고 줄기 세포가 분열하고 수적으로 증가하는데 기여하거나 기여하지 않을 수 있는 배양 조건을 고려한다.

[0456] 용어 "공급 세포" 또는 "공급 세포 층"은 *시험관내* 성장하고 배양 중 목적하는 또 다른 세포의 증식을 지지하기 위해 사용되는 배양 배지로 하나 이상의 인자를 분비하는 세포 배양물을 포함한다. 본원에 사용되는 공급 세포는 랫트 ES 세포의 만능 및 특정 구현예에서, 본원에 기재된 다른 특징 또는 표현형 중 하나 이상을 유지하는 것을 도와준다. 예를 들어, 임신 12일째 내지 16일째 사이에 수득된 마우스 배아 섬유아세포를 포함하는, 마우스 배아 섬유아세포를 포함하는 다양한 공급 세포가 사용될 수 있다. 특정 구현예에서, 공급 세포 층은 유사분열적으로 불활성화된 마우스 배아 섬유아세포(MEF)의 단층을 포함한다.

[0457] 랫트 ES 세포의 *시험관내* 배양물은 유효량의 백혈병 억제제 인자 (LIF) 또는 이의 활성 변이체 또는 단편을 추가로 포함한다. 백혈병 억제 인자 (LIF)는 IL-6 수용체 패밀리에 속한다. LIF는 LIF-특이적 서브유니트, gp190 또는 LIFR, 및 IL-6 패밀리의 다른 구성원들과 공유되는 서브유니트 gp130으로 구성된 이종이량체성 막 수용체에 결합한다. LIF는 마우스에서 배아 줄기 세포의 분화를 억제하고 줄기 세포 자가 재생에 기여한다. 인간 및 마우스 LIF는 79% 서열 상동성을 공유하고 교차-종 활성을 나타낸다. 랫트 LIF (rtLIF)는 뮤린 LIF와 91% 아미노산 서열 동일성을 나타내는 202개 아미노산 잔기들을 함유하는 22.1kDa 단백질이다(문헌참조: Takahama 등 1998). 다양한 종 기원의 LIF 폴리펩타이드 중에서 보존된 6개의 가능한 아스파라긴-연결된 당화(N-당화) 부위, 및 랫트 LIF에 대해 특이적인 Asn150의 추가의 부위가 있다. 마우스 LIF의 3차원 구조 및 이의 기능은 하기 문헌에서 추가로 상세하게 기재되어 있다[문헌참조: Aikawa 등 (1998) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62 1318-1325 및 Senturk 등 (2005) *Immunology of Pregnancy*, 편집자 Gil Mor., 미국 특허 제5,750,654호 및 D P Gearing (1987) *EMBO Journal* 1987-12-20, 이의 각각은 전문이 본원에 참조로서 인용된다]. 부분적 마우스 LIF 서열은 승인 번호 P09056하에 SwissProt 웹 사이트상에 보고되어 있다.

[0458] 마우스 LIF 활성은 M1 골수 백혈병 세포의 분화를 유도하는 능력에 의해 평가한다. 비활성은 1 x 10^6유니트/ml (Cat. No. 03-0011 (제조원: Stemgent) 및 1 x 10^7 유니트 /ml (Cat. No. 03-0011-100 (제조원 Stemgent))이고, 여기서, 50유니트는 1ml의 배지에서 M1 콜로니 50%의 분화를 유도하기 위해 요구되는 마우스 LIF의 양으로서 정의된다. 참고, 또한, Williams, R.L. 등 (1988) Nature 336: 684-687.; Metcalf, D. 등

(1988) Leukemia 2: 216-221; Niwa, H. 등 (2009) Nature 460: 118-122; Xu, J. 등 (2010) *Cell Biol Int.* 34: 791-797; Fukunaga, N. 등 (2010) *Cell Reprogram.* 12: 369-376; 및 Metcalf D. (2003) *Stem Cells* 21: 5-14, 이의 각각은 전문이 본원에 참조로서 인용된다]을 참조한다. "유효량의 LIF"는 미분화된 만능 상태로 유지하기 위해 *시험관내* 배양물의 랫트 ES 세포를 가능하게 하는 LIF의 농도를 포함한다. 만능 상태를 유지하는 세포에 대한 검정에 사용될 수 있는 다양한 마커는 본원에서 기타 다른 곳에서 논의된다.

[0459] 본원에 제공된 다양한 방법 및 조성물에 사용되는 LIF 폴리펩타이드는 포유동물, 설치류, 인간, 랫트 또는 마우스 기원을 포함하는 임의의 유기체로부터 기원할 수 있다. 하나의 구현예에서, 상기 LIF 폴리펩타이드는 마우스 기원이다. 여전히 추가의 구현예에서, 상기 마우스 LIF 폴리펩타이드는 SwissProt 승인번호: P09056에 제시된 아미노산 서열을 포함하고, 이는 전문이 본원에 참조로서 인용되고 또한 서열번호 9.

[0460] 다른 구현예에서, 서열번호: 9 또는 SwissProt 승인번호: P09056에 제시된 바와 같은 마우스 LIF 폴리펩타이드의 활성 변이체 또는 단편이 사용될 수 있다. 상기 활성 변이체 및 단편(서열번호 9와 적어도 75%, 80%, 85% 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,또는 99% 서열 동일성을 갖는 활성 변이체를 포함하는): 본원에서 기타 다른 곳에서 추가로 상세하게 논의된다.

[0461] LIF 폴리펩타이드 또는 이의 활성 변이체 또는 단편은 다양한 방식으로 *시험관내* 배양물에 제공될 수 있다. 하나의 구현예에서, 유효량의 LIF 폴리펩타이드 또는 이의 활성 변이체 또는 단편이 배양 배지에 첨가된다. 다른 구현예에서, 공급 세포는 LIF 폴리펩타이드 또는 이의 활성 변이체 또는 단편을 과발현하도록 유전학적으로 변형되었다. 상기 공급 세포는 매트릭스-관련된 LIF를 발현하는 감마-조사된 또는 마이토마이신-C 처리된 DIA-M 마우스 섬유아세포로부터 제조된 공급 세포를 포함한다. 상기 유전학적으로 변형된 공급 세포를 생성시키고 사용하는 방법은 예를 들어, 문헌[참조: Buehr 등 (2003) *Biol Reprod* 68:222-229, Rathjen 등 (1990) *Cell* 62 1105-1115, 및 Buehr 등 (2008) *Cell* 135:1287-1298, 이의 각각은 본원에 참조로서 인용된다]에서 찾을 수 있다. 공급 세포에서 발현된 이종성 LIF는 공급 세포와 동일한 유기체로부터 기원하거나 공급 세포와는 상이한 유기체로부터 기원할 수 있다. 추가로, 공급 세포에서 발현되는 이종성 LIF는 공급 층이 지지하는 ES 세포와 동일하거나 상이한 유기체 기원일 수 있다.

[0462] 여전히 다른 구현예에서, 본원에 제공된 다양한 방법에 사용된 공급 세포는 이종성 LIF 폴리펩타이드 또는 이의 활성 변이체 또는 단편을 발현하도록 유전학적으로 변형되지 않았다. 따라서, 특정 구현예에서, 상기 방법에서 사용된 유사 분열적으로 불활성화된 마우스 배아 섬유아세포의 단층은 이종성 LIF를 발현하도록 유전학적으로 변형되지 않았다.

[0463] 다른 구현예에서, LIF 폴리펩타이드 또는 이의 활성 변이체 또는 단편은 배양 배지에 첨가한다. LIF가 배양 배지에 첨가되는 경우, LIF는 포유동물, 설치류, 인간, 랫트 또는 마우스 기원을 포함하는 임의의 유기체로부터 기원할 수 있다. 하나의 구현예에서, 배양 배지에 존재하는 LIF는 마우스 기원이다. 여전히 추가의 구현예에서, 상기 마우스 LIF 폴리펩타이드는 서열번호 9에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 다른 구현예에서, 서열번호 9에 제시된 마우스 LIF 폴리펩타이드의 활성 변이체 또는 단편이 사용될 수 있다. 상기 활성 변이체 및 단편(서열번호 9와 적어도 75%, 80%, 85% 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%,또는 99% 서열 동일성을 갖는 활성 변이체를 포함하는): 가 본원에서 기타 다른 곳에서 추가로 상세히 논의된다.

[0464] 특정 구현예에서, 본원에 제공된 랫트 ES 세포 및 랫트 ES 세포주는 파라크린 LIF 시그날 전달 요구 없이 *시험관내* 만능성을 유지한다.

[0465] 특정 구현예에서, LIF 또는 이의 활성 변이체 또는 단편은 랫트 ES 세포를 유지하는 임의의 농도로 배양 배지에 존재한다. LIF 폴리펩타이드 또는 이의 활성 변이체 또는 단편은 배양 배지에 약 25U/ml 내지 약 50U/ml, 약 50U/ml 내지 약 100U/ml, 약 100U/ml 내지 약 125U/ml, 약 125U/ml 내지 약 150U/ml, 약 150U/ml 내지 약 175U/ml, 약 175U/ml 내지 약 200U/ml, 약 200U/ml 내지 약 225U/ml, 약 225U/ml 내지 약 250U/ml, 약 250U/ml 내지 약 300U/ml, 약 300U/ml 내지 약 325U/ml, 약 325U/ml 내지 약 350U/ml, 약 350U/ml 내지 약 400U/ml, 약 400U/ml 내지 약 425U/ml, 약 425U/ml 내지 약 450U/ml, 약 450U/ml 내지 약 475U/ml, 약 475U/ml 내지 약 500U/ml, 약 75U/ml 내지 약 500U/ml 이상으로 존재한다. 다른 구현예에서, LIF 폴리펩타이드 또는 이의 활성 변이체 또는 단편은 배양 배지에 약 25U/ml 내지 약 50U/ml, 약 25U/ml 내지 약 100U/ml, 약 75U/ml 내지 약 125U/ml, 약 50U/ml 내지 약 150U/ml, 약 90U/ml 내지 약 125U/ml, 약 90U/ml 내지 약 110U/ml, 약 80U/ml 내지 약 150U/ml, 또는 약 80U/ml 내지 약 125U/ml로 존재한다. 특정 구현예에서, LIF 폴리펩타이드 또는 이의 변이체 또는 단편은 배양 배지에 약 100U/ml로 존재한다.

[0466] 마우스 LIF가 사용되는 경우, 마우스 LIF 폴리펩타이드 또는 이의 활성 변이체 또는 단편은 랫트 ES 세포를 유지시키는 임의의 농도로 배양 배지에 존재한다. 마우스 LIF 폴리펩타이드 또는 이의 활성 변이체 또는 단편은 약 25U/ml 내지 약 50U/ml, 약 50U/ml 내지 약 100U/ml, 약 100U/ml 내지 약 125U/ml, 약 125U/ml 내지 약 150U/ml, 약 150U/ml 내지 약 175U/ml, 약 175U/ml 내지 약 200U/ml, 약 200U/ml 내지 약 225U/ml, 약 225U/ml 내지 약 250U/ml, 약 250U/ml 내지 약 300U/ml, 약 300U/ml 내지 약 325U/ml, 약 325U/ml 내지 약 350U/ml, 약 350U/ml 내지 약 400U/ml, 약 400U/ml 내지 약 425U/ml, 약 425U/ml 내지 약 450U/ml, 약 450U/ml 내지 약 475U/ml, 약 475U/ml 내지 약 500U/ml, 약 75U/ml 내지 약 500U/ml 이상으로 존재한다. 다른 구현예에서, 마우스 LIF 폴리펩타이드 또는 이의 활성 변이체 또는 단편은 약 25U/ml 내지 약 50U/ml, 약 25U/ml 내지 약 100U/ml, 약 75U/ml 내지 약 125U/ml, 약 50U/ml 내지 약 150U/ml, 약 90U/ml 내지 약 125U/ml, 약 90U/ml 내지 약 110U/ml, 약 80U/ml 내지 약 150U/ml, 또는 약 80U/ml 내지 약 125U/ml로 존재한다. 특정 구현예에서, 마우스 LIF 폴리펩타이드 또는 이의 활성 변이체 또는 단편은 배양 배지에 약 100U/ml으로 존재한다.

[0467] 사용되는 배양 배지는 랫트 ES 세포를 유지한다. 이와 같이, 특정 구현예에서, 다양한 방법 및 조성물에 사용되는 배양 배지는 적어도 5, 10 또는 15회 계대 기간 동안 세포주에서 거의 대부분(즉, 50% 이상)의 랫트 ES 세포의 만능을 유지시킨다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는 만능을 유지시키는 것을 도와주는 하나 이상의 화합물들을 포함한다. 하나의 구현예에서, 배양 배지는 MEK 경로 억제제 및 글리코겐 신타제 키나제-3 (GSK-3)억제제를 포함한다. 상기 배지는 예를 들어, FGF 수용체 억제제, ROCK 억제제, 및/또는 ALK (TGFb 수용체) 억제제를 포함하는, ES 세포를 유지시키는 것을 도와주는 추가의 성분들을 추가로 포함할 수 있다. FGF 수용체 억제제의 비제한적인 예는 PD184352를 포함한다. ROCK 억제제의 비제한적인 예는 Y-27632를 포함하고, ALK (TGFb 수용체) 억제제의 비제한적인 예는 A-83-01을 포함한다. 특정 구현예에서, 2i 배지는 냉동보존된 rESC를 해동하거나 트립신으로 해리시킨 후 rESC를 재분주하는 경우 10 uM ROCKi로 사용된다.

[0468] 다른 구현예에서, 배지는 MEK 경로 억제제 및 글리코겐 신타제 키나제-3 (GSK-3) 억제제로 이루어진 억제제의 조합을 포함한다.

[0469] 하나의 비제한적인 구현예에서, 배양 배지는 CHIR99021을 포함하는 GSK-3 억제제를 포함하고/하거나 PD0325901를 포함하는 MEK 억제제를 포함한다. 다른 구현예에서, 배지는 CHIR99021 및 PD0325901로 이루어진 억제제의 조합을 포함한다. 이들 화합물 중 어느 하나는 예를 들어, 제조원(Stemgent)으로부터 수득할 수 있다. 특정 구현예에서, CHIR99021은 배양 배지에 약 0.5μ 내지 약 3μM, 약 0.5μ 내지 약 3.5 μM, 약 0.5μM 내지 약 4 μM, 약 0.5μM 내지 약 1μM, 약 1μM 내지 약 1.5μM, 약 1.5μM 내지 약 2 μM, 약 2 μM 내지 약 2.5 μM, 약 2.5 내지 약 3μM, 3 μM 내지 약 3.5 μM의 농도로 존재한다. 추가의 구현예에서, CHIR99021은 배양 배지에 약 3μM의 농도로 존재한다. 다른 구현예에서, PD0325901은 배양 배지에 약 0.4 μM 내지 약 1uM, 약 0.4 μM 내지 약 1.5 uM, 약 0.4 μM 내지 약 2 μM, 약 0.4 μM 내지 약 0.8 μM, 0.8μM 내지 약 1.2 μM, 약 1.2 내지 약 1.5 μM의 농도로 존재한다. 추가의 구현예에서, PD0325901은 배양 배지에 약 1μM의 농도로 존재한다. 특정 구현예에서, CHIR99021은 배양 배지에 약 3 μM의 농도로 존재하고, PD0325901은 약 1μM의 농도로 존재한다.

[0470] 하나의 비제한적인 구현예에서, 본원에 기재된 다양한 방법 및 조성물에 사용되는 배양 배지는 DMEM/F12 기저 배지 (1x (50%)의 농도); 신경기저 배지 (/g1>1x (50%)의 농도); 페니실린/스트렙토마이신(1%의 농도); L-글루타민(4mM의 농도); 2-머캅토에탄올 (0.1 mM의 농도); N2 보충물 (1x의 농도); B27 보충물 (1x의 농도); LIF (100U/ml의 농도); PD0325901 (MEK 억제제) (1mM)의 농도) 및 CHIR99021 (GSK 억제제) (3 mM의 농도)를 포함하는 2i 배지이다.

[0471] 사용될 수 있는 추가의 배지는 문헌[참조: 이용될 수 있는 추가 배지는 하기에서 개시된 것을 포함한다: Li 등 (2008) *Cell* 135:1299-1310, Yamamoto 등 (2012) *Transgenic Rats* 21:743-755, Ueda 등 (2008) *PLoS ONE* 3(6):e2800, Meek 등 (2010) *PLoS ONE* 4 (12): e14225; Tong 등 (2010) *Nature* 467:211-213; US Patent Publication 2012/0142092, Buehr 등 (2008) Cell 135:1287-1298, Li 등 (135) *Cell* 1299-1310, 이의 각각의 전문이 본원에 참조로서 인용된다]에 기재된 것들을 포함한다. 상기 배지를 사용하는 경우, LIF의 농도 및 공급원은 본원에 명시된 바와 같이 변형시킬 수 있다. 특정 구현예에서, 다양한 배양 배지는 마우스 LIF 또는 이의 활성 변이체 또는 단편과 조합하여 사용되고, 심지어 추가의 구현예에서, 다양한 배양 배지는 약 50U/ml 내지 약 100U/ml, 약 50U/ml 내지 약 150U/ml, 또는 약 100U/ml의 농도로 마우스 LIF, 또는 이의 활성 변이체 또는 단편을 포함한다.

[0472] ES 세포주의 생산 및 ES 주의 배양 및 유지 둘다를 위한 랫트 ES 세포의 배양 온도는 전형적으로 약 35 ℃ 내지

약 37.5 ℃이다. 특정 구현예에서, 상기 온도는 37.0 ℃이다. 상기 배양은 전형적으로 7.5% CO_2에서 수행된다.

[0473] 7. 서열 동일성

[0474] 본원에 제공된 방법 및 조성물은 표적화된 게놈 통합 시스템의 다양한 상이한 성분들 (즉, 뉴클레아제 제제, 인지 부위, 삽입 핵산, 목적하는 폴리뉴클레오타이드, 표적화 벡터, 선택 마커 및 다른 성분들)을 사용한다. 본원 기재 전반에 걸쳐 표적화된 게놈 통합 시스템의 일부 성분들은 활성 변이체 및 단편을 가질 수 있는 것으로 인지된다. 상기 성분들은 예를 들어, 뉴클레아제 제제 (즉, 가공된 뉴클레아제 제제), 뉴클레아제 제제 인지 부위, 목적하는 폴리뉴클레오타이드, 표적 부위 및 표적화 벡터의 상응하는 상동성 아암을 포함한다. 이들 성분들 각각에 대한 생물학적 활성은 본원에서 기타 다른 곳에 기재되어 있다.

[0475] 본원에 사용된 바와 같은, 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열과 관련하여 "서열 동일성" 또는 "동일성"은 2개의 서열에서 잔기들이 특정 비교 창상에 최대 상응하도록 정렬되는 경우 동일한 것을 언급한다. 서열 동일성%는 단백질 참조로 사용되는 경우, 동일하지 않은 잔기 위치들이 흔히 보존성 아미노산 치환으로 차이가 있는 것으로 인지되고, 여기서, 아미노산 잔기들은 유사한 화학적 성질(예를 들어, 전하 또는 소수성)을 갖는 다른 아미노산 잔기들로 치환되고 따라서 분자의 기능성 성질들을 변화시키지 않는다. 서열이 보존성 치환으로 차이가 있는 경우, % 서열 동일성은 치환의 보존성 성질에 대해 보정하기 위해 상향 조정될 수 있다. 상기 보존성 치환이 차이가 있는 서열은 "서열 유사성" 또는 "유사성"을 갖는 것으로 일컬어진다. 상기 조정하기 위한 수단은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 전형적으로 이것은 보존성 치환을 완전한 미스매치 보다는 부분적으로 스코어링하여 % 서열 동일성을 증가시킨다. 따라서, 예를 들어, 동일한 아미노산이 있는 경우 1의 스코어가 주어지고 비-보존성 치환은 제로 스코어이고 보존성 치환은 0 내지 1의 스코어이다. 보존성 치환의 스코어링은 예를 들어, 프로그램 PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California)에서 수행되는 바와 같이 계산된다.

[0476] 본원에 사용된 바와 같은, "서열 동일성 %"는 비교 창상에 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교함에 의해 결정된 값을 의미하고, 여기서 상기 비교 창내 폴리뉴클레오타이드 서열 부분은 2개의 서열의 최적의 정렬에 대해 표준 서열(첨가 또는 결실을 포함하지 않는)과 비교하여 첨가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. %는 매칭된 위치의 수를 산출하기 위해 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기들이 양 서열에 존재하는 위치의 수를 결정하고 매칭된 위치의 수를 비교 창내 총 위치의 수로 나누고 상기 결과에 100을 곱하여 서열 동일성의 %를 산출함에 의해 계산된다.

[0477] 달리 진술되지 않는 경우, 본원에 제공된 서열 동일성/유사성 값은 하기의 파라미터를 사용하는 GAP 버젼 10을 사용하여 수득된 값을 언급한다: GAP 50의 GAP 중량 및 3의 길이 중량 및 nwsgapdna.cmp 스코어링 매트릭스를 사용한 뉴클레오타이드 서열에 대해 % 동일성 및 % 유사성, 8의 GAP 중량, 2의 길이 중량, 및 BLOSUM62 스코어링 매트릭스 또는 이의 균등한 프로그램. "균등한 프로그램"은 미지의 임의의 2개의 서열에 대하여 GAP 버젼 10에 의해 생성된 상응하는 정렬과 비교하여 동일한 뉴클레오타이드 또는 아미노산 잔기 매칭 및 동일한 % 서열 동일성을 갖는 정렬을 생성시키는 임의의 서열 비교 프로그램을 의미한다.

[0478] 달리 정의되지 않는 경우, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업자에 의해 통상적으로 이해되는바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된바와 유사하거나 균등한 임의의 방법 및 물질이 기재된 발명의 관행 또는 시험에 사용될 수 있을지라도 바람직한 방법 및 물질이 지금 기재된다. 본원에 언급된 모든 공보는 공보가 인용한 것과 연계하여 방법 및/또는 물질을 기재하고 기술하기 위해 본원에 참조로서 인용된다.

[0479] 본원에 사용되고 첨부된 특허청구범위에 사용된 바와 같은 단수 형태 "a", "and", 및 "the"는 달리 명백히 진술하지 않는 경우 복수에 대한 언급을 포함한다. 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 동일한 의미를 갖는다.

[0480] 본원에 기재된 공보는 본 출원의 출원일 전에 유일하게 이들의 기재에 대해서만 제공된다. 본원에서 어떠한 것도 기재된 발명이 이전 발명에 의해 상기 공보가 보다 앞서 있음을 인정하는 것으로 해석되지 말아야 한다. 추가로, 제공된 공보의 날짜는 독립적으로 확인할 필요가 있을 수 있는 실제 공보와는 상이할 수 있다.

[0481] 상기된 발명은 취지 또는 이의 필수 특징으로부터 벗어나는 것 없이 다른 특정 형태로 구현될 수 있고 따라서 본 발명의 범위를 지정하는 것으로서 이전의 명세서 보다는 첨부된 특허청구범위에 의해 언급되어야만 한다.

[0482] 비제한 구현예는 하기를 포함한다:

[0483] 1. 만능 랫트 세포 중 관심 유전자 좌위의 표적화된 변형 방법으로서, (a) 상기 만능 랫트 세포에, 5' 랫트 상동성 아암 및 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 큰 표적 벡터 (LTVEC)을 도입하는 단계로서, 상기 상기 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 적어도 10 kb이지만 150kb 미만인 단계; 및 (b) 상기 관심 유전자 좌위에서 상기 표적화된 유전자 변형을 포함하는 유전적으로 변형된 만능 랫트 세포를 확인하는 단계를 포함하고, 상기 표적화된 유전자 변형은 생식계열을 통해 전달될 수 있는 방법.

[0484] 2. 구현예 1에 있어서, 상기 표적화된 유전자 변형은 2 개의 대립유전자인 방법.

[0485] 3. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 랫트 배아 줄기 (ES) 세포인 방법.

[0486] 4. 구현예 1, 2 또는 3 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 DA 균주 또는 ACI 균주로부터 유도되는 방법.

[0487] 5. 구현예 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 Dnmt3L, Eras, Err-베타, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF 수용체, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1, 또는 이들의 조합을 포함하는 적어도 하나의 만능분화능 마커의 발현을 특징으로 하는 방법.

[0488] 6. 구현예 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 하기 특성 중 하나 이상을 특징으로 하는 방법:

[0489] (a) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음; (b) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 중배엽 마커의 발현 없음; (c) Gata6, Sox17 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현 없음; 또는 (d) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음.

[0490] 7. 구현예 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 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 150kb인 방법.

[0491] 8. 구현예 1 내지 6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 약 16Kb 내지 약 150Kb인 방법.

[0492] 9. 구현예 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 방법: (a) 상동성 또는 이종상동성 핵산 서열에 의한 내인성 랫트 핵산 서열의 치환; (b) 내인성 랫트 핵산 서열의 결실; (c) 내인성 랫트 핵산 서열의 결실로서, 상기 결실은 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 또는 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 약 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 또는 약 2.5Mb 내지 약 3Mb 범위인 결실; (d) 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb 범위의 외인성 핵산 서열; (e) 상동성 또는 이종상동성 핵산 서열를 포함하는 외인성 핵산 서열; (f) 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 키메라성 핵산 서열; (g) 부위-특이적인 재조합효소 표적 서열로 플랭킹된 조건적 대립유전자; 또는 (h) 랫트 세포에서 프로모터 활성에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자.

[0493] 10. 구현예 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 관심 유전자 좌위는 (i) 5' 랫트 상동성 아암에 대해 상보적인 제1 핵산 서열; 및 (ii) 3' 랫트 상동성 아암에 대해 상보적인 제2 핵산 서열을 포함하는 방법.

[0494] 11. 구현예 10에 있어서, 상기 제1 및 제2 핵산 서열은 적어도 5kb이지만 3Mb 미만까지 분리되는 방법.

[0495] 12. 구현예 10에 있어서, 상기 제1 및 제2 핵산 서열은 적어도 5kb이지만 10kb 미만, 적어도 10kb이지만 20kb 미만, 적어도 20kb이지만 40kb 미만, 적어도 40kb이지만 60kb 미만, 적어도 60kb이지만 80kb 미만, 적어도 약 80kb이지만 100kb 미만, 적어도 100kb이지만 150kb 미만, 또는 적어도 150kb이지만 200kb 미만, 적어도 약 200kb이지만 약 300kb 미만, 적어도 약 300kb이지만 약 400kb 미만, 적어도 약 400kb이지만 약 500kb 미만, 적어도 약 500kb이지만 약 1Mb 미만, 적어도 약 1Mb이지만 약 1.5Mb 미만, 적어도 약 1.5Mb이지만 약 2Mb 미만, 적어도 약 2Mb이지만 약 2.5Mb 미만, 또는 적어도 약 2.5Mb이지만 약 3Mb 미만까지 분리되는 방법.

[0496] 13. 구현예 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 도입은 추가로, 만능 랫트 세포에서 표적화 작제물과 관심 유전자 좌위 사이의 상동 재조합을 촉진하는 뉴클레아제를 인코딩하는 제2 핵산을 도입하는 것을 포함

하는 방법.

[0497] 14. 구현예 13에 있어서, 상기 뉴클레아제는 하기를 포함하는 방법: (a) FokI 엔도뉴클레아제에 융합된 아연 핑거-기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라성 단백질; 또는, (b) FokI 엔도뉴클레아제에 융합된 전사 활성제-유사 효과기 뉴클레아제 (TALEN)을 포함하는 키메라성 단백질.

[0498] 15. 구현예 1 내지 12 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 도입은 추가로, 만능 랫트 세포에 하기: (i) 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR)-연관된 (Cas) 단백질를 인코딩하는 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 제1 발현 작제물, (ii) RNA (gRNA)를 안내하기 위해 연결된 게놈 표적 서열에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 제2 발현 작제물를 도입하는 것을 포함하고, 상기 게놈 표적 서열은 프로토스페이서 인접한 모티프 (PAM) 서열에 의해 3' 말단 상에 즉시 플랭킹되는 방법.

[0499] 16. 구현예 15에 있어서, 상기 관심 유전자 좌위는 하기의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법: 서열번호: 1.

[0500] 17. 구현예 15 또는 16에 있어서, 상기 gRNA는 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR) RNA (crRNA) 및 트랜스-활성화 CRISPR RNA (tracrRNA)을 인코딩하는 제3 핵산 서열을 포함하는 방법.

[0501] 18. 구현예 15, 16 또는 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Cas 단백질은 Cas9인 방법.

[0502] 19. 구현예 15, 16, 17, 또는 18 중 어느 한 항에 있어서, 상기 gRNA은 하기를 포함하는 방법: (a) 하기의 핵산 서열의 키메라성 RNA: 서열번호: 2; 또는, (b) 하기의 핵산 서열의 키메라성 RNA: 서열번호: 3.

[0503] 20. 구현예 17에 있어서, 상기 crRNA는 하기를 포함하는 방법: 서열번호: 4; 서열번호: 5; 또는 서열번호: 6.

[0504] 21. 구현예 17에 있어서, 상기 tracrRNA는 하기를 포함하는 방법: 서열번호: 7 또는 서열번호: 8.

[0505] 22. 하기를 포함하는 변형된 랫트 유전자 좌위로서, (i) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열의 삽입; (ii) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 내인성 랫트 핵산 서열의 치환; 또는 (iii) 이들의 조합을 포함하고, 상기 변형된 랫트 유전자 좌위는 생식계열을 통해 전달될 수 있는, 변형된 랫트 유전자 좌위.

[0506] 23. 구현예 22에 있어서, 상기 삽입 또는 치환의 크기는 약 5kb 내지 약 400kb인 변형된 랫트 유전자 좌위.

[0507] 24. 구현예 22에 있어서, 상기 삽입 또는 치환의 크기는 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb인 랫트 유전자 좌위.

[0508] 25. 인간화된 랫트를 만드는 방법으로서, 상기 방법은, (a) 만능 랫트 세포 중 관심 유전자 좌위를 인간 핵산을 포함하는 표적화 작제물로 표적화하여 유전적으로 변형된 만능 랫트 세포를 형성하는 단계; (b) 상기 유전적으로 변형된 만능 랫트 세포를 숙주 랫트 배아에 도입하는 단계; 및 (c) 대리모에서 상기 숙주 랫트 배아를 잉태하는 단계로서; 상기 대리모는 하기를 포함하는 변형된 유전자 좌위를 포함하는 랫트 자손을 생산하는 단계: (i) 인간 핵산 서열의 삽입; (ii) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 관심 유전자 좌위에 있는 랫트 핵산 서열의 치환; (iii) 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 키메라성 핵산 서열; 또는 (iv) 이들의 조합, 상기 변형된 유전자 좌위는 생식계열을 통해 전달될 수 있다.

[0509] 26. 구현예 25에 있어서, 상기 표적화 작제물은 큰 표적 벡터 (LTVEC)이고, 그리고 상기 LTVEC의 5' 및 3' 상동 아암의 총계는 적어도 10 kb이지만 150kb 미만인 방법.

[0510] 27. 구현예 26에 있어서, 상기 표적화 작제물의 5' 및 3' 상동의 총계는 약 10kb 내지 약 30kb, 약 20kb 내지 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 또는 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 120kb, 또는 약 120kb 내지 150kb인 방법.

[0511] 28. 구현예 25, 26 또는 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 핵산 서열은 적어도 5kb이지만 400kb 미만인 방법.

[0512] 29. 구현예 25, 26, 또는 27 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인간 핵산 서열은 적어도 5kb이지만 10kb 미만, 적어도 10kb이지만 20kb 미만, 적어도 20kb이지만 40kb 미만, 적어도 40kb이지만 60kb 미만, 적어도 60kb이지만 80kb 미만, 적어도 약 80kb이지만 100kb 미만, 적어도 100kb이지만 150kb 미만, 적어도 150kb이지만 200kb 미만, 적어도 200kb이지만 250kb 미만, 적어도 250kb이지만 300kb 미만, 적어도 300kb이지만 350kb 미만, 또는 적어도 350kb이지만 400kb 미만인 방법.

[0513] 30. 구현예 25 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 랫트 배아 줄기 (ES) 세포인 방법.

[0514] 31. 구현예 25 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 DA 균주 또는 ACI 균주로부터 유도되는 방법.

[0515] 32. 구현예 25 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 Dnmt3L, Eras, Err-베타, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF 수용체, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1, 또는 이들의 조합을 포함하는 적어도 하나의 만능분화능 마커의 발현을 특징으로 하는 방법.

[0516] 33. 구현예 25 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 하기 특징 중 하나 이상을 특징으로 방법: (a) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음; (b) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 1 이상 중배엽 마커의 발현 없음; (c) Gata6, Sox17, 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현의 없음; 또는 (d) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음.

[0517] 34. 인간화된 유전자 좌위를 포함하는 변형된 랫트로서, 상기 인간화된 유전자 좌위은 하기: (i) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열의 삽입; (ii) 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산 서열에 의한 내인성 유전자 좌위에 있는 랫트 핵산 서열의 치환; (iii) 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 키메라성 핵산 서열, 또는 (iv) 이들의 조합을 포함하고, 상기 인간화된 유전자 좌위는 생식계열을 통해 전달될 수 있는 변형된 랫트.

[0518] 35. 그것의 유전자 좌위에서, 표적화된 유전자 변형을 포함하는 랫트 또는 랫트 세포로서, 상기 유전자 좌위는 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, ApoE 좌위, Rag1 좌위, Rag2 좌위, 또는 Rag2/Rag1 좌위이고, 상기 표적화된 유전자 변형은 하기: (a) 유전자 좌위에서 내인성 랫트 핵산 서열의 결실; (b) 인간 및 랫트 핵산 서열을 포함하는 상동 핵산, 이종상동성 핵산, 또는 키메라성 핵산의 삽입, 또는 (c) 이들의 조합을 포함하고, 상기 표적화된 유전자 변형은 랫트, 또는 랫트 세포로부터 전파된 랫트의 생식계열을 통해 전달가능한 랫트 또는 랫트 세포.

[0519] 36. 구현예 35에 있어서, (a) 상기 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산의 결실은 적어도 약 10kb이거나; 또는, (b) 상기 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산의 결실은 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 또는 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 약 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 또는 약 2.5Mb 내지 약 3Mb이고; (c) 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 적어도 약 5 kb이거나; 또는, (d) 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb인 랫트 또는 랫트 세포.

[0520] 37. 구현예 35 또는 36에 있어서, (a) 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 인터루킨-2 수용체 감마 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고; (b) 상기 ApoE 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 ApoE 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고; (c) 상기 Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag1 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고; (d) 상기 Rag2 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag2 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되거나; 또는, (e) 상기 Rag2/Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag2 단백질 활성 및 Rag1 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되는 랫트 또는 랫트 세포.

[0521] 38. 구현예 35, 36, 또는 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 랫트 또는 랫트 세포: (a) 전체 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; (b) 인간 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분에 의한 전체 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분의 치환; (c) 인간 인터루킨-2 수용체 감마의 엑토-도메인에 의한 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역의 엑토-도메인의 치환; 또는, (d) 인터루킨-2 수용체 감마 좌위의 적어도 3 kb 결실.

[0522] 39. 구현예 35 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ApoE 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 랫트 또는 랫트 세포: (a) 전체 ApoE 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는, (b) ApoE 코딩 영역을 포함하는 ApoE 좌위의 적어도 1.8 kb 결실.

[0523] 40. 구현예 35 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Rag2 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 랫트 또는 랫트 세포: (a) 전체 Rag2 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; (b) Rag2 코딩 영역을 포함하는 Rag2

좌위의 적어도 5.7 kb 결실.

[0524] 41. 구현예 35 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Rag2/Rag1 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 랫트 또는 랫트 세포: (a) 전체 Rag2 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실 및 전체 Rag1 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는, (d) Rag2 코딩 영역을 포함하는 Rag2/Rag1 좌위의 적어도 16 kb의 결실.

[0525] 42. 구현예 35 내지 41 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화된 유전자 변형은 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, ApoE 좌위, Rag1 좌위, Rag2 좌위, 또는 Rag2/Rag1 좌위에서 선택적 마커를 포함하는 발현 카세트의 삽입을 포함하는 랫트 또는 랫트.

[0526] 43. 구현예 42에 있어서, 상기 발현 카세트는 유전자 좌위에서 내인성 프로모터에 작동가능하게 연결된 lacZ 유전자 및 선택적 마커에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 포함하는 랫트 또는 랫트 세포.

[0527] 44. 구현예 35 내지 43 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, ApoE 좌위, Rag1 좌위, Rag2 좌위 또는 Rag2/Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 자가-결실 선택 카세트의 삽입을 포함하는 랫트 또는 랫트 세포.

[0528] 45. 구현예 44에 있어서, 상기 자가-결실 선택 카세트는 랫트 세포에서 프로모터 활성에 작동가능하게 연결된 선택적 마커 유전자 및 수컷 생식 세포 특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 재조합효소 유전자를 포함하고, 상기 자가-결실 카세트는 재조합효소에 의해 인식된 재조합 인식 부위에 의해 플랭킹되는 랫트 또는 랫트 세포.

[0529] 46. 구현예 45에 있어서, (a) 상기 수컷 생식 세포 특이적 프로모터는 프로타민-1 프로모터이거나; 또는, (b) 상기 재조합효소 유전자는 Cre를 인코딩하고, 상기 재조합 인식 부위는 loxP 부위인 랫트 또는 랫트 세포.

[0530] 47. 구현예 35 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 내인성 인터루킨-2 수용체 감마 프로모터, 내인성 ApoE 프로모터, 내인성 Rag1 프로모터, 또는 내인성 Rag2 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 핵산을 포함하는 랫트 또는 랫트 세포.

[0531] 48. 구현예 47에 있어서, 상기 리포터 핵산은 하기를 포함하는 리포터를 인코딩하는 랫트 또는 랫트 세포: β-갈락토시다아제, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, 증대된 황색 형광성 단백질 (EYFP), 에메랄드, 증대된 녹색 형광 단백질 (EGFP), CyPet, 청록색 형광 단백질 (CFP), 셀루리안, T-사파이어, 루시퍼라아제, 알칼리성 포스파타제, 또는 이들의 조합.

[0532] 49. 구현예 35 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 랫트 세포는 만능 랫트 세포 또는 랫트 배아 줄기 (ES) 세포인 랫트 세포.

[0533] 50. 구현예 49에 있어서, 상기 만능 랫트 세포 또는 상기 랫트 배아 줄기 (ES) 세포는, (a) DA 균주 또는 ACI 균주로부터 유도되고; (b) Dnmt3L, Eras, Err-베타, Fbxo15, Fgf4, Gdf3, Klf4, Lef1, LIF 수용체, Lin28, Nanog, Oct4, Sox15, Sox2, Utf1, 또는 이들의 조합을 포함하는 적어도 하나의 만능분화능 마커의 발현을 특징으로 하거나; 또는 (c) 하기 특성 중 하나 이상을 특징으로 하는 랫트 세포: (i) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음; (ii) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 중배엽 마커의 발현 없음; (iii) Gata6, Sox17 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현 없음; 또는 (iv) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음.

[0534] 51. 만능 랫트 세포에서 인터루킨-2 수용체 감마 좌위, ApoE 좌위, Rag1 좌위, Rag2 좌위 또는 Rag2/Rag1 좌위 중 표적 유전자 좌위를 변형시키는 방법으로서, 상기 방법은, (a) 상기 만능 랫트 세포에 표적 유전자 좌위와 상동인 5' 및 3' 랫트 상동 아암으로 플랭킹된 삽입 핵산을 포함하는 표적화 벡터를 도입하는 단계, (b) 표적 유전자 좌위에서 표적화된 유전자 변형을 포함하는 유전적으로 변형된 만능 랫트 세포를 확인하는 단계를 포함하고, 상기 표적화된 유전자 변형은 만능 랫트 세포로부터 전파된 랫트의 생식계열을 통해 전달될 수 있는 방법.

[0535] 52. 구현예 51에 있어서, 상기 표적화 벡터는 큰 표적 벡터 (LTVEC)이고, 상기 5' 및 3' 랫트 상동성 아암의 총 계는 적어도 약 10kb이지만, 약 150kb 미만인 방법.

[0536] 53. 구현예 51 또는 52에 있어서, 표적화 벡터의 만능 랫트 세포로의 도입은 하기를 초래하는 방법: (i) 표적 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산 서열의 결실; (ii) 표적 유전자 좌위에서의 외인성 핵산 서열의 서열; 또는 (iii) 이들의 조합.

[0537] 54. 구현예 53에 있어서, (a) 상기 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산의 결실은 적어도 약 10 kb이거나;

또는, (b) 상기 유전자 좌위에서의 내인성 랫트 핵산의 결실은 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 또는 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 약 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 또는 약 2.5Mb 내지 약 3Mb이고; (c) 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 적어도 약 5 kb이거나; 또는, (d) 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb인 방법.

[0538] 55. 구현예 51 또는 54에 있어서, (a) 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 인터루킨-2 수용체 감마 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고; (b) 상기 ApoE 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 ApoE 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고; (c) 상기 Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag1 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되고; (d) 상기 Rag2 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag2 단백질 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되거나; 또는, (e) 상기 Rag2/Rag1 좌위에서의 표적화된 유전자 변형은 Rag2 단백질 활성 및 i Rag1 활성의 존재 또는 부재에서 감소하게 되는 랫트 또는 랫트 세포.

[0539] 56. 구현예 51 내지 54 중 어느 한 항에 있어서, 상기 인터루킨-2 수용체 감마 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 방법: (a) 전체 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; (b) 인간 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분에 의한 전체 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역 또는 그것의 부분의 치환; (c) 인간 인터루킨-2 수용체 감마의 엑토-도메인에 의한 랫트 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역의 엑토-도메인의 치환; 또는, (d) 인터루킨-2 수용체 감마 코딩 영역을 포함하는 인터루킨-2 수용체 감마 좌위의 적어도 3 kb 결실.

[0540] 57. 구현예 51 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 상기 ApoE 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 방법: (a) 전체 ApoE 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는, (b) ApoE 코딩 영역을 포함하는 ApoE 좌위의 적어도 1.8 kb 결실.

[0541] 58. 구현예 51 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Rag2 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 방법: (a) 전체 Rag2 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는 (b) Rag2 코딩 영역을 포함하는 Rag2 좌위의 적어도 5.7 kb 결실.

[0542] 59. 구현예 51 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 상기 Rag1/Rag2 좌위의 표적화된 유전자 변형은 하기를 포함하는 방법: (a) 전체 Rag2 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실 및 전체 Rag1 코딩 영역 또는 그것의 부분의 결실; 또는, (b) Rag2 및 Rag1 코딩 영역을 포함하는 Rag2/Rag1 좌위의 적어도 16 kb의 결실.

[0543] 60. 구현예 51 내지 59 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입 핵산은 선택적 마커를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 방법.

[0544] 61. 구현예 60에 있어서, 상기 발현 카세트는 유전자 좌위에서 내인성 프로모터에 작동가능하게 연결된 lacZ 유전자 및 선택적 마커 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 포함하는 방법.

[0545] 62. 구현예 51 내지 60 중 어느 한 항에 있어서, 상기 삽입 핵산은 자가-결실 선택 카세트를 포함하는 방법.

[0546] 63. 구현예 62에 있어서, 상기 자가-결실 선택 카세트 랫트 만능 세포에서 프로모터 활성에 작동가능하게 연결된 선택적 마커 및 수컷 생식 세포 특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 재조합효소를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 자가-결실 카세트는 재조합효소에 의해 인식된 재조합 인식 부위에 의해 플랭킹되는 방법.

[0547] 64. 구현예 63에 있어서, (a) 상기 수컷 생식 세포 특이적 프로모터는 프로타민-1 프로모터이거나; 또는, (b) 상기 재조합효소 유전자는 Cre을 인코딩하고 상기 재조합 인식 부위는 loxP 부위인 방법.

[0548] 65. 구현예 53에 있어서, 상기 유전자 좌위에서 외인성 핵산 서열의 삽입은 내인성 인터루킨-2 수용체 감마 프로모터, 내인성 ApoE 프로모터, 내인성 Rag1 프로모터, 또는 내인성 Rag2 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 핵산 서열을 포함하는 방법.

[0549] 66. 구현예 65에 있어서, 상기 리포터 핵산 서열은 하기를 포함하는 리포터를 인코딩하는 방법: β-갈락토시다아제, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, 증대된

황색 형광성 단백질 (EYFP), 에메랄드, 증대된 녹색 형광 단백질 (EGFP), CyPet, 청록색 형광 단백질 (CFP), 셀루리안, T-사파이어, 루시퍼라아제, 알칼리성 포스파타제, 또는 이들의 조합.

[0550] 67. 구현예 51 내지 66 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는 랫트 배아 줄기 (ES) 세포인 방법.

[0551] 68. 구현예 51 내지 67 중 어느 한 항에 있어서, 상기 만능 랫트 세포는, (a) DA 균주 또는 ACI 균주로부터 유도되거나; 또는, (b) Oct-4, Sox-2, 알칼리성 포스파타제, 또는 이들의 조합을 포함하는 만능분화능 마커의 발현을 특징으로 하거나; 또는, (c) 하기 특성 중 하나 이상을 특징으로 하는 방법: (i) c-Myc, Ecat1, 및/또는 Rexo1을 포함하는 1 이상의 만능분화능 마커의 발현 없음; (ii) 브라큐리 및/또는 Bmpr2를 포함하는 중배엽 마커의 발현 없음; (iii) Gata6, Sox17 및/또는 Sox7을 포함하는 1 이상의 내배엽 마커의 발현 없음; 또는 (iv) 네스틴 및/또는 Pax6을 포함하는 1 이상의 신경 마커의 발현 없음.

[0552] 69. 구현예 51 내지 68 중 어느 한 항에 있어서, 표적 유전자 좌위에서 표적화된 유전자 변형을 확인하는 단계를 추가로 포함하고, 상기 확인 단계는 표적 유전자 좌위에서 대립유전자 (MOA)의 변형을 평가하는 정량적 검정을 이용하는 방법.

[0553] 70. 구현예 51 내지 69 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 도입은 추가로, 만능 랫트 세포에서 표적화 벡터와 표적 유전자 좌위 사이의 상동 재조합을 촉진하는 뉴클레아제를 인코딩하는 제2 핵산을 포함하는 방법.

[0554] 71. 구현예 70에 있어서, 상기 뉴클레아제는 FokI 엔도뉴클레아제에 융합된 아연 핑거-기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라성 단백질을 포함하는 방법.

[0555] 72. 구현예 71에 있어서, 상기 방법은 표적 유전자 좌위의 2 개의 대립유전자 변형을 생기게 하는 방법.

[0556] 73. 구현예 51 내지 70 중 어느 한 항에 있어서, 단계 (a)의 도입은 추가로, 만능 랫트 세포에 하기: (i) 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR)-연관된 (Cas) 단백질를 인코딩하는 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 제1 발현 작제물, (ii) RNA (gRNA)를 안내하기 위해 연결된 게놈 표적 서열에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 제2 발현 작제물을 도입하는 것을 포함하고, 상기 게놈 표적 서열은 프로토스페이서 인접한 모티프 (PAM) 서열에 의해 3' 말단 상에 즉시 플랭킹되는 방법.

[0557] 74. 구현예 73에 있어서,, 상기 관심 유전자 좌위는 하기의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 방법: 서열번호: 1.

[0558] 75. 구현예 73 또는 74에 있어서, 상기 gRNA는 군집형태의 규칙적으로 공간사이의 짧은 회귀성 반복체 (CRISPR) RNA (crRNA) 및 트랜스-활성화 CRISPR RNA (tracrRNA)을 인코딩하는 제3 핵산 서열을 포함하는 방법.

[0559] 76. 구현예 73에 있어서, 상기 Cas 단백질은 Cas9인 방법.

[0560] 77. 구현예 73, 74, 또는 75 중 어느 한 항에 있어서, 상기 gRNA은 하기를 포함하는 방법: (a) 하기의 핵산 서열의 키메라성 RNA: 서열번호: 2; 또는, (b) 하기의 핵산 서열의 키메라성 RNA: 서열번호: 3.

[0561] 78. 구현예 75에 있어서, 상기 crRNA는 하기를 포함하는 방법: 서열번호: 4; 서열번호: 5; 또는 서열번호: 6.

[0562] 79. 구현예 75에 있어서, 상기 tracrRNA는 하기를 포함하는 방법: 서열번호: 7 또는 서열번호: 8.

[0563] **실시예**

[0564] 하기의 실시예는 본 발명을 수행하고 사용하는 법에 대한 완전한 기재 및 내용을 당업자에게 제공하기 위해 제시되고 발명자가 이들의 발명으로 간주하는 것의 범위를 제한하고자 하는 것이 아니고 이들은 단지 수행된 실험을 나타내는 것으로 의도된다. 사용된 수치 (*예를 들어* 양, 온도, 등)와 관련하여 확실히 정확하게 하고자 노력했으나 일부 실험적 오차 및 편차가 고려되어야만 한다. 달리 지적되지 않는 경우, 부는 중량부이고. 분자량은 중량 평균 분자량이고, 온도는 섭씨 온도이고 압력은 대기압 또는 이의 근처이다.

[0565] **실시예 1. 랫트 ES 세포 유도 및 특징**

[0566] ***1.1. 랫트 ES 세포 특징***

[0567] 도 1에 보여지는 바와 같이, 랫트 ESC는 촘촘한 구형 콜로니로서 성장하고 이는 통상적으로 디쉬에서 탈착하여 부유한다 (클로즈-업, 도 7). 랫트 ESC는 Oct-4 (도 2a) 및 Sox2 (도 2b)를 포함하는 만능 마커를 발현하고 고수준의 알칼린 포스파타제(도 3, 좌측 패널)를 발현한다. 주 DA.2B에 대한 핵형은 42X,Y이다(도 3, 우측 패널). 랫트 ESC는 흔히 사배체가되고; 따라서, 세포주는 중기 염색체 분산질을 계산함에 의해 미리 스크리닝하고; 대

부분 정상의 계수를 갖는 세포주는 정식적으로 핵형 분류된다.

[0568] ACI 낭포는 상업적으로 구입된 과하게 배란된 암컷으로부터 수거하였다. DA 낭포는 상업적으로 구입된 동결된 8-세포 배아로부터 배양하였다. 투명대(zona pellucidae)를 산 티로데스로 제거하고; 낭포는 유사 분열적으로 불활성화된 MEF 상에 분주하였다. 성장된 것을 집어내고 표준 방법을 사용하여 증식시켰다. 모든 낭포를 분주하고 배양하여 2i 배지를 사용하여 증식시켰다 (문헌참조: Li 등 (2008) Germline competent embryonic stem cells derived from rat blastocysts, Cell 135:1299-1310; 전문이 본원에 참조로 인용됨).

표 1. 랫트 ES 세포 유도

	ACI	DA
배아 공급원	낭포 (과잉 배란)	낭포로 배양된 동결된 8-세포 배아
분주된 낭포:	107	22
성장된 것:	32 (배의 30%)	10 (배의 45%)
세포주:	16 (성장된 것의 50%)	9 (성장된 것의 90%)
핵형 분류된:	3; 모두 42X,Y	6: 3 42X,X 3 42X,Y
입증된 GLT:	1 (ACI.G1)	1 42X,X (DA.2C) 1 42X,Y (DA.2B)

[0569]

[0570] ***1.2. : 랫트 제조***

[0571] 키메라 랫트는 낭포 주사 및 랫트 ESC 게놈의 전달에 의해 제조하였다. 모 ACI.G1 랫트 ESC를 사용한 낭포 미세주사에 의해 제조된 키메라는 도 8에 나타낸다. 도 8에서 별표 (*) 로 표지된 ACI/SD 키메라가 출산한 알비노 한배 새끼와 함께 F1 아고우티 새끼는 도 9에 나타낸다.

[0572] **모 랫트 ESC의 생식선 전달.**

[0573] 3개의 정배수체 랫트 ESC 주는 알비노 SD 낭포로 미세주사함에 의해 만능성에 대해 평가하였다. 키메라는 랫트 ESC 기여를 지적하는 아고우티 코트 색상에 의해 동정하였다. 각각의 주에 대해, 대다수의 키메라는 rESC 게놈을 F1 후손으로 전달하였다(표 2).

표 2. 모 rESC의 생식선 전달

주	육종된 키메라	생식선 전달체	GLT 키메라로부터 총 새끼	rESC-유래된 새끼	GLT 효율 (%)
ACI.G1	5	3 (60%)	103	11	11
DA.2B	5	4 (80%)	129	11	9
DA.2C (XX)	3	2 (66%)	45	7	16

[0574]

[0575] ***1.3. : 랫트 배아 줄기 세포의 유도.***

[0576] 과잉 배란 프로토콜, 랫트

[0577] 0일: 임신 말 혈청을 주사함: IP, 20 U (0.4 ml).

[0578] 1일째: 어떠한 수행 없음

[0579] 2일째: (46시간 후): hCG, IP, 50 U (1 ml)를 주사함.

[0580] - 단일 암컷 짝짓기 셋업.

[0581] 3일째: 플러그 체크. 암컷을 플러그하였다. 이것은 0.5일째이다.

[0582] 6일째 (e3.5): 암컷 안락사 및 배아 세정.

[0583] ES 세포 유도 프로토콜 (과잉 배란)

[0584] 0일째:

[0585] 1) CO_2로 암컷 랫트 안락사.

[0586] 2) 70% 에탄올로 면봉 처리된 복부; 가위를 사용하여 복벽을 개방하여 내장 노출시킴.

[0587] 3) 난관 및 자궁각 절개하고 이들을 가온 N2B27 배지를 함유하는 조직 배양 디쉬에 위치시킨다. 가능한 한 많은 혈액을 세척하고 N2B27과 함께 새로운 디쉬에 전달하였다.

[0588] 4) 1 ml 시린지 및 블런트 27g 바늘을 사용하여, 배지에 자궁각 및 난관을 통해 배지를 세정하여 낭포를 배지에 이탈시킨다.

[0589] 5) 마우스 피펫으로 낭포를 수거하고 KSOM + 2i(1mMPD0325901, 3 mM CHIR99021)를 함유하는 배아 배양 디쉬에 전달한다. KSOM은 제조원(Millipore)에 의해 제조된 배양 배지이다. 카탈로그 번호는 MR-106-D이다.

[0590] 6) 37° 에서 밤새 배양함; 7.5% CO_2.

[0591] ES 세포 유도 프로토콜 (동결된 배아)

[0592] 0일째:

[0593] 1) 동결된 8-세포 배아(상업적으로 구입됨)를 M2 배지에 해동시킴. 실온에서 10분 배양함.

[0594] 2) KSOM + 2i로 전달 및 밤새 배양.

[0595] ES 세포 유도 프로토콜 (둘다 동일함)

[0596] 1일째:

[0597] 1)포획된 배아를 2i 배지로 옮기고 밤새 배양함.

[0598] 2) KSOM +2i에서 포획되지 않은 배아를 계속 배양함

[0599] 2일째:

[0600] 1)모든 남아있는 배아를 2i 배지로 옮김(이들이 포획되었는지에 상관없이).

[0601] 2) 밤새 배양함; 2i 배지에서 보다 이른 배아를 계속 배양함.

[0602] 3일째:

[0603] 1) 30 내지 60초 동안 산 티로데스를 사용하여 배아를 옮겨 투명대를 제거함.

[0604] 2) 2i 배지에서 배아를 3회 세척하여 산 티로데스를 제거함.

[0605] 3) 각각의 배아를 96-웰 공급 플레이트의 별도의 웰에 침적시킴 (상기 웰은 유사 분열적으로 불활성화된 마우스 배아 섬유아세포 (MEF)를 함유한다).

[0606] 4) 2i 배지에서 밤새 배양시킴.

[0607] 4-5일째:

[0608] 1) 성장한 것(무정형 미분화된 세포 매쓰)의 존재에 대해 분주된 배아를 모니터링함. 성장한 것을 분주된 배아 크기의 대략 2배가 된 경우 옮길 준비를 한다.

[0609] 2) 각각의 날: 미세피펫으로 소비된 배지를 제거하고 새로운 2i 배지로 치환함.

[0610] 3) 성장한 것을 새로운 공급 웰로 옮김:

[0611] a. 소비된 배지를 제거하고 PBS로 웰을 약하게 세척함.

[0612] b. PBS를 제거하고 30 μl 0.05% 트립신을 첨가하고; 10분 동안 항온처리함.

[0613] c. 30μl 2i + 10% FBS를 첨가하여 트립신 반응을 종결시킴.

[0614] d. 마이크로피펫터로 세포를 약하게 해리시키고 웰의 전체 내용물을 24웰 공급 플레이트내 새로운 웰로 옮김. 이것은 계대 1 (P1)이었다.

[0615] e) 2i 배지에서 밤새 배양시킴.

[0616] 5-8일째: (타이밍은 각각의 주가 얼마나 증식하는지에 의존함)

[0617] 1) 각각의 날에 배지를 바꾸고(2i 배지) ESC 형태를 갖는 콜로니의 존재에 대해 모니터링함.

[0618] 2) 콜로니가 나타나는 경우, 콜로니가 ~ 50% 컨플루언시로 증식할때까지 계속 배양함.

[0619] 3) 전과 같이 트립신처리하고 계대배양함; 공급체상에 분주함, 6-웰 디쉬에서 주 당 1웰. 이것은 계대 2 (P2)이었다.

[0620] 계속 진행:

[0621] 1) 계속 공급하고 대략 50% 컨플루언트할때까지 각각의 주를 모니터링함.

[0622] 2) 통상적인 바와 같이 세포를 트립신 처리함.

[0623] 3) 2i + 10% FBS로 트립신을 종료하고; 원심분리 (Beckman-Coulter tabletop 원심분리기에서 5', 1200rpm)에 의해 세포를 펠렛화함.

[0624] 4) 상등액을 흡인제거하고 세포를 400 μl 동결 배지 (70% 2i, 20% FBS, 10% DMSO)에 약하게 재현탁시킴.

[0625] 5) 세포를 2개의 바이엘에 분배하고 -80° 에서 동결시킴. 이것은 계대 3 (P3)이었다.

[0626] 6) 장기 보관을 위해, 바이엘을 액체 N_2 보관소로 옮김.

[0627] 2i 배지는 표 3에서와 같이 제조하였다.

[0628]

시약	판매 회사	농도
DMEM/F12 기저 배지	Invitrogen/Life Technologies	1x
신경기저 배지	Invitrogen/Life Technologies	1x
페니실린/스트렙토마이신	Invitrogen/Life Technologies	1%
L-글루타민	Invitrogen/Life Technologies	4 mM
2-머캅토에탄올	Invitrogen/Life Technologies	0.1 mM
N2 보충물	Invitrogen/Life Technologies	1x
B27 보충물	Invitrogen/Life Technologies	1x
LIF	Millipore	100 U/ml
PD0325901 (MEK 억제제).	Stemgent	1 uM
CHIR99021 (GSK 억제제).	Stemgent	3 uM

[0629] 재료: 임신 말 혈청 고나도트로핀 (PMSG)

[0630] 인간 임신 뇨 융모막 고나도트로핀 (HCG)

[0631] 암컷 랫트 (5-12주령)

[0632] 암컷 랫트 (12주 내지 8개월령), 케이지 당 1마리

[0633] 시린지/바늘

[0634] 6:00-18:00의 전등 가동의 동물실

[0635] 과정:

[0636] 1일째: 8:00-10:00 AM

[0637] 암컷에 20 IU PMSG (0.4 ml), IP를 주사함

[0638] 사용되지 않은 PMSG를 버림.

[0639] 3일째: 8:00-10:00 AM (PMSG 주사후 48시간)

[0640] 암컷에 50 IU HCG (1 ml), IP를 주사함

[0641] 수컷 당 하나의 암컷을 찍짓기 케이지에 넣음.

[0642] 사용되지 않은 HCG 버림.

[0643] 4일째: 8:00-10:00 AM (HCG 주사후 24시간)

[0644] 플러그에 대해 암컷 체크.

[0645] 호르몬 공급업체

[0646] PMSG: Sigma #G-4877 (1000 IU). PBS 중에서 50 IU/ml의 최종 [ ]로 재현탁시킴. 1ml의 적정액으로 -20° 에서 보관함.

[0647] HCG: Sigma #CG-5 (5000 IU). PBS 중에서 50 IU/ml의 최종 [ ]로 재현탁시킴. 1ml의 적정액으로 -20° 에서 보관함.

[0648] ***1.4.: 랫트 배아 줄기 세포주의 핵형 분류***

[0649] 본원에서 생성된 랫트 ES 세포주는 핵형 분류하고 상기 결과는 표 4-7에 요약한다.

[0650] 표 4

[0651]

ACI.G1 핵형 분류 결과	세포 수
핵형 분류된 세포 수	7
분석된 세포 수	20
42, XY 세포 수	18
비정상 세포 수	2
40, XY, -5, -9	1
41, XY, -14	1
42, XY	18
기타 주지사항: 2개의 분석된 세포는 상이한 상염색체를 상실하고 이것은 기술적 인공물로 인한 산발적 존재때문일 수 있다. 분석된 세포의 90%는 정상의 수컷 42, XY 핵형을 가졌다.	
도 4는 ACI.G1 랫트 ES 세포주의 염색체 수의 분석을 보여주는 사진을 제공한다.	

[0652] 표 5

DA.2B 핵형 분류 결과	세포 수
핵형 분류된 세포 수	6
분석된 세포 수	20
42, XY 세포 수	20
비정상 세포 수	0
42, XY	20
기타 주지사항: 모든 분석된 세포는 정상의 이배체 42, XY 핵형을 가졌다.	
도 5는 DA.2B 랫트 ES 세포주의 염색 수의 분석을 보여주는 사진을 제공한다.	

[0653]

[0654] 표 6

DA.C2 핵형 분류 결과	세포 수
핵형 분류된 세포 수	5
분석된 세포 수	20
42, XY 세포 수	20
비정상 세포 수	0
42, XX	
기타 주지사항: 분석된 세포의 100%는 정상의 암컷 XX 랫트 핵형을 가졌다.	
도 6은 DA.C2 랫트 ES 세포 주의 염색체 수의 분석을 보여주는 사진을 제공한다.	

[0655]

[0656] 표 7

스트레인	분주된 낭포	확립된 주	핵형 분류된 주	핵형
BN x SD F1	41	8 (20%)	5	모든 주는 높은 %의 복잡한 다배수체였다
ACI	27	16 (60%)	3	G1: 90% 42 XY; 기타 다른 것은 70-85% 정배수체였다
DA	20	9 (45%)	6	2B: 100% 42 XY; 2C: 100% 42 XX; 기타 다른 것은 95-100% 정배수체였다
F344	4	1 (25%)	0	
총	92	34 (37%)		

[0657]

[0658] ***1.5.: 랫트 배아 줄기 세포로의 벡터의 전기천공***

[0659] 1. 전기천공 24 내지 48시간 전 계대된 랫트 ES 세포.

[0660] 2. 전기천공 24시간 전에 배지를 RVG2i + ROCKi (10 μM Y-27632)로 바꿈

[0661] 3. 트립신 처리 30분 전 배지를 바꿈.

[0662] 4. 전기천공될 DNA를 적정액으로 함.

[0663] 5. DNA가 >10분 동안 RT에서 가온되도록 함.

[0664] 6. DNA를 5분 동안 @ 62 ℃에서 가열함. DNA를 빙상에 위치시킴.

[0665] 7. 세포를 트립신 처리함:

[0666] a. 부유 콜로니를 수거함. 플레이트를 세척하고 가능한한 많이 부유물을 수거함.

[0667] b. 펠렛화된 콜로니: 3' @ 750 rpm.

[0668] c. 펠렛을 5-10ml PBS로 1회 세척하고 재회전시키고 펠렛화함

[0669] d. 상등액을 흡인 여과하고; 500λ 트립신, 0.05% + 1% 닭 혈청을 첨가함.

[0670] i. 튜브당 110cm 초과 플레이트의 콜로니를 혼주하지 않았음. 트립신 처리 동안에 튜브의 바닥으로 팩킹된 너무 많은 콜로니가 있는 경우, 이들은 클럼핑하고 세포 대부분이 상실된다.

[0671] e. 4' @ 37° . 클럼핑을 최소화하기 위해 콜로니를 수회 피펫팅함.

[0672] f. 단계 1-2 X를 반복함: 4' @ 37° .

[0673] g. 트립신을 500λ RVG2i + 10% FBS로 종료시킴.

[0674] 8. 세포를 펠렛화함: 5' @ 1200 rpm.

[0675] 9. 10 ml PBS 중에 세포를 재현탁시킴. 2개의 20λ 적정액을 계수하여 총 세포 수를 결정함.

[0676] 10. 세포를 펠렛화하고 (5'/1200rpm); 총 세포 수 및 총 재현탁 용적을 계산하여 올바른 세포 농도를 성취함 (표적 #/75 μl EP 완충액).

[0677] 11. EP 완충액의 최소 용적에 재현탁시키고; 총 용적을 측정하고 EP 완충액을 사용하여 표적 용적으로 조정함. 전기천공 완충액은 Millipore에 의해 판매된다. 카탈로그 #는 ES-003-D이다. 문헌[Valenzuela 등 (2003) Nature Biotechnology 21:652-659, 이는 본원에 참조로 인용된다]을 참조한다.

[0678] 12. 75λ 세포를 50λ DNA에 첨가하고; 125λ 세포/DNA 용액을 BTX 48-웰 큐벳의 하나의 웰로 옮김.

[0679] a. 동일한 칼럼 중에 빈 웰을 125λ EP 완충액으로 충전시킴.

[0680] 13. BTX 전기천공기 중에서 1회 큐벳을 펄싱시킴:

[0681] a. 세팅: 400V; Ω; 100 μF (세팅은 다양할 수 있다)

[0682] 14. 큐벳을 빙상에 15분 동안 위치시켜 회수함.

[0683] 15. 세포를 5 ml RVG2i + 10 μM ROCKi로 제거시킴.

[0684] 16. 20 ml RVG2i + 10 μM ROCKi를 15cm 플레이트에 첨가함. 플레이트는 2x neoR MEF (또는 프로젝트에 따라 다른 MEF)를 갖는다. neoR 선택가능한 마커는 문헌[참조: Beck 등 (1982) Gene, 19:327-36 또는 미국 특허 제7,205,148호 또는 제6,596,541호, 이의 각각은 본원에 참조로서 인용된다]의 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 (neo) 유전자이다.

[0685] 17. @ 37° 에서 항온처리함. 48시간 후 선택을 개시함.

[0686] 사용된 ROCK 억제제는 Y-27632이었다.

[0687] ***1.6: 랫트 배아 줄기 세포에서 표적화된 유전학적 변형을 선택함.***

[0688] 1. 전기천공 전 24 내지 48시간동안 세포를 계대시킴.

[0689] 2. 전기천공 24시간 전 배지를 RVG2i + ROCKi (10 μM Y-27632)로 바꿈

[0690] 3. 트립신 처리 30분 전 배지를 바꿈.

[0691] 4. 전기천공될 DNA를 적정액으로 함.

[0692] 5. DNA를 >10 min 동안 RT에서 가온함.

[0693] 6. DNA를 5분 동안 @ 62 ℃에서 가열함. DNA를 빙상에 위치시킴.

[0694] 7. 세포를 트립신 처리함:

[0695] a. 부유 콜로니를 수거함. 플레이트를 세척하고 가능한한 많이 부유물을 수거함.

[0696] b. 펠렛화된 콜로니: 3' @ 750 rpm.

[0697] c.펠렛을 5-10ml PBS로 1회 세척하고 재회전시키고 펠렛화함

[0698] d. 상등액을 흡인 여과하고; 500λ 트립신, 0.05% + 1% 닭 혈청을 첨가함.

[0699] i.튜브당 110cm 초과 플레이트의 콜로니를 혼주하지 않았음. 트립신 처리 동안에 튜브의 바닥으로 팩킹된 너무 많은 콜로니가 있는 경우, 이들은 클럼핑하고 세포 대부분이 상실된다.

[0700] e. 4' @ 37° . 클럼핑을 최소화하여 수회 콜로니를 피펫팅함

[0701] f. 1-2회 반복함: 4' @ 37° .

[0702] g.트립신을 500λ RVG2i + 10% FBS로 종료시킴.

[0703] 8. 세포를 펠렛화함: 5' @ 1200 rpm.

[0704] 9. 10 ml PBS 중에 세포를 재현탁시킴. 2개의 20λ 적정액을 계수하여 총 세포 수를 결정함.

[0705] 10. 세포를 펠렛화하고 (5'/1200rpm); 총 세포 수 및 총 재현탁 용적을 계산하여 올바른 세포 농도를 성취함 (표적 #/75 μl EP 완충액).

[0706] 11. EP 완충액의 최소 용적으로 재현탁시키고; 총 용적을 측정하고 EP 완충액으로 총 용적을 조정함.

[0707] 12. 75λ 세포를 50λ DNA에 첨가하고; 125λ 세포 /DNA 용액을 BTX 48-웰 큐벳의 하나의 웰에 이전시킴.

[0708] a. 동일한 칼럼 중에 빈 웰을 125λ EP 완충액으로 충전시킴.

[0709] 13. BTX 전기천공기 중에서 1회 큐벳을 펄싱시킴:

[0710] a. 세팅: 400V; 100 μF (세팅은 다양화할 수 있다)

[0711] 14. 큐벳을 빙상에 15분 동안 위치시켜 회수함.

[0712] 15. 세포를 5 ml RVG2i + 10 μM ROCKi로 제거함.

[0713] 16. 20 ml RVG2i + 10 μM ROCKi를 15cm 플레이트에 첨가함. 플레이트는 2x neoR MEF (또는 프로젝트에 따라 다른 MEF)를 가졌다.

[0714] 17. @ 37° 에서 항온처리함. 48시간 후 선별을 개시함.

[0715] 18. G418 선택 프로토콜은 다음과 같다:

[0716] a. 2일째 (EP 후 제2일 째): 세포를 2i 배지 + G418, 75 μg/ml 중에서 항온처리함.

[0717] b. 3일째: G418 부재하에 2i 배지 중에서 세포를 항온처리함

[0718] c. 4일째: 세포를 2i 배지 + G418, 75 μg/ml 중에서 항온처리함.

[0719] d. 11일째: G418 부재하에 2i 배지 중에서 세포를 항온처리함

[0720] e. 6일째: 2i 배지 + G418, 75 μg/ml 중에서 세포를 항온처리함.

[0721] f. 11일째: G418 부재하에 2i 배지 중에서 세포를 항온처리함

[0722] g. 8일째: 2i 배지 + G418, 75 μg/ml 중에서 세포를 항온처리함.

[0723] h. 11일째: G418 부재하에 2i 배지 중에서 세포를 항온처리함

[0724] i. 10일째: 2i 배지 + G418, 75 μg/ml에서 세포를 항온처리함.

[0725] j. 11일째: G418 부재하에 2i 배지 중에서 세포를 항온처리함

[0726] k. 12일째: 콜로니를 집어내어 스크리닝을 위해 확장시킴. 각각의 콜로니는 10분 동안 0.05% 트립신 + 1% 닭 혈청 중에서 해리시키고 이어서 96웰 공급 플레이트의 1웰에 분주함.

[0727] 19. 2i 배지에서 3일 동안 콜로니를 확장시킴.

[0728] 20. 계대된 클론 1:1 대 새로운 96-웰 공급 플레이트.

[0729] 21. 클론을 2i 배지에서 3일동안 확장시킴.

[0730] 22. 각각의 클론에 대해 콜로니를 트립신 중에서 해리시킴. 각각의 클론의 2/3을 동결시키고 -80° 에서 보관하고; 나머지 1/3을 라미닌 플레이트 (10 μg/ml 라미닌으로 코팅된 96웰 플레이트) 상으로 분주함.

[0731] 23. 라미닌 플레이트가 컨플루언트 하는 경우, 클로닝의 유전자 분류를 위해 스크리닝 랩에 전달하였다.

[0732] **1.7. 랫트 배아 줄기 세포의 분자 징후**

[0733] 표 8에 열거된 유전자들은 마우스 ES 세포에서 상응하는 유전자들 보다 랫트 ES 세포에서 20배 낮게 발현시켰다. 표 9에 열거된 유전자들은 마우스 ES 세포에서 상응하는 유전자들 보다 랫트 ES 세포에서 20배 높은 수준으로 발현시켰다.

[0734] 표 8 및 9에서 마이크로어레이 데이타는 다음과 같이 작성하였다. 랫트 ES 세포 (ACI.G2 및 DA.2B) 및 마우스 ES 세포 (F1H4)는 컨플루언트할때까지 3회 계대동안 2i 배지에서 배양하였다. F1H4 세포는 공급자의 부재하에 젤라틴 피복된 플레이트상에 배양하였다. F1H4 마우스 ES 세포는 129S6/SvEvTac 및 C57BL/6NTac 이종접합성 배아로부터 유도하였다 (문헌참조: 예를 들어, 미국 특허. 제7,294,754호 and Poueymirou, W.T., Auerbach, W., Frendewey, D., Hickey, J.F., Escaravage, J.M., Esau, L., Dore, A.T., Stevens, S., Adams, N.C., Dominguez, M.G., Gale, N.W., Yancopoulos, G.D., DeChiara, T.M., Valenzuela,D.M. (2007), 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다).

[0735] 하기의 프로토콜은 샘플 제조를 위해 사용하였다: 1.5mL 에펜도르프 튜브는 샘플 ID로 표지시켰다. 플레이트 상에서 성장한 세포는 37℃ 포스페이트-완충 식염수 (PBS) 중에서 세정하였다. PBS를 제거하고 300 ul의 Trizol® 를 첨가하였다. 스크래퍼를 사용하여 Trizol® (Life Technology) 중에서 세포를 파괴하였다. 용해된 세포를 1.5mL 에펜도르프 튜브로 Trizol®에 수거하였다. 현탁액상에서 성장한 세포에 대해, 세포는 37℃ PBS 중에서 세정하고 1.5mL 튜브에 수거하였다. 세포는 회전 하강시키고; PBS를 제거하고; 300 ul의 Trizol®을 세포에 첨가하였다. 세포 막은 피펫팅함에 의해 파괴시켰다. 샘플은 10 내지 10^5 세포로 FACS에 대해 분류하고, 상기 용적은 100uL 미만으로 농축시켰다. RNA 용해 완충액 4 용적을 첨가하고 피펫팅함에 의해 혼합하였다. 샘플에 대해, 320uL RNA 용해 완충액은 80uL 샘플에 첨가하였다. 샘플은 -20 ℃에서 보관하였다.

[0736] RNA-Seq를 사용하여 마우스 및 랫트 유전자의 발현 수준을 측정하였다. 서열분석 판독은 Tophat에 의해 마우스 및 랫트 표준 게놈에 맵핑하고 RPKM (맵핑된 100만 단편 당 엑손의 킬로베이스 당 단편)은 마우스 및 랫트 유전자에 대해 계산하였다. 유전자 심볼을 기준으로 하는 상동성 유전자를 선택하고 이어서 마우스와 랫트 간의 각각의 유전자의 발현 수준을 비교하기 위해 *t*-시험을 사용하였다. miR-632는 랫트 ESC에서 최고로 발현되는 상위 10개 중에 있지만 마우스 ES 세포에서 발현되지 않았다. 어떠한 비교 데이타도 miR-632에 대해 존재하지 않지만, 랫트 ESC에서 발현되는 다른 유전자 및 배아 발육에서 이들의 공지된 기능과 비교되는 이의 발현 수준을 기준으로, miR-632는 랫트 ES 세포에 대한 마커로서 선택하였다.

[0737] 표 8. 열거된 유전자들은 마우스 ES 세포에서 상응하는 유전자 보다 랫트 ES 세포에서 20배 낮은 수준으로 발현하였다.

ID	심볼	Entrez 유전자 명칭	위치	유형 (들)
Abcb1b	Abcb1b	ATP-결합 카세트, 서브-패밀리 B (MDR/TAP), 구성원 1B	원형질막	수송체
Acta2	ACTA2	액틴, 알파 2, 평활근, 대동맥	세포질	기타
Actg2	ACTG2	액틴, 감마 2, 평활근, 장	세포질	기타
Aebp1	AEBP1	AE 결합 단백질 1	핵	펩티다제
Angptl2	ANGPTL2	안지오포이에틴-2형	세포외 공간	기타
Ankrd1	ANKRD1	안키린 반복 도메인 1 (심장 근육)	세포질	전사 조절인자
Anxa1	ANXA1	아넥신 A1	원형질막	기타
Anxa6	ANXA6	아넥신 A6	원형질막	기타
Anxa8	ANXA8L2	아넥신 A8-2형	원형질막	기타
Arhgef25	ARHGEF25	Rho 구아닌 뉴클레오타이드 교환 인자 (GEF) 25	세포질	기타
Axl	AXL	AXL 조절인자 티로신 키나제	원형질막	키나제
Basp1	BASP1	뇌에 풍부하고 막 부착된 시그날 단백질 1	핵	전사 조절인자
Bgn	BGN	비글리캔	세포외 공간	기타
Bst2	BST2	골수 기질 세포 항원 2	원형질막	기타
Btf3	BTF3	기본 전사 인자 3	핵	전사 조절인자
Btg2	BTG2	BTG 패밀리, 구성원 2	핵	전사 조절인자
Capsl	CAPSL	칼시포신형	기타	기타
Cav1	CAV1	카베올린 1, 카베올래 단백질, 22kDa	원형질막	막관통 수용체
Ccdc80	CCDC80	코일된-코일 도메인 함유 80	핵	기타
Ccnd2	CCND2	사이클린 D2	핵	기타
Cd248	CD248	CD248 분자, 엔도시알린	원형질막	기타
Cd44	CD44	CD44 분자 (인도인 혈액 그룹)	원형질막	효소
Cd97	CD97	CD97 분자	원형질막	G-단백질 커플링된 수용체
Cdc42ep5	CDC42EP5	CDC42 이펙터 단백질 (Rho GTPase 결합) 5	세포질	기타
Cdh11	CDH11	캐드헤린 11, 2형, OB-캐드헤린 (골아세포)	원형질막	기타
Cdkn2a	CDKN2A	사이클린-의존성 키나제 억제제 2A	핵	전사 조절인자
Cdo1	CDO1	시스테인 디옥시게나제 1형	세포질	효소
Clip3	CLIP3	CAP-GLY 도메인 함유 링커 단백질 3	세포질	기타
Cln5	CLN5	세로이드-리포푸신증, 신경원 5	세포질	기타
Cnn1	CNN1	칼포닌 1, 기본, 평활근	세포질	기타

[0738]

ID	심볼	Entrez 유전자 명칭	위치	유형 (들)
Col1a1	COL1A1	콜라겐, I형, 알파 1	세포외 공간	기타
Col1a2	COL1A2	콜라겐, I형, 알파 2	세포외 공간	기타
Col3a1	COL3A1	콜라겐, IIII형, 알파 1	세포외 공간	기타
Col5a2	COL5A2	콜라겐, V형, 알파 2	세포외 공간	기타
Col6a2	COL6A2	콜라겐, VI형, 알파 2	세포외 공간	기타
Cryab	CRYAB	크리스탈린, 알파 B	핵	기타
Csf1	CSF1	콜로니 자극 인자 1 (마크로파아지)	세포외 공간	사이토킨
Cth	CTH	크리스타티오나제 (크리스타티오닌 감마 -리아제)	세포질	효소
Cthrc1	CTHRC1	콜라겐 삼중나선 반복체 함유 1	세포외 공간	기타
Ctsc	CTSC	카텝신 C	세포질	펩티다제
Cyr61	CYR61	시스테인 풍부, 혈관형성 유도제, 61	세포외 공간	기타
Ddx58	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) 박스 폴리펩타이드 58	세포질	효소
Dkk3	DKK3	dickkopf WNT 시그날 전달 경로 억제제 3	세포외 공간	사이토킨
Dmc1	DMC1	DNA 감수분열 리컴비나제 1	핵	효소
Dpysl3	DPYSL3	디하이드로피리미디나제 3형	세포질	효소
Dse	DSE	더마탄 설페이트 에피머라제	세포질	효소
Dusp1	DUSP1	이원 특이성 포스파타제 1	핵	포스파타제
Dusp27	DUSP27	이원 특이성 포스파타제 27 (추정)	기타	포스파타제
Dusp9	DUSP9	이원 특이성 포스파타제 9	핵	포스파타제
Ece2	ECE2	엔도텔린 전환 효소 2	원형질막	펩티다제
Ecm1	ECM1	세포외 매트릭스 단백질 1	세포외 공간	수송체
Egr1	EGR1	조기 성장 반응 1	핵	전사 조절인자
Emp1	EMP1	상피 막 단백질 1	원형질막	기타
Emp3	EMP3	상피막 단백질 3	원형질막	기타
Ephx2	EPHX2	에폭사이드 하이드롤라제 2, 세포질	세포질	효소
F3	F3	응고 인자 III (트롬보플라스틴, 조직 인자)	원형질막	막관통 수용체
Fau	FAU	도처에서 발현되는 Finkel-Biskis-Reilly 뮤린 육종 바이러스 (FBR-MuSV)	세포질	기타
Fbn1	FBN1	피브릴린 1	세포외 공간	기타
Fbxo15	FBXO15	F-박스 단백질 15	기타	전사 조절인자
Fhl2	FHL2	4개 및 반개의 LIM 도메인 2	핵	전사 조절인자
Flnc	FLNC	필라민 C, 감마	세포질	기타
Fos	FOS	FBJ 뮤린 골육종 바이러스	핵	전사 조절인자

[0739]

[0740]

ID	심볼	Entrez 유전자 명칭	위치	유형 (들)
		발암유전자 동족체		
Fundc2	FUNDC2	FUN14 도메인 함유 2	세포질	기타
Gjb3	GJB3	갭 접합 단백질, 베타 3, 31kDa	원형질막	수송체
Gpa33	GPA33	당단백질 A33 (막관통)	원형질막	기타
Gpbp1l1	GPBP1L1	GC-풍부 프로모터 결합 단백질 1-1형	기타	기타
Gpc3	GPC3	글리피칸 3	원형질막	기타
Grb10	GRB10	성장 인자 수용체 결합 단백질 10	세포질	기타
Gstm1	GSTM5	글루타티온 S-트랜스퍼라제 mu 5	세포질	효소
Hap1	HAP1	헌팅틴-연합된 단백질 1	세포질	기타
Hist1h2bc	HIST2H2BE (기타를 포함하는)	히스톤 클러스터 2, H2be	핵	기타
Hmga2	HMGA2	높은 이동성 그룹 AT-후크 2	핵	효소
Hmgn3	Hmgn3	높은 이동성 그룹 뉴클레오솜 결합 도메인 3	핵	기타
Hormad1	HORMAD1	HORMA 도메인 함유 1	핵	기타
Hsd17b14	HSD17B14	하이드록시스테로이드 (17-베타) 데하이드로게나제 14	세포질	효소
Hspb1	HSPB1	열 쇼크 27kDa 단백질 1	세포질	기타
Hspb8	HSPB8	열 쇼크 22kDa 단백질 8	세포질	키나제
Htra1	HTRA1	HtrA 세린 펩티다제 1	세포외 공간	펩티다제
Ifi204	Ifi204 (기타를 포함하는)	인터페론 활성화된 유전자 204	핵	전사 조절인자
Ifi44	IFI44	인터페론 유도된 단백질 44	세포질	기타
Ifit1	IFIT1B	테트라트리코펩타이드 반복체 1B를 갖는 인터페론 유도된 단백질	세포질	기타
Ifitm3	IFITM2	인터페론 유도된 막관통 단백질 2	세포질	기타
Igf2	IGF2	인슐린형 성장 인자 2 (소마토메딘 A)	세포외 공간	성장 인자
Igfbp7	IGFBP7	인슐린형 성장 인자 결합 단백질 7	세포외 공간	수송체
Il1rl1	IL1RL1	인터류킨 1 수용체 1형	원형질막	막관통 수용체
Inhba	INHBA	인히빈, 베타 A	세포외 공간	성장 인자
Inhbb	INHBB	인히빈, 베타 B	세포외 공간	성장 인자
Irf7	IRF7	인터페론 조절 인자 7	핵	전사 조절인자
Isg15	ISG15	ISG15 유비퀴틴형 개질제	세포외 공간	기타
Itga5	ITGA5	인테그린, 알파 5 (피브로넥틴 수용체, 알파 폴리펩타이드)	원형질막	막관통 수용체
Jun	JUN	jun 프로토-발암유전자	핵	전사 조절인자

ID	심볼	Entrez 유전자 명칭	위치	유형 (들)
Junb	JUNB	jun B 프로토- 발암유전자	핵	전사 조절인자
Lgals3bp	LGALS3BP	렉틴, 갈락토시드-결합, 가용성, 3 결합 단백질	원형질막	막관통 수용체
Lgals9	LGALS9	렉틴, 갈락토시드-결합, 가용성, 9	세포외 공간	기타
Lmna	LMNA	라민 A/C	핵	기타
Lox	LOX	리실 옥시다제	세포외 공간	효소
Lox12	LOXL2	리실 옥시다제-2형	세포외 공간	효소
Lox13	LOXL3	리실 옥시다제-3형	세포외 공간	효소
Lrp1	LRP1	저밀도 지질단백질 수용체-관련 단백질 1	원형질막	막관통 수용체
Mageb16	MAGEB16	흑색종 항원 패밀리 B, 16	기타	기타
Mcam	MCAM	흑색종 세포 접착 분자	원형질막	기타
Mgp	MGP	매트릭스 Gla 단백질	세포외 공간	기타
Mmp2	MMP2	매트릭스 메탈로펩티다제 2 (젤라티나제 A, 72kDa 젤라틴아제, 72kDa type IV 콜라겐아제)	세포외 공간	펩티다제
Mxra8	MXRA8	매트릭스-리모델링 연합된 8	기타	기타
Myl9	MYL9	미오신, 경쇄 9, 조절	세포질	기타
Mylpf	MYLPF	미오신 경쇄, 인산화가능한, 패스트 골격근	세포질	기타
Nab2	NAB2	NGFI-A 결합 단백질 2 (EGR1 결합 단백질 2)	핵	전사 조절인자
Ndufb4	NDUFB4	NADH 데하이드로게나제 (유비퀴논) 1 베타 서브복합체, 4, 15kDa	세포질	수송체
Npm1	NPM1	뉴클레오포스민 (핵 포스포단백질 B23, 누마트린)	핵	전사 조절인자
Nr0b1	NR0B1	핵 수용체 서브패밀리 0, 그룹 B, 구성원 1	핵	리간드-의존성 핵 수용체
Nr4a1	NR4A1	핵 수용체 서브패밀리 4, 그룹 A, 구성원 1	핵	리간드-의존성 핵 수용체
Nrp2	NRP2	뉴로필린 2	원형질막	키나제
Oas1a	OAS1	2'-5'-올리고아데닐레이트 신테타제 1, 40/46kDa	세포질	효소
Oas12	Oas12	2'-5' 올리고아데닐레이트 신테타제-2형	기타	효소
P4ha2	P4HA2	프롤릴 4-하이드록실라제, 알파 폴리펩타이드 II	세포질	효소
Parp3	PARP3	폴리 (ADP-리보스) 폴리머라제 패밀리, 구성원 3	핵	효소

[0741]

ID	심볼	Entrez 유전자 명칭	위치	유형 (들)
Pcolce	PCOLCE	프로콜라겐 C-엔도펩티다제 증진제	세포외 공간	기타
Pcyt1b	PCYT1B	포스페이트 시티딜릴트랜스퍼라제 1, 콜린, 베타	세포질	효소
Pdgfc	PDGFC	혈소판 유래 성장 인자 C	세포외 공간	성장 인자
Phlda1	PHLDA1	플렉스트린 상동성형 도메인, 패밀리 A, 구성원 1	세포질	기타
Phlda2	PHLDA2	플렉스트린 상동성형 도메인, 패밀리 A, 구성원 2	세포질	기타
Pla2g1b	PLA2G1B	포스포리파제 A2, 그룹 IB (췌장)	세포외 공간	효소
Pla2g4a	PLA2G4A	포스포리파제 A2, 그룹 IVA (시토졸, 칼슘 의존성)	세포질	효소
Porcn	PORCN	포르쿠핀 동족체 (*드로소필라*)	세포질	기타
Postn	POSTN	페리오스틴, 골아세포 특이적 인자	세포외 공간	기타
Prrx1	PRRX1	쌍을 이룬 관련 호메오박스 1	핵	전사 조절인자
Prss23	PRSS23	프로테아제, 세린, 23	세포외 공간	펩티다제
Psmb8	PSMB8	프로테오좀 (프로좀, 마크로파인) 서브유니트, 베타형, 8	세포질	펩티다제
Ptgs2	PTGS2	프로스타글란딘-엔도퍼옥사이드 신타제 2 (프로스타글란딘 G/H 신타제 및 사이클로옥시게나제)	세포질	효소
Ptn	PTN	플레이오트로핀	세포외 공간	성장 인자
Ptrf	PTRF	폴리머라제 I 및 전사 방출 인자	핵	전사 조절인자
Rarg	RARG	레티노산 수용체, 감마	핵	리간드-의존성 핵 수용체
Rgs16	RGS16	G-단백질 시그날 전달 16의 조절인자	세포질	기타
Rn45s	Rn45s	45S 전-리보솜 RNA	기타	기타
Rpl10a	RPL10A	리보솜 단백질 L10a	기타	기타
Rpl31	RPL31	리보솜 단백질 L31	기타	기타
Rpl37a	RPL37A	리보솜 단백질 L37a	세포질	기타
Rps10	RPS10-NUDT3	RPS10-NUDT3 판독	세포질	기타
Rps14	RPS14	리보솜 단백질 S14	세포질	해독 조절인자
Rps20	Rps20	리보솜 단백질 S20	세포질	기타
Rps26	RPS26	리보솜 단백질 S26	세포질	기타
Rps9	RPS9	리보솜 단백질 S9	세포질	해독 조절인자
S100a4	S100A4	S100 칼슘 결합 단백질 A4	세포질	기타
S100a6	S100A6	S100 칼슘 결합 단백질 A6	세포질	수송체
Schip1	SCHIP1	슈와노민 상호작용 단백질 1	세포질	기타
Sdc2	SDC2	신데칸 2	원형질막	기타

[0742]

ID	심볼	Entrez 유전자 명칭	위치	유형 (들)
Serpine1	SERPINE1	세르핀 펩티다제 억제제, 클레이드 E (넥신, 플라스미노겐 활성화인자 억제제 1형), 구성원 1	세포외 공간	기타
Serpine2	SERPINE2	세르핀 펩티다제 억제제, 클레이드 E (넥신, 플라스미노겐 활성화인자 억제제 1형), 구성원 2	세포외 공간	기타
Serpinf1	SERPINF1	세르핀 펩티다제 억제제, 클레이드 F (알파-2 안티플라스민, 안료 상피 유래된 인자), 구성원 1	세포외 공간	기타
Sh3gl2	SH3GL2	SH3-도메인 GRB2-2형	원형질막	효소
Slc19a2	SLC19A2	용질 캐리어 패밀리 19 (티아민 수송체), 구성원 2	원형질막	수송체
Slc25a5	SLC25A5	용질 캐리어 패밀리 25 (미토콘드리아 캐리어; 아데닌 뉴클레오타이드 운반체), 구성원 5	세포질	수송체
Slc29a1	SLC29A1	용질 캐리어 패밀리 29 (균형 뉴클레오사이드 수송체), 구성원 1	원형질막	수송체
Slc35f2	SLC35F2	용질 캐리어 패밀리 35, 구성원 F2	기타	기타
Snrpn	SNRPN	소핵 리보뉴클레오단백질 폴리펩타이드 N	핵	기타
Snx22	SNX22	선별 넥신 22	기타	수송체
Sparc	SPARC	분비된 단백질, 산성, 시스테인 풍부 (골넥틴)	세포외 공간	기타
Spp1	SPP1	분비된 인단백질 1	세포외 공간	사이토킨
Sult4a1	SULT4A1	설포트랜스퍼라제 패밀리 4A, 구성원 1	세포질	효소
Tagln	TAGLN	트랜스겔린	세포질	기타
Tcea3	TCEA3	전사 연장 인자 A (SII), 3	핵	전사 조절인자
Tgfb3	TGFB3	형질전환 성장 인자, 베타 3	세포외 공간	성장 인자
Thbs1	THBS1	트롬보스폰딘 1	세포외 공간	기타
Thbs2	THBS2	트롬보스폰딘 2	세포외 공간	기타
Tm4sf1	TM4SF1	막관통 4 L 6 패밀리 구성원 1	원형질막	기타
Tmbim1	TMBIM1	막관통 BAX 억제제 모티프 함유 1	세포질	기타
Tmem176b	TMEM176B	막관통 단백질 176B	기타	기타
Tnc	TNC	테나신 C	세포외 공간	기타
Tpd52l1	TPD52L1	종양 단백질 D52-1형	세포질	기타

[0743]

ID	심볼	Entrez 유전자 명칭	위치	유형 (들)
Tpm2	TPM2	트로포미오신 2 (베타)	세포질	기타
Usp18	USP18	유비퀴틴 특이적 펩티다제 18	세포질	펩티다제
Vim	VIM	비멘틴	세포질	기타
Wfdc2	WFDC2	WAP 4-디설파이드 코어 도메인 2	세포외 공간	기타
Wisp2	WISP2	WNT1 유도성 시그날 전달 경로 단백질 2	세포외 공간	성장 인자
Ybx1	YBX1	Y 박스 결합 단백질 1	핵	전사 조절인자

[0744]

[0745] 표 9. 열거된 유전자들은 마우스 ES 세포에서 상응하는 유전자들 보다 랫트 ES 세포에서 20배 높은 수준으로 발현되었다.

[0746]

ID	심볼	Entrez 유전자 명칭	위치	유형 (들)
Ajap1	Ajap1	어드헤린 접합 연합 단백질 1	기타	기타
Amd1	AMD1	아데노실메티오닌 데카복실라제 1	세포질	효소
Ankrd2	ANKRD2	안키린 반복 도메인 2 (스트레치 반응성 근육)	핵	전사 조절인자
Arhgef9	ARHGEF9	Cdc42 구아닌 뉴클레오타이드 교환 인자 (GEF) 9	세포질	기타
Atp5h	Atp5h	ATP 신타제, H+ 수송, 미토콘드리아 F0 복합체, 서브유니트 d	세포질	효소
Btg3	BTG3	BTG 패밀리, 구성원 3	핵	기타
Car6	CA6	카보닉 언하이드라제 VI	세포외 공간	효소
Camk4	CAMK4	칼슘/칼모듈린-의존성-단백질 키나제 IV	핵	키나제
Capn12	CAPN12	칼페인 12	기타	펩티다제
Cct6b	CCT6B	샤페로닌 함유 TCP1, 서브유니트 6B (제타 2)	세포질	수송체
Cdx2	CDX2	꼬리형 호메오박스 2	핵	전사 조절인자
Cldn5	CLDN5	클라우딘 5	원형질막	기타
Clec3a	CLEC3A	C-형 렉틴 도메인 패밀리 3, 구성원 A	기타	기타
Clic6	CLIC6	클로라이드 세포내 채널 6	원형질막	이온 채널
Dhrsx	DHRSX	데하이드로게나제/리덕타제 (SDR 패밀리) X-연결된	기타	효소
Dpysl2	DPYSL2	디하이드로피리미디나제-2형	세포질	효소
Dusp26	DUSP26	이원 특이성 포스파타제 26 (추정)	세포질	효소
Eci3	Eci3	에노일-조효소 A 델타 이소머라제 3	기타	효소
Eef2k	EEF2K	진핵 세포 연장 인자-2 키나제	세포질	키나제
Efna1	EFNA1	에프린-A1	원형질막	기타
Epha4	EPHA4	EPH 수용체 A4	원형질막	키나제
Fank1	FANK1	피브로넥틴 III형 및 안키린 반복 도메인 1	핵	전사 조절인자
Fhit	FHIT	불안정한 히스티딘 트리아드	세포질	효소
Filip1	FILIP1	필라민 A 상호작용 단백질 1	세포질	기타
Fmod	FMOD	피브로모듈린	세포외 공간	기타
Foxe1	FOXE1	포크헤드 박스 E1 (갑상선 전사 인자 2)	핵	전사 조절인자

ID	심볼	Entrez 유전자 명칭	위치	유형 (들)
Fry	FRY	털모양 동족체 (드로소필라)	세포외 공간	기타
Gjb5	GJB5	갭 접합 단백질, 베타 5, 31.1kDa	원형질막	수송체
Gpx2	GPX2	글루타티온 퍼옥시다제 2 (위장)	세포질	효소
Grxcr2	GRXCR2	글루타레독신, 시스테인 풍부 2	기타	기타
Hecw2	HECW2	HECT, C2 및 WW 도메인 함유 E3 유비퀴틴 단백질 리가제 2	세포외 공간	효소
Hey2	HEY2	YRPW 모발 2와 관련된 모발/증진제-오브-스플릿	핵	전사 조절인자
Icos	Icos	유도성 T-세포 보조-자극인자	원형질막	기타
Ifitm1	IFITM1	인터페론 유도된 막관통 단백질 1	원형질막	막관통 수용체
Il1f8	IL1F8 (IL36B)	인터류킨-1 패밀리 구성원 (인터류킨 36 베타)	세포외 공간	사이토킨
Il28ra	IL-28RA	인터류킨 28 수용체, 알파	원형질막	사이토킨 수용체
Igfbpl1	IGFBPL1	인슐린형 성장 인자 결합 단백질-1형	기타	기타
Ipcef1	IPCEF1	사이토헤신 교환 인자 1에 대한 상호작용 단백질	세포질	효소
Lctl	Lctl	락토제형	세포질	기타
Ldhd	LDHD	락테이트 데하이드로게나제 D	세포질	효소
Lef1	LEF1	림프성 인핸서-결합 인자 1	핵	전사 조절인자
Lefty1	LEFTY1	좌측-우측 결정 인자 1	세포외 공간	성장 인자
Lifr	LIFR	백혈병 억제 인자 수용체 알파	원형질막	막관통 수용체
Lpar2	LPAR2	리소포스파티드산 수용체 2	원형질막	G-단백질 커플링된 수용체
Mog	MOG	미엘린 희돌기교세포 당단백질	세포외 공간	기타
Morn5	MORN5	MORN 반복체 함유 5	기타	기타
Pigz	NCBP2	핵 캡 결합 단백질 서브유니트 2, 20kDa	핵	기타
Nptxr	NPTXR	뉴런 펜트락신 수용체	원형질막	막관통 수용체
Ntm	NTM	뉴로트리민	원형질막	기타
Nutf2	NUTF2	핵 수송 인자 2	핵	수송체
Ocln	OCLN	오클루딘	원형질막	효소
Olr1	OLR1	산화된 저밀도 지질단백질 (렉틴형) 수용체 1	원형질막	막관통 수용체
Pabpc4	PABPC4	폴리 (A) 결합 단백질, 세포질 4 (유도성 형태)	세포질	해독 조절인자
Pde11a	PDE11A	포스포디에스테라제 11A	세포질	효소

[0747]

ID	심볼	Entrez 유전자 명칭	위치	유형 (들)
Pdyn	PDYN	프로디노르핀	세포외 공간	수송체
Per3	PER3	기간 시르카디안 클락 3	핵	기타
Pllp	PLLP	플라스몰리핀	원형질막	수송체
Ppp1r14c	PPP1R14C	단백질 포스파타제 1, 조절 (억제제) 서브유니트 14C	세포질	기타
Prame16	Prame16	흑색종 6형에서 우선적으로 발현된 항원	기타	기타
Ptpn18	PTPN18	단백질 티로신 포스파타제, 비-수용체 18형 (뇌-유래된)	핵	포스파타제
Pycr1	PYCR1	피롤린-5-카복실레이트 리덕타제 1	세포질	효소
Rab26	RAB26	RAB26, 구성원 RAS 발암유전자 패밀리	원형질막	효소
Ramp2	RAMP2	수용체 (G 단백질-커플링된) 활성 변형 단백질 2	원형질막	수송체
Rbm24	RBM24	RNA 결합 모티프 단백질 24	기타	기타
Rhag	RHAG	Rh-연합된 당단백질	원형질막	퀩티다제
Rpl3	RPL3	리보솜 단백질 L3	세포질	기타
Sall3	SALL3	sal-3형 (드로소필라)	핵	기타
Satb1	SATB1	SATB 호메오박스 1	핵	전사 조절인자
Scg2	SCG2	세크레토그라닌 II	세포외 공간	사이토킨
Slc15a1	SLC15A1	용질 캐리어 패밀리 15 (올리고펩타이드 수송체), 구성원 1	원형질막	수송체
Slc1a1	SLC1A1	용질 캐리어 패밀리 1 (뉴런/상피 고친화성 글루타메이트 수송체, 시스템 Xag), 구성원 1	원형질막	수송체
Slc24a5	Slc24a5	용질 캐리어 패밀리 24 (나트륨/칼륨/칼슘 교환제), 구성원 5	기타	기타
Slc37a2	SLC37A2	용질 캐리어 패밀리 37 (글루코스-6-포스페이트 수송체), 구성원 2	기타	수송체
40424	SNTB1	신트로핀, 베타 1 (디스트로핀-연합된 단백질 A1, 59kDa, 기본 성분 1)	원형질막	기타
St6galnac3	ST6GALNAC3	ST6 (알파-N-아세틸-뉴라미닐-2,3-베타-갈락토실-1,3)-N-아세틸갈락토사민이데 알파-2,6-시알릴트랜스퍼라제 3	세포질	효소
Tex12	TEX12	고환 발현된 12	핵	기타

[0748]

ID	심볼	Entrez 유전자 명칭	위치	유형 (들)
Tex15	TEX15	고환 발현된 15	세포외 공간	기타
Tfap2a	TFAP2A	전사 인자 AP-2 알파 (활성화 인핸서 결합 단백질 2 알파)	핵	전사 조절인자
Tmc1	TMC1	막관통 채널 1형	원형질막	기타
Tmem130	TMEM130	막관통 단백질 130	기타	기타
Tmem30b	TMEM30B	막관통 단백질 30B	기타	기타
Tomm20	TOMM20	외부 미토콘드리아 막 20 동족체의 트랜스로카제 (효모)	세포질	수송체
Tox3	TOX3	TOX 높은 이동성 그룹 박스 패밀리 구성원 3	기타	기타
Ttc25	TTC25	테트라트리코펩타이드 반복 도메인 25	세포질	기타
Tymp	TYMP	티미딘 포스포릴라제	세포외 공간	성장 인자
Ubb	Ubb	유비퀴틴 B	세포질	기타
Vamp7	VAMP7	소포-연합된 막 단백질 7	세포질	수송체
Wfdc12	Wfdc12	WAP 4개-디설파이드 코어 도메인 12	세포외 공간	기타
Wfdc15a	Wfdc15a	WAP 4개-디설파이드 코어 도메인 15A	기타	기타
Wfdc6a	Wfdc6a	WAP 4개-디설파이드 코어 도메인 6A	기타	기타

[0749]

[0750] 표 10. 마우스 ES 세포에서 상응하는 유전자들 보다 랫트 ES 세포에서 20배 높은 수준으로 발현되는 표 9의 유전자 서브세트.

ID	Entrez 유전자 명칭
Ajap1	아드헤레스 접합 연합 단백질
Cldn5	클라우딘 5
Arhgef9	Cdc42 구아닌 뉴클레오타이드 교환 인자 9
Camk4	칼슘/칼모듈린-의존성 단백질 키나제 IV
Efna1	에프린-A1
Epha4	EPH 수용체 A4
Gjb5	갭 접합 단백질 베타 5
Igfbpl1	인슐린형 성장 인자 결합 단백질 1형
Il1f8	인터류킨 36 베타
Il28ra	인터류킨 28 수용체, 알파
Lefty1	좌측-우측 결정 인자 1
Lifr	백혈병 억제 인자 수용체 알파
Lpar2	리소포스파티드산 수용체 2
Ntm	뉴런 펜트락신 수용체
Ptpn18	단백질 티로신 포스파타제 비-수용체형 18
Cdx2	꼬리형 호메오박스 2
Fank1	피브로넥틴 III형 및 안키린 반복 도메인 1
Foxe1	포크헤드 박스 E1 (갑상선 전사 인자 2)
Hey2	YRPW 모티프 2와 관련된 모발/증진제-오브-스플릿
Lef1	림프성 인핸서-결합 인자 1
Sall3	Sal-3형 (드로소필라)
Satb1	SATB 호메오박스 1

[0751]

[0752] 랫트 ES 세포에 대한 만능 마커/유전자를 사용하는 추가의 분자 징후가 또한 발병되었다. 표 11은 RNA 프로파일링 데이타로부터 유전자 목록 및 이들의 발현 랭크를 제공한다. mRNA는 랫트 ES 세포로부터 단리되었고 다양한 마커의 발현 수준은 서로에 상대적으로 비교하였다. 용어 "랭크"는 개별 유전자들의 비교되는 발현 수준을 의미하고; 랭크가 높을수록(1이 최고임) 발현은 보다 높다. 예를 들어, 13의 Oct4의 랭크는 검정되는 모든 유전자들

중에 12개 유전자들을 제외한 모든 유전자에 대해 보다 많이 발현됨을 의미한다. 상기 실험에서 배경은 30미만의 임의의 발현 값이고 6107 유전자들은 30 이상의 발현 값을 가졌다.

[0753] 표 11. 다양한 만능, 중배엽, 내배엽, 신경 및 영양외배엽 마커/유전자들을 사용하는 랫트 ES 세포분자 징후.

만능	만능 랭크	중배엽	중배엽 랭크	내배엽	내배엽 랭크	신경	신경 랭크	영양외배엽	영양외배엽 랭크
c-Myc	8248	단미증	7542	Gata6	11195	네스틴	7761	Cdx2	739
Dnmt3L	127	Flk1	시험되지 않음	Sox17	11418	Pax6	13570		
Dppa2	시험되지 않음	마디성	3050	Hhex1	4571	Sox2	681		
Dppa5	시험되지 않음	Bmp4	3072	마디성	3050				
Ecat1	9714	Bmpr2	6382	Ext1	6091				
Eras	2541			Sox7	10284				
Err-베타	1368								
Fbxo15	1369								
Fgf4	3440								
Fthl17	시험되지 않음								
Gdf3	2771		랭크 > 6107 = bkg 발현						
Klf4	836								
Lef1	1313								
LIF 수용체	724								
Lin28	828								
Nanog	774								
Oct4	13								
Rexo1	6119								
Sox15	4524								
Sox2	681								
SSEA1	시험되지 않음								
SSEA4	시험되지 않음								
스텔라	시험되지 않음								
Tcl1	시험되지 않음								
Utf1	1501								

[0754]

[0755] **실시예 2: 랫트에서 게놈 유전자 좌위의 불활성화**

[0756] ***2.1: 엔도뉴클레아제 제제를 사용한 내인성 게놈 유전자 좌위의 불활성화***

[0757] 내인성 랫트 게놈 유전자 좌위에서 돌연변이 대립형질유전자를 도입하기 위해, 본원에 기재된 랫트 ES 세포를 ZFNs 1 및 2 (또는 TALENs 1 및 2)를 발현하는 발현 벡터(또는 mRNA)와 함께 전기천공한다. 이들 단백질은 약 6bp 내지 약 40bp로 분리되어 있는, 반대 가닥상의 이들의 표적 서열에 결합한다. 이중가닥 절단은 표적 유전자 좌위내에 형성되고 세포는 비-상동성 말단-접합(NHEJ)에 의해 복구시키고자한다. 많은 경우에, NHEJ는 흔히 유전자의 기능을 파괴하는 (흔히 대부분 판독전이 돌연변이를 생성함에 의해) 결실을 생성시킨다. 돌연변이 대립형질유전자를 포함하는 양성 클론을 동정하기 위해, 전기천공된 세포는 어떠한 약물 선택이 수행되지 않기 때문에 낮은 밀도로 분주한다. 콜로니를 집어내고 표적 부위에서 돌연변이가 생성되었는지를 보기 위해 검정하였다 (예를 들어, 상기된 대립형질유전자 변형(MOA) 검정을 사용하여). 돌연변이 대립형질유전자를 포함하는 선택된 ES 세포는 이어서 예를 들어, 전-상실포배 단계 또는 낭포 단계 랫트 배아와 같은 숙주 랫트 배아로 도입하고 대리모의 자궁에 이식하여 시조 랫트(F0 랫트)를 생성하였다. 후속적으로, 시조 랫트는 야생형 랫트로 육종시켜 돌연변이 대립형질유전자에 대해 이종접합성인 F1 후손을 생성시킨다. 이종접합성 F1 랫트의 짝짓기는 돌연변이 대립형질유전자에 동종접합성인 후손을 생성킬시킬 수 있다.

[0758] ***2.2.: 아연 핑거 뉴클레아제를 사용한 랫트 아포지질단백질 E (ApoE) 유전자의 불활성화를 위한 랫트 ESC 표적화***

[0759] 아연 핑거 뉴클레아제는 게놈내 고유 표적 서열로 엔도뉴클레아제 활성을 지시하기 위해 서열 특이적 모듈러 DNA 결합 도메인을 사용한다. ZFN은 단량체의 쌍으로 가공된다. 각각의 단량체는 3개 이상의 아연 핑거 DNA-결합 도메인에 융합된 *FokI* 엔도뉴클레아제 기원의 비특이적 절단 도메인을 함유한다. 각각의 아연 핑거는 3bp 서브사이트에 결합하고 특이성은 단량체 둘다의 조합된 표적 부위에 의해 성취된다. ZFN은 DNA에 이중가닥 절단(DSB)를 생성시키고 돌연변이(삽입 또는 결실)은 흔하게 비-상동성 말단 접합(NHEJ) 동안에 일어난다. DSB는 또한 공여자 서열이 ZFN과 함께 제공되는 경우 상동성 재조합에 의해 상동성-지시된 복구(HDR)를 자극한다.

[0760] 상기 ZFN은 표적화 효율을 개선하기 위해 본원에 기재된 다양한 방법 및 조성물과 조합하여 사용하였다. 랫트 아포지질단백질 E (ApoE) 유전자 좌위는 ZFN 1 및 2를 발현하는 발현 벡터가 또한 랫트 ES 세포로 도입되는 것을 제외하고는 실시예 3.2(a)(i)에 기재된 바와 같이 표적화하였다. rTZFN1P 및 rTZFN2P와 조합된 ApoE 표적화 반응의 도식을 제공하는 도 10을 참조한다. 표적화 효율은 실시예 6에서 하기 논의된 바와 같이 결정하고 결과는 도 11에 나타낸다. 놀랍게도, 표적화 효율은 8-10배 상승하였다.

[0761] 플라스미드 표적화 벡터는 자가 결실 약물 선택 카세트 및 리포터 유전자로서 lacZ 유전자를 사용하여 작제하였다. 우수한 표적화 효율이 성취되었고 높은 % 키메라가 생성되었다. 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFNs)는 또한 표적화 벡터와 조합하여 시험하여 표적화 효율을 개선시키는 것에 대한 효과를 조사하였다. 상기 표적화 벡터는 ApoE 유전자 좌위를 절단하는 2개 ZFN 쌍에 대한 발현 벡터와 동시 발현하였다. 표적화 벡터와 ZFN 세트 둘다와 함께 전기천공된 랫트 ESC 클론은 단독의 표적화 벡터와 함께 전기천공된 랫트 ESC 클론의 효율 보다 8 내지 10배 높은 표적화 효율을 보여주었다. 더욱이, 본 발명의 클론의 약 2%에서 이대립형질유전자 동종접합성 표적화가 검출되었다. 이들 표적화된 클론 중 2개로부터 높은 %의 키메라가 수득되었다.

[0762] ApoE-표적화된 (ZFN 원조와 함께) 랫트 ESC 클론은 SD 낭포로 미세주입하고, 이어서 표준 기술을 사용하여 가임신 SD 수용자 암컷으로 이전시켰다. 키메라는 코트 색깔로 식별하고; 수컷 F0 키메라는 SD 암컷에 교배하였다. 생식선 F1 새끼는 표적화된 ApoE 대립형질 유전자의 존재에 대해 유전형 분류하였다 (도 17). 이들 표적화된 클론 중 2개로부터 높은 %의 키메라가 있었다.

[0763] ApoE 녹아웃 랫트는 다양한 유형의 장애 및 질환을 연구하기 위한 수단을 제공한다. 인간에서, 아포지질단백질은 유미지립, HDL, LDL 및 VLDL에서 발견된다. ApoE는 트리글리세리드 풍부 지질단백질 성분들의 정상 이화작용을 위해 필수적이다. APOE내 결함은 많은 질환 상태를 유발하고 이는 예를 들어, 가계성 고콜레스테롤혈증, 고지질혈증, 베타지질단백질혈증, 가계성 이상베타지질단백뇨증, III형 고지질단백뇨증 (HLP III), 관상 동맥 질환의 위험을 포함한다. 하나의 이소형 (ApoE4)은 후기 발병 가계성 및 산발성 알츠하이머 질환, 또한 가능하게는 MS와 연관된다.

[0764] 마우스에서, ApoE는 주로 HDL에서 발견되고 인간에서와 같이 콜레스테롤을 수송한다. ApoE-결핍 마우스 (2개 독립적 KO)는 5배의 정상 혈장 콜레스테롤을 갖고 3개월령(인간 증후군과 비교가능한)까지 이들의 근위 대동맥에 기포 세포-풍부 침적을 발병했다.

[0765] 랫트에서 ApoE 녹아웃은 플라크 형성, 전사 변화 (RNA-Seq), 생체외 기능을 포함하지만, 그러나 이에 제한되지 않는 내피 기능 을 연구하기 위한 동물 모델을 제공한다. 더욱이, 랫트의 보다 큰 크기는 모든 이들 검정을 촉진시키고 잠재적으로 RNA-Seq 데이타의 질을 개선시킨다.

[0766] ***2.3. 아연 핑거 뉴클레아제를 사용한 랫트 인터류킨-2 수용체 감마 (IL2r-γ) 유전자 좌위의 불활성화***

[0767] 랫트 인터류킨-2 수용체 감마 (IL2r-γ) 유전자 좌위는 ZFN U (ZFN 업스트림) 및 ZFN D (ZFN 다운스트림)을 발현하는 발현 벡터가 또한 랫트 ES 세포로 도입되는 것을 제외하고는 실시예 3.3(a)에 기재된 바와 같이 표적화하였다. 도 18은 ZFN U 및 ZFN D와 조합된 IL2r-γ 표적화 반응의 도식을 제공한다. 이들 아연 핑거가 결합하는 IL2r-γ 유전자 좌위의 서열은 도 18에 나타낸다. 상기 표적화 효율은 실시예 3.3(a)에서 하기 논의된 바와 같이 결정하고 상기 결과는 도 18에 나타낸다. 간략하게, 동종접합적으로 표적화된 클론은 PCR로 확인하였다. ZFN1 쌍에 대해: 192개 중 173개 (90%) 돌연변이 클론이 스크리닝되었고 ZFN2 쌍에 대해서는: 192개 중 162개 (84%) 클론이 스크리닝되었다.

[0768] IL2r-γ-표적화된 (ZFN 원조와 함께) 랫트 ESC 클론은 SD 낭포로 미세주입하고, 이것은 이어서 표준 기술을 사용하여 가임신 SD 수용자 암컷으로 이전시켰다. 키메라는 코트 색깔로 식별하고; 수컷 F0 키메라는 SD 암컷에

교배하였다. 생식선 F1 새끼는 표적화된 IL2r-γ 대립형질유전자의 존재에 대해 유전형 분류되었다.

[0769] ***2.4.: CRISPR/Cas9를 사용한 랫트 인터류킨-2 수용체 감마(IL2r-γ)의 불활성화***

[0770] 랫트 IL2r-γ 유전자 좌위는 CRISPR/Cas9 시스템이 또한 표적화 효율을 도와주기 위해 랫트 ES 세포에 도입되는 것을 제외하고는 실시예 3.3(a)에 기재된 바와 같이 표적화하였다. SBI: 시스템 바이오사이언스 Cas9 "스마트뉴클레아제" 올-인-원 벡터를 사용하였고 Cas9 발현은 CAG, EF1a, PGK, 또는 CMV 프로모터에 의해 구동시켰다. 맞춤형 gRNA는 벡터에 연결하고 H1 프로모터에 의해 발현하였다. I12rg에 대한 4 gRNA를 디자인하였다. 다양한 가이드 RNA를 사용하는 경우 상기 표적화 효율은 도 19에 나타낸다.

[0771] **실시예 3: 랫트 게놈 유전자 좌위의 표적화된 변형**

[0772] **3.1: 랫트 ESC 표적화: 랫트 Rosa 26 유전자 좌위.**

[0773] 랫트 Rosa 26 유전자 좌위는 동일한 공간과 함께 마우스에서 Setd5와 Thumpd3 유전자 사이에 존재한다. 랫트 Rosa 26 유전자 좌위(도 12, 패널 B)는 마우스 Rosa 26 유전자 좌위 (도 12, 패널 A)와는 상이하다. 상기 마우스 Rosa 26 전사체는 2 또는 3개의 엑손으로 이루어진다. 랫트 유전자 좌위는 마우스 엑손1(Ex1a)에 대한 상동성 엑손에 추가로 제2 엑손 1(Ex1b)을 함유한다. 제3 엑손은 랫트에서 동정되지 않았다. 랫트 Rosa26 대립형질유전자의 표적화는 도 12(바닥)에 도시하고 여기서, 5kb의 상동성 아암은 DA 랫트 ESC 기원의 게놈 DNA를 사용하는 PCR로 클로닝하였다. 상기 표적화된 대립형질유전자는 랫트 Rosa26 인트론에서 117bp 결실을 치환하는 SA(스플라이싱 수용체)-lacZ-hUb-neo 카세트를 함유한다.

[0774] 랫트 Rosa26 유전자 좌위에서 표적화 효율을 결정하였다 (표 12). 선형화된 벡터는 DA 또는 ACI 랫트 ESC로 전기천공하고, 형질감염된 콜로니는 표준 기술을 사용하여 2i 배지 + G418에서 배양하였다. 개별 콜로니를 집어내고 대립형질유전자 상실 (LOA) 검정을 사용하여 스크리닝하였다(문헌참조: Valenzuela, D. *외* (2003) High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, Nature Biotech. 21:652-660, 본원에 참조로서 인용됨)

표 12. 랫트 Rosa 26 표적화 효율

세포주	콜로니 집어냄	양성임을 재확인함	표적화 효율 (%)
DA.2B	192	4	2.1
ACI.G1	96	4	4.2

[0775]

[0776] **Rosa26-표적화된 랫트 ESC 클론을 사용한 키메라 생성 및 생식선 전달.** 재확인된 Rosa26-표적화된 랫트 ESC 클론을 SD 낭포로 미세주입하고 이것은 이어서 표준 기술을 사용하여 가임신 SD 수용자 암컷에 이전시켰다. 키메라는 코트 색깔로 식별하고; 수컷 F0 키메라는 SD 암컷에 교배하였다. 생식선 (아고우티) F1 새끼는 표적화된 Rosa 26 대립형질유전자의 존재에 대해 유전형 분류하였고; 22개 아고우티 새끼 중 9개는 Rosa 26 유전자 좌위에서 이종접합성으로서 유전형 분류되었다(표 13).

표 13. 표적화된 Rosa26 rESC를 사용한 생식선 전달

세포주	R26 클론 주사됨	키메라를 생성하는 클론	생식선 전달 클론	총 새끼	rESC-유도된 새끼	ESC-유도된 새끼 (%)
DA.2B	4	3	2	AH7: 64 AE3: 112	AH7: 41 AE3: 6	AH7: 63 AE3: 3
ACI.G1	4	4	1	DE9: 39	DE9: 4	10

[0777]

[0778] ***3.2.(a)(i) : 랫트 아포지질단백질 E(ApoE) 유전자 좌위의 표적화.***

[0779] 랫트 아포지질단백질 E (ApoE) 유전자 좌위는 ApoE 기능을 파괴하기 위해 표적화하였다. ApoE 유전자 좌위의 표적화는 ApoE 유전자 좌위에 상동성인 5' 및 3' 상동성 아암으로 플랭킹된 lacZ-hUb-neo 카세트를 포함하는 표적화 벡터를 사용하여 수행하였다. 도 20은 1.8 kb 결실 및 프로타민 프로모터에 의해 구동되는 Crei 유전자를 포함하는 자가 결실 Cre 카세트를 추가로 포함하는 lacZ-hUb-neo 카세트의 삽입에 의해 붕괴된 유전학적으로 변형된 랫트 ApoE 유전자 좌위를 도시한다. 전기천공 조건은 다음과 같다: 6 ug DNA; 2.05 x 10^6 세포;400V; 200 uF: 342 V, 593 usec; 2i + 10 uM ROCKi에서 15 cm 2x 밀집 neoR MEF상에 분주한다.

[0780] ApoE 유전자 좌위에서 표적화 효율을 결정하고 표 14에 나타낸다. 선형화된 벡터는 DA 스트레인으로부터 유도된 DA.2B 랫트 ESC에 전기천공하였고 형질감염된 콜로니는 표준 기술을 사용하여 배양하였다. 개별 콜로니를 집어내고 대립형질유전자 상실(LOA) 검정을 사용하여 스크리닝하였다.

[0781]

	표 14. 랫트 ApoE 표적화 효율			
세포주	벡터	콜로니 집어냄	표적화된	표적화 효율 (%)
DA.2B	ApoE-mSDC	192	7	3.7
DA.2B	ApoE-mSDC	192	15	7.8

[0782] ApoE-표적화된 랫트 ESC 클론을 사용한 키메라 생성 및 생식선 전달을 수행하였다. ApoE-표적화된 랫트 ESC 클론을 SD 낭포에 미세주입하고, 이는 이어서 표준 기술을 사용하여 가임신 SD 수용자 암컷으로 이전시켰다. 키메라는 코트 색깔로 식별하고; 수컷 F0 키메라는 SD 암컷에 교배하였다. F1 새끼는 표적화된 ApoE 대립형질유전자의 존재에 대해 유전형 분류하였다 (표 15).

[0783] 표 15 미세주입 결과

[0784]

Exp	클론	새끼	키메라
1	ApoE-AF5	4	3 (90, 90, 90)
2	ApoE-BC4	5	0

[0785] ApoE에 대한 추가의 표적화 데이타는 또한 도 21에 제공된다.

[0786] ***3.2.(a)(ii). 표적화 벡터를 사용한 랫트에서 ApoE 표적화***

[0787] 도 20은 랫트 ApoE 유전자 좌위 및 표적화 플라스미드의 도식을 제공한다. 도 20의 상부 도식은 랫트 ApoE 유전자 좌위의 게놈 구조 및 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 5 kb 및 5.4 kb; 암회색 박스)에 상응하는 게놈 영역을 보여준다. ApoE의 엑손 1은 비암호화이고 5' 상동성 아암에 가장 인접한 개방 박스로서 나타낸다. ApoE의 3개의 인트론은 선으로 나타내고 엑손 2 및 3은 암호화 영역을 포함하고 점묘 회색 박스로 나타낸다. 엑손 4는 암호화 및 비암호화 서열 둘다를 함유하고 점묘 회색 음영 및 개방 박스로 나타낸다.

[0788] 도 20에서 하부 도식은 표적화 벡터이다. 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 5 kb 및 5.4 kb)은 암회색 박스로 나타낸다. 표적화 벡터는 리포터 유전자(lacZ) 및 loxP 부위에 의해 플랭킹된 자가 결실 카세트(개방 화살표)를 포함한다. 자가 결실 카세트는 마우스 Prm1 프로모터에 작동가능하게 연결된 Crei 유전자 및 인간 유비퀴틴 프로모터에 작동가능하게 연결된 네오마이신 내성 유전자를 포함하는 카세트를 포함한다.

[0789] Crei 유전자는 Cre 리컴비나제를 암호화하는 2개의 엑손을 포함하고 이들은 인트론(Crei)로 분리되어 원핵 세포에서 이의 발현을 차단한다. 예를 들어 자가 결실 카세트를 상세히 기재하고 이의 전문이 본원에 참조로서 인용되는 문헌[미국 특허 제8,697,851호 및 미국 출원 공개공보 제2013-0312129호]을 참조한다. Prm1 프로모터를 사용함에 의해, 자가 결실 카세트는 F0 랫트의 수컷 생식 세포에서 특이적으로 결실될 수 있다. 상기 표적화 벡터는 실시예 1에서 수득된 랫트 ES 세포에 전기천공하고 상기 세포는 2i + 10 uM ROCKi에서 15 cm 2x 밀집 네오마이신-내성 MEF상에 분주하였다. 형질전환된 랫트 ES 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 배양하고, 선별하고 유지시켰다.

[0790] 표 23에 나타낸 바와 같이, 384개 콜로니를 스크리닝하고 23개의 표적화된 클론을 수득하였다. 표적화 효율은 5.99%이었다. 3개 클론을 본원에서 실시예 1에 기재된 바와 같이 낭포에 주사하였다. 키메라를 생성하는 3개의

클론을 수득하고 클론 중 2개를 생식선을 통해 표적화된 변형을 전달하였다.

[0791] **3.2.(a)(iii). 아연 핑거 뉴클레아제와 조합된 표적화 벡터를 사용하여 랫트내 ApoE를 표적화함**

[0792] 실시예 3.2(a)(ii)에 사용된 상기 표적화 벡터는 아연 핑거 뉴클레아제와 조합하여 사용하여 랫트 ApoE 유전자 좌위를 표적화한다. 표 16은 랫트 ApoE 유전자 좌위의 게놈 구성에 대한 개요를 제공한다. 표 16에 나타낸 위치는 랫트 게놈의 참조 서열 빌드 5.0(ENSMBL)으로부터 취하였다. ApoE는 (-) 가닥상의 염색체 1에 있다.

[0793] 표 16. 랫트 ApoE 유전자 좌위 및 아연 핑거 뉴클레아제 결합 부위 및 절단 부위의 위치의 개요.

특징	개시	말단	길이	주지사항
엑손 1	81881110	81881182	73	5' 비-암호화
Exon2	81880269	81880332	64	ATG를 함유함
ATG	81880309	81880311	3	개시 코돈
Exon3	81879607	81879775	169	
ZFN1a 결합 부위	81879707	81879693	15	CAGGCCCTGAACCGC (서열번호 10)
ZFN1 절단 부위	81879692	81879687	6	TTCTGG (서열번호 11)
ZFN1b 결합 부위	81879686	81879671	16	GATTACCTGCGCTGGG (서열번호 12)
인트론 3-4	81879776	81879207	400	
ZF21a 결합 부위	81879591	81879577	15	TTCACCCTCCGCACC (서열번호 13)
ZFN2 절단 부위	81879576	81879570	7	TGCTGAG (서열번호 14)
ZF21b 결합 부위	81879569	81879552	18	TATCCAGATCCAGGGGTT (서열번호 15)
엑손 4	81878371	81879208	838	TGA를 함유함
TGA	81878482	81878484	3	
ApoE 결실	81878482	81880311	1830	

[0794]

[0795] 도 10은 랫트 ApoE 유전자 좌위의 도식을 제공하고 ZFN1 및 ZFN2에 대한 절단 부위를 회색 박스로 나타낸다. ZFN1에 대한 절단 부위는 엑손 3에 있고 ZNF2에 대한 절단 부위는 인트론 3에 있다. ZFN 부위 둘다의 정확한 위치는 표 16에 제시되어 있다. 5' 및 3' 상동성 아암에 상응하는 게놈성 영역(각각 5 kb 및 5.4 kb) 암 갈색 박스로 나타낸다. ApoE의 엑손 1은 비암호화이고 5' 상동성 아암에 가장 인접한 개방 박스로서 나타낸다. ApoE 유전자의 3개의 인트론은 선으로 나타내고 엑손 2 및 3은 점묘 회색 박스로서 나타낸다. 엑손 4는 암호화 및 비암호화 서열 둘다를 함유하고 점묘 회색 음영 및 개방 박스로 나타낸다.

[0796] 상기 사용된 표적화 벡터는 실시예 3.2(a)(ii)에 기재된바와 동일하고 도 20에 나타낸다. ZFN은 ZFN 쌍의 각각의 절반에 대한 하나인 2개의 발현 플라스미드로서 도입하였다. ZFN1에 대해 20 ug의 플라스미드 및 ZFN2에 대한 20 ug의 플라스미드를 사용하였다. ZFN은 제조원[Sigma]로부터 구입하였다. 각각의 ZFN의 발현은 CMV 프로모터로 구동시켰다.

[0797] 표적화 벡터는 실시예 1에서 수득된 랫트 ES 세포로 전기천공하고 세포는 2i + 10 uM ROCKi에서 15 cm 2x 밀집 neoR MEF 상에 분주하였다. 상기 형질전환된 랫트 ES 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 배양하고, 선택하고 유지시켰다.

[0798] 표 23에 나타낸 바와 같이 384개 콜로니를 스크리닝하고 290개 표적화된 클론을 수득하였다. 표적화 효율은 75.52%이었다. 2개 클론을 본원에서 실시예 1에 기재된 바와 같이 낭포에 주입하였다. 키메라를 생성하는 2개의 클론을 수득하고 상기 클론들 중 하나는 생식선을 통해 표적화된 변형을 전달하였다.

[0799] 더욱이, ZFN1 및 ZFN2를 사용하여 2.08% 효율을 갖는 8개 이대립형질유전자 표적화된 클론을 생성하였다.

[0800] ***3.2.(b)(i): 대형 표적화 벡터(LTC)를 사용한 랫트 아포지질단백질 E (ApoE) 유전자 좌위의 표적화된 변형.***

[0801] ApoE 유전자 좌위의 표적화는 약 45 kb의 ApoE 유전자 좌위에 대한 5' 상동성 아암 및 약 23kb의 ApoE 유전자 좌위에 대한 3' 상동성 아암으로 플랭킹된 lacZ-마우스 Prm1-Crei 카세트를 포함하는 대형 표적화 벡터를 사용하여 수행한다. 도 22는 랫트 ApoE 유전자 좌위를 도시하고, 여기서 상기 ApoE 유전자 좌위는 1.83kb의 결실 및

lacZ 유전자, 및 mPrm1-Crei 카세트 및 hUb-neo 선택 카세트를 포함하는 자가 결실 카세트에 의해 파괴되었다. 실시예 3.2(a)(i)에 사용된 방법은 상기 벡터를 랫트 ES 세포에 도입하기 위해 사용될 수 있다.

[0802] ***실시예 3.2.(b)(ii). 대형 표적화 벡터(LTVEC)을 사용한 랫트-ApoE의 표적화***

[0803] 도 22는 랫트 ApoE 유전자 및 대형 표적화 벡터(LTEVC)의 도식을 제공한다. 도 22의 상부 도식은 5' 및 3' 상동성 아암에 상응하는 랫트 ApoE 유전자 좌위 및 게놈 영역(각각 (45 kb 및 23 kb; 암갈색 박스)의 게놈 구성을 보여준다. ApoE의 엑손 1은 비암호화이고 5' 상동성 아암에 가장 인접한 개방 박스로서 나타낸다. ApoE의 3개의 인트론은 선으로 나타내고 엑손 2 및 3은 암호화 영역을 포함하고 점묘 회색 박스로 나타낸다. 엑손 4는 암호화 및 비암호화 서열 둘다를 함유하고 점묘 회색 음영 및 개방 박스로 나타낸다.

[0804] 도 22의 하부 도식은 LTVEC이다. 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 45 kb 및 23 kb)은 암회색 박스로 나타낸다. 표적화 벡터는 수용체 유전자(lacZ), 및 마우스 Prm1 프로모터에 작동가능하게 연결된 Crei 유전자 및 인간 유비퀴틴 프로모터에 작동가능하게 연결된 네오마이신 내성 유전자를 포함하는 약물 선택 카세트를 포함하는, loxP 부위 (개방 화살표)에 의해 플랭킹된 자가 결실 카세트를 포함한다. Crei는 Cre 리컴비나제를 암호화하는 2개의 엑손을 포함하고, 이들은 인트론(Crei)에 의해 분리되어 있어 원핵 세포에서의 발현을 차단한다. 예를 들어, 문헌[미국 특허 제8,697,851호 및 미국 출원 공개공보 2013-0312129, 을 참조하고, 이것은 자가 결실 카테트를 상세히 기재하고 있고 이들의 전문이 본원에 참조로서 인용된다. 마우스 Prm1 프로모터를 사용함에 의해, 자가 결실 카세트는 F0 랫트의 수컷 생식 세포에서 특이적으로 결실될 수 있다.

[0805] LTVEC는 실시예 1에서 수득된 랫트 ES 세포에 전기천공하고 상기 세포는 2i + 10 uM ROCKi에서 15 cm 2x 밀집 neoR MEF 상에 분주하였다. 형질전환된 랫트 ES 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 배양하고, 선별하고 유지시켰다.

[0806] 표 23에 나타낸 바와 같이, 288개의 콜로니를 스크리닝하고 8개의 표적화된 클론을 수득하였다. 표적화 효율은 2.78%이었다. 3개의 클론은 본원의 실시예 2에 기재된 바와 같이 낭포 단계에서 숙주 배아에 주사하여 키메라 랫트(F0)을 제조하였다. 더욱이, 1개의 0.35%의 이대립형질유전자 효율을 제공하는 이대립형질유전자 표적화된 클론을 제조하였다.

[0807] ***3.2.(b)(iii). 아연 핑커 뉴클레아제와 조합된 대형 표적화 벡터(LTVEC)를 사용한 랫트에서 ApoE 표적화***

[0808] 실시예 3.2(b)(ii)에서 사용된 상기 LTVEC는 아연 핑커 뉴클레아제와 함께 사용하여 랫트 ApoE 유전자 좌위를 표적화하였다. 표 16은 랫트 ApoE 유전자 좌위의 게놈 구성의 개요를 제공하고 나타낸 바와 같은 위치는 랫트 게놈의 표준 서열(ENSMBL)의 빌드 5.0으로부터 취하였다.

[0809] 도 23은 랫트 ApoE 유전자 좌위의 도식을 제공하고 ZFN1 및 ZFN2에 대한 절단 부위를 회색 막대로 나타낸다. ZFN1에 대한 절단 부위는 t 엑손 3에 있고 ZNF2에 대한 절단 부위는 인트론 3에 있다. ZFN 부위 둘다의 정확한 위치는 표 16에 제시되어 있다. 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 45 kb 및 23 kb)은 암회색 박스로 나타낸다. ApoE 유전자의 엑손 1은 비암호화이고 5' 상동성 아암에 가장 인접한 개방 박스로 나타낸다. ApoE의 3개의 인트론은 선으로 나타낸다. 엑손 2 및 3은 점묘 회색 박스로 나타낸다. 엑손 4는 암호화 및 비암호화 서열 둘다를 함유하고 점묘 회색 음영 및 개방 박스로 나타낸다.

[0810] 사용된 LTVEC는 실시예 3.2(b)(ii)의 것 및 도 22에 나타낸 것과 동일하다. ZFN은 ZFN 쌍의 각각의 절반에 대한 하나인 2개의 발현 플라스미드로서 도입하였다. ZFN 1에 대해 20 ug의 플라스미드 및 ZFN2에 대해 20 ug의 플라스미드를 사용하였다. ZFN은 제조원[Sigma]로부터 구입하였다. 각각의 ZFN의 발현은 CMV 프로모터로 구동시켰다.

[0811] 상기 표적화 벡터는 실시예 1에서 수득된 랫트 ES 세포에 전기천공시키고 상기 세포는 2i + 10 uM ROCKi.에서 15 cm 2x 밀집 neoR MEF상에 분주하였다. 형질전환된 랫트 ES 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 배양하고, 선별하고 유지시켰다.

[0812] 표 23에 나타낸 바와 같이, 288개의 콜로니를 스크리닝하고 16개의 표적화된 클론을 수득하였다. 표적화 효율은 5.56%이었다. 하나의 클론을 실시예 2에 기재된 바와 같이 낭포에 주입하였다.

[0813] 더욱이, ZFN1 및 ZFN2의 사용은 0.35%의 효율과 함께 하나의 이대립형질유전자 표적화된 클론을 제조하였다.

[0814] ***3.3(a): 랫트 인터류킨-2 수용체 감마 (IL2r-γ) 유전자 좌위의 표적화***

[0815] 상기 랫트 인터류킨-2 수용체 감마 (IL2r-γ) 유전자 좌위는 IL2r- γ 기능을 파괴하기 위해 표적화하였다.

IL2r- γ는 IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21를 시그날 전달하는데 중요한 역할을 하고 IL2r-γ 내 돌연변이는 T, B 및 NK 세포 발육에 중증 결함과 관련된다.

[0816] IL2r-γ 유전자 좌위의 표적화는 IL2r-γ 유전자 좌위에 상동성인 5' 및 3' 상동성 아암으로 플랭킹된 eGFP-hUb-neo 카세트를 포함하는 표적화 벡터를 사용하여 수행하였다. 도 26은 랫트 IL2r-γ 유전자 좌위의 게놈 구조를 도시하고, 여기서 IL2r-γ 유전자 좌위는 3.2kb 결실에 의해 파괴되었다. 상기 표적화된 IL2r-γ 유전자 좌위는 또한 eGFP 유전자 및 마우스 프로타민 1 프로모터에 작동가능하게 연결된 Crei 함유 자가 결실 카세트 및 네오마이신 내성 유전자에 작동가능하게 연결된 hUb 프로모터를 포함하는 약물 선택 카세트를 포함했다.

[0817] IL2r-γ 유전자 좌위에서 표적화 효율을 결정하고 표 17에 나타낸다. 선형화된 벡터는 DA.2B 랫트 ESC에 전기천공하고 형질감염된 콜로니는 표준 기술을 사용하여 배양하였다. 개별 콜로니를 집어내고 대립형질유전자 상실(LOA) 검정을 사용하여 스크리닝하였다.

[0818]

	표 17. 랫트 IL2r-γ 표적화 효율			
세포주	벡터	콜로니 집어냄	표적화된	표적화 효율 (%)
DA.2B	I12rg-플록시드 네오	136	1	0.7
DA.2B	I12rg-mSDC	96	4	4.2

[0819] IL2r-γ-표적화된 랫트 ESC 클론을 사용한 키메라 생성 및 생식선 전달을 수행하였다. IL2r-γ- 표적화된 랫트 ESC 클론은 SD 낭포에 미세주입하고 이어서 표준 기술을 사용하여 가임신 SD 수용자 암컷에 전달하였다. 키메라는 코트 색깔로 식별하고; 수컷 F0 키메라는 SD 암컷에 교배하였다. 생식선 F1 새끼는 표적화된 IL2r-γ 대립형질유전자의 존재에 대해 유전형 분류하였다(표 18).

[0820] 표 18 미세주입 결과

[0821]

Exp	클론	새끼	키메라
1	I12rg-AA1	5	2 (90, 70)
2	I12rg-AA1	10	3 (90, 90, 80)

[0822] $I12rg^{-/Y}$ 키메라 #3의 표현형은 추가로 연구하였다. 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)는 여러 림프성 계통에서 항원들을 인지하는 항체들로 염색시켰다. GFP-양성 PBMC는 2개의 키메라로부터 검출하였다. 더욱이, GFP+ 세포는 T-세포 마커 CD3에 대해 음성이었고 대부분 B-세포 마커 B220 및 NK 세포 마커 CD161a에 대해 음성이었다. 도 30을 참조한다. 작은 이중 양성 집단은 마우스에서 공개된 I12rg 녹아웃 표현형과 일치한다. 이들 데이타는 IL2 수용체 감마 양성 세포를 함유하는 키메라로부터 수득하였고 이것은 표현형의 분석을 복잡하게 할 수 있다.

[0823] ***3.3(b): 랫트 인터류킨-2 수용체 감마 (IL2r-γ) 유전자 좌위의 표적화된 변형***

[0824] 랫트 인터류킨-2 수용체 감마 (IL2r-γ) 유전자 좌위는 랫트에서 IL2r- γ 기능을 파괴하기 위해 표적화하였다. 도 26은 유전자 좌위로 도입된 랫트 I12rg 유전자 좌위 및 표적화 벡터의 게놈 구조를 보여준다. eGFP는 유전학적으로 변형된 랫트의 면역표현형이 FACS를 사용하여 조사될 수 있도록 리포터로서 선택되었다. 자가-결실 카세트 (hUb-Neo; Prm1-Cre)를 사용하여 F0 랫트의 암컷 생식 세포에서 특이적으로 약물 선택 카세트 및 Cre 유전자를 결실시켰다. 추가로, 상기 표적화 벡터는 랫트 I12rg 유전자의 전체 암호화 영역(약 3.2kb)이 결실되도록 디자인하였다.

[0825] ESC에서 결실 크기는 랫트 I12rg 유전자 좌위에 특이적인 프라이머를 사용하는 PCR에 의해 확인하였다. 낭포 단계에서 표적화된 클론의 숙주 배아로의 미세주입시 높은 %의 키케라가 수득되었다. 상기 키메라는 육종을 위해 설정하였다. 표적화가 예상된 바와 같이 작용했는지의 여부를 결정하기 위해, 키메라로부터 말초 혈액을 육종 전에 수거하고 말초 혈액에서 면역 세포의 표현형은 FACS를 통해 분석하였다. 도 30에 나타낸 바와 같이, GFP-양성 세포는 조사된 3개의 키메라 중 2개의 말초 혈액에서 검출하였고(우측 패널), 키메라 랫트는 1% 미만의 T 세포, 1% 미만의 B 세포 및 1% 미만의 NK-세포를 함유하였고, 이들은 GFP (즉, I12rg KO 세포)에 대해 양성이었

다.

[0826] ***3.4(a). 대형 표적화 벡터 (LTVEC)를 사용한 랫트에서 Rag2 유전자 좌위의 표적화***

[0827] 표 19는 랫트 Rag2 유전자 좌위의 게놈 구조의 개요를 제공하고 나타낸 위치는 랫트 게놈의 표준 서열(ENSMBL)의 빌드 5.0으로부터 취하였다. Rag2는 염색체 3의 (+) 가닥 상에 있다.

[0828] 표 19. 랫트 Rag2 유전자 좌위의 게놈 구조 개요.

[0829]

특징	개시	말단	길이	주지사항
엑손 1	97,851,317	97,851,448	132	
엑손 2	97,854,635	97,854,693	59	
엑손 3	97,858,260	97,859,615	1,356	전체 암호화 서열을 함유함
ATG	97,856,286	97,856,288	3	개시 코돈
TGA	97,857,867	97,857,869	3	종료 코돈
Rag2 결실	97,856,289	97,859,784	3,496	

[0830] 도 27은 랫트 Rag2 유전자 좌위 및 대형 표적화 벡터 (LTVEC)의 도식을 제공한다. 도 27의 상부 도식은 랫트 ApoE 유전좌의 게놈 구성 및 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 48 Kb 및 15 Kb; 암회색 박스)에 상응하는 게놈 영역들을 보여준다. Rag2는 점묘 회색 음영에 의해 나타낸 단일 엑손을 포함한다.

[0831] 도 27에서 하부 도식은 LTVEC이다. 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 48 kb 및 15 kb)은 암회색 박스로 나타낸다. LTVEC는 리포터 유전자 (lacZ), 및 loxP 부위(개방 화살표)에 의해 플랭킹된 자가 결실 카세트를 포함한다. 자가-결실 카세트는 Crei 유전자에 작동가능하게 연결된 마우스 Prm1 프로모터 및 네오마이신 내성 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 유비퀴틴 프로모터를 포함하는 약물 선택 카세트를 포함한다. Crei는 Cre 리컴비나제를 암호화하는 2개의 엑손을 포함하고 이들은 인트론(Crei)에 의해 분리되어 있어 원핵 세포에서 이의 발현을 차단한다. 예를 들어, 자가 결실 카세트를 상세히 기재하고 있고 이들의 전문이 본원에 참조로서 인용되는 문헌[미국 특허 제8,697,851호 및 미국 출원 공개공보 제2013-0312129호,]을 참조한다. 마우스 Prm1 프로모터를 사용함에 의해, 자가 결실 카세트는 F0 랫트의 수컷 생식 세포에서 특이적으로 결실될 수 있다.

[0832] LTVEC는 실시예 1에서 수득된 랫트 ES 세포에 전기천공하고 상기 세포는 2i + 10 uM ROCKi에서 15 cm 2x 밀집 neoR MEF 상에 분주하였다. 형질전환된 랫트 ES 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 배양하고 유지시켰다.

[0833] 콜로니는 본원의 기타 다른 곳에 기재된 바와 같이 스크리닝하고 표적화된 클론을 수득하였다. 이어서 표적화된 클론은 본원의 기타 다른 곳에 기재된 바와 같이 숙주 배아에 주사하여 F0 랫트를 제조하였다.

[0834] ***3.4.(b). 랫트에서 Rag1 및 Rag 2 유전자 좌위 표적화***

[0835] 도 28은 랫트 Rag1/Rag2 유전자 좌위의 게놈 구조를 제공한다. CDS는 상기 암호화 서열을 나타내고 회색 박스는 엑손을 나타낸다. Rag2는 전사와 함께 우측으로 "플러스" 가닥상에 있다. Rag1은 전사와 함께 좌측으로 "마이너스" 가닥상에 있다. Mbp = 100만 염기쌍.

[0836] 표 20은 랫트 Rag2 및 Rag1 유전자 좌위의 게놈 구성의 개요를 제공하고 나타낸 위치는 랫트 게놈의 표준 서열(ENSMBL)의 빌드 5.0으로부터 취하였다. Rag1은 염색체 3의 (-) 가닥상에 있다.

[0837] 표 20. 랫트 Rag1 유전자 좌위의 게놈 구성 개요.

[0838]

특징	개시	말단	길이	주지사항
엑손 1	97,877,145	97,877,066	80	
엑손 2	97,872,503	97,866,047	6,457	전체 암호화 서열을 함유함
ATG	97,872,489	97,872,487	3	개시 코돈
TAA	97,869,369	97,869,367	3	종료 코돈
Rag1-2 결실	97,856,289	97,872,486	16,198	

[0839] 도 29는 랫트 Rag2 및 Rag1 유전자 좌위 및 대형 표적화 벡터 (LTVEC)의 도식을 제공한다. 도 29의 상부 도식은 Rag1 및 Rag2 유전자 좌위의 게놈 구성 및 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 48 kb 및 84 kb; 암회색 박스)에 상응하

는 게놈 영역을 보여준다. Rag2 및 Rag 1은 각각 점묘 회색 음영에 의해 나타낸 단일 엑손을 포함한다. 도 29에서 하부 도식은 LTVEC이다. 5' 및 3' 상동성 아암 (각각 48 kb 및 84 kb)은 암회색 박스로 나타낸다. LTVEC는 리포터 유전자 (lacZ), 및 loxP 부위(개방 화살표)에 의해 플랭킹된 자가 결실 카세트를 포함한다. 자가-결실 카세트는 Crei 유전자에 작동가능하게 연결된 랫트 Prm1 프로모터 및 네오마이신 내성 유전자에 작동가능하게 연결된 인간 프로모터를 포함하는 약물 선택 카세트를 포함한다. Crei는 Cre 리컴비나제를 암호화하는 2개의 엑손을 포함하고 이들은 인트론(Crei)에 의해 분리되어 있어 원핵 세포에서 이의 발현을 차단한다. 예를 들어, 자가 결실 카세트를 상세하게 기재하고 이들의 전문이 본원에 참조로서 인용디되는 문헌[미국 특허 제8,697,851호 및 미국 출원 공개공보 제2013-0312129호을 참조한다. 수컷 생식 세포에서 특이적으로 Crei의 발현을 구동시키는 랫트 Prm1 프로모터를 사용함에 의해, 자가 결실 카세트는 F0 랫트의 수컷 생식 세포로부터 결실될 수 있다.

[0840] LTVEC는 실시예 1에서 수득된 랫트 ES 세포에 전기천공하고 상기 세포는 2i + 10 uM ROCKi에서 15 cm 2x 밀집 neoR MEF 상에 분주하였다. 형질전환된 랫트 ES 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 배양하고 유지시켰다.

[0841] 콜로니는 본원의 기타 다른 곳에 기재된 바와 같이 스크리닝하고 표적화된 클론을 수득하였다. 이어서 표적화된 클론은 본원의 기타 다른 곳에 기재된 바와 같이 숙주 배아에 주사하여 F0 랫트를 제조하였다.

[0842] **실시예 4. 인간화**

[0843] ***4.1. 랫트 게놈 유전자 좌위의 인간화***

[0844] 랫트 게놈 유전자 좌위의 인간화는 *시험관내* 하나 이상의 전기천공 후 이들의 만능을 지속할 수 있고 후속 세대로 표적화된 유전학적 변형을 전달할 수 있는 본원에 기재된 랫트 ES 세포를 사용하여 수행한다. 추가로, 대형 게놈 DNA 단편을 수용하는데 있어서 플라스미드의 한계를 극복하고 표적화된 유전학적 변형을 랫트 ES 세포내 내인성 유전자 좌위로 도입하는 낮은 효율을 개선하기 위해, 하나 이상의 표적화된 유전학적 변형은 세균 예를 들어, *이. 콜라이*에서 세균 상동성 재조합(BHR)을 사용하고 대형 표적화 벡터(LTVEC)를 사용함에 의해 수행한다. 본원에 기재된 LTVEC는 예를 들어, 하나 이상의 변형과 함께 내인성 랫트 게놈 서열의 대형 단편을 포함하거나 특정 게놈 영역에 상보적인 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 외인성 핵산 (*예를 들어*, 상동성 또는 이종상동성 인간 핵산)을 포함한다.

[0845] ***4.2. 랫트 면역글로불린 유전자 좌위의 인간화***

[0846] 내인성 랫트 면역글로불린 중쇄 유전자 좌위의 인간화는 하나 이상의 내인성 랫트 면역글로불린 중쇄 핵산 서열 (예를 들어, 하나 이상의 내인성 V_H 유전자 절편, 하나 이상의 인간 D 유전자 절편 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 절편)을 제거하고; 변형된 면역글로불린 유전자 좌위에 표적화 벡터, 예를 들어, 하기를 포함하는 대형 표적화 벡터(LTVEC)를 도입함에 의해 수행된다: (i) 하나 이상의 비재배열된 인간 가변 영역 핵산 서열 (예를 들어, 하나 이상의 인간 V_H 유전자 절편, 하나 이상의 인간 D 유전자 절편, 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 절편), 또는 하나 이상의 재배열된 인간 가변 영역 핵산 서열 (예를 들어, 하나 이상의 인간 재배열된 V-D-J 유전자 절편); (ii) 선택 카세트 (*예를 들어, loxP 부위로 플랭킹된* 네오마이신 내성 유전자); 및 (iii) 5' 및 3' 랫트 상동성 아암.

[0847] 간략하게, 랫트 BAC 클론에서 하나 이상의 내인성 랫트 면역글로불린 중쇄 가변 영역 절편 (즉., 하나 이상의 V_H 유전자 절편, 하나 이상의 인간 D 유전자 절편, 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 절편)은 랫트 상동성 아암에 의해 플랭킹된 선택 카세트로 내인성 랫트 면역글로불린 중쇄 유전자 좌위를 표적화함에 의해 제거되거나 불활성화된다. 보다 구체적으로, 표적화 벡터는 표적 랫트 게놈 서열(예를 들어, 하나 이상의 랫트 VH 유전자 절편, 하나 이상의 인간 D 유전자 절편, 및 하나 이상의 인간 JH 유전자 절편을 포괄하는 업스트림 및 다운스트림 랫트 게놈 DNA 서열)을 보완하는 5' 및 3' 랫트 상동성 아암으로 플랭킹된 선택 카세트 (예를 들어, loxP 부위로 플랭킹된 네오마이신 내성 유전자)를 함유하도록 작제된다.

[0848] 다음, 랫트 면역글로불린 중쇄 유전자 좌위를 포괄하는 대형 랫트 게놈 DNA 단편을 함유하는 세균 세포는 선택되고 일시적 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된, 리컴비나제를 암호화하는 플라스미드(예를 들어, pABG)가 도입된다. 상기 작제된 상기 표적화 벡터는 이어서 재조합 적격 세균 세포로 도입한다. 전기천공 후, 세균 세포는 유도제(예를 들어, 아라비노사이드)로 처리하여 BAC 클론에서 표적화 벡터와 표적 랫트 게놈 서열간의 상동성 재조합을 개시한다. 형질전환된 세포는 고밀도로 분주하고 약물 내성인 콜로니를 발견하기 위해 약물 선별에 적용하였다. 약물-내성 콜로니를 집어내고 표적화된 증폭을 위해 스크리닝하였다.

[0849] 표적화된 유전학적 변형의 동정을 촉진하기 위해, 고속 처리 정량 검정, 즉, 대립형질유전자 변형(MOA) 검정을

사용하고 이는 유전학적 변형 후 모 염색체에서 변형된 대립형질유전자(들)의 대형 스크리닝을 가능하게 한다. MOA 검정은 다양한 분석학적 기술을 통해 수행할 수 있고, 이는 정량적 PCR, 예를 들어, 실시간 PCR(qPCR)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 실시간 PCR은 표적 유전자 좌위를 인지하는 제1 프라이머 세트 및 비-표적화된 참조 유전자 좌위를 인지하는 제2 프라이머 세트를 포함한다. 추가로, 상기 프라이머 세트는 증폭된 서열을 인지하는 형광성 프로브를 포함할 수 있다. 대안적으로, 상기 정량적 검정은 다양한 분석학적 기술을 통해 수행될 수 있고, 이는 형광성-매개된 동일계 하이브리드화(FISH), 비교 게놈 하이브리드화, 등온 DNA 증폭, 고정화된 프로브로의 정량적 하이브리드화, Invader Probes®, MMP assays®, TaqMan® Molecular Beacon, 및 Eclipse™ 프로브 기술을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. (문헌참조: 예를 들어, US2005/0144655, 본원에 참조로서 인용됨).

[0850] 변형된 랫트 BAC 클론, 즉, 랫트 게놈 DNA 서열을 함유하는 BAC 클론을 포함하는 세균 세포(여기서, 하나 이상의 내인성 중쇄 가변 영역 유전자 절편들 (V_H, D, 및/또는 J_H 유전자 절편)은 결실되어 있거나 불활성화되어 있다)는 이어서 다음을 포함하는 대형 표적화 벡터(LTVEC)로 전기천공시켰다: (i) 하나 이상의 재배열되지 않은 인간 가변 영역 핵산 서열(예를 들어, 하나 이상의 비재배열된 인간 V_H 유전자 절편, 하나 이상의 인간 D 유전자 절편 및 하나 이상의 인간 J_H 유전자 절편), 하나 이상의 재배열된 인간 가변 영역 핵산 서열 (예를 들어, 하나 이상의 재배열된 인간 V-D-J 유전자 절편).

[0851] 세균 세포에서 상동성 재조합의 개시 및 양성 클론의 선택은 상기된 바와 같이 수행한다. 비재재열되거나 재배열된 인간 면역글로불린 중쇄 가변 영역 핵산 서열은 내인성 면역글로불린 중쇄 유전자 좌위로 표적화되는 경우, 내인성 랫트 면역글로불린 중쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다. 대안적으로, 내인성 랫트 중쇄 부변 영역 유전자 좌위는 예를 들어, 내인성 중쇄 불변 영역 유전자 좌위로부터 하나 이상의 랫트 중쇄 불변 영역 유전자 절편(CH)을 제거함에 의해 불활성화될 수 있고 인간 중쇄 불변 영역 핵산 서열로 치환될 수 있다.

[0852] 또한, 내인성 랫트 면역글로불린 κ 또는 λ 경쇄 유전자 좌위의 인간화는 하나 이상의 내인성 랫트 면역글로불린 κ 및/또는 λ 경쇄 가변 영역 핵산 서열 (예를 들어, 하나 이상의 내인성 랫트 Vκ 유전자 절편들 및 하나 이상의 내인성 랫트 Jκ 유전자 절편들)을 제거하고; 변형된 면역글로불린 경쇄 유전자 좌위를 표적화 벡터, *예를 들어,* 다음을 포함하는 대형 표적화 벡터 (LTVEC)로 표적화함에 의해 수행된다: (i) 하나 이상의 비재배열된 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역 핵산 서열 (*예를 들어,* 하나 이상의 인간 Vκ 유전자 절편 및 하나 이상의 인간 Jκ 유전자 절편), 또는 하나 이상의 재배열된 인간 가변 영역 핵산 서열 (예를 들어, 하나 이상의 인간 재배열된 Vκ-Jκ 유전자 절편); (ii) 선택 카세트 (*예를 들어* loxP 부위로 플랭킹된 네오마이신 내성 유전자); 및 (iii) 5'및 3' 랫트 상동성 아암.

[0853] 비재배열되거나 재배열된 인간 면역글로불린 경쇄 가변 영역 핵산 서열은 내인성 면역글로불린 경쇄 유전자 좌위로 표적화되는 경우, 내인성 랫트 면역글로불린 경쇄 불변 영역 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0854] 세균 세포에서 생성된 LTVEC는 예를 들어, 인간화된 랫트 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 유전자 좌위를 함유하는 삽입 핵산을 포함하고, 여기서, 하나 이상의 내인성 랫트 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 유전자 절편은 하나 이상의 인간 중쇄 또는 경쇄 가변 영역 유전자 절편 및 특정 게놈 표적 서열에 상보적인 랫트 상동성 아암 (예를 들어, 5kb 내지 150kb 범위)으로 치환되었다. 상기된 유전학적 변형을 포함하는 LTVEC는 이어서 선형화하고 랫트 ES 세포에 전기천공하였다. 전기천공된 랫트 ES 세포는 고밀도로 분주하여 표적화 벡터를 포함하는 약물 내성 ES를 선택하였다. 약물 선택 프로세싱은 대다수의 분주된 세포(약 99%)를 제거하고 이의 각각이 단일 세포로부터 유래된 클론인 개별 콜로니를 잔류시킨다. 잔류하는 세포 중에, 대부분의 세포 (~ 80-100%)는 게놈내 무작위 위치에 위치된 표적화 벡터를 함유한다. 따라서, 콜로니는 집어내고 개별적으로 유전형 분류하여 올바른 게놈 위치에서 표적화 벡터를 포함하는 랫트 ES 세포를 동정한다(예를 들어, 상기된 바와 같은 대립형질유전자 변형(MOA) 검정을 사용하여).

[0855] 표적화된 유전학적 변형의 효율을 증가시키기 위해, 랫트 ES 세포는 LTVEC와 함께 ZFN 1 및 2 (또는 TALEN 1 및 2)를 발현하는 발현 벡터(또는 mRNA)로 전기천공시켰다. 표적화 벡터의 상동성 아암은 ZFN 표적 부위 외부에 있고 따라서 표적화 벡터는 ZFN에 의해 절단되지 않는다. ZFN에 의해 생성된 이중 가닥 절단은 포유동물 세포에서 (비-상동성 말단-접합; NHEJ) 정상적으로 일어나는 매우 작은 %의 복구를 차지하는 상동성 지시된 복구(HDR)를 자극한다.

[0856] 대안적으로, 본원에 기재된 바와 같이 II형 CRISPR-관련된 뉴클레아제 (예를 들어, Cas9)를 함유하는 발현

벡터, 가이드 RNA (CRISPR-RNA (cr-RNA) 및 트랜스 작용 CRISPR RNA (tracrRNA)를 포함하는)은 LTVEC와 함께 세균 세포에 도입되어 표적 게놈 유전자 좌위에서 상동성 재조합의 효율을 증가시킬 수 있다. 전기천공된 세포는 고밀도로 분주하고 약물 선별에 적용하여 약물 내성인 콜로니를 모색하였다. 약물 내성 콜로니를 집어내고 본원에 기재된 바와 같은 대립형질유전자 변형 (MOA) 검정을 사용하여 표적화된 변형에 대해 스크리닝하였다. 이들 과정 후, 표적 효율에서의 개선이 성취될 수 있다. 예를 들어, 개선의 양은 작을 수 있거나(예를 들어, 10%에서 15%로 개선) 클 수 있다(예를 들어, 10%에서 80%로 개선).

[0857] 표적화된 유전학적 변형을 포함하는 선택된 랫트 ES 세포는 이어서 숙주 랫트 배아, 예를 들어, 전-상실포배 또는 낭포 단계 랫트 배아에 도입되고 대리모의 자궁에 이식되어 시조 랫트(F0 랫트)를 제조한다. 후속적으로, 시조 랫트를 야생형 랫트에 교배하여 유전학적 변형에 대해 이종접합성인 F1 후손을 제조하였다. 이종접합성 F1의 짝짓기는 유전학적 변형에 대해 이종접합성 후손을 제조할 수 있다.

[0858] *4.3(a). Rat IL2rg의 인간 IL2 수용체 감마로의 치환*

[0859] 표 21은 랫트 인터류킨 2 수용체 감마 유전자 좌위의 개요를 제공하고 나타낸 위치는 랫트 게놈의 표준 서열(ENSMBL)의 빌드 5.0으로부터 취하였다. IL2rg는 염색체 X상의 (-) 가닥상에 있다.

[0860] 표 21. 랫트 I12rg 유전자 좌위의 게놈 구성의 개요

특징	개시	말단	길이	주지사항
엑손 1	72,021,388	72,021,516	129	ATG를 함유함
ATG	72,017,500	72,017,502	3	개시 코돈
Exon2	72,021,007	72,021,160	154	
ZFN1a 결합 부위	72,021,014	72,021,028	15	CAGGCCCTGAACCGC (서열번호 17)
ZFN1 절단 부위	72,021,008	72,021,013	6	TTCTGG (서열번호 18)
ZFN1b 결합 부위	72,020,993	72,021,007	15	GATTACCTGCGCTGGG (서열번호 20)
Exon3	72,020,606	72,020,790	185	
Exon4	72,020,274	72,020,413	140	
Exon5	72,019,662	72,019,824	163	
Exon6	72,019,101	72,019,197	97	
Exon7	72,018,844	72,018,910	67	
Exon8	72,017,856	72,018,506	651	TGA를 함유함
TGA	72,018,321	72,018,323	3	종료 코돈
I12rg 결실	72,018,323	72,021,502	3,180	

[0861]

[0862] 도 26에서 하부 도식은 IL2rg 3.2kb 결실에 대한 표적화 벡터이다. 표적화 벡터는 내인성 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자(eGFP) 및 loxP 부위(개방 화살표)에 의해 플랭킹된 자가 결실 카세트를 포함한다. 자가 결실 카세트는 마우스 Prm1 프로모터에 작동가능하게 연결된 Crei 유전자 및 인간 유비퀴틴 프로모터에 작동가능하게 연결된 네오마이신 내성 유전자를 포함하는 카세트를 포함한다.

[0863] Crei 유전자는 Cre 리컴비나제를 암호화하는 2개의 엑손을 포함하고 이들은 인트론(Crei)로 분리되어 원핵 세포에서 이의 발현을 차단한다. 예를 들어 자가 결실 카세트를 상세히 기재하고 이의 전문이 본원에 참조로서 인용되는 문헌[미국 특허 제8,697,851호 및 미국 출원 공개공보 제2013-0312129호]을 참조한다. 마우스 Prm1 프로모터를 사용함에 의해 Cre 발현 카세트 및 약물 선택 카세트는 F0 랫트의 수컷 생식 세포에서 특이적으로 결실될 수 있다. 상기 표적화 벡터는 실시예 1에서 수득된 랫트 ES 세포에 전기천공하고 상기 세포는 2i + 10 uM ROCKi에서 15 cm 2x 밀집 네오마이신-내성 MEF상에 분주하였다. 형질전환된 랫트 ES 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 배양하고, 선별하고 유지시켰다.

[0864] 표 23에 나타낸 바와 같이, 168개 콜로니를 스크리닝하고 6개의 표적화된 클론을 수득하였다. 상기 표적화 효율은 3.57%였다.

[0865] 클론은 본원의 실시예 1에 기재된 바와 같이 낭포에 주사한다. F0 랫트를 생성하는 클론을 수득하고 생식선을 통해 표적화된 변형을 전달하는 F0 랫트를 수득한다.

[0866] ***실시예 4.3(b). 랫트 IL2rg Ecto-도메인의 인간 IL2rg Ecto-도메인으로의 치환***

[0867] IL 2 수용체 감마의 전장 인간화는 상기 변형된 유전자 좌위를 갖는 랫트는 인간 I12rg를 생성하기때문에 유용하고; 이것은 인간 I12rg에 특이적인 항체와 함께 랫트에서 인간 I12rg의 검출을 가능하게 한다.

[0868] ecto-인간화 (즉, I12rg의 랫트 ecto-도메인의 I12rg의 인간 ecto-도메인으로의 치환)는 I12rg에 대한 인간 리간드에 결합하는 I12rg 폴리펩타이드를 유도하지만, 세포질 도메인이 여전히 랫트이기 때문에, I12rg의 ecto-인간화된 형태는 도한 랫트 시그날 전달 기구와 상호작용할 것이다. 도 33은 랫트 IL-2rg 단백질의 나머지에 융합된 IL-2rg의 인간 ecto-도메인을 포함하는 인간 IL-2rg 단백질 (서열번호 20; NP_000197.1); 랫트 IL-2rg 단백질 (서열번호 21; NP_543165.1); 및 키메라 IL-2rg 단백질 (서열번호 22)의 서열 정렬을 제공한다. 인간과 랫트 IL-2rg간의 접합은 수직선으로 나타낸다.

[0869] 표 22는 랫트 인터류킨 2 수용체 감마 유전자 좌위의 개요를 제공하고 나타낸 상기 위치는 랫트 게놈의 표준 서열(ENSMBL)의 표준 서열의 빌드 5.0으로부터 취한다. IL2rg는 염색체 X상의 (-) 가닥상에 있다. IL2rg의 ecto-도메인의 위치가 추가로 주지된다.

[0870] 표 22. 랫트 I12rg 유전자 좌위의 게놈 구성의 개요

특징	개시	말단	길이	주지사항
엑손 1	71,111,444	71,111,543	100	ATG를 함유함
ATG	71,111,537	71,111,539	3	개시 코돈
Exon2	71,110,897	71,111,050	154	
Exon3	71,110,504	71,110,688	185	
Exon4	71,110,156	71,110,295	140	
Exon5	71,109,228	71,109,390	163	
Exon6	71,108,599	71,108,645	47	막관통 도메인을 함유함
Exon7	71,108,277	71,108,346	70	
Exon8	71,107,404	71,107,921	518	TGA를 함유함
TGA	71,108,736	71,108,738	3	종료 코돈
전장 인간화:	71,107,404	71,111,539	4,136	(ATG 내지 TGA 플러스 3' poly-A)
엑토-인간화	71,108,679	71,111,539	2,861	(ATG에서 막관통 도메인의 개시까지)

[0871]

[0872] 플라스미드 표적화 벡터는 인터류킨 2 수용체 감마 암호화 영역의 랫트 ecto-도메인을 도 31에 나타낸 바와 같이 ecto 도메인으로 치환하도록 작제하였다. 상기 표적화 벡터는 실시예 1에서 수득된 랫트 ES 세포에 전기천공하고 상기 세포는 2i + 10 uM ROCKi에서 15 cm 2x 밀집 네오마이신-내성 MEF상에 분주하였다. 형질전환된 랫트 ES 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 배양하고, 선별하고 유지시켰다.

[0873] 표 23에 나타낸 바와 같이, 192개 콜로니를 스크리닝하고 13개의 표적화된 클론을 수득하였다. 표적화 효율은 6.77%이었다.

[0874] 클론은 본원의 실시예 1에 기재된 바와 같이 낭포에 주사한다. F0 랫트를 생성하는 클론을 수득하고 생식선을 통해 표적화된 변형을 전달하는 F0 랫트를 수득한다.

[0875] **실시예 5. 개요**

[0876] 표 23. 실시예 3 및 4에서 논의된 다양한 벡터 유형 및 뉴클레아제 제제를 사용한 랫트 표적화의 개요.

표 23 표적화 개요

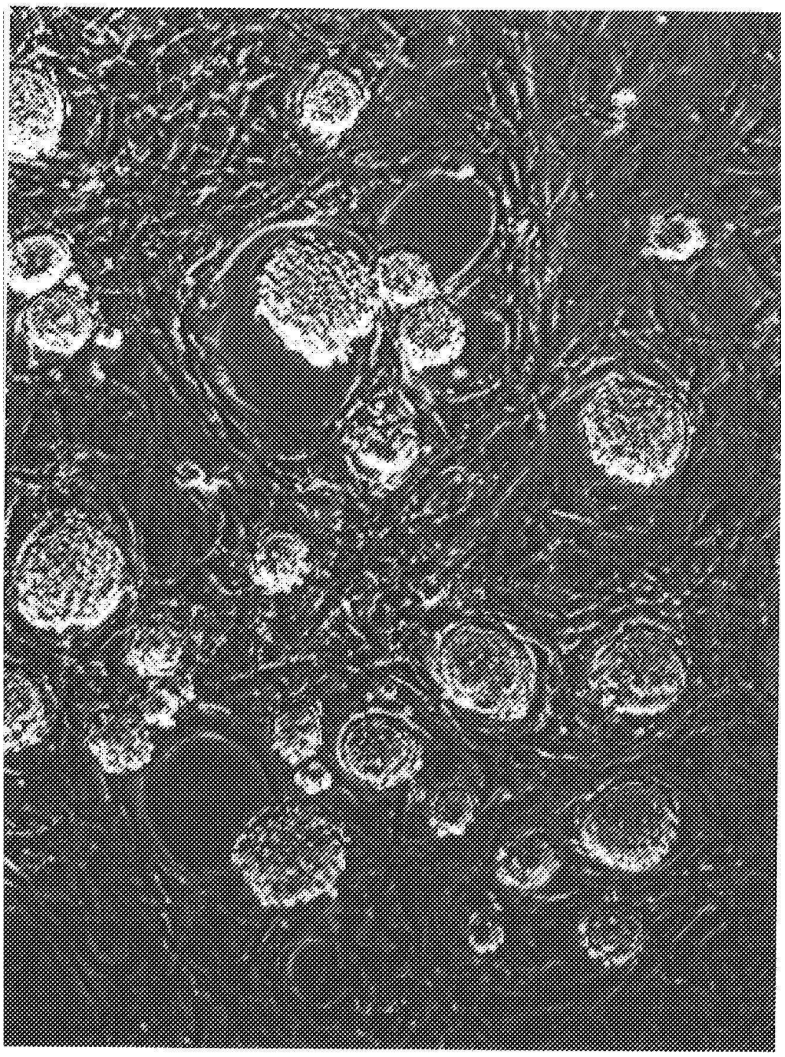
실시예 #	유전자좌	벡터	스크리닝된 콜로니	표적화된 클론	표적화 효율	표적화된 이대립형질유전자	이대립형질유전자 효율	주사된 클론	키메라를 생성하는 클론	생식선을 통해 전달하는 클론	주지사항
3.2(a)(ii)	ApoE	플라스미드	384	23	5.99%			3	3	2	
3.2(a)(iii)	ApoE + ZFN	플라스미드	384	200	75.52%	8	2.08%	2	2	1	이들 2개의 콜로니는 이대립형질유전자 표적화된다
3.3(a)	Il2rg	플라스미드	232	5	2.16%			6	5		
3.2(b)(ii)	ApoE LTVEC	LTVEC	288	8	2.78%	1	0.35%	3	1		
3.2(b)(iii)	ApoE LTVEC + ZFN	LTVEC	288	16	5.56%	1	0.35%	1	N/A		상기 클론은 이대립형질유전자 표적화된다
4.3(a)	Il2rg 인간화 1	플라스미드	168	6	3.57%						전체 랫트 Il2rg를 인간 Il2rg로 대체한다
4.3(b)	Il2rg 인간화 2	플라스미드	192	13	6.77%			2	N/A		랫트 Il2rg 엑토-도메인의 인간 Il2rg 엑토-도메인으로 대체한다
3.4(a)	Rag2	LTVEC	270	N/A							예측된 5.7 KB 결실
3.4(b)	Rag1-2	LTVEC	256	N/A							예측된 16.2 kb 결실

[0877]

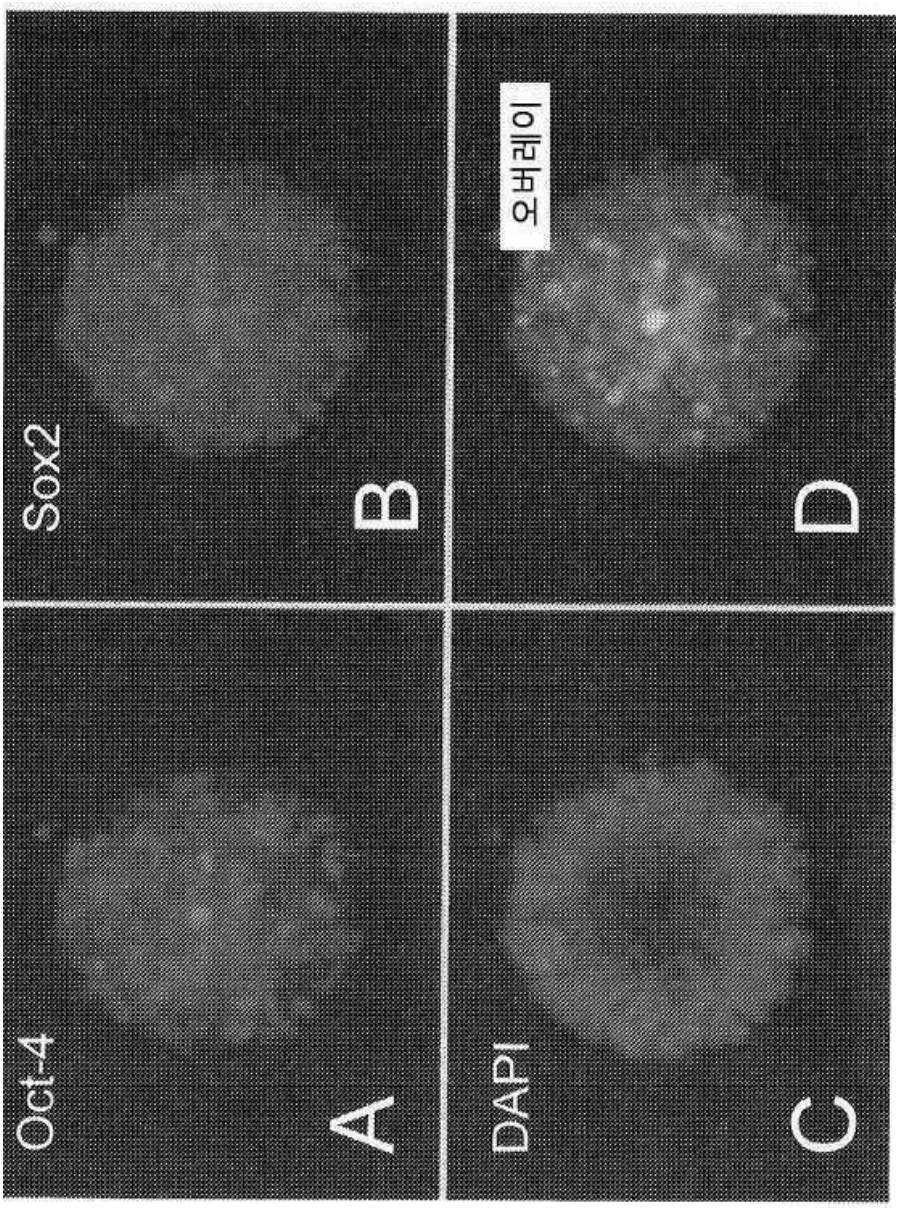
[0878] 본원에 언급된 모든 공보 및 특허 출원은 본 발명이 속하는 당업자의 수준을 지적한다. 모든 공보 및 특허 출원은 각각의 개별 공보 또는 특허 출원이 구체적으로 및 개별적으로 본원에 참조로 인용되는 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 인용된다. 임의의 구현예의 측면에서 달리 자명하지 않는 경우, 본 발명의 양상, 단계 또는 특징은 서로 조합하여 사용될 수 있다. 범위에 대한 참조는 범위, 범위내 서브범위내 임의의 정수를 포함한다. 다중 범위에 대한 참조는 상기 범위의 혼성을 포함한다.

도면

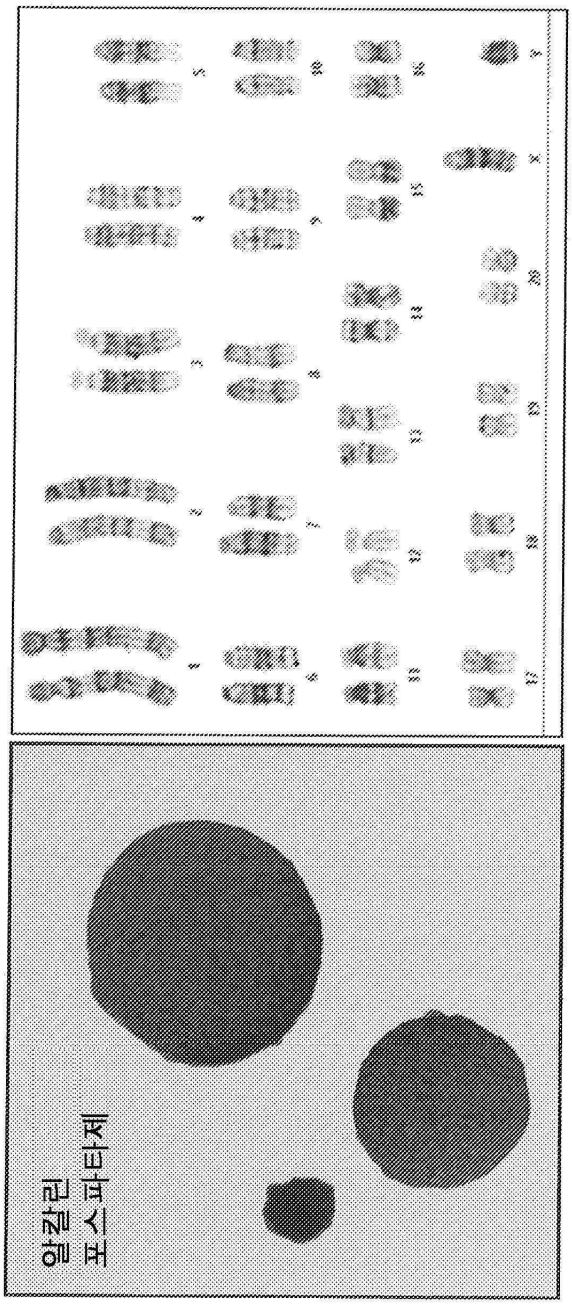
도면1



도면2



도면3



도면4a

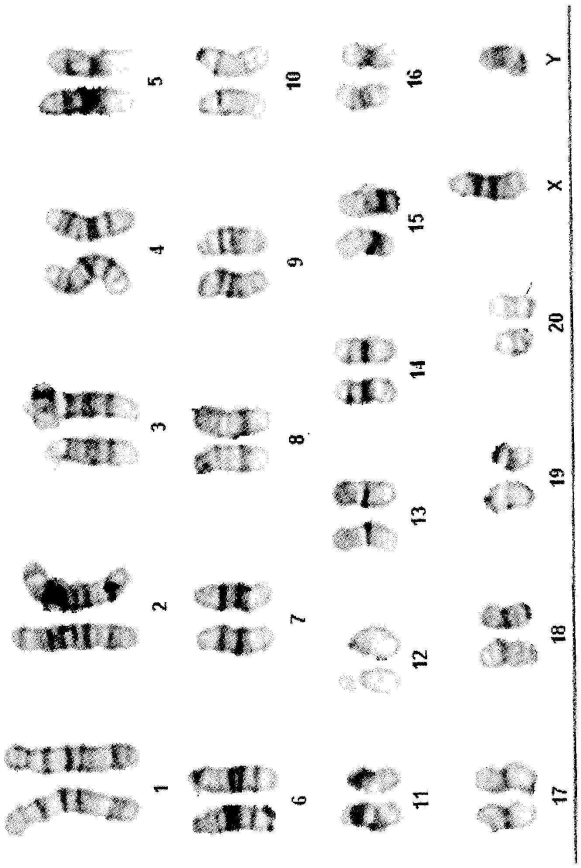


Cell Results: 42,XX

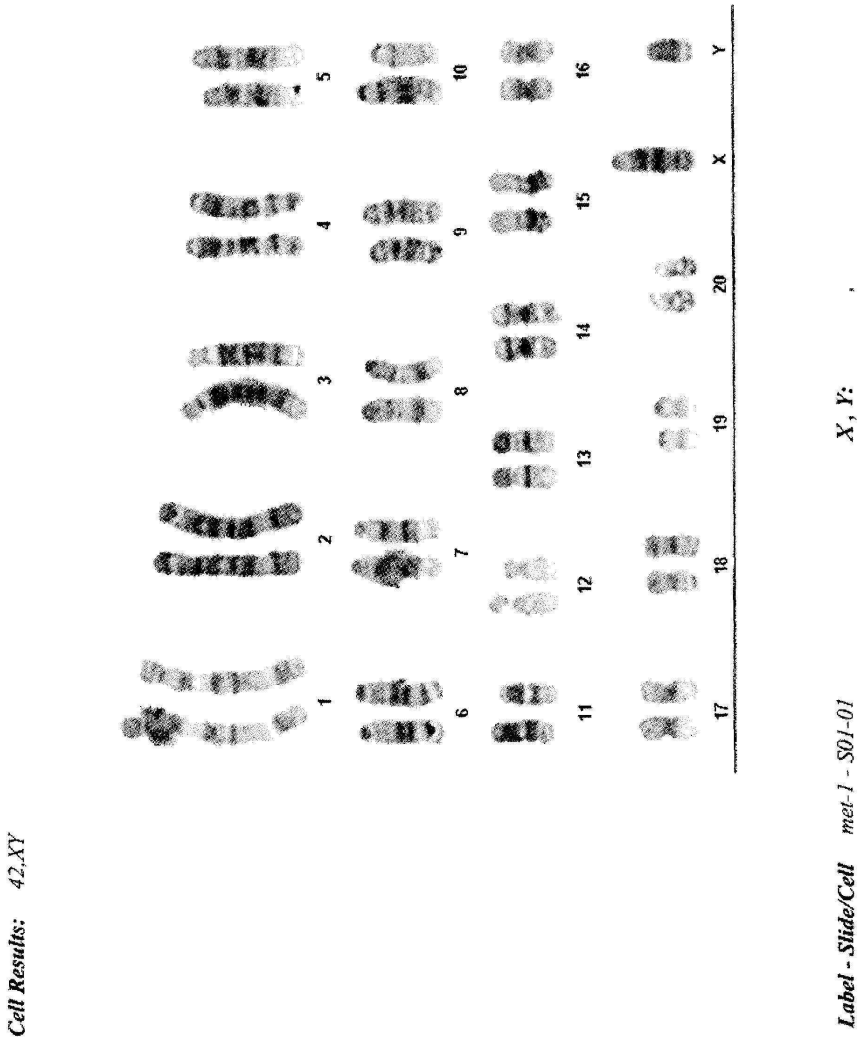
Label - Slide/Cell met-4 - S01-01

X, Y:

도면4b


Cell Results: 42,XY
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
X
Y
Label - Slide/Cell met-1 - S01-01
X, Y:

도면5a


Cell Results: 42,XY
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
X
Y
Label - Slide/Cell met-1 - S01-01
X, Y:

도면5b

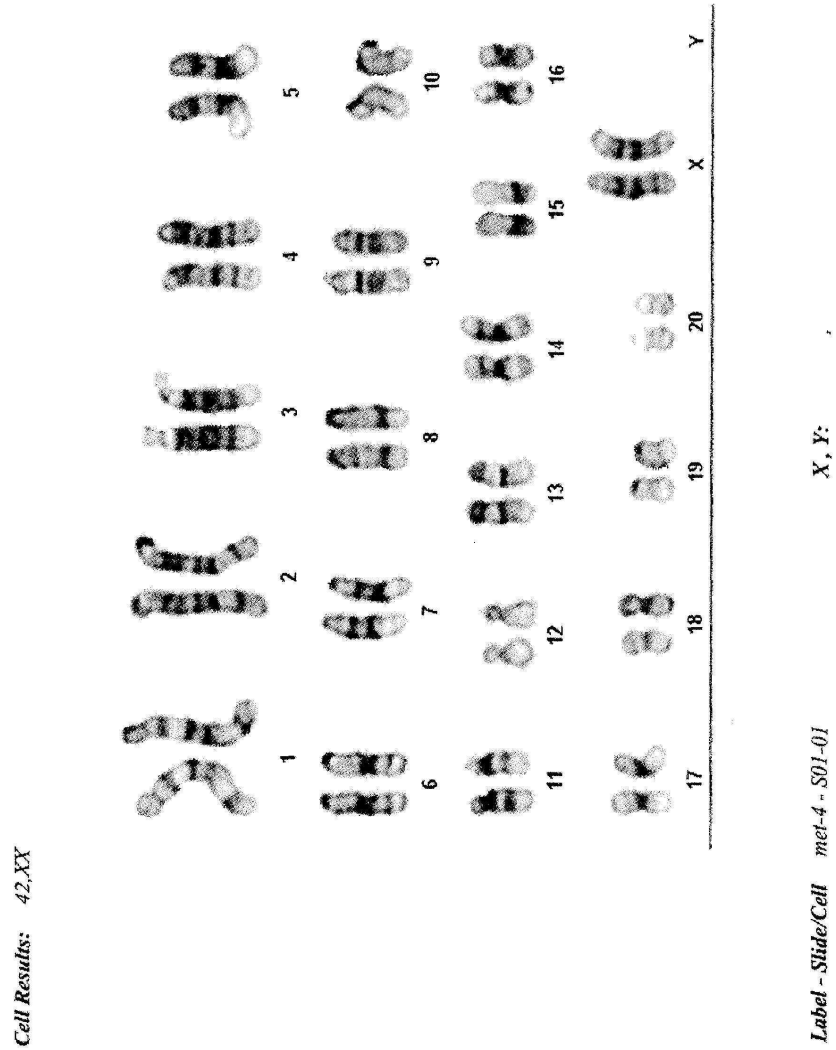


Cell Results: 42,XY

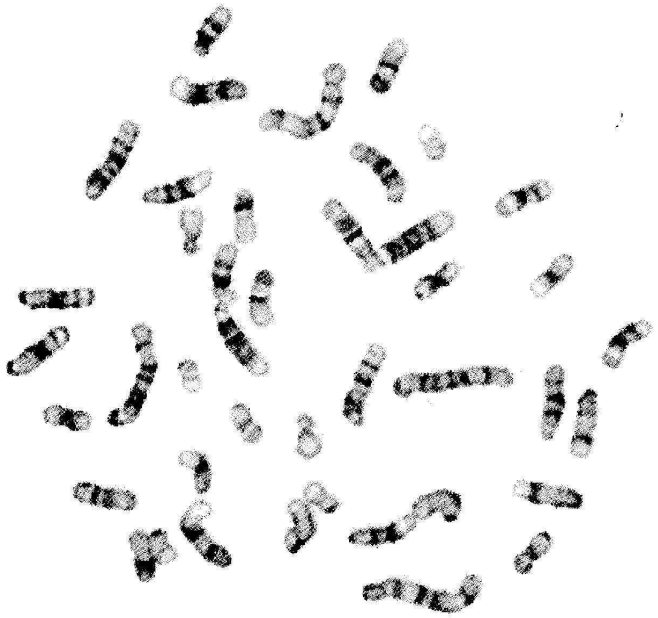
Label - Slide/Cell met-1 - S01-01

X, Y:

도면6a


Cell Results: 42,XX
1 2 3 4 5
6 7 8 9 10
11 12 13 14 15 16
17 18 19 20 X Y
Label - Slide/Cell met-4 - S01-01
X, Y:

도면6b

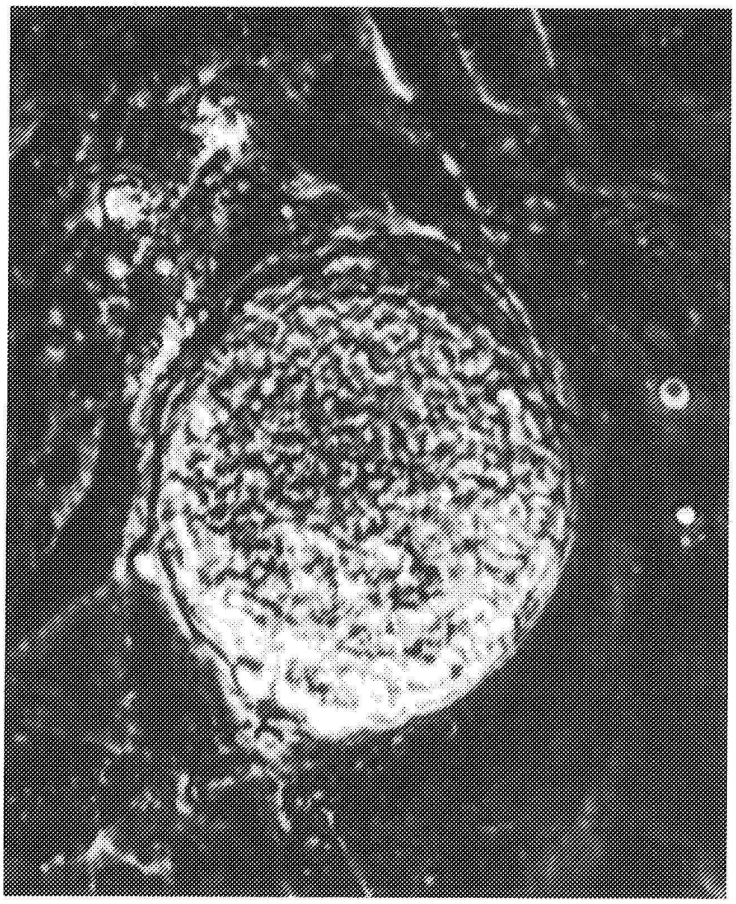


Cell Results: 42,XX

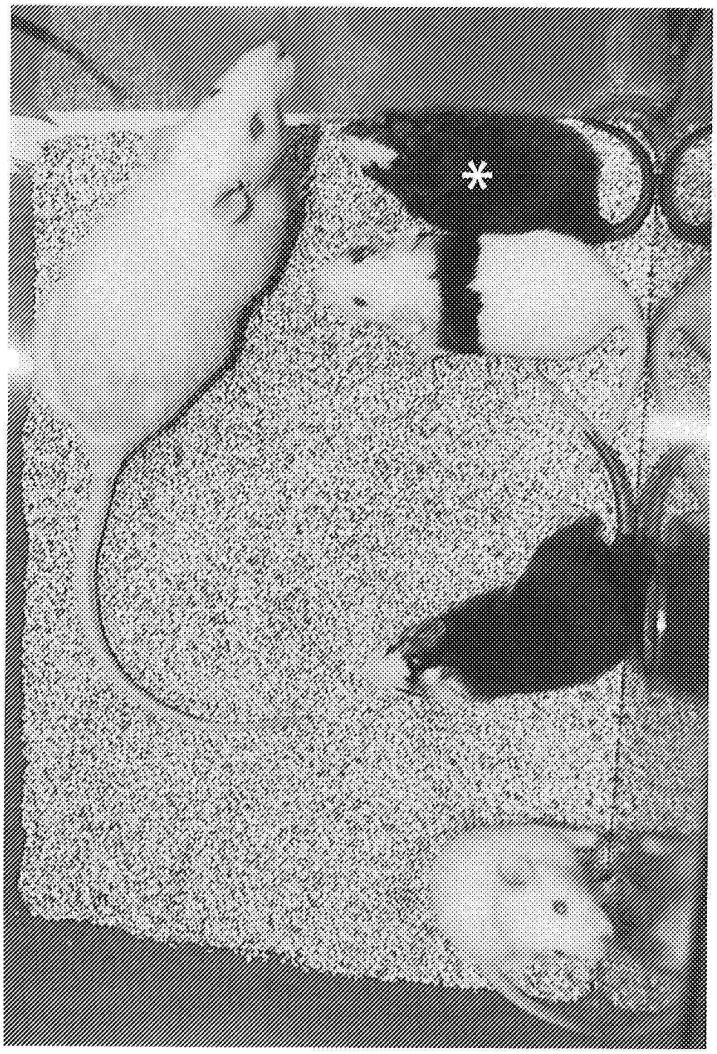
Label - Slide/Cell met-4 - S01-01

X, Y:

도면7



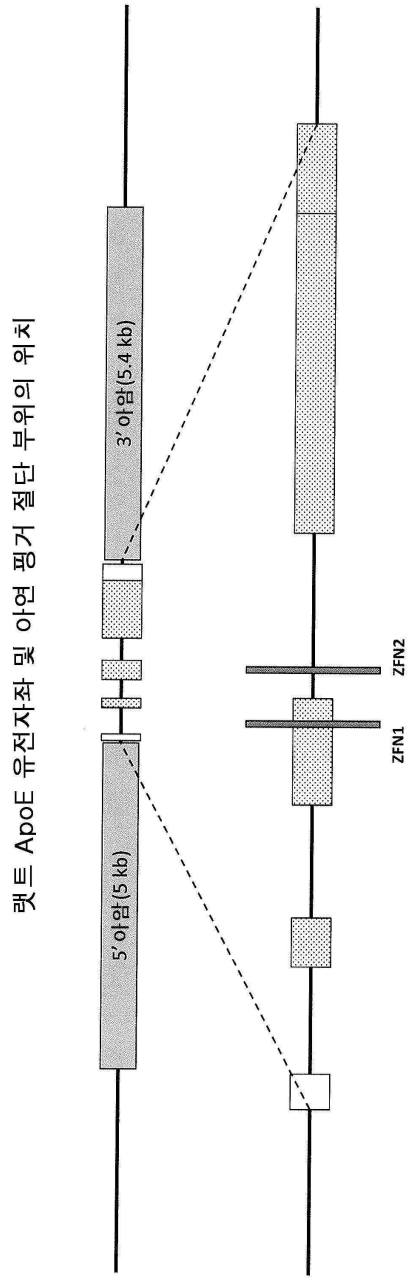
도면8



도면9



도면10



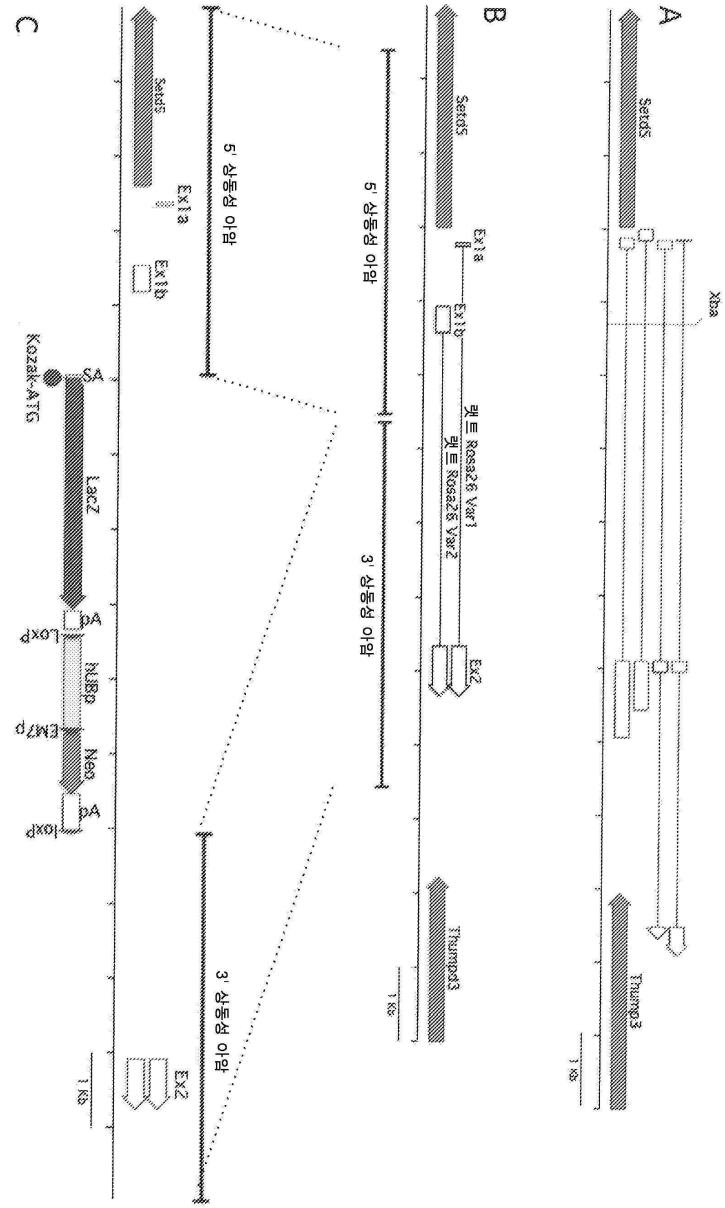
도면11

랫트 ApoE ZFNs: 개선된 표적화 효율

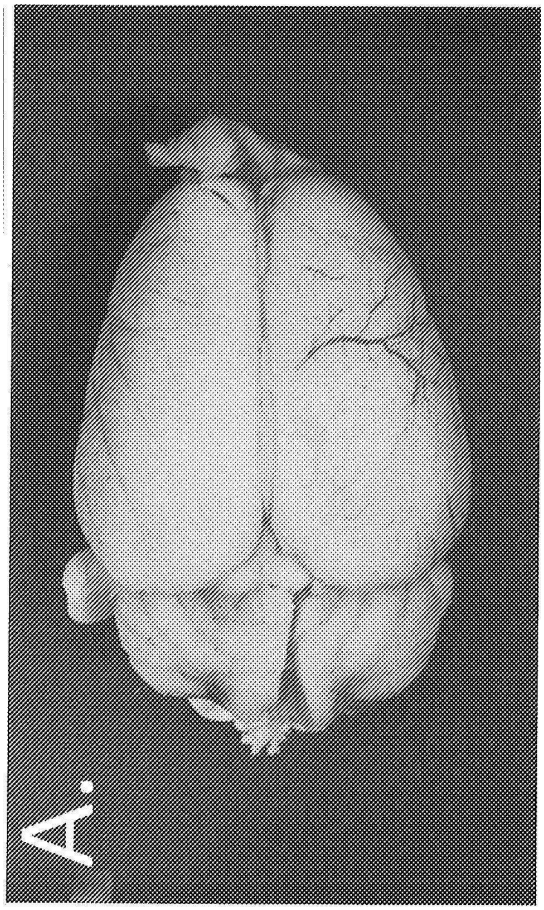
DNA:	콜로니	스크리닝됨	이중절합성 표적화	이중절합성 표적화	'혼합된' 더블	절단/ 비표적화된
벡터	330	184	15 (8.2%)	0	0	N/A
벡터 + ZFN 1	560	192	**132** (68.8%)	**6** (3.1%)	**18** (9.4%)	**17** (8.9%)
벡터 + ZFN 2	410	192	**136** (70.8%)	**2** (1.0%)	**6** (3.1%)	**18** (9.4%)

이중절합성 표적화된: 1 카피의 LOA U & D 상실; 1 카피의 ZFN 프로브 상실
혼합된 더블: 1 카피의 LOA U & D 상실; 2 카피의 ZFN 프로브 상실
이중절합성 표적화된: 2 카피의 LOA U & D 상실; 2 카피의 ZFN 프로브 상실

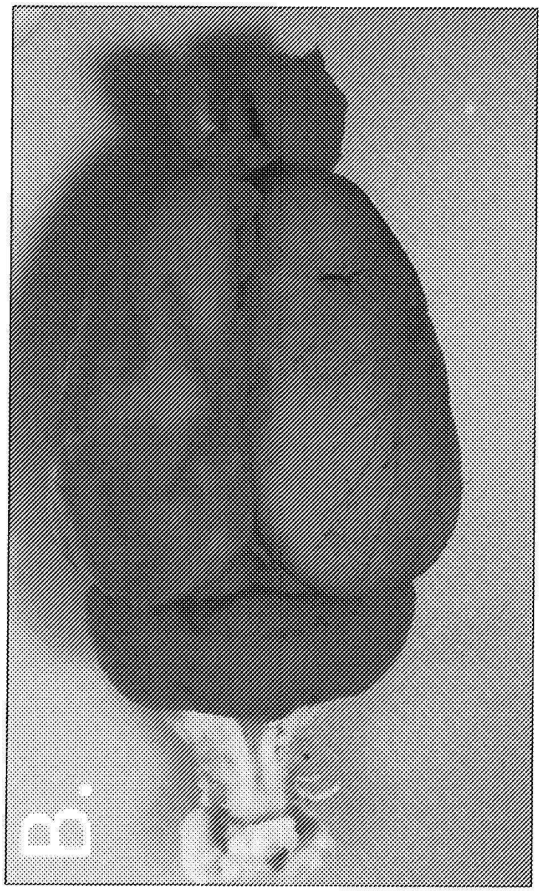
도면12


A
Sarp5
Xba
Thumb3
1 kb
B
Sarp5
Ex1a
Ex1b
로즈 Rosa26 Var1
로즈 Rosa26 Var2
Ex2
Thumb3
1 kb
5' 상동성 아암
3' 상동성 아암
C
Sarp5
Ex1a
Ex1b
5' 상동성 아암
Kozak-ATG
SA
LacZ
pA
LoxP
Neo
EM7p
pA
0xP
3' 상동성 아암
Ex2
1 kb

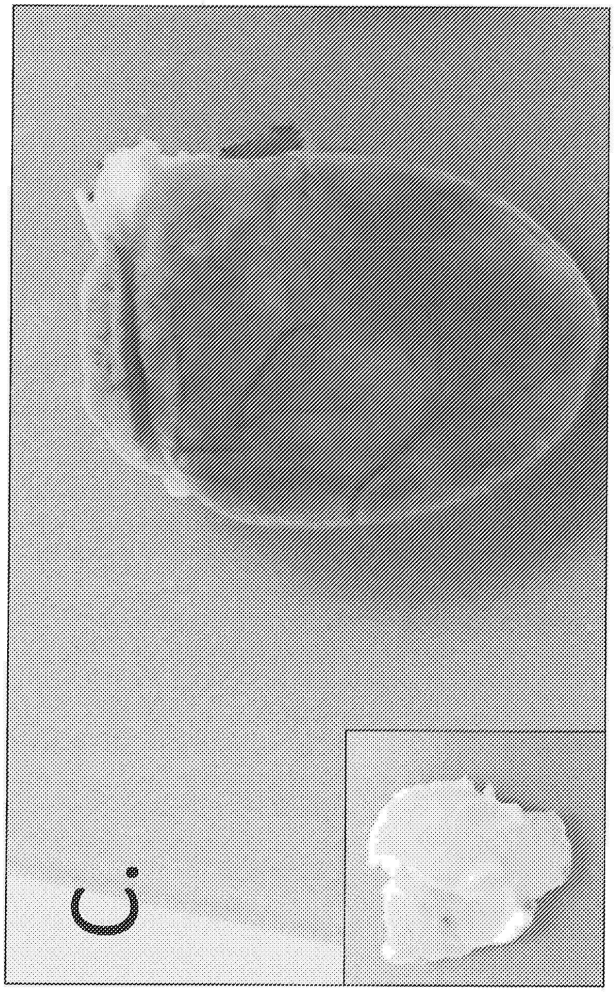
도면13a



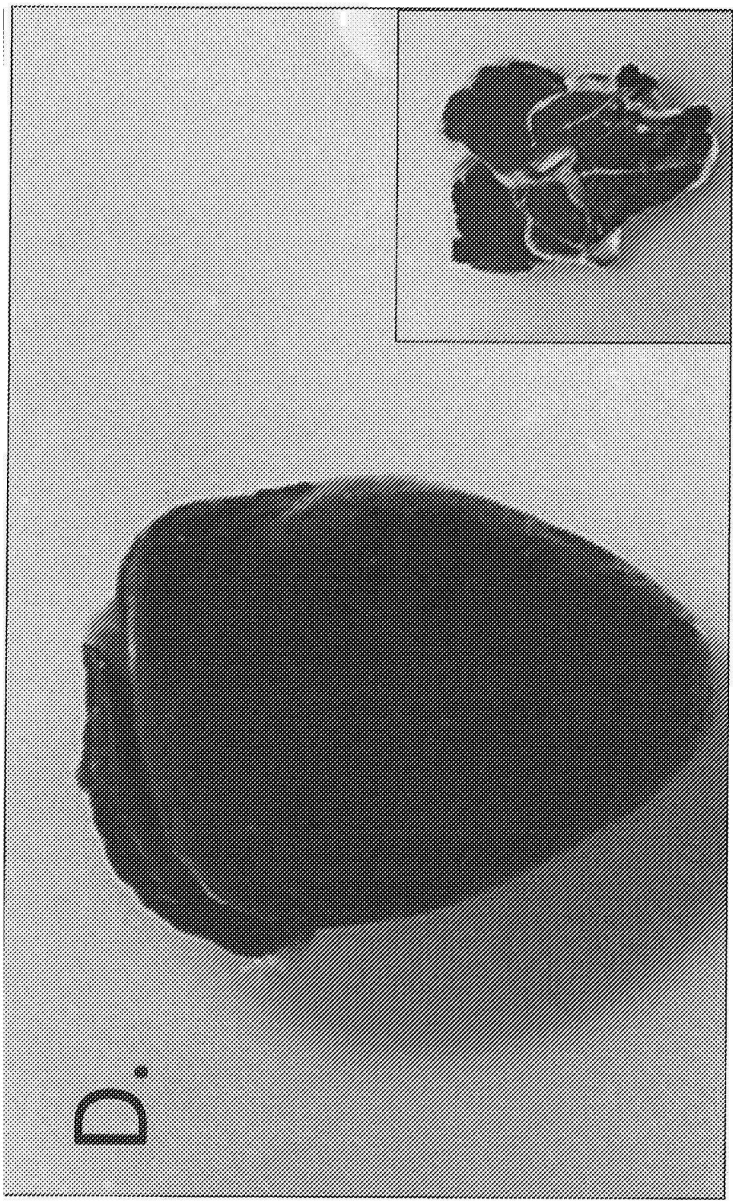
도면13b



도면13c



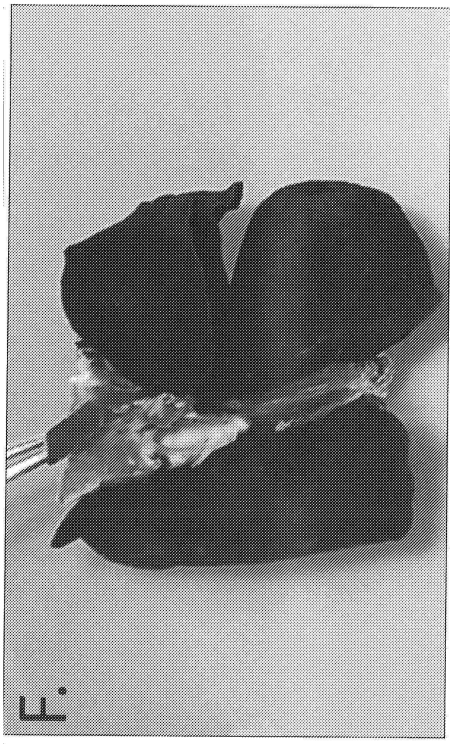
도면13d



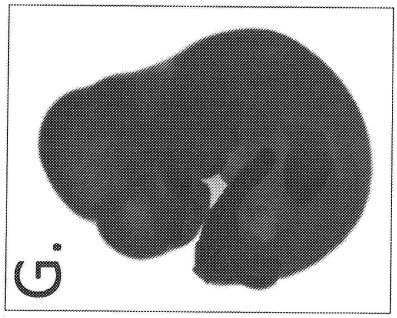
도면13e



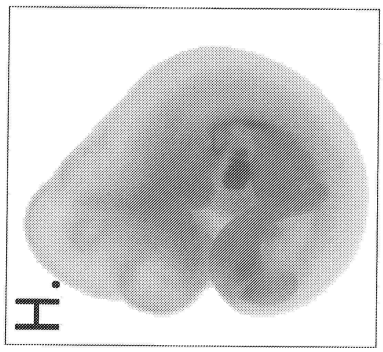
도면13f



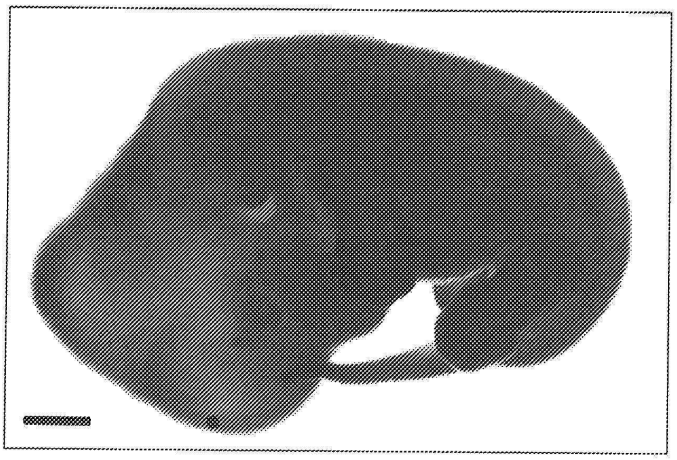
도면13g



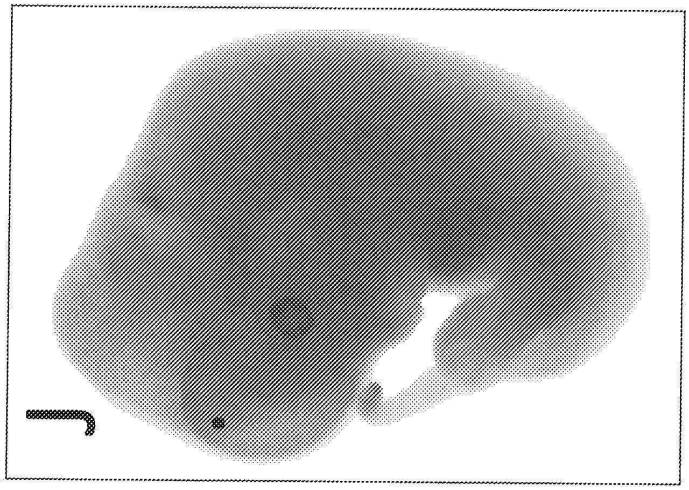
도면13h



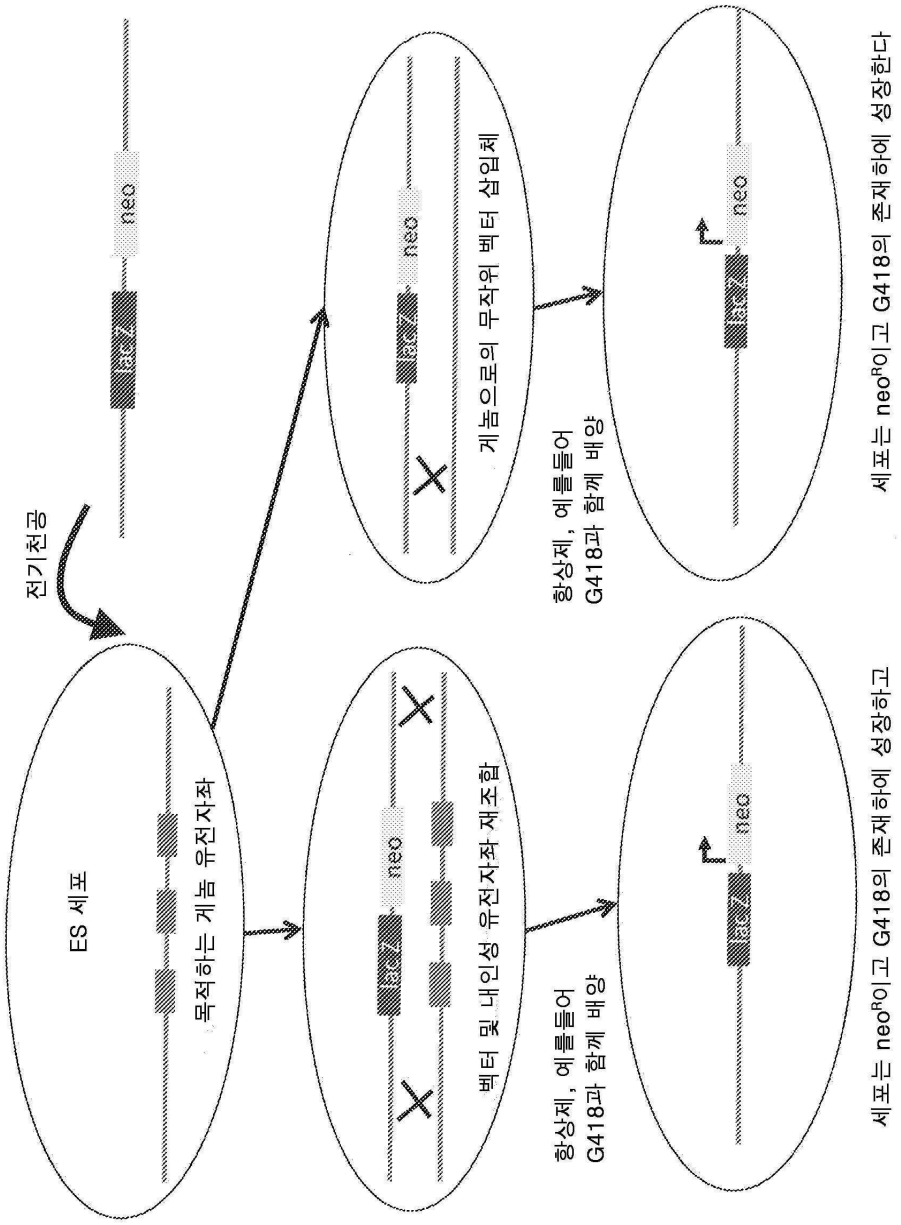
도면13i



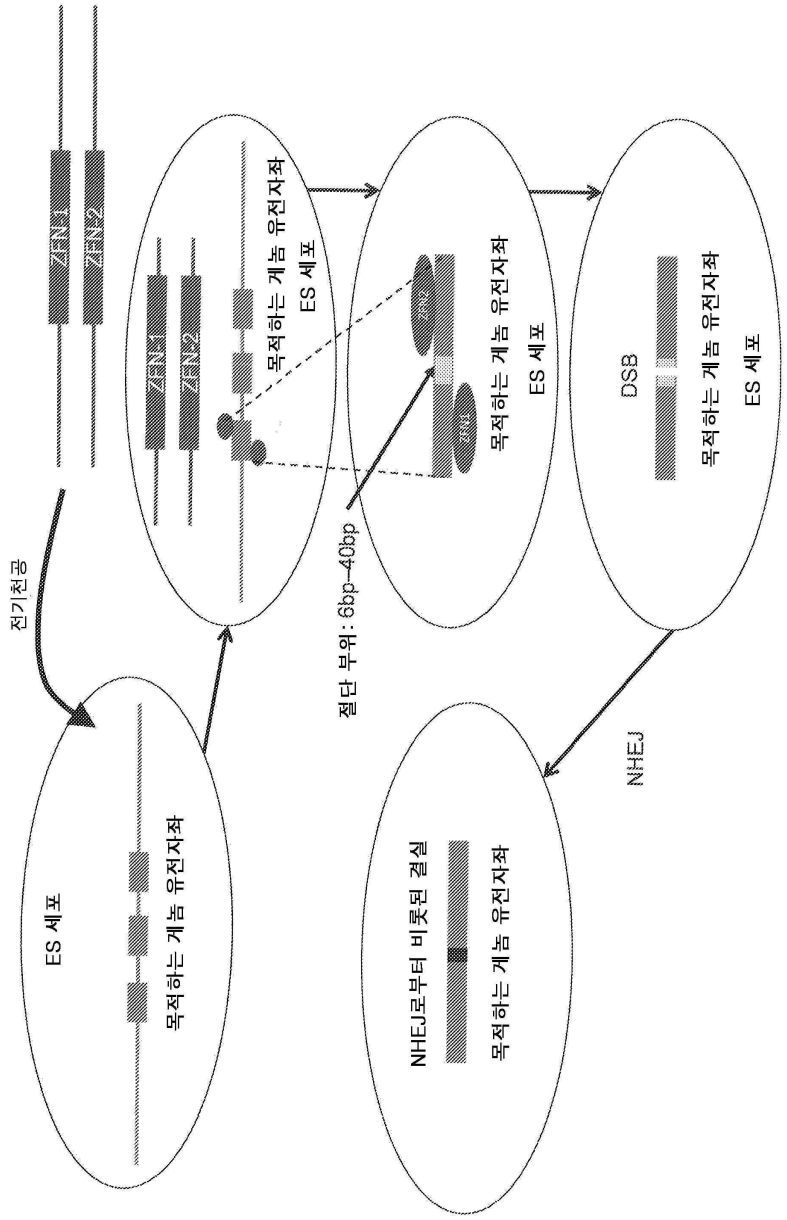
도면13j



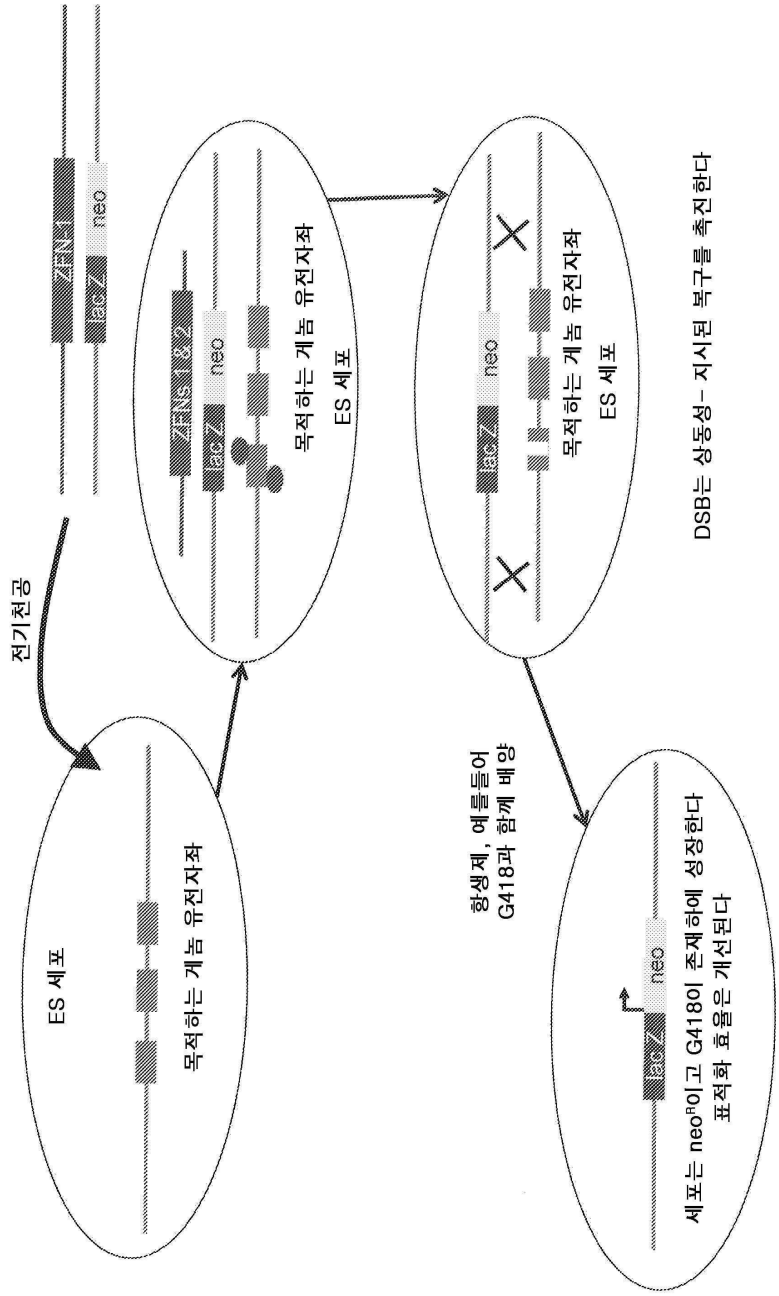
도면14


ES 세포
목적하는 게놈 유전자좌
전기천공
neo
lacZ
벡터 및 내인성 유전자좌 재조합
게놈으로의 무작위 벡터 삽입체
항상제, 예를들어
G418과 함께 배양
세포는 neo^R이고 G418의 존재하에 성장한다
세포는 neo^R이고 G418의 존재하에 성장하고
전형적으로 1-20% (최대)의 삽입

도면15

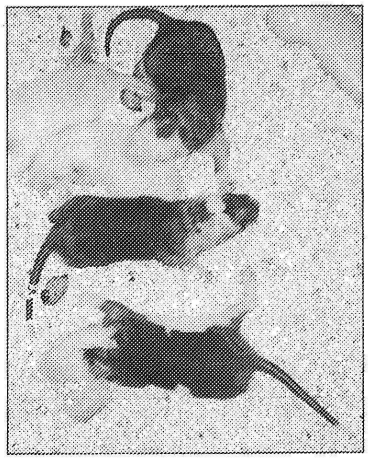

ZFN1
ZFN2
전기천공
ES 세포
목적하는 게놈 유전자좌
목적하는 게놈 유전자좌
ES 세포
절단 부위: 6bp-40bp
ZFN1
ZFN2
목적하는 게놈 유전자좌
ES 세포
DSB
목적하는 게놈 유전자좌
ES 세포
NHEJ
NHEJ로부터 비롯된 결실
목적하는 게놈 유전자좌

도면16


ZFN-L
neo
lacZ
전기천공
ES 세포
목적하는 게놈 유전자좌
ZFN-R
neo
lacZ
목적하는 게놈 유전자좌
ES 세포
DSB는 상동성- 지시된 복구를 촉진한다
항생제, 예를들어
G418과 함께 배양
neo
lacZ
세포는 neoR이고 G418이 존재하에 성장한다
표적화 효율은 개선된다

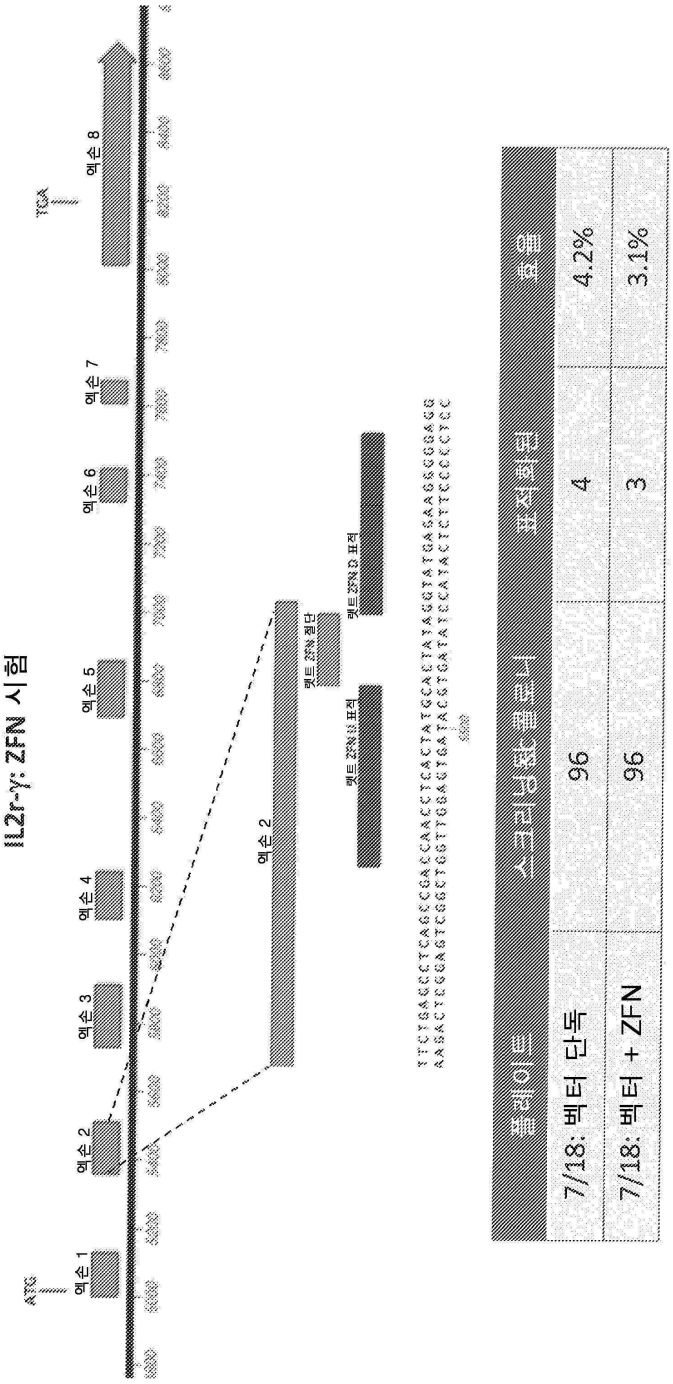
도면17

표적	서열	키메라	
ApoE-ZFN1-AB5 (동종접합성 표적화됨)	12	4 (90, 90, 80, 80)	
ApoE-ZFN1-AE5 (동종접합성 표적화됨)	6	3 (90, 80, 70)	

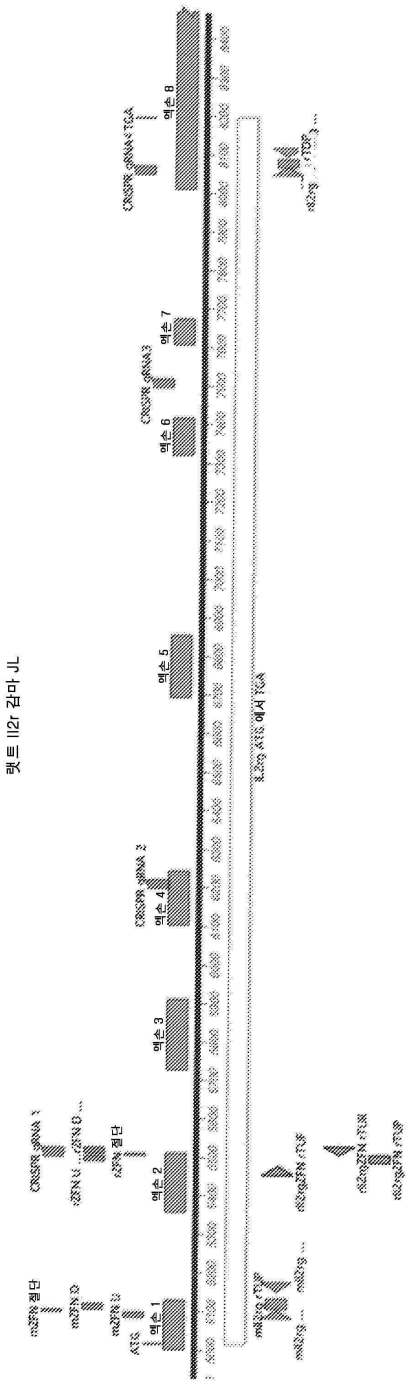


ApoE-ZFN1-AB5
키메라

도면18

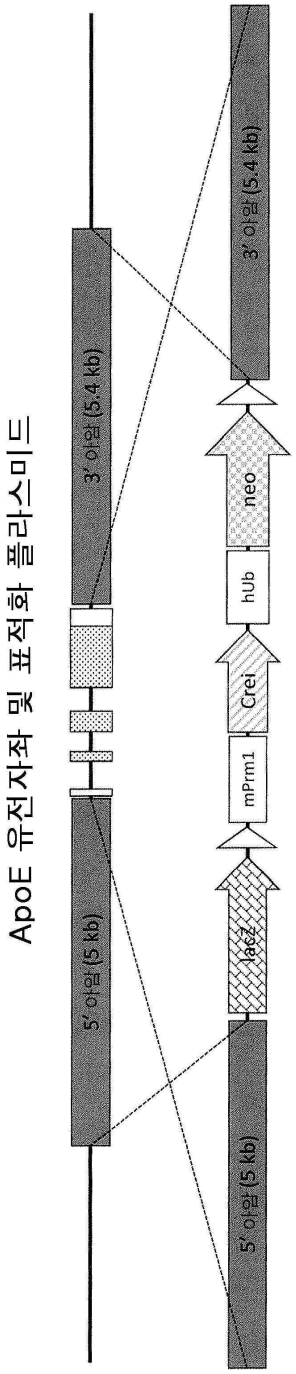

IL2rγ: ZFN 시험
ATG
TGA
엑손 1
엑손 2
엑손 3
엑손 4
엑손 5
엑손 6
엑손 7
엑손 8
엑손 2
렛트 ZFN 절단
렛트 ZFN 표적
렛트 ZFN 표적
TTCTGAGCCTCAGCCGACCAACCTCACTATGCACTATAGGTATGAGAAGGGAGGG
AAGACTCGGAGTCGGCTGGTTGGAGTGATACGTGATATCCATACTCTTCCCCCTCC
6500
7/18: 벡터 단독
7/18: 벡터 + ZFN
불레이트
스크리닝된 콜로니
96
96
표적화됨
4
3
표적
4.2%
3.1%

도면19

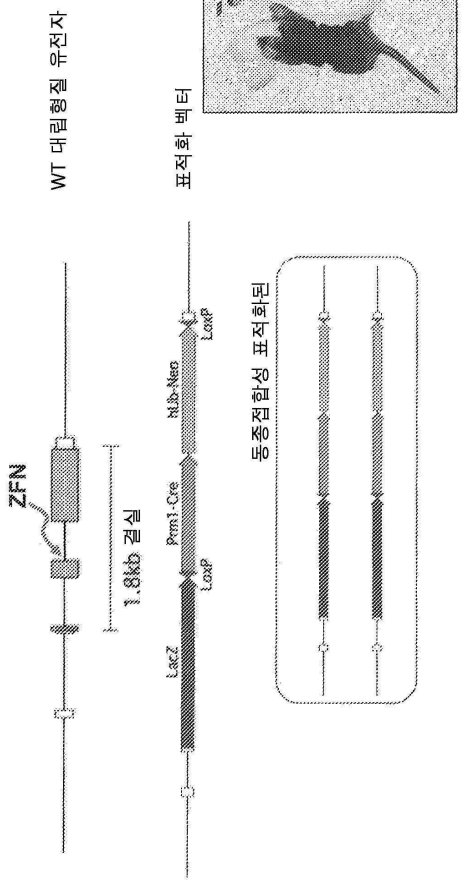


적재물(들)	DNA (μg)	콜로니	후보물
Il2rg 플라스미드 벡터	6 μg	30	3 (모두 "약함")
플라스마 + SBI gRNA1	6 μg/40 μg	22	1 강함, 1 약함
플라스마 + SBI gRNA2	6 μg/40 μg	45	2 강함, 1 약함
플라스마 + SBI gRNA3	6 μg/40 μg	66	1 강함, 2 약함
플라스마 + SBI gRNA4	6 μg/40 μg	59	0

도면20

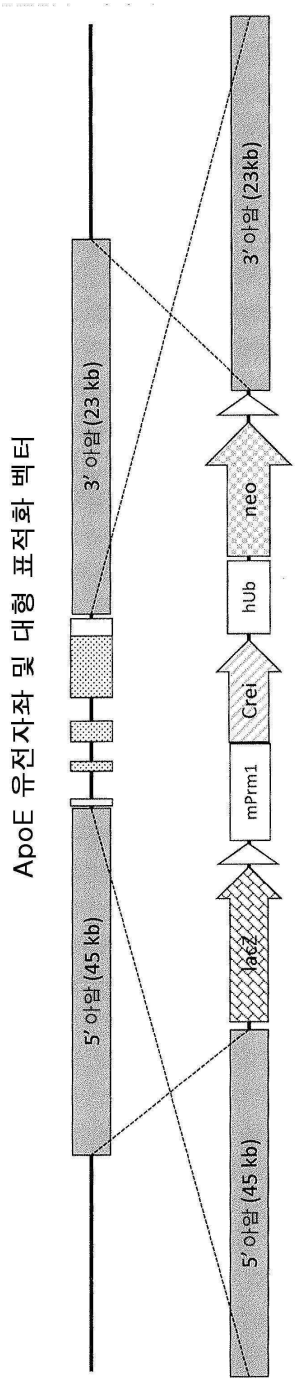

ApoE 유전자좌 및 표적화 플라스미드
3' 아암 (5.4 kb)
5' 아암 (5 kb)
3' 아암 (5.4 kb)
neo
hUb
Crei
mPrm1
lacz
5' 아암 (5 kb)

도면21

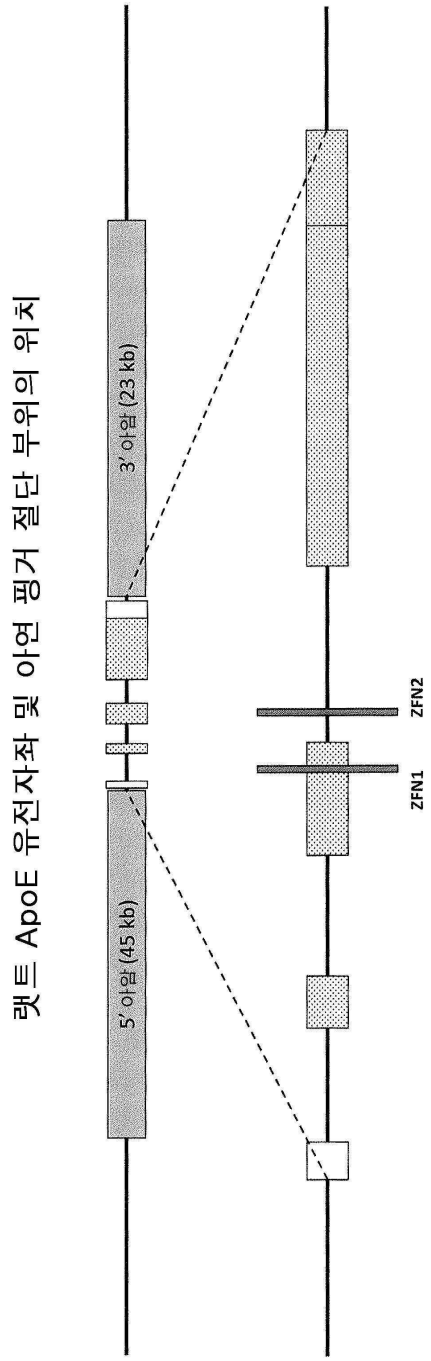


DNA	이종접합성 표적화된	동종접합성 표적화된	미세주입된	키메라 (% 키메라 형성)	육종
벡터 단독	15/192 (8%)	0			
벡터 + ZFN 쌍 1	156/192 (81%)	6/192 (3%)	2 클론	7 (70-90%)	
벡터 + ZFN 쌍 2	134/192 (70%)	2/192 (1%)			

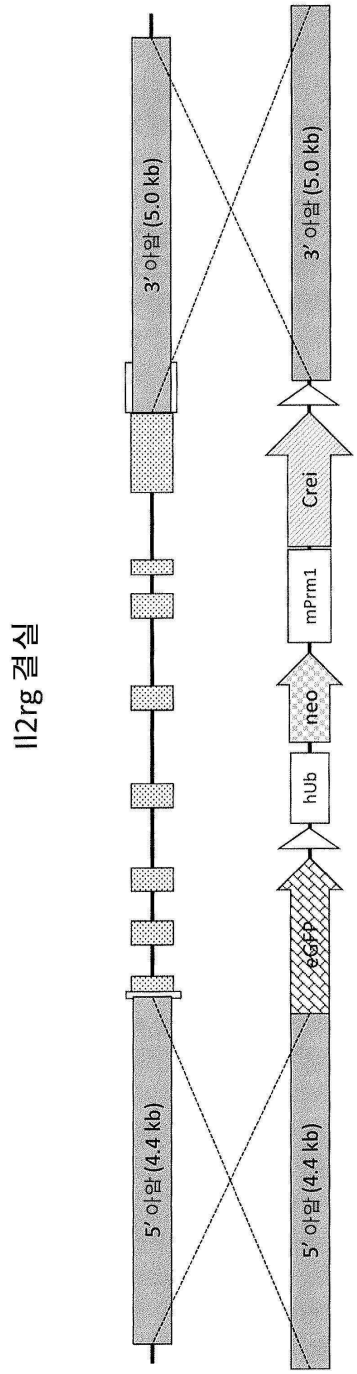
도면22


ApoE 유전자좌 및 대형 표적화 벡터
3' 아암 (23 kb)
5' 아암 (45 kb)
Ibe2
mPrm1
Crei
hUb
neo
3' 아암 (23kb)
5' 아암 (45 kb)

도면23



도면24


Il2rg 결실
3' 아암 (5.0 kb)
Crei
mPrm1
neo
hUb
eGFP
5' 아암 (4.4 kb)
3' 아암 (5.0 kb)
5' 아암 (4.4 kb)

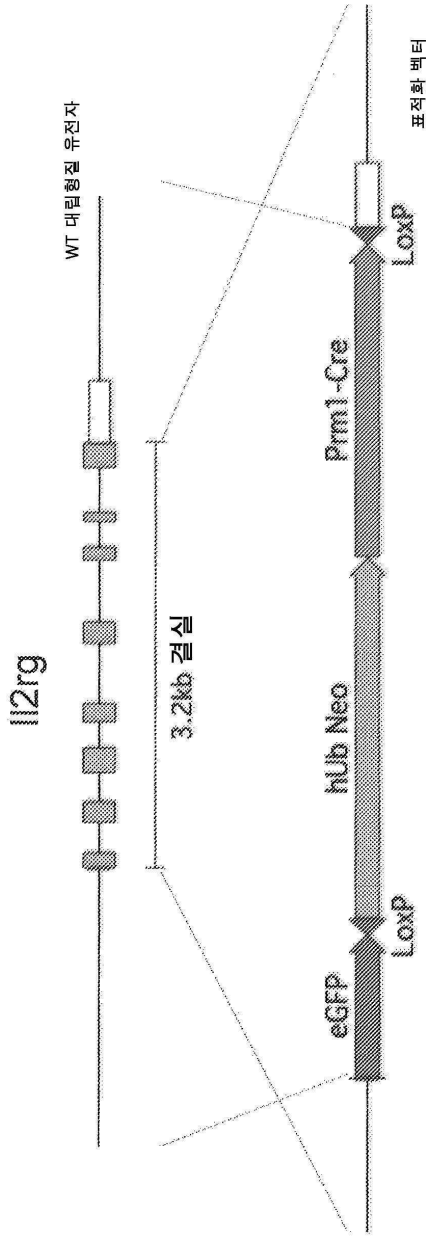
도면25

확인된 생식성 전달

주	핵형	키메라 피페	생식성 전달물자	rESC-유래된 새끼	GLT (%)
ACI.G1	XY	5	3 (60%)	11/103	11%
알(Dark) 아고우티 2B	XY	5	4 (80%)	11/129	9%
알(Dark) 아고우티 2C	XX	3	2 (66%)	7/45	16%

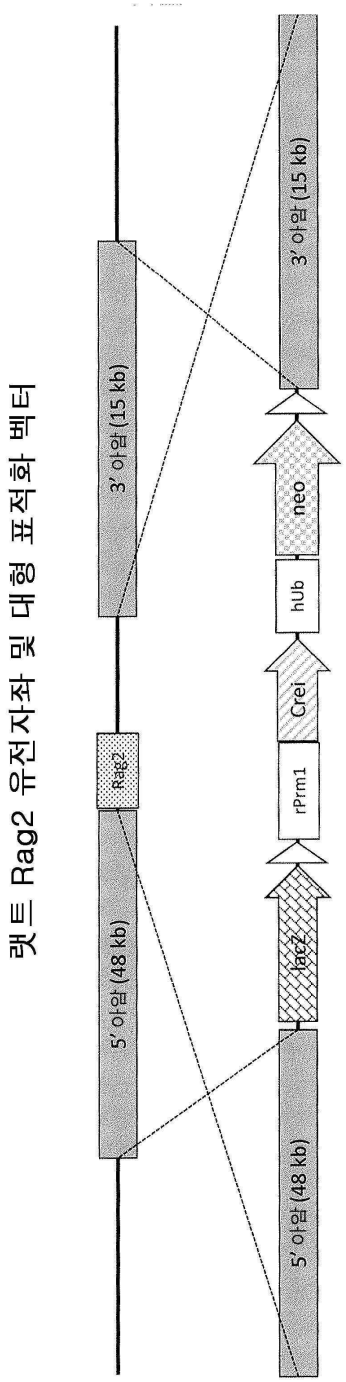
세포주	알섬	표적화 효율
DA.2B	8/192	4.2%
ACI.G1	4/192	2.1%

도면26

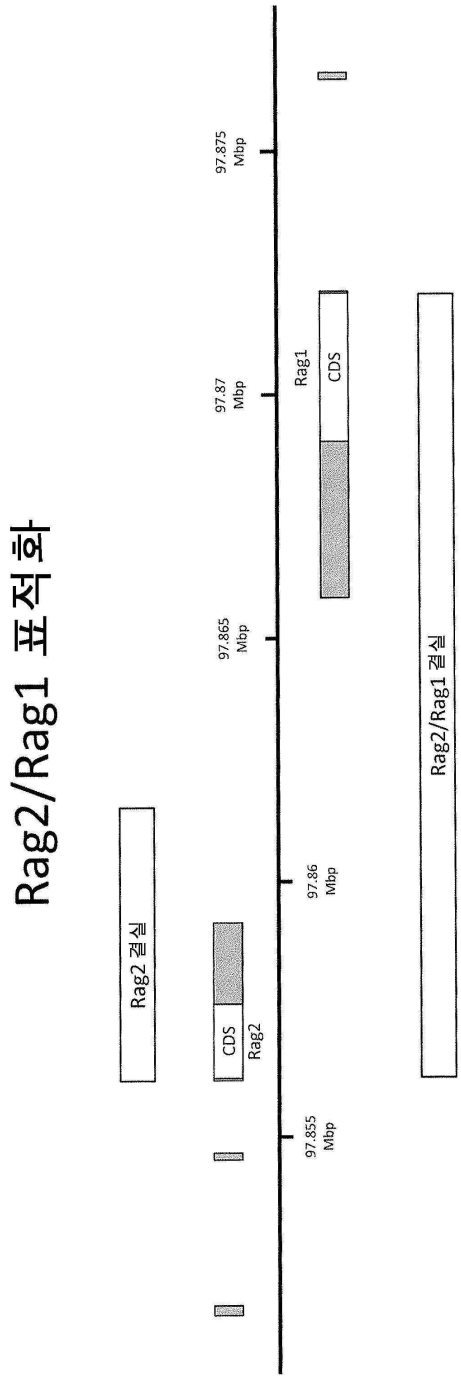


유전자	표적화된 클론	키메라 (% 키메라 형성)
Il2rg	4/232 (2%)	5 (70–90%)

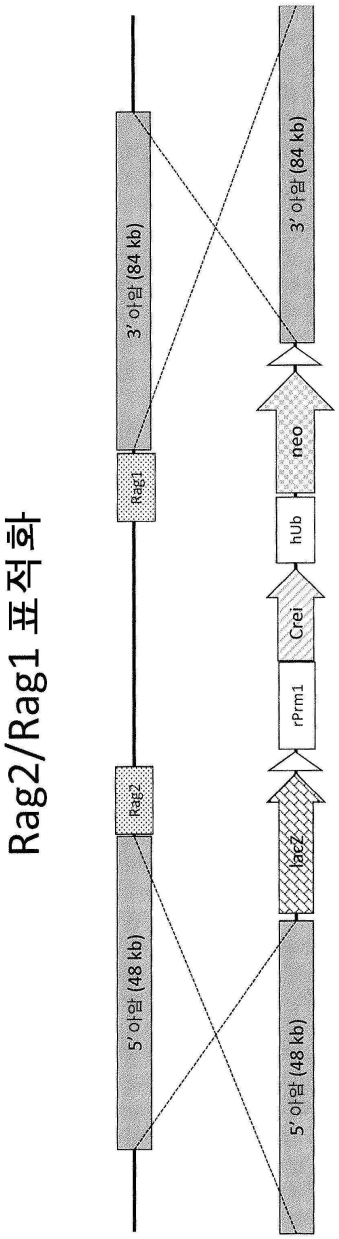
도면27


랫트 Rag2 유전자좌 및 대형 표적화 벡터
3' 아암 (15 kb)
Rag2
5' 아암 (48 kb)
3' 아암 (15 kb)
neo
hUb
Cre
rPrm1
Jacz
5' 아암 (48 kb)

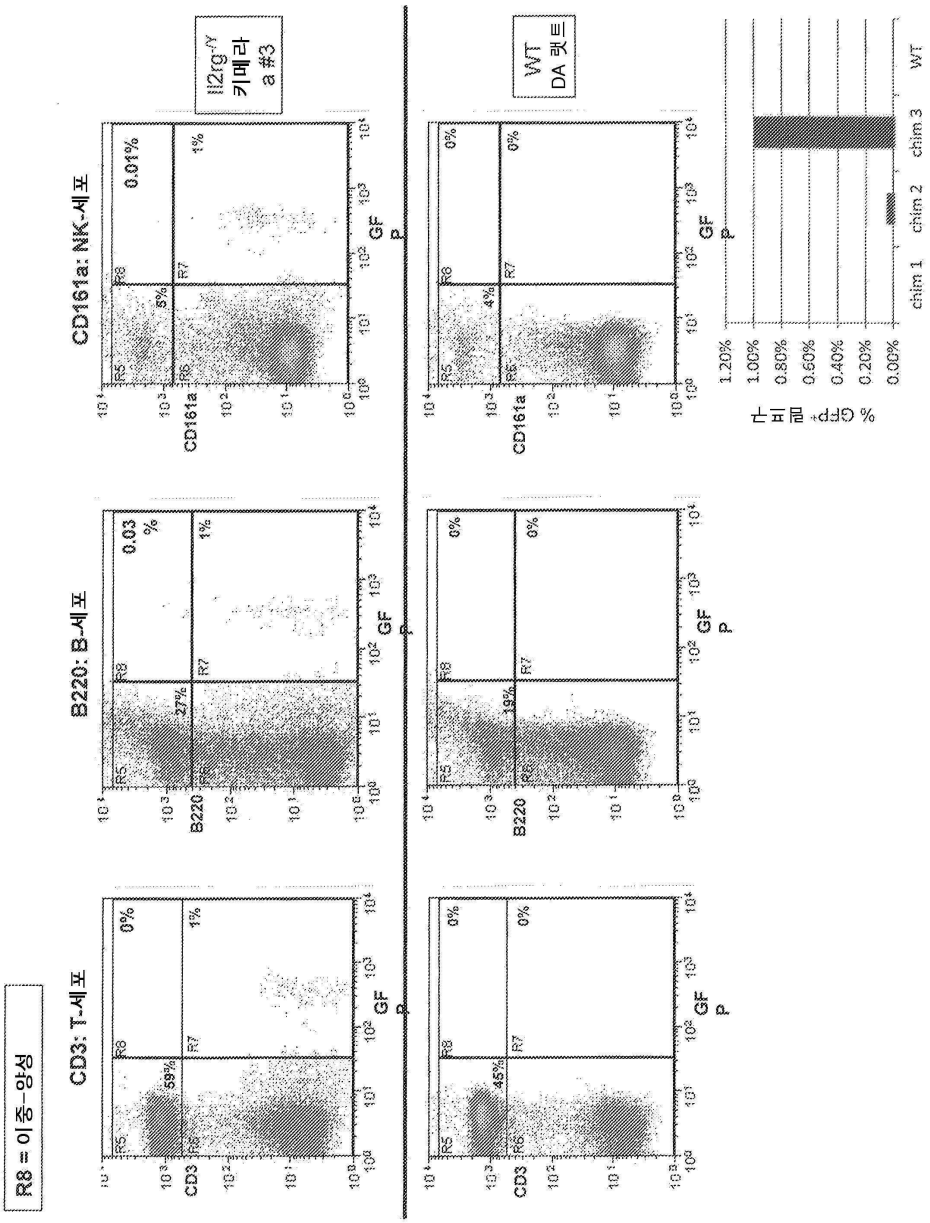
도면28


Rag2/Rag1 표적화
Rag2 결실
CDS
Rag2
97.855 Mbp
97.865 Mbp
97.86 Mbp
97.87 Mbp
97.875 Mbp
Rag1
CDS
Rag2/Rag1 결실

도면29

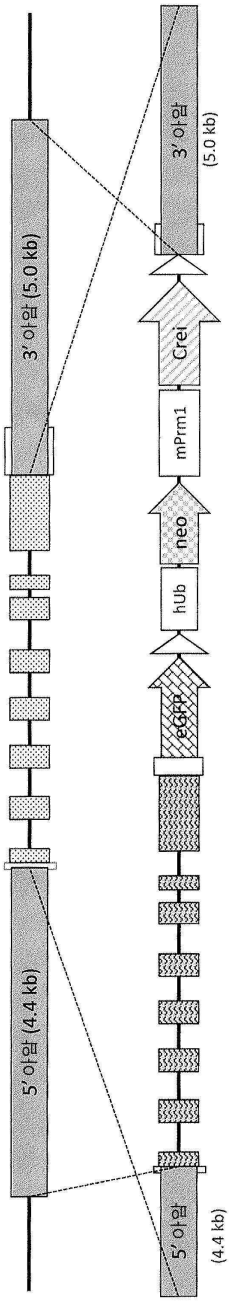

Rag2/Rag1 표적화
3' 아암 (84 kb)
Rag1
Rag2
5' 아암 (48 kb)
3' 아암 (84 kb)
neo
hUb
Crei
rPrm1
lacZ
5' 아암 (48 kb)

도면30

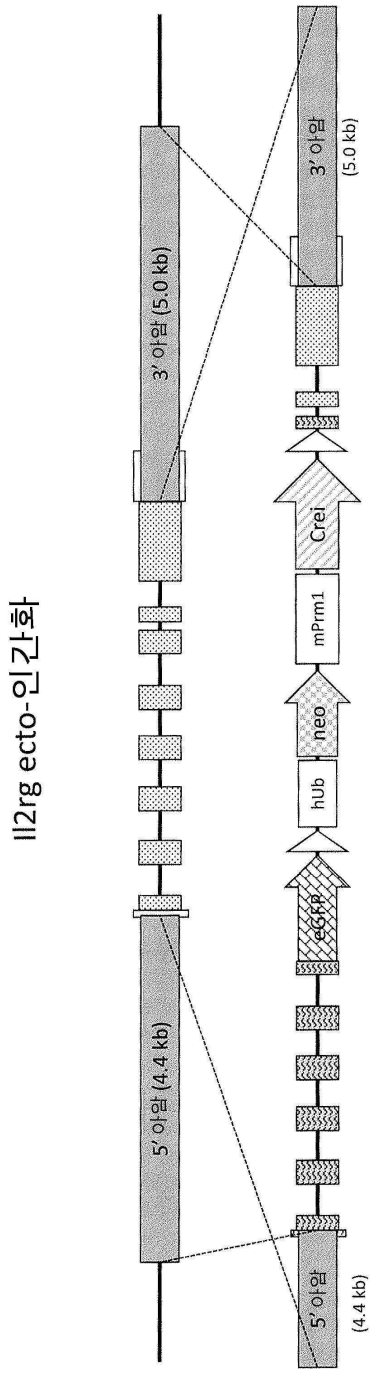

R8 = 이중-양성
CD3: T-세포
B220: B-세포
CD161a: NK-세포
Il2rg-/Y 키메라 a #3
WT DA 랫트
CD3
B220
CD161a
GF
P
59%
45%
27%
19%
8%
4%
0.03 %
0.01%
1%
0%
% GFP+ 림프구
1.20%
1.00%
0.80%
0.60%
0.40%
0.20%
0.00%
chim 1
chim 2
chim 3
WT

도면31

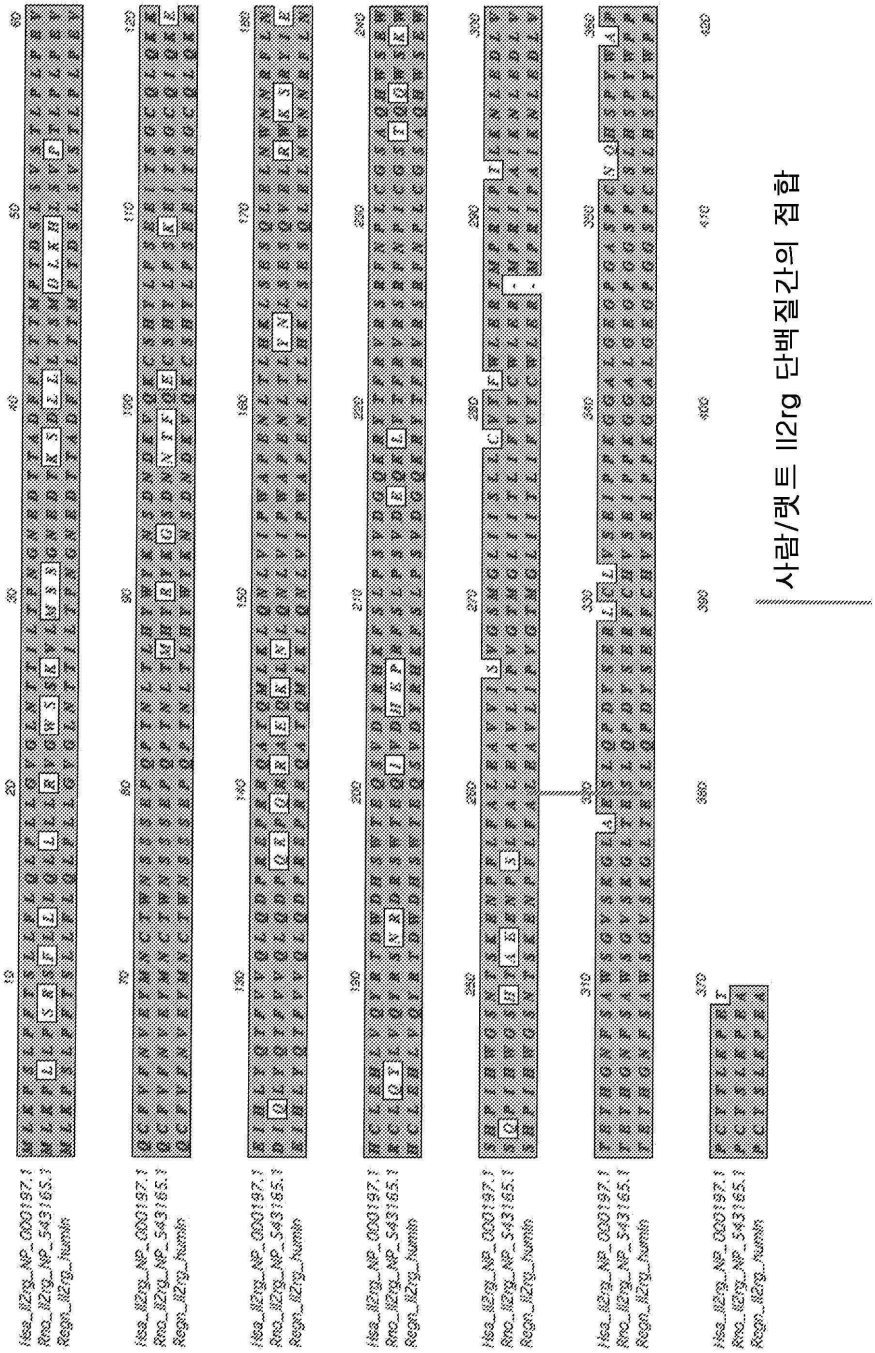
Il2rg 완전 인간화



도면32


Il2rg ecto-인간화
3' 아암 (5.0 kb)
5' 아암 (4.4 kb)
3' 아암
(5.0 kb)
Cre
mPrm1
neo
hUb
eGFP
5' 아암
(4.4 kb)

도면33



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> Lee, Jeffrey D.

Mujica, Alexander O.

Auerbach, Wojtek

Lai, Venus Ka-Man

Valenzuela, David M.

Vancopoulos, George D.

<120> Targeted Modification of Rat Genome

<130> 57766-444071

<160> 23

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a genomic target sequence that is linked to a
guide RNA (gRNA)

<220>

<221> misc_feature

<222> 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,

19, 20, 21

<223> n = A,T,C or G

<400> 1

gnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngg 23

<210> 2

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a guide RNA (gRNA)

<400> 2

guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 3

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a guide RNA (gRNA)

<400> 3

guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cg 42

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a crRNA

<400> 4

guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau 30

<210> 5

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a crRNA

<400> 5

guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aag 33

<210> 6

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a crRNA

<400> 6

gaguccgagc agaagaagaa guuuua 26

<210> 7

<211

> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a tracrRNA

<400> 7

aaggcuaguc cg 12

<210> 8

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a tracrRNA

<400> 8

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 50

<210> 9

<211> 203

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 9

Met Lys Val Leu Ala Ala Gly Ile Val Pro Leu Leu Leu Leu Val Leu
1 5 10 15

His Trp Lys His Gly Ala Gly Ser Pro Leu Pro Ile Thr Pro Val Asn
20 25 30

Ala Thr Cys Ala Ile Arg His Pro Cys His Gly Asn Leu Met Asn Gln
35 40 45

Ile Lys Asn Gln Leu Ala Gln Leu Asn Gly Ser Ala Asn Ala Leu Phe
50 55 60

Ile Ser Tyr Tyr Thr Ala Gln Gly Glu Pro Phe Pro Asn Asn Val Glu
65 70 75 80

Lys Leu Cys Ala Pro Asn Met Thr Asp Phe Pro Ser Phe His Gly Asn
85 90 95

Gly Thr Glu Lys Thr Lys Leu Val Glu Leu Tyr Arg Met Val Ala Tyr
100 105 110

Leu Ser Ala Ser Leu Thr Asn Ile Thr Arg Asp Gln Lys Val Leu Asn
115 120 125

Pro Thr Ala Val Ser Leu Gln Val Lys Leu Asn Ala Thr Ile Asp Val
130 135 140

Met Arg Gly Leu Leu Ser Asn Val Leu Cys Arg Leu Cys Asn Lys Tyr

145 150 155 160

Arg Val Gly His Val Asp Val Pro Pro Val Pro Asp His Ser Asp Lys

165 170 175

Glu Ala Phe Gln Arg Lys Lys Leu Gly Cys Gln Leu Leu Gly Thr Tyr

180 185 190

Lys Gln Val Ile Ser Val Val Val Gln Ala Phe

195 200

<210> 10

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZFN1a binding site

<400> 10

caggccctga accgc 15

<210> 11

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZFN1 cutting site

<400> 11

ttctgg 6

<210> 12

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZFN1b binding site

<400> 12

gattacctgc gctggg 16

<210> 13

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZF21a binding site

<400> 13

ttcaccctcc gcacc 15

<210> 14

<211> 7

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZFN2 cutting site

<400> 14

tgctgag 7

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZF21b binding site

<400> 15

tatccagatc caggggtt 18

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> conserved domain of a family of homing nucleases

<400> 16

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1 5

<210> 17

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZFN1a binding site

<400> 17

caggccctga accgc 15

<210> 18

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZFN1 cutting site

<400> 18

ttctgg 6

<210> 19

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> ZFN1b binding site

<400> 19

gattacctgc gctggg 16

<210> 20

<211> 369

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
1 5 10 15

Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly
20 25 30

Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp
35 40 45

Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val

50 55 60

Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro
65 70 75 80

Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn
85 90 95

Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr
100 105 110

Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe
115 120 125

Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln
130 135 140

Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu
145 150 155 160

Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn
165 170 175

Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp
180 185 190

Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe
195 200 205

Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg
210 215 220

Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp
225 230 235 240

Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe
245 250 255

Leu Phe Ala Leu Glu Ala Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu
260 265 270

Ile Ile Ser Leu Leu Cys Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro
275 280 285

Arg Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His
290 295 300

Gly Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser
305 310 315 320
Leu Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro
325 330 335
Pro Lys Gly Gly Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn
340 345 350

Gln His Ser Pro Tyr Trp Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu
355 360 365
Thr

<210> 21
<211> 368
<212> PRT
<213> Rattus norvegicus
<400> 21
Met Leu Lys Pro Leu Leu Pro Ser Arg Ser Phe Leu Leu Leu Gln Leu
1 5 10 15
Leu Leu Leu Arg Val Gly Trp Ser Ser Lys Val Leu Met Ser Ser Gly
20 25 30
Asn Glu Asp Thr Lys Ser Asp Leu Leu Leu Thr Ser Met Asp Leu Lys

35 40 45
His Leu Ser Val Pro Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val
50 55 60
Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro
65 70 75 80
Gln Pro Thr Asn Leu Thr Met His Tyr Arg Tyr Lys Gly Ser Asp Asn
85 90 95
Asn Thr Phe Gln Glu Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Lys Glu Ile Thr

100 105 110
Ser Gly Cys Gln Ile Gln Lys Glu Asp Ile Gln Leu Tyr Gln Thr Phe
115 120 125
Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Gln Lys Pro Gln Arg Arg Ala Glu Gln

130 135 140

Lys Leu Asn Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu

145 150 155 160

Thr Leu Tyr Asn Leu Ser Glu Ser Gln Val Glu Leu Arg Trp Lys Ser

165 170 175

Arg Tyr Ile Glu Arg Cys Leu Gln Tyr Leu Val Gln Tyr Arg Ser Asn

180 185 190

Arg Asp Arg Ser Trp Thr Glu Gln Ile Val Asp His Glu Pro Arg Phe

195 200 205

Ser Leu Pro Ser Val Asp Glu Gln Lys Leu Tyr Thr Phe Arg Val Arg

210 215 220

Ser Arg Phe Asn Pro Ile Cys Gly Ser Thr Gln Gln Trp Ser Lys Trp

225 230 235 240

Ser Gln Pro Ile His Trp Gly Ser His Thr Ala Glu Glu Asn Pro Ser

245 250 255

Leu Phe Ala Leu Glu Ala Val Leu Ile Pro Val Gly Thr Met Gly Leu

260 265 270

Ile Ile Thr Leu Ile Phe Val Tyr Cys Trp Leu Glu Arg Met Pro Arg

275 280 285

Ile Pro Ala Ile Lys Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly

290 295 300

Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Thr Glu Ser Leu

305 310 315 320

Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Phe Cys His Val Ser Glu Ile Pro Pro

325 330 335

Lys Gly Gly Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly Gly Ser Pro Cys Ser Leu

340 345 350

His Ser Pro Tyr Trp Pro Pro Pro Cys Tyr Ser Leu Lys Pro Glu Ala

355 360 365

<210> 22

<211> 368

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> chimeric IL-2 receptor gamma comprising the rat
IL-2 receptor gamma protein having the ecto domain
of IL-2 gamma receptor from human

<400> 22

Met Leu Lys Pro Ser Leu Pro Phe Thr Ser Leu Leu Phe Leu Gln Leu
1 5 10 15

Pro Leu Leu Gly Val Gly Leu Asn Thr Thr Ile Leu Thr Pro Asn Gly
20 25 30

Asn Glu Asp Thr Thr Ala Asp Phe Phe Leu Thr Thr Met Pro Thr Asp
35 40 45

Ser Leu Ser Val Ser Thr Leu Pro Leu Pro Glu Val Gln Cys Phe Val
50 55 60

Phe Asn Val Glu Tyr Met Asn Cys Thr Trp Asn Ser Ser Ser Glu Pro
65 70 75 80

Gln Pro Thr Asn Leu Thr Leu His Tyr Trp Tyr Lys Asn Ser Asp Asn
85 90 95

Asp Lys Val Gln Lys Cys Ser His Tyr Leu Phe Ser Glu Glu Ile Thr
100 105 110

Ser Gly Cys Gln Leu Gln Lys Lys Glu Ile His Leu Tyr Gln Thr Phe
115 120 125

Val Val Gln Leu Gln Asp Pro Arg Glu Pro Arg Arg Gln Ala Thr Gln
130 135 140

Met Leu Lys Leu Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu
145 150 155 160

Thr Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn
165 170 175

Arg Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp
180 185 190

Trp Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe

195 200 205

Ser Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg

210 215 220

Ser Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp

225 230 235 240

Ser His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe

245 250 255

Leu Phe Ala Leu Glu Ala Val Leu Ile Pro Val Gly Thr Met Gly Leu

260 265 270

Ile Ile Thr Leu Ile Phe Val Tyr Cys Trp Leu Glu Arg Met Pro Arg

275 280 285

Ile Pro Ala Ile Lys Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly

290 295 300

Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Thr Glu Ser Leu

305 310 315 320

Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Phe Cys His Val Ser Glu Ile Pro Pro

325 330 335

Lys Gly Gly Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly Gly Ser Pro Cys Ser Leu

340 345 350

His Ser Pro Tyr Trp Pro Pro Pro Cys Tyr Ser Leu Lys Pro Glu Ala

355 360 365

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a genomic target sequence that is linked to a guide RNA (gRNA)

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)...(21)

<223> n= A, T, C or G

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)...(21)

<223> n can be from 1-20 nucleotides

<400> 23

gnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngg 23