

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(10) 국제공개번호

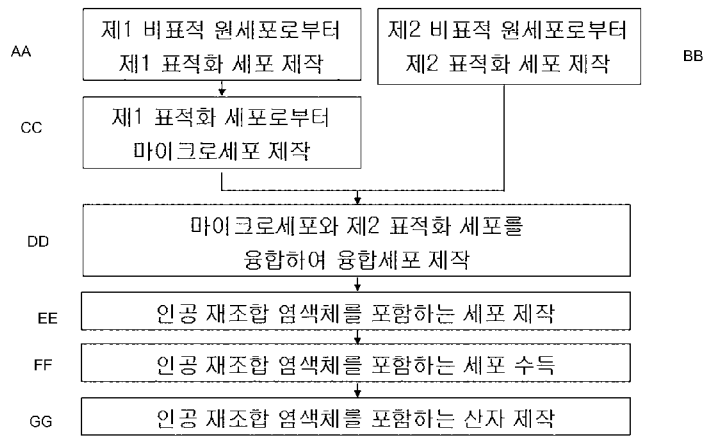
(43) 국제공개일
2020년 10월 15일 (15.10.2020) WIPO | PCT

WO 2020/209458 A1

- (51) 국제특허분류: C12N 5/16 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2019/015351
- (22) 국제출원일: 2019년 11월 12일 (12.11.2019)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 62/833,489 2019년 4월 12일 (12.04.2019) US
- (71) 출원인: 주식회사 휴맵 (HUMAB CO., LTD.) [KR/KR]; 04782 서울시 성동구 연무장5가길 25,1212호, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 오창규 (OH, Chang Kyu); 03012 서울시 종로구 진흥로 438-1, 101동 102호, Seoul (KR). 박순익 (PARK, Soon Ik); 04385 서울시 용산구 서빙고로67, 101동 2602호, Seoul (KR). 강호진 (KANG, Ho Jin); 16039 경기도 의왕시 계원대학로 28, 429호, Gyeonggi-do (KR). 최애진 (CHOI, Ae Jin); 12181 경기도 남양주시 화도읍 경춘로 2102-25, 205동 606호, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 아이피에스 (IPS PATENT FIRM); 06656 서울시 서초구 반포대로23길 14, 5층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유

(54) Title: ARTIFICIAL RECOMBINANT CHROMOSOME AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 인공 재조합 염색체 및 이의 이용



AA ... Produce first targeted cells from first non-targeted protoplasts
 BB ... Produce second targeted cells from second non-targeted protoplasts
 CC ... Produce microcells from first targeted cells
 DD ... Fuse microcells and second targeted cells to produce fused cells
 EE ... Produce cells comprising artificial recombinant chromosome
 FF ... Obtain cells comprising artificial recombinant chromosome
 GG ... Produce living offspring comprising artificial recombinant chromosome

(57) Abstract: The disclosure of the present specification relates to an artificial recombinant chromosome and use thereof and, more specifically, to an artificial recombinant chromosome produced by recombination of two or more chromosomes and to the production of a transgenic animal through the use of cells comprising same.

(57) 요약서: 본 명세서에 의해 게시되는 내용은 인공 재조합 염색체 (artificial recombinant chromosome) 및 이의 이용에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 둘 이상의 염색체의 재조합에 의해 생성된 인공 재조합 염색체 및 이를 포함하는 세포를 이용한 형질전환 동물 제작에 관한 것이다.

[다음 쪽 계속]



WO 2020/209458 A1

럼 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 인공 재조합 염색체 및 이의 이용

기술분야

- [1] 본 명세서에 의해 개시되는 내용은 인공 재조합 염색체 (artificial recombinant chromosome) 및 이의 이용에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 둘 이상의 염색체의 재조합에 의해 생성된 인공 재조합 염색체 및 이를 포함하는 세포를 이용한 형질전환 동물 제작에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 형질전환 동물(transgenic animal)은 외인성 단백질을 코딩하는 DNA를 발현하게 하거나, 내인성 유전자를 불활성화시켜 유전 공학적 발전에 기여할 수 있다.
- [4] 형질전환 동물의 제작을 위해, 일반적으로 외인성 단백질을 코딩하는 DNA를 동물 세포의 게놈 내로 삽입하고, 이로부터 생성된 세포를 이용해 동물을 제작한다. 이때, 외인성 단백질을 코딩하는 DNA 동물 세포의 게놈 내로 삽입시키니 위해, 외인성 단백질을 코딩하는 DNA가 포함된 벡터를 이용하고, 상기 벡터를 제작하기 위해 외인성 단백질을 코딩하는 DNA를 클로닝한다.

[5]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 형질전환 동물의 제작을 위해, 일반적으로 외인성 단백질을 코딩하는 DNA를 동물 세포의 게놈 내로 삽입하고, 이로부터 생성된 세포를 이용해 동물을 제작한다. 이때, 외인성 단백질을 코딩하는 DNA 동물 세포의 게놈 내로 삽입시키니 위해, 외인성 단백질을 코딩하는 DNA가 포함된 벡터를 이용하고, 상기 벡터를 제작하기 위해 외인성 단백질을 코딩하는 DNA를 클로닝한다. 상기와 같은 방법은 외인성 단백질을 코딩하는 DNA의 크기에 따라 하나 또는 둘 이상의 벡터를 이용한다. 예를 들어, 외인성 단백질을 코딩하는 DNA의 크기가 수 십 킬로베이스 이상인 경우, 상기 외인성 단백질을 코딩하는 DNA를 분절하여 여러 개의 벡터를 이용해 삽입해야 한다. 하나의 벡터를 이용하여 삽입하는 경우와 비교하여 복수개의 벡터를 이용하는 경우, 외인성 단백질을 코딩하는 DNA의 전장이 삽입된 세포의 수득 효율은 감소하는 문제점이 발생한다.
- [7] 이러한 문제를 해결하기 위해, 본 발명은 삽입하고자 하는 유전자의 사이즈에 관계없이 효율적으로 삽입하고자 하는 유전자를 동물 세포의 게놈 내에 삽입하는 방법을 제공하고자 한다.
- [8] 본 출원에 의해 개시되는 내용은 인공 재조합 염색체(artificial recombinant chromosome) 및 이의 제작 방법을 제공하고자 한다.

[9] 본 출원에 의해 개시되는 내용은 인공 재조합 염색체(artificial recombinant chromosome)를 포함하는 세포 및 이의 제작 방법을 제공하고자 한다.

[10] 본 출원에 의해 개시되는 내용은 인공 재조합 염색체(artificial recombinant chromosome)를 포함하는 세포를 이용한 형질 전환 동물의 생산 방법을 제공하고자 한다.

[11]

과제 해결 수단

[12] 기술적 과제의 해결을 위해, 본 출원에 의해 개시되는 내용은 삽입하고자 하는 유전자의 전장(암호화 영역 및 비암호화 영역 등)을 별도의 클로닝 없이 동물 세포의 게놈 내 삽입시킬 수 있는 방법을 제공한다. 또한 이렇게 생성된 형질전환 동물 세포를 이용한 형질 전환 동물의 생산 방법도 함께 제공한다.

[13]

[14] 본 출원에 의해 개시되는 내용의 일 양태에 따르면, 하나 이상의 인공 재조합 염색체(artificial recombinant chromosome)를 포함하는 세포의 제작 방법이 제공된다.

[15] 일 구현예에서, 하나 이상의 인공 재조합 염색체(artificial recombinant chromosome)를 포함하는 세포의 제작 방법은

[16] i) 제1 표적화 세포 및 제2 표적화 세포를 생산하고;

[17] ii) 상기 제2 표적화 세포를 이용해 하나 이상의 마이크로세포(microcell)를 생산하며;

[18] iii) 상기 하나 이상의 마이크로세포 및 상기 제1 표적화 세포를 이용해 융합세포를 생성하고; 및

[19] iv) 상기 융합세포에 SSR(site specific recombinase)를 처리하여 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 생성하는,

[20] 것을 포함할 수 있다.

[21] 상기 제1 표적화 세포는 제1 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.

[22] 상기 제2 표적화 세포는 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.

[23] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 제1 일부, 제1 RRS(a first recombinase recognition sequence; a first RRS) 및 제1 프래그먼트(a first fragment)를 포함할 수 있다. 상기 제1 RRS는 상기 제1 일부와 상기 제1 프래그먼트의 사이에 위치할 수 있다.

[24] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 제2 일부, 제2 RRS(a second recombinase recognition sequence; a second RRS) 및 제2 프래그먼트(a second fragment)를 포함할 수 있다. 상기 제2 RRS는 상기 제2 일부와 상기 제2 프래그먼트의 사이에 위치할 수 있다.

[25] 상기 하나 이상의 마이크로세포는 상기 제2 표적화된 염색체 또는 제2 표적화된 염색체의 절편(fragment)를 포함할 수 있다.

- [26] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체의 절편은 제2 RRS(a second recombinase recognition sequence; a second RRS) 및 제2 프래그먼트(a second fragment)를 포함할 수 있다.
- [27] 상기 융합세포는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체, 또는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체의 절편을 포함할 수 있다.
- [28] 상기 SSR은 상기 융합세포에 포함된 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 RRS의 페어링(pairing)을 인지하여 재조합을 유도할 수 있다.
- [29] 이때, 상기 재조합에 의해 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 프래그먼트가 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 프래그먼트와 교환될 수 있다.
- [30] 이에 따라, 상기 제1 일부 및 상기 제2 프래그먼트를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체가 생성될 수 있다.
- [31] 이때, 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제2 표적화된 염색체를 포함하지 않을 수 있다.
- [32] 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 제2 인공 재조합 염색체를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 제2 인공 재조합 염색체는 상기 제2 일부 및 상기 제1 프래그먼트를 포함할 수 있다.
- [33] 상기 제1 일부는 상기 제1 표적화된 염색체의 양쪽의 텔로미어 말단 중 하나를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 프래그먼트는 상기 제1 표적화된 염색체의 양쪽의 텔로미어 말단 중 나머지 하나를 포함할 수 있다.
- [34] 상기 제2 일부는 상기 제2 표적화된 염색체의 양쪽의 텔로미어 말단 중 하나를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제2 프래그먼트는 상기 제2 표적화된 염색체의 양쪽의 텔로미어 말단 중 나머지 하나를 포함할 수 있다.
- [35] 상기 제1 RRS는 loxP 및 loxP 변이체 중 선택된 하나일 수 있고, 상기 제2 RRS는 loxP 및 loxP 변이체 중 선택된 하나일 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제2 RRS와 페어링(pairing)할 수 있다. 이때, 상기 SSR은 Cre recombinase일 수 있고, 상기 SSR은 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS를 인지할 수 있다.
- [36] 또는 상기 제1 RRS는 FRT, attP, attB, ITR 및 이들의 변이체 중 선택된 하나일 수 있고, 상기 제2 RRS는 FRT, attP, attB, ITR 및 이들의 변이체 중 선택된 하나일 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제2 RRS와 페어링(pairing)할 수 있다. 이때, 상기 SSR은 flippase(FLP), 인테그레이즈(integrase) 및 트랜스포세이즈(transposase) 중 선택된 하나일 수 있고, 상기 SSR은 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS를 인지할 수 있다.
- [37] 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 체세포 분열 또는 감수 분열을 할 수 있다.
- [38]

- [39] 다른 일 구현예에서, 하나 이상의 인공 재조합 염색체(artificial recombinant chromosome)를 포함하는 세포의 제작 방법은
- [40] i) 제1 표적화 세포 및 제2 표적화 세포를 생산하고;
- [41] ii) 상기 제2 표적화 세포를 이용해 하나 이상의 마이크로세포(microcell)를 생산하며;
- [42] iii) 상기 하나 이상의 마이크로세포 및 상기 제1 표적화 세포를 이용해 융합세포를 생성하고; 및
- [43] iv) 상기 융합세포에 SSR(site specific recombinase)를 처리하여 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 생성하는,
- [44] 것을 포함할 수 있다.
- [45] 상기 제1 표적화 세포는 제1 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [46] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 제1 일부, 제1 RRS(a first recombinase recognition sequence; a first RRS), 제1 프래그먼트(a first fragment), 제2 RRS(a second recombinase recognition sequence; a second RRS) 및 제2 일부를 포함할 수 있다.
- [47] 이때, 상기 제1 일부는 상기 제1 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단 중 하나를 포함할 수 있고, 상기 제2 일부는 상기 제1 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단 중 나머지 하나를 포함할 수 있다.
- [48] 이때, 상기 제1 프래그먼트는 상기 제1 RRS와 상기 제2 RRS 사이에 위치할 수 있다.
- [49] 상기 제2 표적화 세포는 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [50] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 제3 일부, 제3 RRS(a third recombinase recognition sequence; a third RRS), 제2 프래그먼트(a second fragment), 제4 RRS(a fourth recombinase recognition sequence; a fourth RRS) 및 제4 일부를 포함할 수 있다.
- [51] 이때, 상기 제3 일부는 상기 제2 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단 중 하나를 포함할 수 있고, 상기 제4 일부는 상기 제2 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단 중 나머지 하나를 포함할 수 있다.
- [52] 이때, 상기 제2 프래그먼트는 상기 제3 RRS와 상기 제4 RRS 사이에 위치할 수 있다.
- [53] 상기 하나 이상의 마이크로세포는 상기 제2 표적화된 염색체 또는 제2 표적화된 염색체의 절편(fragment)를 포함할 수 있다.
- [54] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체의 절편은 제3 RRS, 제2 프래그먼트 및 제4 RRS를 포함할 수 있다.
- [55] 상기 융합세포는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체, 또는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체의 절편을 포함할 수 있다.
- [56] 상기 SSR은 상기 융합세포에 포함된 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는

상기 제1 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제3 RRS의 페어링(pairing) 및 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제4 RRS의 페어링(pairing)을 인지하여 재조합을 유도할 수 있다.

- [57] 이때, 상기 재조합에 의해 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 프래그먼트가 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 프래그먼트와 교환될 수 있다.
- [58] 이에 따라, 상기 제1 일부, 상기 제2 프래그먼트 및 상기 제2 일부를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체가 생성될 수 있다.
- [59] 이때, 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제2 표적화된 염색체를 포함하지 않을 수 있다.
- [60] 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 제2 인공 재조합 염색체를 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 제2 인공 재조합 염색체는 상기 제3 일부, 상기 제1 프래그먼트, 상기 제4 일부를 포함할 수 있다.
- [61] 상기 제1 일부는 상기 제1 표적화된 염색체의 동원체를 포함할 수 있다. 또는 상기 제1 프래그먼트는 상기 제1 표적화된 염색체의 동원체를 포함할 수 있다.
- [62] 상기 제3 일부는 상기 제2 표적화된 염색체의 동원체를 포함할 수 있다. 상기 제2 프래그먼트는 상기 제1 표적화된 염색체의 동원체를 포함할 수 있다.
- [63] 상기 제1 RRS는 loxP 및 loxP 변이체 중 선택된 하나일 수 있고, 상기 제3 RRS는 loxP 및 loxP 변이체 중 선택된 하나일 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제3 RRS와 페어링(pairing)할 수 있다.
- [64] 상기 제2 RRS는 loxP 및 loxP 변이체 중 선택된 하나일 수 있고, 상기 제4 RRS는 loxP 및 loxP 변이체 중 선택된 하나일 수 있다. 이때, 상기 제2 RRS는 상기 제4 RRS와 페어링(pairing)할 수 있다.
- [65] 이때, 상기 SSR은 Cre recombinase일 수 있다.
- [66] 또는 상기 제1 RRS는 FRT, attP, attB, ITR 및 이들의 변이체 중 선택된 하나일 수 있고, 상기 제3 RRS는 FRT, attP, attB, ITR 및 이들의 변이체 중 선택된 하나일 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제3 RRS와 페어링(pairing)할 수 있다.
- [67] 상기 제2 RRS는 FRT, attP, attB, ITR 및 이들의 변이체 중 선택된 하나일 수 있고, 상기 제4 RRS는 FRT, attP, attB, ITR 및 이들의 변이체 중 선택된 하나일 수 있다. 이때, 상기 제2 RRS는 상기 제4 RRS와 페어링(pairing)할 수 있다.
- [68] 이때, 상기 SSR은 flippase(FLP), 인테그레이즈(integrase) 및 트랜스포세이즈(transposase) 중 선택된 하나일 수 있다.
- [69] 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 체세포 분열 또는 감수 분열을 할 수 있다.
- [70]
- [71] 본 출원에 의해 개시되는 내용의 다른 일 양태에 따르면, 하나 이상의 인공 재조합 염색체(artificial recombinant chromosome)를 포함하는 세포를 이용한

형질전환 비인간 동물의 제작 방법이 제공된다.

- [72] 일 구현예에서, 하나 이상의 인공 재조합 염색체(artificial recombinant chromosome)를 포함하는 세포를 이용한 형질전환 비인간 동물의 제작 방법은
- [73] i) 제1 표적화 세포 및 제2 표적화 세포를 생산하고;
- [74] ii) 상기 제2 표적화 세포를 이용해 하나 이상의 마이크로세포(microcell)를 생산하며;
- [75] iii) 상기 하나 이상의 마이크로세포 및 상기 제1 표적화 세포를 이용해 융합세포를 생성하고;
- [76] iv) 상기 융합세포에 SSR(site specific recombinase)를 처리하여 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 생성하며; 및
- [77] v) 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 포함하는 키메라 배반포(Chimeric Blastocyst)를 대리모의 자궁에 착상시켜 산자를 생산하는,
- [78] 것을 포함할 수 있다.
- [79] 상기 제1 표적화 세포는 배아 줄기 세포일 수 있다.
- [80] 상기 제1 표적화 세포는 제1 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 상기 제2 표적화 세포는 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [81] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 제1 일부, 제1 RRS(a first recombinase recognition sequence; a first RRS) 및 제1 프래그먼트(a first fragment)를 포함할 수 있다. 상기 제1 RRS는 상기 제1 일부와 상기 제1 프래그먼트의 사이에 위치할 수 있다.
- [82] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 제2 일부, 제2 RRS(a second recombinase recognition sequence; a second RRS) 및 제2 프래그먼트(a second fragment)를 포함할 수 있다. 상기 제2 RRS는 상기 제2 일부와 상기 제2 프래그먼트의 사이에 위치할 수 있다.
- [83] 상기 하나 이상의 마이크로세포는 상기 제2 표적화된 염색체 또는 제2 표적화된 염색체의 절편(fragment)를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화된 염색체의 절편은 제2 RRS(a second recombinase recognition sequence; a second RRS) 및 제2 프래그먼트(a second fragment)를 포함할 수 있다.
- [84] 상기 융합세포는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체, 또는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체의 절편을 포함할 수 있다.
- [85] 상기 SSR은 상기 융합세포에 포함된 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 RRS의 페어링(pairing)을 인지하여 재조합을 유도할 수 있다.
- [86] 이때, 상기 재조합에 의해 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 프래그먼트가 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 프래그먼트와 교환될 수 있다.
- [87] 이에 따라, 상기 제1 일부 및 상기 제2 프래그먼트를 포함하는 제1 인공 재조합

- 염색체가 생성될 수 있다.
- [88] 이때, 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제2 표적화된 염색체를 포함하지 않을 수 있다.
- [89] 상기 키메라 배반포는 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 배반포에 주입하여 생산될 수 있다.
- [90]
- [91] 다른 일 구현예에서, 하나 이상의 인공 재조합 염색체(artificial recombinant chromosome)를 포함하는 세포를 이용한 형질전환 비인간 동물의 제작 방법은
- [92] i) 제1 표적화 세포 및 제2 표적화 세포를 생산하고;
- [93] ii) 상기 제2 표적화 세포를 이용해 하나 이상의 마이크로세포(microcell)를 생산하며;
- [94] iii) 상기 하나 이상의 마이크로세포 및 상기 제1 표적화 세포를 이용해 융합세포를 생성하고;
- [95] iv) 상기 융합세포에 SSR(site specific recombinase)를 처리하여 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 생성하며; 및
- [96] v) 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 포함하는 키메라 배반포(Chimeric Blastocyst)를 대리모의 자궁에 착상시켜 산자를 생산하는,
- [97] 것을 포함할 수 있다.
- [98] 상기 제1 표적화 세포는 배아 줄기 세포일 수 있다.
- [99] 상기 제1 표적화 세포는 제1 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 상기 제2 표적화 세포는 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [100] 상기 제1 표적화된 염색체는 제1 일부, 제1 RRS(a first recombinase recognition sequence; a first RRS), 제1 프래그먼트(a first fragment), 제2 RRS(a second recombinase recognition sequence; a second RRS) 및 제2 일부를 포함할 수 있다.
- [101] 이때, 상기 제1 일부는 상기 제1 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단 중 하나를 포함할 수 있고, 상기 제2 일부는 상기 제1 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단 중 나머지 하나를 포함할 수 있다.
- [102] 이때, 상기 제1 프래그먼트는 상기 제1 RRS와 상기 제2 RRS 사이에 위치할 수 있다.
- [103] 상기 제2 표적화된 염색체는 제3 일부, 제3 RRS(a third recombinase recognition sequence; a third RRS), 제2 프래그먼트(a second fragment), 제4 RRS(a fourth recombinase recognition sequence; a fourth RRS) 및 제4 일부를 포함할 수 있다.
- [104] 이때, 상기 제3 일부는 상기 제2 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단 중 하나를 포함할 수 있고, 상기 제4 일부는 상기 제2 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단 중 나머지 하나를 포함할 수 있다.
- [105] 이때, 상기 제2 프래그먼트는 상기 제3 RRS와 상기 제4 RRS 사이에 위치할 수 있다.
- [106] 상기 하나 이상의 마이크로세포는 상기 제2 표적화된 염색체 또는 제2

표적화된 염색체의 절편(fragment)를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화된 염색체의 절편은 제3 RRS, 제2 프래그먼트 및 제4 RRS를 포함할 수 있다.

[107] 상기 융합세포는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체, 또는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체의 절편을 포함할 수 있다.

[108] 상기 SSR은 상기 융합세포에 포함된 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제3 RRS의 페어링(pairing) 및 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제4 RRS의 페어링(pairing)을 인지하여 재조합을 유도할 수 있다.

[109] 이때, 상기 재조합에 의해 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 프래그먼트가 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 프래그먼트와 교환될 수 있다.

[110] 이에 따라, 상기 제1 일부, 상기 제2 프래그먼트 및 상기 제2 일부를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체가 생성될 수 있다.

[111] 이때, 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제2 표적화된 염색체를 포함하지 않을 수 있다.

[112] 상기 키메라 배반포는 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 배반포에 주입하여 생산될 수 있다.

[113]

발명의 효과

[114] 본 명세서에 의해 개시되는 기술에 따르면, 다음과 같은 효과가 발생한다.

[115] 첫째, 인공 재조합 염색체 (artificial recombinant chromosome) 및 이의 제작방법을 제공할 수 있다. 나아가, 보다 큰 크기의 외인성 DNA 분절을 포함하는 인공 재조합 염색체를 제공할 수 있다.

[116] 둘째, 인공 재조합 염색체 (artificial recombinant chromosome)를 포함하는 세포 및 이의 제작 방법을 제공할 수 있다. 나아가, 보다 큰 크기의 외인성 DNA 분절을 표적 염색체에 제공하여, 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포 및 이의 제조하는 방법을 제공할 수 있다.

[117] 셋째, 인공 재조합 염색체 (artificial recombinant chromosome)를 포함하는 세포를 이용한 형질전환 동물의 제작 방법을 제공할 수 있다. 나아가, 보다 큰 크기의 외인성 DNA 분절을 표적 염색체에 제공하여, 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 이용한 형질전환 동물의 제조하는 방법을 제공할 수 있다.

[118]

도면의 간단한 설명

[119] 도 1은 일 실시예에 따른 흐름도를 나타낸다.

[120] 도 2 내지 도 10는 표적화된 염색체로부터 인공 재조합 염색체를 제조하는 것에

대한 모식도이다.

- [121] 도 11은 제1 비표적 원염색체에 제1 DNA 공여체 및 제2 DNA 공여체를 제공하여 제1 표적화된 염색체를 제조하는 것에 대한 모식도이다.
- [122] 도 12은 제2 비표적 원염색체에 제3 DNA 공여체 및 제4 DNA 공여체를 제공하여 제2 표적화된 염색체를 제조하는 것에 대한 모식도이다.
- [123] 도 13는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체로부터 제1 인공 제조합 염색체 및 제2 인공 제조합 염색체를 제조하는 것에 대한 모식도이다.
- [124] 도 14은 제1 인공 제조합 염색체로부터 최종 인공 제조합 염색체를 제조하는 것에 대한 모식도이다.
- [125] 도 15는 제1 비표적 원염색체에 제1 DNA 공여체 및 제2 DNA 공여체를 제공하여 제1 표적화된 염색체를 제조하는 것에 대한 모식도이다.
- [126] 도 16는 제1 표적화된 염색체의 목적 유전자를 역위시키는 것에 대한 모식도이다.
- [127] 도 17은 제2 비표적 원염색체에 제3 DNA 공여체 및 제4 DNA 공여체를 제공하여 제2 표적화된 염색체를 제조하는 것에 대한 간략도이다.
- [128] 도 18은 제2 표적화된 염색체의 목적 유전자를 역위시키는 것에 대한 모식도이다.
- [129] 도 19은 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체로부터 제1 인공 제조합 염색체 및 제2 인공 제조합 염색체를 제조하는 것에 대한 모식도이다.
- [130] 도 20는 제1 인공 제조합 염색체로부터 최종 인공 제조합 염색체를 제조하는 것에 대한 모식도이다.
- [131] 도 21 내지 도 24은 일 실시예에 따른 표적화된 염색체의 DNA 구조에 대한 모식도이다.
- [132] 도 25 및 도 26는 일 실시예에 따른 표적화 세포의 선별 결과를 나타낸다.
- [133] 도 27은 일 실시예에 따른 마이크로세포를 나타낸다.
- [134] 도 28은 일 실시예에 따른 융합 세포의 제조 과정을 나타낸다.
- [135] 도 29은 일 실시예에 따른 표적화된 염색체를 포함하는 융합 세포를 나타낸다.
- [136] 도 30은 일 실시예에 따른 인공 제조합 염색체를 포함하는 융합 세포를 나타낸다.
- [137] 도 31 내지 도 33는 일 실시예에 따른 융합 세포에 있어서, 인공 제조합 염색체를 포함하는 융합 세포 및 표적화된 염색체를 포함하는 융합 세포의 비교를 나타낸다.
- [138] 도 34 내지 도 35는 일 실시예에 따른 인공 제조합 염색체를 포함하는 융합 세포의 선별 결과 및 인공 제조합 염색체를 확인한 결과를 나타낸다.
- [139]

발명의 실시를 위한 형태

- [140] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술적 및 과학적 용어는

본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사 또는 동일한 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 이하에 기재된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특히 출원, 특히 및 기타 다른 참고문헌은 전체가 참고로 포함된다. 추가로, 물질, 방법 및 실시예는 단지 예시적이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[141]

[142] 이하 본 발명을 설명한다.

[143]

[144] 본 명세서에 의해 개시되는 내용은 인공 재조합 염색체의 생산 및 이를 포함하는 세포에 관한 것이다.

[145] 형질전환 동물은 인위적인 형질을 도입한 동물로, 다양한 질병 연구, 기전 연구, 치료제 개발 등을 위해 사용되고 있다. 형질전환 동물의 생산을 위해서, 형질전환 동물의 생산 방법은 동물 세포로 원하는 형질을 도입하는 과정을 포함한다. 이를 위해 현재 클로닝 벡터를 이용한 방법이 사용되고 있다.

[146] 클로닝 벡터를 이용한 방법은 원하는 형질, 즉, 형질전환 동물에서 발현시키고자 하는 목적 유전자를 클로닝하여 인위적으로 만들어준 벡터를 동물세포에 전달하여 게놈 내 삽입하는 방법이다. 이와 같은 방법은 플라스미드, BAC(bacterial artificial chromosome) 또는 YAC(yeast artificial chromosome)을 이용한다. BAC 또는 YAC는 플라스미드에 비해 더 큰 절편(150~350 kbp)을 운반할 수 있는 DNA 구조물로, 형질전환을 위해 많이 이용되고 있다. 특히, BAC 또는 YAC가 플라스미드에 비해 비교적 큰 절편을 운반할 수 있다는 장점을 가지고 있어 사이즈가 큰 목적 유전자의 형질도입을 위해 이용되고 있다.

[147] 하지만, 사이즈가 큰 목적 유전자에 경우, 다수 개의 BAC 또는 YAC가 필요하다. 예를 들어, 인간 항체를 생산하는 마우스를 생산하는 경우, 상기 마우스를 생산하기 위해, 인간 면역글로불린(immunoglobulin; Ig) 유전자가 도입된 마우스 세포가 생산되어야 한다. 이를 위해, 1250 킬로베이스(kilobases; kb)의 크기를 가지는 인간 면역글로불린 중쇄(immunoglobulin heavy; IGH) 유전자를 클로닝한 형질전환용 벡터가 제작되어야 한다. 상기 형질전환용 벡터가 BAC인 경우, 각각 서로 다른 DNA 절편을 가지는 적어도 4 내지 9개의 BAC이 만들어진다. 이렇게 만들어진 BAC들은 순차적으로 마우스 세포에 도입해서 게놈 내 삽입된다. 즉, 첫 번째 BAC이 마우스 세포에 도입되어 게놈 내 삽입되고, 첫 번째 BAC가 삽입된 마우스 세포가 선별된다. 선별된 마우스 세포에 두 번째 BAC이 도입되어 게놈 내 삽입되고, 다시 두 번째 BAC가 삽입된 마우스 세포가 선별된다. 이렇게 목적 유전자, 즉, 인간 IGH 유전자의 전장(전체 DNA)이 게놈 내 삽입된 마우스 세포를 선별하기 위해 상기과 같은 과정이 반복되어야 한다. 이러한 반복 과정은 목적 유전자의 전장이 삽입된 마우스 세포의 수율을 감소시키는 요인이 된다. 또한, 형질 도입 및 선별 과정의 반복에

따른 시간 소모, 비용 소모 등의 문제가 발생한다. 더불어, 다수 개의 BAC를 만드는 과정의 시간과 비용도 상당하다.

- [148] 이러한 문제들을 해결하기 위해, 본 발명은 염색체와 염색체 사이의 재조합을 이용하는 형질전환 기술을 개발하였다.
- [149] 본 명세서에 의해 개시되는 내용은 염색체 간의 재조합을 통해 인공 재조합 염색체를 생산하므로써 기존에 BAC 및 YAC 등의 형질전환 벡터를 이용하던 시스템을 대체 가능함을 보여준다.
- [150] 본 명세서에 의해 개시되는 방법은 BAC 또는 YAC이 아닌 염색체를 이용한 형질도입(형질전환) 방법을 개시한다. 염색체를 이용한 형질도입 방법은 기존에 방법에서 사용하던 BAC 또는 YAC 대신 하나의 염색체를 동물 세포에 도입시키고 재조합하는 과정을 통해 목적 유전자를 동물의 게놈 내로 삽입시켜 형질전환(형질도입)된 동물 세포를 만드는 것이다.
- [151] 본 명세서에 의해 개시되는 염색체를 이용한 형질도입 방법은 크게 3가지 과정으로 나눌 수 있다.
- [152] 첫번째는 목적 유전자, 즉, 형질도입(형질전환)을 위한 유전자를 포함하는 염색체 및 목적 유전자가 삽입될 염색체를 재조합에 필요한 요소를 포함하도록 인위적으로 조작하는 과정이다. 이 과정은 목적 유전자를 포함하는 염색체를 가지는 공여체 세포 및 목적 유전자가 삽입될 염색체를 가지는 수용체 세포에서 각각 수행될 수 있다. 재조합에 필요한 요소는 재조합 효소 또는 상동성 재조합을 이용하여 재조합이 가능하도록 하는 인자일 수 있다. 예를 들어, 재조합 효소를 사용하는 경우, 재조합 효소가 인식하는 사이트가 재조합에 필요한 요소라고 할 수 있다. 일 예로, Cre 재조합 효소를 사용하는 경우, 재조합에 필요한 요소는 loxP일 수 있다. 다른 일 예로, flippase(FLP) 재조합 효소를 사용하는 경우, 재조합에 필요한 요소는 FRT일 수 있다. 상기 과정의 목적은 염색체 간의 재조합시 재조합 효소가 인식할 수 있는 사이트 또는 상동성 재조합을 위한 상동성 사이트를 제공하기 위함이다. 상기 과정을 수행함에 있어, 목적 유전자를 포함하는 염색체에 포함되는 재조합에 필요한 요소와 목적 유전자가 삽입될 염색체에 포함되는 재조합에 필요한 요소의 각각의 위치 및 페어링(pairing)을 고려하여 설계해야 한다. 상기 위치는 목적 유전자의 삽입 위치와 관련성이 높고, 상기 페어링은 재조합 성공 여부 및 재조합의 형태를 결정할 수 있다. 상기 과정을 통해 재조합에 필요한 요소가 삽입된 목적 유전자를 포함하는 염색체를 가지는 세포(공여체 세포) 및 재조합에 필요한 요소가 삽입된 염색체를 가지는 세포(수용체 세포)가 각각 생산된다. 이때, 상기 공여체 세포가 가지는 염색체에 포함된 재조합에 필요한 요소는 상기 수용체 세포가 가지는 염색체에 포함된 재조합에 필요한 요소와 페어링(pairing) 된다.
- [153] 두번째는 마이크로세포 생산 및 이를 이용한 세포 융합 과정이다. 이 과정은 앞선 과정에서 생산된 세포(공여체 세포)를 이용하는 것으로, 이 과정을 통해 생산된 마이크로세포는 재조합에 필요한 요소가 삽입된 목적 유전자를

포함하는 염색체를 가진다. 또는 이 과정을 통해 생산된 마이크로세포는 재조합에 필요한 요소가 삽입된 목적 유전자를 포함하는 염색체의 절편을 가지며, 이때, 상기 절편은 재조합에 필요한 요소가 삽입된 목적 유전자를 포함한다. 상기 과정은 공지의 기술인 MMCT(Microcell-Mediated Chromosome Transfer)를 이용해 수행될 수 있다. MMCT는 일반적으로 공여체 세포에서 수용체 세포로 염색체를 전이하기 위해 사용되는 기술이다(Thorfinn Ege et al., 1974; Thorfinn Ege et al., 1977). 상기 과정을 통해 생산된 마이크로세포는 염색체 또는 염색체의 절편을 포함하며, 이때, 상기 염색체 또는 염색체 절편은 인위적인 클로닝을 통해 복제된 플라스미드 등의 클로닝 벡터가 아니다. 또한, 이때, 상기 염색체 또는 염색체 절편은 재조합에 필요한 요소를 포함하며, 상기 포함된 재조합에 필요한 요소는 수용체 세포에 포함된 재조합에 필요한 요소와 페어링(pairing) 된다. 생산된 마이크로세포는 수용체 세포와 융합된다. 이 과정을 통해 공여체 세포의 재조합에 필요한 요소가 삽입된 목적 유전자를 포함하는 염색체가 마이크로세포의 융합을 통해 수용체 세포로 도입(전달)된다.

[154] 세번째는 재조합 효소 또는 상동성 재조합을 이용한 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포 생산 과정이다. 이 과정은 앞선 과정에서 생산된 세포, 즉, 세포 융합을 통해 생산된 융합세포에 재조합 효소 또는 상동성 재조합이 유도하는 인자를 처리하여 염색체 간의 재조합을 유도하는 과정이다. 이 과정에서 재조합 효소를 처리하는 경우, 재조합 효소가 인식하는 사이트, 즉, 상기 재조합에 필요한 요소를 가지는 염색체 간의 재조합이 유도된다. 다시 말해, 재조합에 필요한 요소를 가지는 목적 유전자를 포함하는 염색체와 재조합에 필요한 요소를 가지는 목적 유전자가 삽입될 염색체 간의 재조합이 유도된다. 그 결과, 상기 두 염색체 간의 재조합이 발생하여 목적 유전자가 위치 이동을 함으로써 새로운 인공 재조합 염색체가 생성된다. 이때, 생성된 인공 재조합 염색체는 목적 유전자가 삽입될 염색체에 목적 유전자가 삽입된 형태로, 즉, 원하는 형질(목적 유전자)이 삽입된 염색체이다. 다시 말해, 생성된 인공 재조합 염색체는 수용체 세포의 염색체(즉, 상기 목적 유전자가 삽입될 염색체) 내로 공여체 세포의 염색체 일부(즉, 상기 목적 유전자)가 삽입된 염색체로, 염색체간 재조합에 의해 생성된 염색체이다. 상기 인공 재조합 염색체를 가지는 세포를 이용해 형질 전환 동물을 생산할 수 있다.

[155] 앞선 예를 이용하여 설명하면, 인간 항체를 생산하는 마우스를 생산하는 경우, 1250 킬로베이스(kilobases; kb)의 크기를 가지는 인간 면역글로불린 중쇄(immunoglobulin heavy; IGH) 유전자를 마우스 세포에 도입해야 한다. 본 명세서에 의해 개시되는 염색체를 이용한 형질도입 방법을 이용하는 경우, 인간 면역글로불린 중쇄(immunoglobulin heavy; IGH) 유전자가 포함된 염색체, 즉, 인간 14번 염색체를 마우스 세포에 도입한다. 이때, 상기 인간 IGH 유전자가 포함된 염색체는 목적 유전자, 즉, 인간 IGH 유전자의 양 말단에 재조합에 필요한 요소가 포함되도록 인위적으로 조작된 염색체이다. 마우스 세포 내로

상기 인간 14번 염색체를 도입 또는 전달하기 위해, MMCT(Microcell-Mediated Chromosome Transfer)를 이용할 수 있다. MMCT를 이용해 마이크로세포 및 마우스 세포가 융합된 융합세포를 형성하게 되고, 이때, 상기 융합세포는 마우스 세포의 전체 염색체 및 상기 인간 14번 염색체를 포함한다. 상기 융합세포에 재조합 효소를 처리하여 도입된 상기 인간 14번 염색체와 목적 유전자가 삽입되길 원하는 염색체(예를 들어, 마우스 IGH 유전자를 포함하는 마우스 12번 염색체) 간의 재조합을 유도한다. 이때, 상기 목적 유전자가 삽입되길 원하는 염색체(예를 들어, 마우스 IGH 유전자를 포함하는 마우스 12번 염색체)는 상기 인간 14번 염색체와 마찬가지로 목적 유전자가 삽입되길 원하는 좌위(예를 들어, 마우스 IGH 유전자의 양 말단)에 재조합에 필요한 요소가 포함되도록 인위적으로 조작된 염색체이다. 재조합 유도 과정을 거치면 상기 인간 14번 염색체의 인간 IGH 유전자가 상기 목적 유전자가 삽입되길 원하는 좌위(예를 들어, 마우스 IGH 유전자 좌위)로 삽입 또는 교체 삽입된다. 삽입의 경우, 마우스 IGH 유전자 좌위의 상류 또는 하류에 인간 IGH 유전자가 삽입될 수 있다. 교체 삽입의 경우, 마우스 IGH 유전자 좌위에 마우스 IGH 유전자가 인간 IGH 유전자로 교체 삽입될 수 있다. 재조합(삽입 또는 교체 삽입)은 재조합에 필요한 요소의 설계에 따라 다양화될 수 있다. 상기에 기재한 예는 하나의 예시일 뿐, 목적 유전자는 선택적으로 변경 가능하며 다양화될 수 있다.

[156] 본 명세서에 의해 개시되는 염색체를 이용한 형질도입 방법은 인위적인 클로닝 단계 없이 세포 내에 존재하는 염색체 자체를 이용하는 것으로, 기존의 BAC 및 YAC 등의 형질전환 벡터를 이용한 시스템과 기술적 차별성을 가진다. 또한, 본 명세서에 의해 개시되는 염색체를 이용한 형질도입 방법은 목적 유전자, 특히, 큰 사이즈의 목적 유전자를 도입하고자 하는 경우, 기존 방법의 BAC 및 YAC 등의 형질전환 벡터를 이용한 여러 번에 걸친 순차적 도입의 횟수를 현저히 줄임으로 기존 방식의 문제점(효율, 시간, 비용 등)을 해결할 수 있는 새로운 기술이다.

[157] 본 명세서에 의해 개시되는 염색체를 이용한 형질도입 방법은 도입하고자 하는 유전자, 즉, 목적 유전자의 전체 서열을 클로닝하지 않는다. 하나의 목적 유전자의 게놈 내 도입을 위해, 본 명세서에 의해 개시되는 염색체를 이용한 형질도입 방법은 세포 융합 후 재조합 효소(또는 상동성 재조합이 유도하는 인자) 처리하여 염색체를 재조합 시킨 후 추가로 마이크로세포를 융합하지 않는다. 다만, 목적 유전자가 둘 이상이며, 각각의 목적 유전자가 서로 다른 염색체에 위치하는 경우, 상기 염색체를 이용한 형질도입 방법은 각각의 목적 유전자의 게놈 내 도입을 위해 수행되며, 이때, 상기 염색체를 이용한 형질도입 방법을 통해 생성된 첫번째 목적 유전자가 도입된 세포에 두번째 목적 유전자의 도입을 위해 마이크로세포를 융합하는 단계가 추가로 수행된다.

[158]

[159] 이하에서, 본 명세서에 의해 개시되는 염색체를 이용한 형질도입 방법, 즉, 인공

재조합 염색체를 생산하는 방법에 대해 자세히 설명한다.

[160]

[161] 본 명세서에 의해 개시되는 내용의 일 태양은 인공 재조합 염색체에 관한 것이다.

[162]

“인공 재조합 염색체(artificial recombinant chromosome)”는 2 이상의 원세포(source cell)로부터 제공된 2 이상의 염색체 간 일부가 재조합된 염색체를 의미한다. 또한, 상기 인공 재조합 염색체는 상기 2 이상의 원세포(source cell)로부터 제공된 2 이상의 염색체 간 일부가 재조합된 염색체의 복제에 의해 생성된 염색체도 모두 포함한다. 일 예로, 상기 인공 재조합 염색체는 제1 원세포(a first source cell)로부터 제공된 염색체 및 제2 원세포(a second source cell)로부터 제공된 염색체 간 일부가 재조합된 염색체일 수 있다. 이때, 상기 제1 원세포(a first source cell)로부터 제공된 염색체는 제1 원염색체(a first source chromosome)일 수 있으며, 상기 제1 원염색체(a first source chromosome)는 상기 제1 원세포(a first source cell)에 포함될 수 있다. 이때, 상기 제2 원세포(a second source cell)로부터 제공된 염색체는 제2 원염색체(a second source chromosome)일 수 있으며, 상기 제2 원염색체(a second source chromosome)는 상기 제2 원세포(a second source cell)에 포함될 수 있다.

[163]

상기 인공 재조합 염색체를 적어도 하나 이상 포함하는 세포를 “재조합 세포”로 지칭한다. 이때, 상기 재조합 세포는 적어도 하나 이상의 인공 재조합 염색체 및 적어도 하나 이상의 원염색체를 포함한다.

[164]

“원염색체(source chromosome)”는 인공 재조합 염색체의 제조를 위해 제공되는 염색체를 의미한다. 상기 원염색체는 자연 염색체 및 인위적으로 조작된 염색체를 모두 포함한다. 상기 자연 염색체는 자연발생적으로 존재하는 염색체로, 어떠한 인위적인 변형도 가하지 않은 염색체를 의미한다. 예를 들어, 인간의 신경세포는 46개의 자연발생적으로 존재하는 염색체를 가진다. 상기 인위적으로 조작된 염색체는 상기 자연 염색체에 인위적인 변형을 가하여 생성된 염색체를 의미한다. 이때, 상기 인위적인 변형은 상기 자연 염색체를 구성하는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삭제, 삽입, 치환 또는 이들의 조합을 포함한다. 상기 인위적으로 조작된 염색체는 하기에 기술할 표적화된 염색체, 이를 생산하는 과정에서 발생하는 염색체, 및 표적화된 염색체의 제조 목적 외의 인위적인 변형을 포함하는 염색체 모두를 포함한다. 예를 들어, 상기 표적화된 염색체의 제조 목적 외의 인위적인 변형을 포함하는 염색체는 외인성 단백질(exogenous protein)의 발현을 위해 이를 암호화하는 외인성 핵산(exogenous nucleic acid)이 삽입된 염색체일 수 있다.

[165]

“원세포(source cell)”는 상기 원염색체를 포함하는 세포를 의미한다. 상기 원세포는 자연 염색체를 포함하는 세포 및 인위적으로 조작된 염색체를 포함하는 세포를 모두 포함한다. 이때, 상기 인위적으로 조작된 염색체를 포함하는 세포는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포, 이를 생산하는

과정에서 발생하는 세포, 및 표적화된 염색체의 제조 목적 외의 인위적인 변형을 포함하는 염색체를 포함하는 세포를 모두 포함한다. 또한 인공 재조합 염색체 외의 염색체를 포함하는 세포, 즉, 인공 재조합 염색체를 포함하지 않는 세포도 본원에서 원세포로 지칭할 수 있다.

[166]

[167] 인공 재조합 염색체

[168] 상기 인공 재조합 염색체는 제1 원염색체로부터 제공된 염색체 서열 일부 및 제2 원염색체로부터 제공된 염색체 서열 일체가 재조합된 염색체일 수 있다.

[169] 상기 인공 재조합 염색체는 제1 원염색체로부터 제공된 염색체 서열 일체 및 제2 원염색체로부터 제공된 염색체 서열 일부가 재조합된 염색체일 수 있다.

[170] 상기 인공 재조합 염색체는 제1 원염색체로부터 제공된 염색체 서열 일체 및 제2 원염색체로부터 제공된 염색체 서열 일체가 재조합된 염색체일 수 있다.

[171] 상기 인공 재조합 염색체는 제1 원염색체로부터 제공된 염색체 서열 일부 및 제2 원염색체로부터 제공된 염색체 서열 일부가 재조합된 염색체일 수 있다.

[172] 상기 제1 원염색체는 제1 원세포에 포함될 수 있다.

[173] 상기 제2 원염색체는 제2 원세포에 포함될 수 있다.

[174] 상기 제1 원염색체는 제1 원세포 유래일 수 있다.

[175] 상기 제2 원염색체는 제2 원세포 유래일 수 있다.

[176] 상기 제1 원염색체는 제1 원세포에 포함되며, 상기 제2 원염색체는 제2 원세포에 포함될 수 있다. 이 경우, 상기 제1 원세포 및 상기 제2 세포는 동일한 종류의 세포일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 원세포 및 상기 제2 세포는 마우스 섬유아 세포일 수 있으며, 이때, 상기 제1 원세포 및 상기 제2 원세포는 각각의 세포로 존재할 수 있다. 상기 제1 염색체는 제2 원염색체와 서로 다른 염색체일 수 있다. 또는, 상기 제1 원염색체와 제2 원염색체는 상동 염색체일 수 있다.

[177] 상기 제1 원세포 및 상기 제2 원세포는 동일 개체 유래일 수 있다.

[178] 상기 제1 원세포 및 상기 제2 원세포는 다른 개체 유래일 수 있다. 이때, 상기 다른 개체는 동종 및 이종을 모두 포함할 수 있다.

[179] 상기 원세포는 인간 세포(human cell) 유래일 수 있다.

[180] 상기 원세포는 비인간 세포(non-human cell) 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 비인간 세포(non-human cell)는 마우스 세포(mouse cell), 래트 세포(rat cell), 설치류 세포(rodent cell), 양 세포(goral cell), 소 세포(cattle cell) 또는 유제류 세포(ungulate cell) 유래일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[181] 상기 원세포는 체세포(somatic cell) 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 체세포(somatic cell)는 예를 들어, 섬유아세포(fibroblast cell)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[182] 상기 원세포는 면역세포(immune cell) 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 면역세포(immune cell)는 B-세포(B-cell), T-세포(T-cell), NK세포(NK cell), 대식세포, 호중구, 호염기구 또는 호산구 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은

아니다.

- [183] 상기 원세포는 생식세포(germ cell)유래일 수 있다. 예를 들어, 정자, 정모세포, 정원줄기세포, 난자, 난모세포, 난원줄기세포 또는 수정란 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [184] 상기 원세포는 줄기세포(stem cell) 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 줄기세포(stem cell)는 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell), 성체줄기세포, 체대혈 줄기세포, 정원줄기세포 또는 난원줄기세포 유래일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [185]
- [186] 일 구현예로서, 상기 인공 재조합 염색체는 제1 프래그먼트(a first fragment) 및 제2 프래그먼트(a second fragment)를 포함할 수 있다.
- [187] 상기 제1 프래그먼트는 제1 원세포의 제1 원염색체의 일부분일 수 있다.
- [188] 이때, 상기 제1 프래그먼트는 제1 텔로미어 말단을 포함할 수 있다. 상기 제1 텔로미어 말단은 상기 제1 원염색체의 양 텔로미어 말단 중 하나일 수 있다.
- [189] 이때, 상기 제1 원세포는 인간세포, 마우스 세포(mouse cell), 래트 세포(rat cell), 설치류 세포(rodent cell), 양 세포(goral cell), 소 세포(cattle cell) 또는 유제류 세포(ungulate cell)일 수 있다.
- [190] 상기 제2 프래그먼트는 제2 원세포의 제2 원염색체의 일부분일 수 있다.
- [191] 이때, 상기 제2 프래그먼트는 동원체 및 제2 텔로미어 말단을 포함할 수 있다. 상기 동원체는 제2 원염색체의 동원체일 수 있다. 상기 제2 텔로미어 말단은 상기 제2 원염색체의 양 텔로미어 말단 중 하나일 수 있다.
- [192] 이때, 상기 제2 원세포는 인간세포, 마우스 세포(mouse cell), 래트 세포(rat cell), 설치류 세포(rodent cell), 양 세포(goral cell), 소 세포(cattle cell) 또는 유제류 세포(ungulate cell)일 수 있다.
- [193] 이때, 상기 제2 원세포는 제1 원세포와 이종 개체 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 원세포가 인간세포인 경우, 상기 제2 원세포는 마우스 세포일 수 있다.
- [194] 또는 상기 제2 원세포는 제1 원세포와 동종 개체 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 원세포가 인간세포인 경우, 상기 제2 원세포는 인간세포일 수 있다.
- [195] 상기 제1 프래그먼트와 상기 제2 프래그먼트는 포스포다이에스터 결합(phosphodiester bond)에 의해 연결될 수 있다.
- [196] 상기 인공 재조합 염색체는 이종 개체 유래의 2개의 텔로미어 말단을 가질 수 있다.
- [197] 상기 인공 재조합 염색체는 서로 다른 길이를 가지는 2개의 텔로미어 말단을 가질 수 있다.
- [198] 이때, 상기 인공 재조합 염색체는 제1 원염색체와 동일한 염색체가 아니며, 또한 상기 인공 재조합 염색체는 제2 원염색체와 동일한 염색체가 아니다.
- [199]
- [200] 다른 일 구현예로서, 상기 인공 재조합 염색체는 제1 프래그먼트(a first

fragment), 제2 프래그먼트(a second fragment) 및 제3 프래그먼트(a third fragment)를 포함할 수 있다.

[201] 상기 제1 프래그먼트는 제1 원세포의 제1 원염색체의 일부분일 수 있다.

[202] 이때, 상기 제1 원세포는 인간세포, 마우스 세포(mouse cell), 래트 세포(rat cell), 설치류 세포(rodent cell), 양 세포(goral cell), 소 세포(cattle cell) 또는 유제류 세포(ungulate cell)일 수 있다.

[203] 상기 제2 프래그먼트는 제2 원세포의 제2 원염색체의 일부분일 수 있다.

[204] 이때, 상기 제2 프래그먼트는 동원체 및 제1 텔로미어 말단을 포함할 수 있다. 상기 동원체는 제2 원염색체의 동원체일 수 있다. 상기 제1 텔로미어 말단은 상기 제2 원염색체의 양 텔로미어 말단 중 하나일 수 있다.

[205] 상기 제3 프래그먼트는 제2 원세포의 제2 원염색체의 일부분일 수 있다.

[206] 이때, 상기 제3 프래그먼트는 제2 텔로미어 말단을 포함할 수 있다. 상기 제2 텔로미어 말단은 상기 제2 원염색체의 양 텔로미어 말단 중 하나일 수 있다.

[207] 이때, 상기 제2 원세포는 인간세포, 마우스 세포(mouse cell), 래트 세포(rat cell), 설치류 세포(rodent cell), 양 세포(goral cell), 소 세포(cattle cell) 또는 유제류 세포(ungulate cell)일 수 있다.

[208] 이때, 상기 제2 원세포는 제1 원세포와 이종 개체 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 원세포가 인간세포인 경우, 상기 제2 원세포는 마우스 세포일 수 있다.

[209] 또는 상기 제2 원세포는 제1 원세포와 동종 개체 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 원세포가 인간세포인 경우, 상기 제2 원세포는 인간세포일 수 있다.

[210] 상기 제1 프래그먼트와 상기 제2 프래그먼트는 포스포다이에스터 결합(phosphodiester bond)에 의해 연결될 수 있다.

[211] 상기 제1 프래그먼트와 상기 제3 프래그먼트는 포스포다이에스터 결합(phosphodiester bond)에 의해 연결될 수 있다.

[212] 상기 인공 재조합 염색체는 [제2 프래그먼트]-[제1 프래그먼트]-[제3 프래그먼트] 순으로 구성될 수 있다.

[213] 이때, 상기 제1 프래그먼트는 역위된(inverted) 형태일 수 있다. 이때, 상기 역위된 형태는 상기 제1 원염색체에 존재하는 제1 프래그먼트의 역위(inversion)일 수 있다. 이 경우, 상기 인공 재조합 염색체를 포함한 세포는 상기 제1 프래그먼트에 포함된 유전자를 단백질로 발현시키지 않을 수 있다. 또는, 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제1 원염색체를 포함하는 상기 제1 원세포와 비교하여 상기 제1 프래그먼트에 포함된 유전자의 발현 양상이 다를 수 있다.

[214] 상기 인공 재조합 염색체는 동일 개체 유래의 텔로미어 양말단을 가질 수 있다.

[215] 이때, 상기 인공 재조합 염색체는 제1 원염색체와 동일한 염색체가 아니며, 또한 상기 인공 재조합 염색체는 제2 원염색체와 동일한 염색체가 아니다.

[216]

[217] 또 다른 일 구현예로서, 상기 인공 재조합 염색체는 제1 프래그먼트(a first

fragment), 제2 프래그먼트(a second fragment) 및 제3 프래그먼트(a third fragment)를 포함할 수 있다.

- [218] 상기 제1 프래그먼트는 제1 원세포의 제1 원염색체의 일부분일 수 있다.
- [219] 이때, 상기 제1 프래그먼트는 동원체를 포함할 수 있다. 상기 동원체는 상기 제1 원염색체의 동원체일 수 있다.
- [220] 이때, 상기 제1 원세포는 인간세포, 마우스 세포(mouse cell), 래트 세포(rat cell), 설치류 세포(rodent cell), 양 세포(goral cell), 소 세포(cattle cell) 또는 유제류 세포(ungulate cell)일 수 있다.
- [221] 상기 제2 프래그먼트는 제2 원세포의 제2 원염색체의 일부분일 수 있다.
- [222] 이때, 상기 제2 프래그먼트는 제1 텔로미어 말단을 포함할 수 있다. 상기 제1 텔로미어 말단은 상기 제2 원염색체의 양 텔로미어 말단 중 하나일 수 있다.
- [223] 상기 제3 프래그먼트는 제2 원세포의 제2 원염색체의 일부분일 수 있다.
- [224] 이때, 상기 제3 프래그먼트는 제2 텔로미어 말단을 포함할 수 있다. 상기 제2 텔로미어 말단은 상기 제2 원염색체의 양 텔로미어 말단 중 하나일 수 있다.
- [225] 이때, 상기 제2 원세포는 인간세포, 마우스 세포(mouse cell), 래트 세포(rat cell), 설치류 세포(rodent cell), 양 세포(goral cell), 소 세포(cattle cell) 또는 유제류 세포(ungulate cell)일 수 있다.
- [226] 이때, 상기 제2 원세포는 제1 원세포와 이종 개체 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 원세포가 인간세포인 경우, 상기 제2 원세포는 마우스 세포일 수 있다.
- [227] 또는 상기 제2 원세포는 제1 원세포와 동종 개체 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 원세포가 인간세포인 경우, 상기 제2 원세포는 인간세포일 수 있다.
- [228] 상기 제1 프래그먼트와 상기 제2 프래그먼트는 포스포다이에스터 결합(phosphodiester bond)에 의해 연결될 수 있다.
- [229] 상기 제1 프래그먼트와 상기 제3 프래그먼트는 포스포다이에스터 결합(phosphodiester bond)에 의해 연결될 수 있다.
- [230] 상기 인공 재조합 염색체는 [제2 프래그먼트]-[제1 프래그먼트]-[제3 프래그먼트] 순으로 구성될 수 있다.
- [231] 이때, 상기 제1 프래그먼트는 역위된(inverted) 형태일 수 있다. 이때, 상기 역위된 형태는 상기 제1 원염색체에 존재하는 제1 프래그먼트의 역위(inversion)일 수 있다. 이 경우, 상기 인공 재조합 염색체를 포함한 세포는 상기 제1 프래그먼트에 포함된 유전자를 단백질로 발현시키지 않을 수 있다. 또는, 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제1 원염색체를 포함하는 상기 제1 원세포와 비교하여 상기 제1 프래그먼트에 포함된 유전자의 발현 양상이 다를 수 있다.
- [232] 상기 인공 재조합 염색체는 동일 개체 유래의 텔로미어 양말단을 가질 수 있다.
- [233] 이때, 상기 인공 재조합 염색체는 제1 원염색체와 동일한 염색체가 아니며, 또한 상기 인공 재조합 염색체는 제2 원염색체와 동일한 염색체가 아니다.
- [234]

- [235] 다른 일 구현예로서, 상기 인공 재조합 염색체는 제1 프래그먼트(a first fragment), 제2 프래그먼트(a second fragment) 및 제3 프래그먼트(a third fragment)를 포함할 수 있다.
- [236] 상기 제1 프래그먼트는 제1 원세포의 제1 원염색체의 일부분일 수 있다.
- [237] 이때, 상기 제1 프래그먼트는 제1 텔로미어 말단을 포함할 수 있다. 상기 제1 텔로미어 말단은 상기 제1 원염색체의 양 텔로미어 말단 중 하나일 수 있다.
- [238] 이때, 상기 제1 원세포는 인간세포, 마우스 세포(mouse cell), 래트 세포(rat cell), 설치류 세포(rodent cell), 양 세포(goral cell), 소 세포(cattle cell) 또는 유제류 세포(ungulate cell)일 수 있다.
- [239] 상기 제2 프래그먼트는 제2 원세포의 제2 원염색체의 일부분일 수 있다.
- [240] 이때, 상기 제2 프래그먼트는 동원체를 포함할 수 있다. 상기 동원체는 상기 제2 원염색체의 동원체일 수 있다.
- [241] 이때, 상기 제2 원세포는 인간세포, 마우스 세포(mouse cell), 래트 세포(rat cell), 설치류 세포(rodent cell), 양 세포(goral cell), 소 세포(cattle cell) 또는 유제류 세포(ungulate cell)일 수 있다.
- [242] 상기 제3 프래그먼트는 제3 원세포의 제3 원염색체의 일부분일 수 있다.
- [243] 이때, 상기 제3 프래그먼트는 제2 텔로미어 말단을 포함할 수 있다. 상기 제2 텔로미어 말단은 상기 제3 원염색체의 양 텔로미어 말단 중 하나일 수 있다.
- [244] 이때, 상기 제3 원세포는 인간세포, 마우스 세포(mouse cell), 래트 세포(rat cell), 설치류 세포(rodent cell), 양 세포(goral cell), 소 세포(cattle cell) 또는 유제류 세포(ungulate cell)일 수 있다.
- [245] 이때, 상기 제3 원세포는 제1 원세포 및 제2 원세포와 이종 개체 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 원세포 및 상기 제2 원세포가 인간세포인 경우, 상기 제3 원세포는 마우스 세포일 수 있다. 또는 예를 들어, 상기 제1 원세포가 인간세포이고, 제2 원세포가 마우스 세포인 경우, 상기 제3 원세포는 래트 세포일 수 있다.
- [246] 또는 상기 제3 원세포는 제1 원세포와 이종 개체 유래이고 제2 원세포와 동종 개체 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 원세포가 인간세포이고, 상기 제2 원세포가 마우스 세포인 경우, 상기 제3 원세포는 마우스 세포일 수 있다.
- [247] 또는, 상기 제3 원세포는 제1 원세포와 동종 개체 유래이고 제2 원세포와 이종 개체 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 원세포가 마우스 세포이고, 상기 제2 원세포가 래트 세포인 경우, 상기 제3 원세포는 마우스 세포일 수 있다.
- [248] 상기 제1 프래그먼트와 상기 제2 프래그먼트는 포스포다이에스터 결합(phosphodiester bond)에 의해 연결될 수 있다.
- [249] 상기 제2 프래그먼트와 상기 제3 프래그먼트는 포스포다이에스터 결합(phosphodiester bond)에 의해 연결될 수 있다.
- [250] 상기 인공 재조합 염색체는 [제1 프래그먼트]-[제2 프래그먼트]-[제3 프래그먼트] 순으로 구성될 수 있다.

- [251] 이때, 상기 제2 프래그먼트는 역위된(inverted) 형태일 수 있다. 이때, 상기 역위된 형태는 상기 제2 원염색체에 존재하는 제2 프래그먼트의 역위(inversion)일 수 있다. 이 경우, 상기 인공 재조합 염색체를 포함한 세포는 상기 제2 프래그먼트에 포함된 유전자를 단백질로 발현시키지 않을 수 있다. 또는, 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제2 원염색체를 포함하는 상기 제2 원세포와 비교하여 상기 제2 프래그먼트에 포함된 유전자의 발현 양상이 다를 수 있다.
- [252] 상기 인공 재조합 염색체는 동일 개체 유래의 텔로미어 양말단을 가질 수 있다.
- [253] 또는 상기 인공 재조합 염색체는 이종 개체 유래의 2개의 텔로미어 말단을 가질 수 있다. 상기 인공 재조합 염색체는 서로 다른 길이를 가지는 2개의 텔로미어 말단을 가질 수 있다.
- [254] 이때, 상기 인공 재조합 염색체는 제1 원염색체, 제2 원염색체 및 제3 원염색체와 동일한 염색체가 아니다.
- [255]
- [256] 본 명세서에 의해 개시되는 내용의 일 태양은 인공 재조합 염색체의 생산 방법에 관한 것이다.
- [257] 인공 재조합 염색체는 원염색체로부터 생산될 수 있다.
- [258] 상기 원염색체는 인위적으로 조작된 염색체일 수 있다.
- [259] 상기 인위적으로 조작된 염색체는 표적화된 염색체(targeted chromosome)일 수 있다.
- [260] “표적화된 염색체(targeted chromosome)”는 자연 염색체에 재조합을 위한 일 또는 복수 개의 구성요소를 더 포함하는 염색체를 의미한다. 일 예로, 상기 표적화된 염색체는 자연 염색체에 일 또는 복수 개의 RRS(Recombinase recognition site)를 더 포함된 염색체일 수 있다. 다른 일 예로, 상기 표적화된 염색체는 자연 염색체에 일 또는 복수 개의 ASCE(Artificial Sequence for Chromosome Exchange)를 더 포함하는 염색체일 수 있다.
- [261] 상기 표적화된 염색체는 자연 염색체로부터 제조될 수 있다.
- [262] 상기 원염색체 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [263] 일 예로, 제1 표적화된 염색체(a first targeted chromosome)는 제1 자연 염색체로부터 제작될 수 있다. 상기 제1 표적화된 염색체는 상기 제1 자연 염색체에 일 또는 복수 개의 RRS(Recombinase recognition site)를 가지는 것일 수 있다. 상기 제1 표적화된 염색체는 상기 제1 자연 염색체에 일 또는 복수 개의 ASCE(Artificial Sequence for Chromosome Exchange)를 가지는 것일 수 있다.
- [264] 다른 일 예로, 제2 표적화된 염색체(a second targeted chromosome)는 제2 자연 염색체로부터 제작될 수 있다. 상기 제2 표적화된 염색체는 상기 제2 자연 염색체에 일 또는 복수 개의 RRS(Recombinase recognition site)를 가지는 것일 수 있다. 상기 제2 표적화된 염색체는 상기 제2 자연 염색체에 일 또는 복수 개의 ASCE(Artificial Sequence for Chromosome Exchange)를 가지는 것일 수 있다.

- [265] “RRS(Recombinase recognition site)”는 부위 특이적 재조합효소에 의한 재조합 부위를 제공할 수 있는 핵산 서열을 의미한다. 일 예로, 상기 RRS는 loxP 부위 또는 그의 변이체일 수 있다(표 1). 다른 일 예로, 상기 RRS는 FRT 부위 또는 그의 변이체일 수 있다. 일 예로, 상기 RRS는 attP/attB 또는 그의 변이체일 수 있다. 다른 일 예로, 상기 RRS는 하나 이상의 트랜스포세이즈(transposase)에 의해 인지되는 ITR (inverted terminal repeat; 역위 말단 반복) 서열 또는 그의 변이체일 수 있다. 다만, RRS는 기재된 것에 제한되는 것은 아니다.
- [266] 상기 표적화된 염색체를 자연 염색체로부터 제작하기 위하여, 부위 특이적 재조합 시스템이 이용될 수 있다. 상기 부위 특이적 재조합 시스템은 RRS에 작용하는 SSR을 이용하는 시스템으로, 당업계에 공지되어 있다. 상기 부위 특이적 재조합 시스템은 Cre-lox을 포함할 수 있다. 상기 부위 특이적 재조합 시스템은 FLP/FRT를 포함할 수 있다. 상기 부위 특이적 재조합 시스템은 ϕ C31 인테그레이즈-attP/attB(ϕ C31 integrase-attP/attB)를 포함할 수 있다. 상기 부위 특이적 재조합 시스템은 트랜스포존(transposon)-ITR을 포함할 수 있다. 다만, RRS 및 SSR에 의한 부위 특이적 재조합 시스템은 기재된 것에 제한되는 것은 아니며, 다양한 종류의 recombinase, integrase, resolvase, 또는 trasposase가 SSR로 이용가능하며, SSR에 따라 RRS는 다양하게 변경 설계 가능하다.
- [267] 상기 RRS는 공지의 서열일 수 있다. 일 예로, 상기 RRS는 LoxP 또는 그 변이체일 수 있다.
- [268] 예를 들어, 상기 LoxP 변이체는 Lox m2/71, Lox m2/66, Lox71 및 Lox66 중 어느 하나 이상일 수 있다. 상기 loxP 변이체의 DNA 서열은, 하기 표 1에 개시한다. 이하에서, 서열 번호는 SEQ ID NO:로 기재한다.

[269]

[270] [표1]

LoxP 변이체의 DNA 서열

No.	Lox 변이체	DNA 서열	SEQ ID NO:
1	Lox m2/71	5'-taccgTTCGTATAtgTtctTATAACGAAGTTAT-3'	23
2	Lox m2/66	5'-ATAACTTCGTATAtgTtctTATAACGAACggtta-3'	24
3	Lox 71	5'-taccgTTCGTATAGCATAACATTATAACGAAGTTA T-3'	25
4	Lox 66	5'-ATAACTTCGTATAGCATAACATTATAACGAACggtta-3'	26

[271]

[272] 상기 RRS는 공지의 서열일 수 있다. 다른 예로, 상기 RRS는 FRT 부위 또는 그 변이체일 수 있다.

[273] 또 다른 예로, 상기 RRS는 attP/attB 또는 그의 변이체일 수 있다. 또 다른 예로, 상기 RRS는 트랜스포제이즈(transposase)에 의해 인지되는 ITR (inverted terminal repeat; 역위 말단 반복) 서열 또는 그의 변이체일 수 있다. 이때, 상기 ITR은 트랜스포존 ITR일 수 있고, 상기 트랜스포존 ITR은 트랜스포존 terminal repeat(TR) 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열은 piggyBac terminal repeat(PB-TR)을 포함할 수 있다.

[274] 상기 RRS 및 그 변이체의 DNA 서열은, 하기 표 2에 개시한다.

[275]

[276] [표2]

RRS의 DNA 서열

No.	RRS	DNA 서열	SEQ ID NO:
1	FRT	5'-gaagttcctatactttctagagaataggaacttcggaataggaacttc-3'	27
2	φC31-attP	5'-cccaggtcagaagcgggttttcgggagtagtgccccaactggggtaacctttgagttctctcagttgggggcgtagggtcgccgacatgacacaaggggtt -3'	28
3	φC31-attB	5'-ctcgaagcccggtgcccgggtgccagggcgtgcccttgggctcccggggcgcgtactccacctcaccatc -3'	29
4	PiggyBac right(3') ITR	5'-ccctagaaagataatcatattgtgacgtacgttaaagataatcatcgtaaaattgacgcatg-3'	30
5	PiggyBac left(5') ITR	5'-catgcgtcaattttacgcagactatctttctaggg-3'	31

[277]

[278] “ASCE(Artificial Sequence for Chromosome Exchange)”는 상동성 재조합(Homologous Recombination; HR)에 의한 재조합 부위를 제공하는 핵산 서열을 의미한다. 상기 ASCE는 인위적인 서열일 수 있다. 상기 ASCE는 표적화된 염색체에 포함된 인위적인 서열일 수 있다. 예를 들어, 제1 표적화된 염색체는 제1 ASCE를 포함할 수 있다. 제2 표적화된 염색체는 제2 ASCE를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 상기 제1 ASCE와 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 상기 제2 ASCE는 추후 상동성 재조합에 이용될 수 있다.

[279] 상기 표적화된 염색체를 자연 염색체로부터 제작하기 위하여, 상동성 재조합이 이용될 수 있다. 상기 상동성 재조합(Homologous recombination)은 염색체의 DSB(double strand breaking) 및/또는 SSB(single strand breaking)에 의해 진행될 수 있다. 상기 SSB 및/또는 DSB는 자연적으로 발생할 수 있다. 상기 SSB 및/또는

DSB는 클라스토젠(clastogen; 염색체이상유발물질)에 의해 발생할 수 있다. 상기 클라스토젠은 이온화 방사선, UV, X선, γ 선, 활성산소종, 특정 케미컬일 수 있다. 상기 특정 케미컬은, 예를 들어, 블레오마이신(bleomycin), 하이드록시요소(Hydroxyurea), 캄프토테신(Camptothecin), 4-NQO(4-nitroquinoline 1-oxide), 시스플라틴(Cisplatin), EMS 또는 MMS 등의 메틸화 시약(methylating agent) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 SSB 및/또는 DSB는 유전자 가위에 의해 발생할 수 있다. 예를 들어, 상기 SSB 및/또는 DSB는 ZFN(Zinc-finger nucleases), TALEN(Transcription activator-like effector nucleases) 및 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein) 중 어느 하나 이상에 의해 발생할 수 있다.

[280]

[281] 일 구현예로서, 상기 인공 재조합 염색체는 적어도 두 개 이상의 표적화된 염색체에 의해 생산된 것일 수 있다.

[282] 상기 적어도 두 개 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.

[283] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 하나 이상의 RRS를 포함할 수 있다.

[284] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 하나 이상의 RRS를 포함할 수 있다.

[285] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 RRS는 SSR(site specific recombinase)에 의해 인지될 수 있다. 이때, 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 RRS는 서로 페어링(pairing)할 수 있다.

[286] 상기 인공 재조합 염색체는 제1 표적화된 염색체의 일부 및 제2 표적화된 염색체의 일부를 포함할 수 있다.

[287] 이때, 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 RRS 및 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 RRS의 페어링을 이용한 부위 특이적 재조합에 의해 생성된 것일 수 있다.

[288] 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체가 [제1 프래그먼트]-[제1 RRS]-[제2 프래그먼트]로 구성되고, 상기 제2 표적화된 염색체가 [제3 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제4 프래그먼트]로 구성된 경우,

[289] 상기 인공 재조합 염색체는 [제1 프래그먼트]-[제3 프래그먼트], [제1 프래그먼트]-[제4 프래그먼트], [제3 프래그먼트]-[제2 프래그먼트] 또는 [제2 프래그먼트]-[제4 프래그먼트]로 구성될 수 있다.

[290] 또는 상기 인공 재조합 염색체는 [제1 프래그먼트]-[제1 RRS]-[제3 프래그먼트], [제1 프래그먼트]-[제1 RRS]-[제4 프래그먼트], [제3 프래그먼트]-[제1 RRS]-[제2 프래그먼트] 또는 [제2 프래그먼트]-[제1 RRS]-[제4 프래그먼트]로 구성될 수 있다.

[291] 또는 상기 인공 재조합 염색체는 [제1 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제3 프래그먼트], [제1 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제4 프래그먼트], [제3

- 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제2 프래그먼트] 또는 [제2 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제4 프래그먼트]로 구성될 수 있다.
- [292] 또는 상기 인공 제조합 염색체는 [제1 프래그먼트]-[제3 RRS]-[제3 프래그먼트], [제1 프래그먼트]-[제3 RRS]-[제4 프래그먼트], [제3 프래그먼트]-[제3 RRS]-[제2 프래그먼트] 또는 [제2 프래그먼트]-[제3 RRS]-[제4 프래그먼트]로 구성될 수 있다. 이때, 상기 제3 RRS는 상기 제1 RRS와 상기 제2 RRS의 제조합에 의해 생성된 RRS로, 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS와 동일하지 않은 RRS일 수 있다.
- [293] 다른 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체가 [제1 프래그먼트]-[제1 RRS]-[제2 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제3 프래그먼트]로 구성되고, 상기 제2 표적화된 염색체가 [제4 프래그먼트]-[제3 RRS]-[제5 프래그먼트]-[제4 RRS]-[제6 프래그먼트]로 구성된 경우,
- [294] 상기 인공 제조합 염색체는 [제1 프래그먼트]-[제5 프래그먼트]-[제3 프래그먼트] 또는 [제4 프래그먼트]-[제2 프래그먼트]-[제6 프래그먼트]로 구성될 수 있다.
- [295] 또는 상기 인공 제조합 염색체는 [제1 프래그먼트]-[제1 RRS]-[제5 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제3 프래그먼트], [제1 프래그먼트]-[제1 RRS]-[제5 프래그먼트]-[제4 RRS]-[제3 프래그먼트], [제1 프래그먼트]-[제3 RRS]-[제5 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제3 프래그먼트], [제1 프래그먼트]-[제3 RRS]-[제5 프래그먼트]-[제4 RRS]-[제3 프래그먼트], [제4 프래그먼트]-[제1 RRS]-[제2 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제6 프래그먼트], [제4 프래그먼트]-[제1 RRS]-[제2 프래그먼트]-[제4 RRS]-[제6 프래그먼트], [제4 프래그먼트]-[제3 RRS]-[제2 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제6 프래그먼트] 또는 [제4 프래그먼트]-[제3 RRS]-[제2 프래그먼트]-[제4 RRS]-[제6 프래그먼트]로 구성될 수 있다.
- [296] 또는 상기 인공 제조합 염색체는 [제1 프래그먼트]-[제5 RRS]-[제5 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제3 프래그먼트], [제1 프래그먼트]-[제5 RRS]-[제5 프래그먼트]-[제4 RRS]-[제3 프래그먼트], [제4 프래그먼트]-[제5 RRS]-[제2 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제6 프래그먼트] 또는 [제4 프래그먼트]-[제5 RRS]-[제2 프래그먼트]-[제4 RRS]-[제6 프래그먼트]로 구성될 수 있다. 이때, 상기 제5 RRS는 상기 제1 RRS와 상기 제3 RRS의 제조합에 의해 생성된 RRS로, 상기 제1 RRS 및 상기 제3 RRS와 동일하지 않은 RRS일 수 있다.
- [297] 또는 상기 인공 제조합 염색체는 [제1 프래그먼트]-[제1 RRS]-[제5 프래그먼트]-[제6 RRS]-[제3 프래그먼트], [제1 프래그먼트]-[제3 RRS]-[제5 프래그먼트]-[제6 RRS]-[제3 프래그먼트], [제4 프래그먼트]-[제1 RRS]-[제2 프래그먼트]-[제6 RRS]-[제6 프래그먼트] 또는 [제4 프래그먼트]-[제3 RRS]-[제2 프래그먼트]-[제6 RRS]-[제6 프래그먼트]로 구성될 수 있다. 이때, 상기 제6 RRS는 상기 제2 RRS와 상기 제4 RRS의 제조합에 의해 생성된 RRS로, 상기 제2 RRS 및 상기 제4 RRS와 동일하지 않은 RRS일 수 있다.

- [298] 또는 상기 인공 제조합 염색체는 [제1 프래그먼트]-[제5 RRS]-[제5 프래그먼트]-[제6 RRS]-[제3 프래그먼트] 또는 [제4 프래그먼트]-[제5 RRS]-[제2 프래그먼트]-[제6 RRS]-[제6 프래그먼트]로 구성될 수 있다. 이때, 상기 제5 RRS는 상기 제1 RRS와 상기 제3 RRS의 제조합에 의해 생성된 RRS로, 상기 제1 RRS 및 상기 제3 RRS와 동일하지 않은 RRS일 수 있다. 이때, 상기 제6 RRS는 상기 제2 RRS와 상기 제4 RRS의 제조합에 의해 생성된 RRS로, 상기 제2 RRS 및 상기 제4 RRS와 동일하지 않은 RRS일 수 있다.
- [299]
- [300] 다른 일 구현예로서, 상기 인공 제조합 염색체는 적어도 두 개 이상의 표적화된 염색체에 의해 생산된 것일 수 있다.
- [301] 상기 적어도 두 개 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.
- [302] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 하나 이상의 ASCE를 포함할 수 있다.
- [303] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 하나 이상의 ASCE를 포함할 수 있다.
- [304] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 ASCE는 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 ASCE와 상동성인 서열일 수 있다.
- [305] 상기 인공 제조합 염색체는 제1 표적화된 염색체의 일부 및 제2 표적화된 염색체의 일부를 포함할 수 있다.
- [306] 이때, 상기 인공 제조합 염색체는 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 ASCE 및 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 ASCE의 상동성을 이용한 상동성 제조합에 의해 생성된 것일 수 있다.
- [307] 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체가 [제1 프래그먼트]-[제1 ASCE]-[제2 프래그먼트]-[제2 ASCE]-[제3 프래그먼트]로 구성되고, 상기 제2 표적화된 염색체가 [제4 프래그먼트]-[제3 ASCE]-[제5 프래그먼트]-[제4 ASCE]-[제6 프래그먼트]로 구성된 경우,
- [308] 상기 인공 제조합 염색체는 [제1 프래그먼트]-[제5 프래그먼트]-[제3 프래그먼트] 또는 [제4 프래그먼트]-[제2 프래그먼트]-[제6 프래그먼트]로 구성될 수 있다.
- [309] 또는 상기 인공 제조합 염색체는 [제1 프래그먼트]-[제1 ASCE]-[제5 프래그먼트]-[제2 ASCE]-[제3 프래그먼트], [제1 프래그먼트]-[제1 ASCE]-[제5 프래그먼트]-[제4 ASCE]-[제3 프래그먼트], [제1 프래그먼트]-[제3 ASCE]-[제5 프래그먼트]-[제2 ASCE]-[제3 프래그먼트], [제1 프래그먼트]-[제3 ASCE]-[제5 프래그먼트]-[제4 ASCE]-[제3 프래그먼트], [제4 프래그먼트]-[제1 ASCE]-[제2 프래그먼트]-[제2 ASCE]-[제6 프래그먼트], [제4 프래그먼트]-[제1 ASCE]-[제2 프래그먼트]-[제4 ASCE]-[제6 프래그먼트], [제4 프래그먼트]-[제3 ASCE]-[제2 프래그먼트]-[제2 ASCE]-[제6 프래그먼트] 또는 [제4 프래그먼트]-[제3 ASCE]-[제2 프래그먼트]-[제4 ASCE]-[제6 프래그먼트]로 구성될 수 있다.
- [310]

- [311] 본 명세서에 의해 개시되는 내용의 일 태양은 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 생산 방법에 관한 것일 수 있다.
- [312] 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 생산 방법은 세포 융합을 이용하는 것일 수 있다.
- [313] “세포 융합(cell fusion)”은 둘 이상의 세포 간의 융합; 및/또는 하나 이상의 세포 및 하나 이상의 세포 유사체 간의 융합을 의미한다. 이때, 상기 융합은 둘 이상의 세포 간의 결합(또는 혼합)을 통해 하나의 세포가 형성되는 것; 및/또는 하나 이상의 세포 및 하나 이상의 세포 유사체 간의 결합(또는 혼합)을 통해 하나의 세포가 형성되는 것일 수 있다. 이때, 상기 세포 유사체는 게놈의 일부 또는 전체 염색체 중 일부는 포함하나 정상적인 체세포 분열 또는 감수 분열을 하지 못하는 세포 또는 세포 유래 물질일 수 있다.
- [314] 상기 세포 융합은 융합세포를 형성할 수 있다.
- [315] “융합세포(fusion cell)”은 원세포에 하나 이상의 염색체 또는 염색체의 절편(fragment)을 가지도록 생성된 세포를 의미한다. 이때, 상기 하나 이상의 염색체 또는 염색체의 절편(fragment)은 상기 원세포에서 자연발생적으로 존재하지 않는 추가적으로 부가된 염색체 또는 염색체의 절편(fragment)이다. 이때, 상기 하나 이상의 염색체 또는 염색체의 절편(fragment)은 원염색체, 원염색체의 절편, 인공 재조합 염색체, 또는 인공 재조합 염색체의 절편일 수 있다.
- [316] 상기 융합세포는 원세포에 하나 이상의 원염색체 또는 원염색체의 절편을 가지는 세포일 수 있다. 이때, 상기 하나 이상의 원염색체 또는 원염색체의 절편은 상기 원세포에서 자연발생적으로 존재하지 않는 추가적으로 부가된 염색체 또는 염색체의 절편일 수 있다.
- [317] 예를 들어, 인간 섬유아 세포가 원세포인 경우, 상기 융합세포는 마우스 섬유아 세포 유래의 하나 이상의 염색체를 포함하는 인간 섬유아 융합세포일 수 있다. 이때, 상기 인간 섬유아 융합세포는 상기 인간 섬유아 세포, 즉, 원세포와 다른 게놈을 가지며, 또한 상기 마우스 섬유아 세포와도 다른 게놈을 가질 수 있다. 이때, 상기 인간 섬유아 융합세포는 인간 섬유아 세포 유래 염색체 2n개(46개)와 마우스 섬유아 세포 유래 염색체 1개를 포함할 수 있다. 또는 상기 인간 섬유아 융합세포는 인간 섬유아 세포 유래 염색체 2n-1개(45개)와 마우스 섬유아 세포 유래 염색체 1개를 포함할 수 있다.
- [318] 상기 융합세포는 원세포에 하나 이상의 재조합된 염색체를 가지는 세포일 수 있다. 이때, 상기 하나 이상의 재조합된 염색체는 융합세포 내의 염색체 간의 재조합에 의해 생성된 것일 수 있다. 이때, 상기 재조합된 염색체는 인공 재조합 염색체일 수 있다.
- [319] 예를 들어, 마우스 배아 줄기 세포(embryonic stem cell; ESC)가 원세포인 경우, 상기 융합세포는 인간 섬유아 세포 유래의 하나 이상의 염색체를 포함하는 마우스 융합ESC일 수 있다. 이때, 상기 마우스 융합ESC는 상기 마우스 ESC, 즉,

원세포와 다른 계통을 가지며, 또한, 상기 인간 섬유아 세포와도 다른 계통을 가질 수 있다. 이때, 상기 마우스 융합ESC는 마우스 ESC 유래 염색체 $2n$ 개(40개)와 인간 섬유아 세포 유래 염색체 1개를 포함할 수 있다. 또는 상기 마우스 융합ESC는 마우스 ESC 유래 염색체 $2n-1$ 개(39개)와 인간 섬유아 세포 유래 염색체 1개를 포함할 수 있다. 또는 상기 마우스 융합ESC는 마우스 ESC 유래 염색체 $2n-1$ 개(39개)와 재조합된 염색체 2개를 포함할 수 있고, 이때, 상기 재조합된 염색체 2개는 마우스 ESC 유래 염색체 1개와 인간 섬유아 세포 유래 염색체 1개 간의 재조합에 의해 생성된 것일 수 있다. 또는 상기 마우스 융합ESC는 마우스 ESC 유래 염색체 $2n-1$ 개(39개)와 재조합된 염색체 1개를 포함할 수 있고, 이때, 상기 재조합된 염색체 1개는 마우스 ESC 유래 염색체 1개와 인간 섬유아 세포 유래 염색체 1개 간의 재조합에 의해 생성된 것일 수 있다.

- [320] 상기 융합세포는 $2n+1$ 개의 염색체를 가지는 동물세포일 수 있다.
- [321] 상기 융합세포는 $2n$ 개의 염색체를 가지는 동물세포일 수 있다. 이때, 상기 $2n$ 개의 염색체는 적어도 하나 이상은 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.
- [322] 상기 융합세포는 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포일 수 있다.
- [323] 상기 융합세포는 정상적인 체세포 분열 또는 감수 분열을 할 수 있다.
- [324] 상기 융합세포는 $n+1$ 개의 염색체를 가지는 동물 생식세포일 수 있다.
- [325] 상기 융합세포는 n 개의 염색체를 가지는 동물 생식세포일 수 있다. 이때, 상기 n 개의 염색체는 적어도 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.
- [326] 상기 융합세포는 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포일 수 있다.
- [327] 상기 인공 재조합 염색체 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [328]
- [329] 일 구현예로서, 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 생산 방법은
- [330] i) 표적화 세포의 생산;
- [331] ii) 상기 표적화 세포를 이용한 마이크로세포(microcell)을 생산;
- [332] iii) 상기 마이크로세포를 이용한 융합세포 생산; 및
- [333] iv) 상기 융합세포를 이용한 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포 생산
- [334] 을 포함하는 방법일 수 있다.
- [335] 상기 i) 단계에 의해 생산되는 표적화 세포는 2 이상의 표적화 세포일 수 있다.
- [336] 이때, 상기 2 이상의 표적화 세포는 공여체 세포(donor cell) 및 수용체 세포(recipient cell)일 수 있다.
- [337] 상기 ii) 단계에서 이용되는 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [338] 상기 iii) 단계에서 상기 마이크로세포는 수용체 세포와 세포 융합될 수 있다.
- [339]
- [340] 각 단계에 대해서 이하에서 구체적으로 설명한다.
- [341]

[342] **i) 표적화 세포의 생산**

[343] 상기 i) 단계에 의해 생산되는 표적화 세포는 2 이상의 표적화 세포일 수 있다.

[344] 상기 2 이상의 표적화 세포는 공여체 세포(donor cell) 및 수용체 세포(recipient cell)일 수 있다. 상기 공여체 세포는 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함하는 세포이며, 상기 수용체 세포는 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함하는 세포이다. 이때, 상기 공여체 세포에 포함된 표적화된 염색체는 상기 수용체 세포에 포함된 표적화된 염색체와 관련성이 있어야 한다. 상기 관련성은 상기 공여체 세포에 포함된 표적화된 염색체와 상기 수용체 세포에 포함된 표적화된 염색체간의 재조합을 유도할 수 있는 구성요소의 페어링(pairing) 또는 상동성 결합 가능성일 수 있다.

[345] 이때, 상기 구성요소는 상기에 기술한 RRS 또는 ASCE일 수 있다.

[346] 상기 관련성은 상기 공여체 세포에 포함된 표적화된 염색체에 존재하는 RRS와 상기 수용체 세포에 포함된 표적화된 염색체에 존재하는 RRS와의 페어링(pairing)일 수 있다.

[347] 예를 들어, 상기 공여체 세포에 포함된 표적화된 염색체는 하나 이상의 RRS(예를 들어, 제1 RRS)를 포함하며, 상기 수용체 세포에 포함된 표적화된 염색체는 하나 이상의 RRS(예를 들어, 제2 RRS)를 포함한다. 이때, 상기 공여체 세포에 포함된 표적화된 염색체의 RRS(예를 들어, 제1 RRS)와 상기 수용체 세포에 포함된 표적화된 염색체의 RRS(예를 들어, 제2 RRS)는 서로 페어링(pairing)하도록 설계되어야 한다.

[348] 다른 예를 들어, 상기 공여체 세포에 포함된 표적화된 염색체는 둘 이상의 RRS(예를 들어, 제1 RRS 및 제2 RRS)를 포함하며, 상기 수용체 세포에 포함된 표적화된 염색체는 둘 이상의 RRS(예를 들어, 제3 RRS 및 제4 RRS)를 포함하는 경우, 상기 공여체 세포에 포함된 표적화된 염색체의 하나의 RRS(예를 들어, 제1 RRS)와 상기 수용체 세포에 포함된 표적화된 염색체의 두 개의 RRS(예를 들어, 제3 RRS 및 제4 RRS) 중 하나는 서로 페어링(pairing)하도록 설계되어야 하고, 또한, 상기 공여체 세포에 포함된 표적화된 염색체의 나머지 하나의 RRS(예를 들어, 제2 RRS)와 상기 수용체 세포에 포함된 표적화된 염색체의 두 개의 RRS(예를 들어, 제3 RRS 및 제4 RRS) 중 나머지 하나는 서로 페어링(pairing)하도록 설계되어야 한다.

[349] 상기 관련성은 상기 공여체 세포에 포함된 표적화된 염색체에 존재하는 ASCE와 상기 수용체 세포에 포함된 표적화된 염색체에 존재하는 ASCE와의 상동성 결합일 수 있다.

[350]

[351] 상기 i) 단계에서 표적화 세포, 즉, 공여체 세포 및 수용체 세포를 생산할 수 있다.

[352] 상기 공여체 세포와 상기 수용체 세포는 각각 생산될 수 있으며, 이하에서 기술하는 방법으로 생산될 수 있다.

- [353] “표적화 세포(targeted cell)”는 원세포의 한 종류로, 하나 이상의 표적화된 염색체(targeted chromosome)를 포함하는 세포를 의미한다.
- [354] 상기 표적화 세포는 적어도 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [355] 상기 표적화 세포는 하나 이상의 자연 염색체를 포함할 수 있다.
- [356] 상기 표적화 염색체 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [357] 상기 자연 염색체 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [358] 상기 표적화 세포는 인간 세포(human cell) 유래일 수 있다. 상기 표적화 세포는 비인간 세포(non-human cell) 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 비인간 세포(non-human cell)는 마우스 세포(mouse cell), 래트 세포(rat cell), 설치류 세포(rodent cell), 양 세포(goral cell), 소 세포(cattle cell) 또는 유제류 세포(ungulate cell) 유래일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [359] 상기 표적화 세포는 체세포(somatic cell) 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 체세포(somatic cell)는 예를 들어, 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [360] 상기 표적화 세포는 면역세포(immune cell) 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 면역세포(immune cell)는 B-세포(B-cell), T-세포(T-cell), NK세포(NK cell), 대식세포, 호중구, 호염기구 또는 호산구 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [361] 상기 표적화 세포는 생식세포(germ cell) 유래일 수 있다. 예를 들어, 정자, 정모세포, 정원줄기세포, 난자, 난모세포, 난원줄기세포 또는 수정란 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [362] 상기 표적화 세포는 줄기세포(stem cell) 유래일 수 있다. 예를 들어, 상기 줄기세포(stem cell)는 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell), 성체줄기세포, 체대혈 줄기세포, 정원줄기세포 또는 난원줄기세포 유래일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [363] 상기 표적화 세포는 자연 염색체 및/또는 표적화된 염색체의 제조 목적 외의 인위적인 변형을 포함하는 염색체를 포함하는 세포로부터 제작될 수 있다.
- [364] 상기 자연 염색체 및/또는 표적화된 염색체의 제조 목적 외의 인위적인 변형을 포함하는 염색체를 포함하는 세포는 원세포의 한 종류이며, 상기 원세포 관련 설명은 인위적 상기 기술한 바와 같다. 상기 자연 염색체 및/또는 표적화된 염색체의 제조 목적 외의 인위적인 변형을 포함하는 염색체를 포함하는 세포는 이하 비표적 원세포로 기재하며, 상기 자연 염색체 및 표적화된 염색체의 제조 목적 외의 인위적인 변형을 포함하는 염색체는 이하 비표적 원염색체로 기재한다.
- [365] 상기 표적화 세포는 비표적 원세포로부터 제작될 수 있다.
- [366] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 제1 비표적 원세포로부터 제작될 수 있다. 상기 제1 표적화 세포는 제1 비표적 원세포에 포함된 단일 및/또는 2개 이상의 비표적 원염색체가 표적화된 염색체로 치환되는 것일 수 있다.

- [367] 예를 들어, 상기 제2 표적화 세포는 제2 비표적 원세포로부터 제작될 수 있다. 상기 제2 표적화 세포는 제2 비표적 세포에 포함된 단일 및/또는 2개 이상의 비표적 원염색체가 표적화된 염색체로 치환된 것일 수 있다.
- [368] 상기 표적화 세포는 비표적 원세포에 공여체 DNA(donor DNA)를 제공함으로써 제작될 수 있다.
- [369] 상기 공여체 DNA는 적어도 하나 이상의 RRS 및 적어도 하나 이상의 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함할 수 있다.
- [370] 예를 들어, 상기 공여체 DNA(Donor DNA)는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 어느 하나 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다.
- [371] 상기 공여체 DNA는 적어도 하나 이상의 ASCE 및 적어도 하나 이상의 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함할 수 있다.
- [372] 상기 DNA 공여체(Donor DNA)는 선발표지 유전자(selection marker gene)을 더 포함할 수 있다. 상기 DNA 공여체(Donor DNA)에 포함된 상기 선발표지 유전자(selection marker gene)는 하나 또는 그 이상일 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene)는 형광 단백질 유전자, 항생제 저항성 유전자, FISH 표적 서열(FISH target sequence), 또는 이들의 역위 유전자(inversion gene)일 수 있다. 상기 형광 단백질 유전자 및 이의 역위 유전자(inversion gene)는 공지의 서열일 수 있다. 예를 들어, 상기 형광 단백질 유전자는 GFP 유전자(GFP gene), YFP 유전자(YFP gene), RFP 유전자(RFP gene) 또는 mCherry 유전자(mCherry gene) 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 항생제 저항성 유전자 및 이의 역위 유전자(inversion gene)는 공지의 서열일 수 있다. 예를 들어, 상기 항생제 저항성 유전자는 하이그로마이신 저항성 유전자(hygromycin resistant gene), 네오마이신 저항성 유전자(neomycin resistant gene), 카나마이신 저항성 유전자(kanamycin resistant gene), 블라스티사이딘 저항성 유전자(blasticidin resistant gene), 제오신 저항성 유전자(zeocin resistant gene) 또는 퓨로 Δ TK 유전자(puro Δ TK gene) 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 FISH 표적 서열(FISH target sequence) 및 이의 역위 유전자(inversion gene)는 공지의 서열일 수 있다.
- [373] 상기 DNA 공여체(Donor DNA)는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 더 포함할 수 있다. 상기 트랜스포존(Transposon)은 피기백(PiggyBac)일 수 있다. 예를 들어, 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열은 상기 표 2에 개시한 PiggyBac right(3') ITR 서열 및/또는 PiggyBac left(5') ITR 서열일 수 있다. 상기 트랜스포존 ITR은 트랜스포존 terminal repeat(TR) 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열은 piggyBac terminal repeat(PB-TR)을 포함할 수 있다.
- [374] 예를 들어, 상기 DNA 공여체(Donor DNA)는 상기 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(homologous arm)에 인접한 위치에 트랜스포존 ITR(Transposon ITR)

서열을 추가로 더 포함할 수 있다.

[375] 예를 들어, 상기 DNA 공여체(Donor DNA)는 상기 RRS 또는 상기 ASCE에 인접한 위치에 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.

[376] 상기 공여체 DNA는 공지된 트랜스펙션 방법(Transfection method)을 이용하여 상기 비표적 원세포에 제공될 수 있다. 예를 들어, 상기 트랜스펙션 방법(Transfection method)은 바이러스성 트랜스펙션 방법(viral transfection method), 시약 트랜스펙션 방법(reagent transfection method), 물리적 트랜스펙션 방법(physical transfection method)이 이용될 수 있다. 상기 바이러스성 트랜스펙션 방법(viral transfection method)은, 예로, 렌티바이러스(lentivirus)를 이용한 것일 수 있다. 상기 시약 트랜스펙션 방법(reagent transfection method)은, 예를 들어, 인산 칼슘(calcium phosphate), 양이온 지질(cation lipid), DEAE-덱스트란(DEAE-dextran), 폴리에틸렌이민(Polyethylenimine; PEI)을 이용한 것일 수 있다. 상기 물리적 트랜스펙션 방법(physical transfection method)은, 예를 들어, 전기 천공법(electroporation)을 이용한 것일 수 있다. 또한, 상기 트랜스펙션(transfection)은 리포솜(Liposome)을 이용한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[377] 상기 DNA 공여체(Donor DNA)는 상기 비표적 원염색체의 표적 서열에 삽입될 수 있다.

[378] 상기 표적 서열은 RRS 또는 ASCE 삽입을 위하여 제공되는 상기 비표적 원염색체 상의 서열로, 유전자 좌위 및/또는 비유전자 서열일 수 있다. 상기 표적 서열은 *in silico* 고안을 통하여 결정될 수 있다.

[379] 일 예로, 상기 RRS 또는 상기 ASCE는 비표적 원염색체에 존재하는 목적유전자의 상류(upstream)에 삽입될 수 있다. 따라서, 상기 RRS 또는 상기 ASCE를 제공하는 DNA 공여체(Donor DNA)는 상기 목적유전자의 상류(upstream) 중 일 영역에 대한 상동성 암(homologous arm)을 포함할 수 있다.

[380] 일 예로, 상기 RRS 또는 상기 ASCE는 비표적 원염색체에 존재하는 목적유전자의 하류(downstream)에 삽입될 수 있다. 따라서, 상기 RRS 또는 상기 ASCE를 제공하는 DNA 공여체(Donor DNA)는 상기 목적유전자의 하류(downstream) 중 일 영역에 대한 상동성 암(homologous arm)을 포함할 수 있다.

[381] 상기 DNA 공여체(Donor DNA)는 상기 비표적 원염색체의 표적 서열에 상동성 재조합(Homologous Recombination)을 통해 삽입될 수 있다.

[382] 상기 표적 서열에 상동성 재조합(Homologous Recombination)을 일으키기 위하여, SSB(single strand breaking) 및/또는 DSB(double strand breaking)를 생성하는 단계가 포함될 수 있다. 상기 SSB 및/또는 DSB는 자연적으로 발생할 수 있다. 상기 SSB 및/또는 DSB는 클라스토젠(clastogen; 염색체이상유발물질)에 의해 발생할 수 있다. 상기 클라스토젠은 이온화 방사선, UV, X선, γ 선,

활성산소종, 특정 케미컬일 수 있다. 상기 특정 케미컬은, 예를 들어, 블레오마이신(bleomycin), 하이드록시요소(Hydroxyurea), 캄프토테신(Camptothecin), 4-NQO(4-nitroquinoline 1-oxide), 시스플라틴(Cisplatin), EMS 또는 MMS 등의 메틸화 시약(methylating agent) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 SSB 및/또는 DSB는 유전자 가위에 의해 발생할 수 있다. 예를 들어, 상기 SSB 및/또는 DSB는 ZFN(Zinc-finger nucleases), TALEN(Transcription activator-like effector nucleases) 및 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein) 중 어느 하나 이상에 의해 발생할 수 있다.

- [383] 상기 방법으로 생산된 표적화 세포는 적어도 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [384] 이때, 상기 표적화된 염색체는 공여체 DNA의 구성에 따라 다양하게 생성될 수 있다.
- [385] 일 예로, 상기 공여체 DNA가 단일 RRS를 포함하는 경우, 상기 표적화된 염색체는 상기 단일 RRS를 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [386] 다른 일 예로, 상기 공여체 DNA가 둘 이상의 RRS를 포함하는 경우, 상기 표적화된 염색체는 상기 둘 이상의 RRS를 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [387] 또 다른 일 예로, 상기 공여체 DNA가 단일 RRS 및 선발표지 유전자(selection marker gene)를 포함하는 경우, 상기 표적화된 염색체는 상기 단일 RRS 및 선발표지 유전자(selection marker gene)를 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [388] 다른 일 예로, 상기 공여체 DNA가 단일 RRS 및 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 포함하는 경우, 상기 표적화된 염색체는 상기 단일 RRS 및 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [389] 또 다른 일 예로, 상기 공여체 DNA가 단일 RRS, 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 포함하는 경우, 상기 표적화된 염색체는 상기 단일 RRS, 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [390] 다른 일 예로, 상기 공여체 DNA가 둘 이상의 RRS, 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 포함하는 경우, 상기 표적화된 염색체는 상기 둘 이상의 RRS, 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [391] 일 예로, 상기 공여체 DNA가 단일 ASCE를 포함하는 경우, 상기 표적화된 염색체는 상기 단일 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [392] 다른 일 예로, 상기 공여체 DNA가 둘 이상의 ASCE를 포함하는 경우, 상기 표적화된 염색체는 상기 둘 이상의 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [393] 또 다른 일 예로, 상기 공여체 DNA가 단일 ASCE 및 선발표지 유전자(selection

- marker gene)를 포함하는 경우, 상기 표적화된 염색체는 상기 단일 ASCE 및 선발표지 유전자(selection marker gene)를 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [394] 다른 일 예로, 상기 공여체 DNA가 단일 ASCE 및 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 포함하는 경우, 상기 표적화된 염색체는 상기 단일 ASCE 및 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [395] 또 다른 일 예로, 상기 공여체 DNA가 단일 ASCE, 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 포함하는 경우, 상기 표적화된 염색체는 상기 단일 ASCE, 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [396] 다른 일 예로, 상기 공여체 DNA가 둘 이상의 ASCE, 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 포함하는 경우, 상기 표적화된 염색체는 상기 둘 이상의 ASCE, 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [397]
- [398] i-1) 단일 RRS가 삽입된 염색체를 포함하는 세포(single RRS inserted chromosome included cell)
- [399] 본 명세서에 의해 개시되는 일 실시예에 의하면, 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포 및 이의 제조 방법이 제공될 수 있다. 상기 표적화된 염색체는 단일 RRS를 포함하는 것일 수 있다.
- [400] 상기 단일 RRS는 인공 재조합 염색체의 생성에 이용되는 RRS일 수 있다.
- [401] 상기 RRS 및 상기 표적화된 염색체 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [402] 상기 단일 RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포는 비표적 원세포에 RRS를 포함하는 공여체 DNA(donor DNA)를 제공함으로써 제작될 수 있다.
- [403] 상기 donor DNA는 단일 RRS 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 donor DNA일 수 있다.
- [404] 예를 들어, 상기 donor DNA는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 어느 하나 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 LoxP 변이체는 인공 재조합 염색체의 생성에 이용될 수 있다.
- [405] 이때, 상기 donor DNA는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [406] 이때, 상기 donor DNA는 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [407] 예를 들어, 상기 donor DNA는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 어느 하나, FRT, 트랜스포존 ITR, 항생제 저항성 유전자 및 비표적 원염색체에 대한 상동성

- 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 FRT 및 트랜스포존 ITR은 추가 RRS로 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [408] 상기 donor DNA는 공지된 트랜스펙션 방법(Transfection method)을 이용하여 상기 비표적 원세포에 제공될 수 있다. 상기 트랜스펙션 방법(Transfection method) 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [409] 상기 비표적 원세포에 제공된 donor DNA에 의하여 단일 RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포가 제조될 수 있다. 상기 비표적 원세포에 제공된 donor DNA는 비표적 원염색체의 표적 서열에 삽입되어 표적화된 염색체로 변경될 수 있다. 상기 표적화된 염색체를 포함하는 세포는 표적화 세포이다.
- [410]
- [411] 상기 표적화 세포의 제작을 위하여, 단일 RRS를 가지는 donor DNA가 비표적 원세포에 트랜스펙션(transfection)될 수 있다.
- [412] 상기 donor DNA는 단일 RRS 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함할 수 있다.
- [413] 상기 단일 RRS는 인공 재조합 염색체의 생성에 이용되는 RRS일 수 있다.
- [414] 이때, 상기 donor DNA는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [415] 이때, 상기 donor DNA는 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [416]
- [417] 일 구현예로서, 하나의 donor DNA를 이용하여 하나의 표적화된 염색체를 가지는 표적화 세포가 제작될 수 있다.
- [418] 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [419] 상기 donor DNA는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 하나 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다.
- [420] 이때, 상기 상동성 암은 상기 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [421] 상기 donor DNA는 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 donor DNA는 비표적 원세포에 포함된 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [422] 이때, 상기 donor DNA는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [423] 이때, 상기 donor DNA는 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는

- 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [424] 상기 표적화된 염색체는 상기 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체를 포함할 수 있다.
- [425] 이때, 상기 표적화된 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [426] 이때, 상기 표적화된 염색체는 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [427] 상기 공여체 세포에 대한 수용체 세포는 하나의 donor DNA를 이용하여 제작될 수 있다. 이때, 상기 donor DNA는 상기 공여체 세포 제작에 이용된 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체와 페어링할 수 있는 LoxP 변이체 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다.
- [428]
- [429] 다른 일 구현예로서, 2 이상의 donor DNA를 이용하여 2 이상의 표적화된 염색체를 가지는 표적화 세포가 제작될 수 있다.
- [430] 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [431] 상기 2 이상의 donor DNA는 제1 donor DNA 및 제2 donor DNA일 수 있다.
- [432] 상기 제1 donor DNA는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 하나 및 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [433] 상기 제2 donor DNA는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 하나 및 제2 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [434] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 비표적 원세포에 포함된 제1 비표적 원염색체 및 제2 비표적 염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 각각 가진 것일 수 있다.
- [435] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [436] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [437] 상기 2 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.
- [438] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 상기 제1 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체를 포함할 수 있다.

- [439] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 상기 제2 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체를 포함할 수 있다.
- [440] 이때, 상기 제1 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체는 상기 제2 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [441] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [442] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [443] 상기 공여체 세포에 대한 수용체 세포는 2 이상의 donor DNA(제3 donor DNA 및 제4 donor DNA)를 이용하여 제작될 수 있다. 이때, 상기 제3 donor DNA는 상기 공여체 세포 제작에 이용된 제1 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체와 페어링할 수 있는 LoxP 변이체 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 제4 donor DNA는 상기 공여체 세포 제작에 이용된 제2 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체와 페어링할 수 있는 LoxP 변이체 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다.
- [444]
- [445] 서로 다른 2 이상의 표적화 세포의 제작을 위하여, 제1 RRS를 가지는 제1 donor DNA가 제1 비표적 원세포에 트랜스펙션(transfection)될 수 있다. 또한 제 2 RRS를 가지는 제2 donor DNA가 제2 비표적 원세포에 트랜스펙션(transfection)될 수 있다.
- [446] 상기 단일 RRS는 인공 제조합 염색체의 생성에 이용되는 RRS일 수 있다.
- [447] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함할 수 있다.
- [448] 이때, 상기 제1 donor DNA는 제1 RRS 및 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다. 상기 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [449] 상기 제2 donor DNA는 제2 RRS 및 제2 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다. 상기 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [450] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [451] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 제조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.

[452]

[453] 일 구현예로서, 2 이상의 donor DNA를 이용하여 2 이상의 표적화 세포가 제작될 수 있다.

[454] 상기 2 이상의 donor DNA는 제1 donor DNA 및 제2 donor DNA일 수 있다.

[455] 상기 제1 donor DNA는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 하나 및 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.

[456] 상기 제2 donor DNA는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 하나 및 제2 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다. 이때, 상기 선택된 LoxP 변이체는 상기 제1 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체와 페어링(pairing)할 수 있다.

[457] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.

[458] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 제조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.

[459] 상기 제1 donor DNA는 제1 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 상기 제2 donor DNA는 제2 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 제1 donor DNA는 제1 비표적 원세포에 포함된 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다. 상기 제2 donor DNA는 제2 비표적 원세포에 포함된 제2 비표적 염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.

[460] 상기 2 이상의 표적화 세포는 제1 표적화 세포 및 제2 표적화 세포일 수 있다.

[461] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있고, 상기 제2 표적화 세포는 수용체 세포일 수 있다.

[462] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 상기 제1 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체를 포함하는 제1 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.

[463] 이때, 상기 제2 표적화 세포는 상기 제2 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체를 포함하는 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.

[464] 이때, 상기 제1 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체는 상기 제2 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체와 동일하거나 상이할 수 있다.

[465] 이때, 상기 제1 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체는 상기 제2 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체와 페어링(pairing)할 수 있다.

[466] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을

- 추가로 더 포함할 수 있다.
- [467] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [468]
- [469] i-2) 2개의 RRS가 삽입된 염색체를 포함하는 세포(double RRS inserted chromosome included cell)
- [470] 본 명세서에 의해 개시되는 다른 일 실시예에 의하면, 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포 및 이의 제조 방법이 제공될 수 있다. 상기 표적화된 염색체는 2개 이상의 RRS를 포함하는 것일 수 있다.
- [471] 상기 2개 이상의 RRS는 인공 재조합 염색체의 생성에 이용되는 RRS일 수 있다.
- [472] 상기 RRS 및 상기 표적화된 염색체 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [473] 상기 2개 이상의 RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포는 비표적 원세포에 RRS를 포함하는 donor DNA를 제공함으로써 제작될 수 있다.
- [474] 상기 donor DNA는 공지된 트랜스펙션 방법(Transfection method)을 이용하여 상기 원세포에 제공될 수 있다. 상기 트랜스펙션 방법(Transfection method) 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [475] 상기 비표적 원세포에 제공된 donor DNA에 의하여 2개 이상의 RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포가 제조될 수 있다. 상기 비표적 원세포에 제공된 donor DNA는 비표적 원염색체의 표적 서열에 삽입되어 표적화된 염색체로 변경될 수 있다. 상기 표적화된 염색체를 포함하는 세포는 표적화 세포이다.
- [476]
- [477] 상기 표적화 세포의 제작을 위하여, 2개 이상의 RRS를 가지는 donor DNA가 비표적 원세포에 트랜스펙션(transfection)될 수 있다.
- [478] 상기 2개 이상의 RRS는 인공 재조합 염색체의 생성에 이용되는 RRS일 수 있다.
- [479] 상기 donor DNA는 2개 이상의 RRS 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함할 수 있다.
- [480] 이때, 상기 donor DNA는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [481] 이때, 상기 donor DNA는 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [482]
- [483] 일 구현예로서, 하나의 donor DNA를 이용하여 하나의 표적화된 염색체를 가지는 표적화 세포가 제작될 수 있다.

- [484] 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [485] 상기 donor DNA는 2개 이상의 RRS를 포함할 수 있다.
- [486] 상기 2개 이상의 RRS는 제1 RRS 및 제2 RRS일 수 있다.
- [487] 이때, 상기 제1 RRS는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 것일 수 있다.
- [488] 이때, 상기 제2 RRS는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 것일 수 있다.
- [489] 이때, 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [490] 상기 donor DNA는 비표적 원염색체에 대한 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열을 포함할 수 있다.
- [491] 상기 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)은 제1 상동성 암 및 제2 상동성 암일 수 있다.
- [492] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [493] 이때, 상기 제2 상동성 암은 상기 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [494] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 제2 상동성 암과 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [495] 상기 donor DNA는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [496] 상기 donor DNA는 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [497] 상기 donor DNA는 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 donor DNA는 비표적 원세포에 포함된 비표적 원염색체에 대한 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [498] 상기 표적화된 염색체는 상기 donor DNA에 포함된 제1 RRS 및 제2 RRS를 포함할 수 있다.
- [499] 이때, 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [500] 상기 표적화된 염색체는 2개 이상의 LoxP 변이체를 포함할 수 있다.
- [501] 이때, 상기 표적화된 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [502] 이때, 상기 표적화된 염색체는 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [503] 상기 공여체 세포에 대한 수용체 세포는 하나 이상의 donor DNA를 이용하여 제작될 수 있다. 이때, 상기 donor DNA는 상기 공여체 세포 제작에 이용된 donor DNA에 포함된 제1 RRS와 페어링할 수 있는 제3 RRS 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 또한, 상기 donor DNA는 상기 공여체 세포 제작에 이용된 donor DNA에 포함된 제2 RRS와 페어링할 수 있는 제4 RRS 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다.

- [504]
- [505] 다른 일 구현예로서, 2 이상의 donor DNA를 이용하여 하나의 표적화된 염색체를 가지는 표적화 세포가 제작될 수 있다.
- [506] 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [507] 상기 2 이상의 donor DNA는 제1 donor DNA 및 제2 donor DNA일 수 있다.
- [508] 상기 제1 donor DNA는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 하나 및 비표적 원염색체에 대한 제1 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다.
- [509] 상기 제2 donor DNA는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 하나 및 비표적 원염색체에 대한 제2 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다.
- [510] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [511] 이때, 상기 제2 상동성 암은 상기 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [512] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 제2 상동성 암과 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [513] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [514] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [515] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 비표적 원세포에 포함된 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 각각 가진 것일 수 있다.
- [516] 상기 표적화된 염색체는 2개 이상의 LoxP 변이체를 포함할 수 있다.
- [517] 이때, 상기 2개 이상의 LoxP 변이체 중 하나는 상기 제1 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체일 수 있다. 상기 2개 이상의 LoxP 변이체 중 다른 하나는 상기 제2 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체일 수 있다.
- [518] 이때, 상기 제1 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체는 상기 제2 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [519] 상기 표적화된 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [520] 이때, 상기 표적화된 염색체는 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [521] 상기 공여체 세포에 대한 수용체 세포는 2 이상의 donor DNA(제3 donor DNA 및 제4 donor DNA)를 이용하여 제작될 수 있다. 이때, 상기 제3 donor DNA는

상기 공여체 세포 제작에 이용된 제1 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체와 페어링할 수 있는 LoxP 변이체 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 제4 donor DNA는 상기 공여체 세포 제작에 이용된 제2 donor DNA에 포함된 LoxP 변이체와 페어링할 수 있는 LoxP 변이체 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다.

[522]

[523] 또 다른 일 구현예로서, 2 이상의 donor DNA를 이용하여 2 이상의 표적화된 염색체를 가지는 표적화 세포가 제작될 수 있다.

[524] 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.

[525] 상기 2 이상의 donor DNA는 제1 donor DNA 및 제2 donor DNA일 수 있다.

[526] 상기 제1 donor DNA는 2개 이상의 RRS를 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 RRS는 제1 RRS 및 제2 RRS일 수 있다.

[527] 상기 제2 donor DNA는 2개 이상의 RRS를 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 RRS는 제3 RRS 및 제4 RRS일 수 있다.

[528] 이때, 상기 제1 RRS는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 것일 수 있다.

[529] 이때, 상기 제2 RRS는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 것일 수 있다.

[530] 이때, 상기 제3 RRS는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 것일 수 있다.

[531] 이때, 상기 제4 RRS는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 것일 수 있다.

[532] 이때, 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제3 RRS, 및 제4 RRS는 모두 동일하거나 모두 상이할 수 있다. 또는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제3 RRS, 및 제4 RRS는 일부 동일하거나 일부 상이할 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 RRS와 상기 제3 RRS는 동일하고, 상기 제2 RRS 및 제4 RRS는 상기 제1 RRS와 상이할 수 있다. 또는 상기 제1 RRS와 상기 제4 RRS는 동일하고, 상기 제2 RRS와 제3 RRS는 동일할 수 있다. 또는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제3 RRS, 및 제4 RRS는 모두 상이할 수 있다. 또는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제3 RRS, 및 제4 RRS는 모두 동일할 수 있다.

[533] 상기 제1 donor DNA는 제1 비표적 원염색체에 대한 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)은 제1 상동성 암 및 제2 상동성 암일 수 있다.

[534] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.

[535] 이때, 상기 제2 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.

[536] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 제2 상동성 암과 상이한 서열을 가질 수 있다.

[537] 상기 제2 donor DNA는 제2 비표적 원염색체에 대한 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)은 제3 상동성 암 및 제4 상동성 암일 수 있다.

- [538] 이때, 상기 제3 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [539] 이때, 상기 제4 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [540] 이때, 상기 제3 상동성 암은 상기 제4 상동성 암과 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [541] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [542] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 제조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [543] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 제1 donor DNA는 상기 비표적 원세포에 포함된 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다. 상기 제2 donor DNA는 상기 비표적 원세포에 포함된 제2 비표적 염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [544] 상기 2 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.
- [545] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [546] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 상기 제3 RRS 및 상기 제4 RRS를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제3 RRS 및 상기 제4 RRS는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [547] 상기 제1 표적화된 염색체는 2개 이상의 LoxP 변이체를 포함할 수 있다.
- [548] 상기 제2 표적화된 염색체는 2개 이상의 LoxP 변이체를 포함할 수 있다.
- [549] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [550] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [551] 상기 공여체 세포에 대한 수용체 세포는 2 이상의 donor DNA(제3 donor DNA 및 제4 donor DNA)를 이용하여 제작될 수 있다. 이때, 상기 제3 donor DNA는 상기 공여체 세포 제작에 이용된 제1 donor DNA에 포함된 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS와 각각 페어링할 수 있는 제5 RRS, 제6 RRS 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 제4 donor DNA는 상기 공여체 세포 제작에 이용된 제2 donor DNA에 포함된 상기 제3 RRS 및 상기 제4 RRS와 각각 페어링할 수 있는 제7 RRS, 제8 RRS 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다.

[552]

[553] 서로 다른 2 이상의 표적화 세포의 제작을 위하여, 2 이상의 RRS를 가지는 제1 donor DNA가 제1 비표적 원세포에 트랜스펙션(transfection)될 수 있다. 또한 2 이상의 RRS를 가지는 제2 donor DNA가 제2 비표적 원세포에 트랜스펙션(transfection)될 수 있다.

[554] 상기 2개 이상의 RRS는 인공 재조합 염색체의 생성에 이용되는 RRS일 수 있다.

[555] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함할 수 있다.

[556] 상기 제1 donor DNA는 제1 RRS, 제2 RRS 및 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.

[557] 상기 제2 donor DNA는 제3 RRS, 제4 RRS 및 제2 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.

[558] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.

[559] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.

[560]

[561] 일 구현예로서, 2 이상의 donor DNA를 이용하여 2 이상의 표적화 세포가 제작될 수 있다.

[562] 상기 2 이상의 donor DNA는 제1 donor DNA 및 제2 donor DNA일 수 있다.

[563] 상기 제1 donor DNA는 2개 이상의 RRS를 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 RRS는 제1 RRS 및 제2 RRS일 수 있다.

[564] 상기 제2 donor DNA는 2개 이상의 RRS를 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 RRS는 제3 RRS 및 제4 RRS일 수 있다.

[565] 이때, 상기 제1 RRS는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 것일 수 있다.

[566] 이때, 상기 제2 RRS는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 것일 수 있다.

[567] 이때, 상기 제3 RRS는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 것일 수 있다.

[568] 이때, 상기 제4 RRS는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 것일 수 있다.

[569] 이때, 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제3 RRS, 및 제4 RRS는 모두 동일하거나 모두 상이할 수 있다. 또는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제3 RRS, 및 제4 RRS는 일부 동일하거나 일부 상이할 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 RRS와 상기 제4 RRS는 동일하고, 상기 제2 RRS 및 제3 RRS는 상기 제1 RRS와 상이할 수 있다. 또는 상기 제2 RRS와 상기 제4 RRS는 동일하고, 상기 제1 RRS와 제3 RRS는 동일할 수 있다. 또는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제3

RRS, 및 제4 RRS는 모두 상이할 수 있다. 또는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제3 RRS, 및 제4 RRS는 모두 동일할 수 있다.

- [570] 상기 제1 donor DNA는 제1 비표적 원염색체에 대한 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)은 제1 상동성 암 및 제2 상동성 암일 수 있다.
- [571] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [572] 이때, 상기 제2 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [573] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 제2 상동성 암과 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [574] 상기 제2 donor DNA는 제2 비표적 원염색체에 대한 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)은 제3 상동성 암 및 제4 상동성 암일 수 있다.
- [575] 이때, 상기 제3 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [576] 이때, 상기 제4 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [577] 이때, 상기 제3 상동성 암은 상기 제4 상동성 암과 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [578] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [579] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [580] 상기 제1 donor DNA는 제1 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 상기 제2 donor DNA는 제2 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 제1 donor DNA는 상기 제1 비표적 원세포에 포함된 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다. 상기 제2 donor DNA는 상기 제2 비표적 원세포에 포함된 제2 비표적 염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [581] 상기 2 이상의 표적화 세포는 제1 표적화 세포 및 제2 표적화 세포일 수 있다.
- [582] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있고, 상기 제2 표적화 세포는 수용체 세포일 수 있다.
- [583] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS를 포함하는 제1 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [584] 이때, 상기 제2 표적화 세포는 상기 제3 RRS 및 상기 제4 RRS를 포함하는 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 상기 제3 RRS는 상기 제1 RRS 및 상기 제2

RRS 중 하나와 페어링(pairing)할 수 있고, 상기 제4 RRS는 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS 중 나머지 하나와 페어링(pairing)할 수 있다.

- [585] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [586] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [587]
- [588] i-3) 단일 ASCE가 삽입된 염색체를 포함하는 세포(single ASCE inserted chromosome included cell)
- [589] 본 명세서에 의해 개시되는 일 실시예에 의하면, 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포 및 이의 제조 방법이 제공될 수 있다. 상기 표적화된 염색체는 단일 ASCE를 포함하는 것일 수 있다.
- [590] 상기 ASCE 및 상기 표적화된 염색체 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [591] 상기 단일 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포는 비표적 원세포에 ASCE를 포함하는 donor DNA를 제공함으로써 제작될 수 있다.
- [592] 상기 donor DNA는 공지된 트랜스펙션 방법(Transfection method)을 이용하여 상기 원세포에 제공될 수 있다. 상기 트랜스펙션 방법(Transfection method) 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [593] 상기 비표적 원세포에 제공된 donor DNA에 의하여 단일 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포가 제조될 수 있다. 상기 비표적 원세포에 제공된 donor DNA는 비표적 원염색체의 표적 서열에 삽입되어 표적화된 염색체로 변경될 수 있다. 상기 표적화된 염색체를 포함하는 세포는 표적화 세포이다.
- [594]
- [595] 상기 표적화 세포의 제작을 위하여, 단일 ASCE를 가지는 donor DNA가 비표적 원세포에 트랜스펙션(transfection)될 수 있다.
- [596] 상기 donor DNA는 단일 ASCE 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함할 수 있다.
- [597] 상기 단일 ASCE는 인공 재조합 염색체의 생성에 이용되는 ASCE일 수 있다.
- [598] 이때, 상기 donor DNA는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [599] 이때, 상기 donor DNA는 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [600]
- [601] 일 구현예로서, 하나의 donor DNA를 이용하여 하나의 표적화된 염색체를

가지는 표적화 세포가 제작될 수 있다.

- [602] 상기 donor DNA는 단일 ASCE 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다.
- [603] 상기 donor DNA는 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 donor DNA는 비표적 원세포에 포함된 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [604] 이때, 상기 donor DNA는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [605] 이때, 상기 donor DNA는 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [606] 상기 표적화된 염색체는 상기 donor DNA에 포함된 단일 ASCE를 포함할 수 있다.
- [607] 이때, 상기 표적화된 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [608] 이때, 상기 표적화된 염색체는 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [609]
- [610] 다른 일 구현예로서, 2 이상의 donor DNA를 이용하여 2 이상의 표적화된 염색체를 가지는 표적화 세포가 제작될 수 있다.
- [611] 상기 2 이상의 donor DNA는 제1 donor DNA 및 제2 donor DNA일 수 있다.
- [612] 상기 제1 donor DNA는 제1 ASCE 및 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [613] 상기 제2 donor DNA는 제2 ASCE 및 제2 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [614] 이때, 상기 제1 ASCE는 상기 제2 ASCE와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [615] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [616] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [617] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 비표적 원세포에 포함된 제1 비표적 원염색체 및 제2 비표적 염색체에 대한 상동성

- 암(Homologous Arm)을 각각 가진 것일 수 있다.
- [618] 상기 2 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.
- [619] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 상기 제1 ASCE를 포함할 수 있다.
- [620] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 상기 제2 ASCE를 포함할 수 있다.
- [621] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [622] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [623]
- [624] 서로 다른 2 이상의 표적화 세포의 제작을 위하여, 제1 ASCE를 가지는 제1 donor DNA가 제1 비표적 원세포에 트랜스펙션(transfection)될 수 있다. 또한 제 2 ASCE를 가지는 제2 donor DNA가 제2 비표적 원세포에 트랜스펙션(transfection)될 수 있다.
- [625] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함할 수 있다.
- [626] 상기 제1 donor DNA는 제1 ASCE 및 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [627] 상기 제2 donor DNA는 제2 ASCE 및 제2 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [628] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [629] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [630]
- [631] 일 구현예로서, 2 이상의 donor DNA를 이용하여 2 이상의 표적화 세포가 제작될 수 있다.
- [632] 상기 2 이상의 donor DNA는 제1 donor DNA 및 제2 donor DNA일 수 있다.
- [633] 상기 제1 donor DNA는 제1 ASCE 및 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [634] 상기 제2 donor DNA는 제2 ASCE 및 제2 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다. 이때, 상기 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.

- [635] 이때, 상기 제1 ASCE는 상기 제2 ASCE와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [636] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [637] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [638] 상기 제1 donor DNA는 제1 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 상기 제2 donor DNA는 제2 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 제1 donor DNA는 제1 비표적 원세포에 포함된 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다. 상기 제2 donor DNA는 제2 비표적 원세포에 포함된 제2 비표적 염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [639] 상기 2 이상의 표적화 세포는 제1 표적화 세포 및 제2 표적화 세포일 수 있다.
- [640] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 상기 제1 ASCE를 포함하는 제1 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [641] 이때, 상기 제2 표적화 세포는 상기 제2 ASCE를 포함하는 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [642] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [643] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [644]
- [645] i-4) 2개의 ASCE가 삽입된 염색체를 포함하는 세포(double ASCE inserted chromosome included cell)
- [646] 본 명세서에 의해 개시되는 다른 일 실시예에 의하면, 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포 및 이의 제조 방법이 제공될 수 있다. 상기 표적화된 염색체는 2개 이상의 ASCE를 포함하는 것일 수 있다.
- [647] 상기 2개 이상의 ASCE는 인공 재조합 염색체의 생성에 이용되는 ASCE일 수 있다.
- [648] 상기 ASCE 및 상기 표적화된 염색체 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [649] 상기 2개 이상의 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포는 비표적 원세포에 ASCE를 포함하는 donor DNA를 제공함으로써 제작될 수 있다.
- [650] 상기 donor DNA는 공지된 트랜스펙션 방법(Transfection method)을 이용하여 상기 원세포에 제공될 수 있다. 상기 트랜스펙션 방법(Transfection method) 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.

- [651] 상기 비표적 원세포에 제공된 donor DNA에 의하여 2개 이상의 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포가 제조될 수 있다. 상기 비표적 원세포에 제공된 donor DNA는 비표적 원염색체의 표적 서열에 삽입되어 표적화된 염색체로 변경될 수 있다. 상기 표적화된 염색체를 포함하는 세포는 표적화 세포이다.
- [652]
- [653] 상기 표적화 세포의 제작을 위하여, 2개 이상의 ASCE를 가지는 donor DNA가 비표적 원세포에 트랜스펙션(transfection)될 수 있다.
- [654] 상기 donor DNA는 2개 이상의 ASCE 및 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함할 수 있다.
- [655] 상기 2개 이상의 ASCE는 인공 재조합 염색체의 생성에 이용되는 ASCE일 수 있다.
- [656] 이때, 상기 donor DNA는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [657] 이때, 상기 donor DNA는 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [658]
- [659] 일 구현예로서, 하나의 donor DNA를 이용하여 하나의 표적화된 염색체를 가지는 표적화 세포가 제작될 수 있다.
- [660] 상기 donor DNA는 2개 이상의 ASCE를 포함할 수 있다.
- [661] 상기 2개 이상의 ASCE는 제1 ASCE 및 제2 ASCE일 수 있다.
- [662] 이때, 상기 제1 ASCE 및 상기 제2 ASCE는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [663] 상기 donor DNA는 비표적 원염색체에 대한 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열을 포함할 수 있다.
- [664] 상기 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)은 제1 상동성 암 및 제2 상동성 암일 수 있다.
- [665] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [666] 이때, 상기 제2 상동성 암은 상기 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [667] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 제2 상동성 암과 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [668] 상기 donor DNA는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [669] 이때, 상기 donor DNA는 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는

- 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [670] 상기 donor DNA는 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 donor DNA는 비표적 원세포에 포함된 비표적 원염색체에 대한 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [671] 상기 표적화된 염색체는 상기 donor DNA에 포함된 제1 ASCE 및 제2 ASCE를 포함할 수 있다.
- [672] 이때, 상기 제1 ASCE 및 상기 제2 ASCE는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [673] 상기 표적화된 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [674] 상기 표적화된 염색체는 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [675]
- [676] 다른 일 구현예로서, 2 이상의 donor DNA를 이용하여 하나의 표적화된 염색체를 가지는 표적화 세포가 제작될 수 있다.
- [677] 상기 2 이상의 donor DNA는 제1 donor DNA 및 제2 donor DNA일 수 있다.
- [678] 상기 제1 donor DNA는 제1 ASCE 및 비표적 원염색체에 대한 제1 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다.
- [679] 상기 제2 donor DNA는 제2 ASCE 및 비표적 원염색체에 대한 제2 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열일 수 있다.
- [680] 이때, 상기 제1 ASCE 및 상기 제2 ASCE는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [681] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [682] 이때, 상기 제2 상동성 암은 상기 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [683] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 제2 상동성 암과 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [684] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [685] 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [686] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 비표적 원세포에 포함된 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 각각 가진 것일 수 있다.
- [687] 상기 표적화된 염색체는 2개 이상의 ASCE를 포함할 수 있다.
- [688] 이때, 상기 2개 이상의 ASCE 중 하나는 상기 제1 donor DNA에 포함된 제1 ASCE일 수 있다. 상기 2개 이상의 ASCE 중 다른 하나는 상기 제2 donor DNA에

포함된 제2 ASCE일 수 있다.

- [689] 상기 표적화된 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [690] 상기 표적화된 염색체는 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [691]
- [692] 또 다른 일 구현예로서, 2 이상의 donor DNA를 이용하여 2 이상의 표적화된 염색체를 가지는 표적화 세포가 제작될 수 있다.
- [693] 상기 2 이상의 donor DNA는 제1 donor DNA 및 제2 donor DNA일 수 있다.
- [694] 상기 제1 donor DNA는 2개 이상의 ASCE를 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 ASCE는 제1 ASCE 및 제2 ASCE일 수 있다.
- [695] 상기 제2 donor DNA는 2개 이상의 ASCE를 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 ASCE는 제3 ASCE 및 제4 ASCE일 수 있다.
- [696] 이때, 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제3 ASCE, 및 제4 ASCE는 모두 동일하거나 모두 상이할 수 있다. 또는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제3 ASCE, 및 제4 ASCE는 일부 동일하거나 일부 상이할 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 ASCE와 상기 제3 ASCE는 동일하고, 상기 제2 ASCE 및 제4 ASCE는 상기 제1 ASCE와 상이할 수 있다. 또는 상기 제1 ASCE와 상기 제4 ASCE는 동일하고, 상기 제2 ASCE와 제3 ASCE는 동일할 수 있다. 또는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제3 ASCE, 및 제4 ASCE는 모두 상이할 수 있다. 또는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제3 ASCE, 및 제4 ASCE는 모두 동일할 수 있다.
- [697] 상기 제1 donor DNA는 제1 비표적 원염색체에 대한 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)은 제1 상동성 암 및 제2 상동성 암일 수 있다.
- [698] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [699] 이때, 상기 제2 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [700] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 제2 상동성 암과 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [701] 상기 제2 donor DNA는 제2 비표적 원염색체에 대한 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)은 제3 상동성 암 및 제4 상동성 암일 수 있다.
- [702] 이때, 상기 제3 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [703] 이때, 상기 제4 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [704] 이때, 상기 제3 상동성 암은 상기 제4 상동성 암과 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [705] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할

- 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [706] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [707] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 제1 donor DNA는 상기 비표적 원세포에 포함된 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다. 상기 제2 donor DNA는 상기 비표적 원세포에 포함된 제2 비표적 염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [708] 상기 2 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.
- [709] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 상기 제1 ASCE 및 상기 제2 ASCE를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 ASCE 및 상기 제2 ASCE는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [710] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 상기 제3 ASCE 및 상기 제4 ASCE를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제3 ASCE 및 상기 제4 ASCE는 동일하거나 상이할 수 있다.
- [711] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [712] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [713]
- [714] 서로 다른 2 이상의 표적화 세포의 제작을 위하여, 2 이상의 ASCE를 가지는 제1 donor DNA가 제1 비표적 원세포에 트랜스펙션(transfection)될 수 있다. 또한 2 이상의 ASCE를 가지는 제2 donor DNA가 제2 비표적 원세포에 트랜스펙션(transfection)될 수 있다.
- [715] 상기 2개 이상의 ASCE는 인공 재조합 염색체의 생성에 이용되는 ASCE일 수 있다.
- [716] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 포함할 수 있다.
- [717] 상기 제1 donor DNA는 제1 ASCE, 제2 ASCE 및 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [718] 상기 제2 donor DNA는 제3 ASCE, 제4 ASCE 및 제2 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [719] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.

- [720] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 재조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [721]
- [722] 일 구현예로서, 2 이상의 donor DNA를 이용하여 2 이상의 표적화 세포가 제작될 수 있다.
- [723] 상기 2 이상의 donor DNA는 제1 donor DNA 및 제2 donor DNA일 수 있다.
- [724] 상기 제1 donor DNA는 2개 이상의 ASCE를 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 ASCE는 제1 ASCE 및 제2 ASCE일 수 있다.
- [725] 상기 제2 donor DNA는 2개 이상의 ASCE를 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 ASCE는 제3 ASCE 및 제4 ASCE일 수 있다.
- [726] 이때, 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제3 ASCE, 및 제4 ASCE는 모두 동일하거나 모두 상이할 수 있다. 또는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제3 ASCE, 및 제4 ASCE는 일부 동일하거나 일부 상이할 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 ASCE와 상기 제4 ASCE는 동일하고, 상기 제2 ASCE 및 제3 ASCE는 상기 제1 ASCE와 상이할 수 있다. 또는 상기 제2 ASCE와 상기 제4 ASCE는 동일하고, 상기 제1 ASCE와 제3 ASCE는 동일할 수 있다. 또는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제3 ASCE, 및 제4 ASCE는 모두 상이할 수 있다. 또는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제3 ASCE, 및 제4 ASCE는 모두 동일할 수 있다.
- [727] 상기 제1 donor DNA는 제1 비표적 원염색체에 대한 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)은 제1 상동성 암 및 제2 상동성 암일 수 있다.
- [728] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [729] 이때, 상기 제2 상동성 암은 상기 제1 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [730] 이때, 상기 제1 상동성 암은 상기 제2 상동성 암과 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [731] 상기 제2 donor DNA는 제2 비표적 원염색체에 대한 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)을 포함하는 서열을 포함할 수 있다. 이때, 상기 2개 이상의 상동성 암(Homologous Arm)은 제3 상동성 암 및 제4 상동성 암일 수 있다.
- [732] 이때, 상기 제3 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [733] 이때, 상기 제4 상동성 암은 상기 제2 비표적 원염색체의 일부 서열과 상동성인 서열일 수 있다.
- [734] 이때, 상기 제3 상동성 암은 상기 제4 상동성 암과 상이한 서열을 가질 수 있다.
- [735] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 및 상기 트랜스포존

ITR(Transposon ITR) 서열 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.

- [736] 상기 제1 donor DNA 및 상기 제2 donor DNA는 각각 추가 RRS를 더 포함할 수 있다. 이때, 추가 RRS는 인공 제조합 염색체 생성에 이용되지 않는 RRS일 수 있다.
- [737] 상기 제1 donor DNA는 제1 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 상기 제2 donor DNA는 제2 비표적 원세포에 처리될 수 있다. 이때, 상기 제1 donor DNA는 상기 제1 비표적 원세포에 포함된 제1 비표적 원염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다. 상기 제2 donor DNA는 상기 제2 비표적 원세포에 포함된 제2 비표적 염색체에 대한 상동성 암(Homologous Arm)을 가진 것일 수 있다.
- [738] 상기 2 이상의 표적화 세포는 제1 표적화 세포 및 제2 표적화 세포일 수 있다.
- [739] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 상기 제1 ASCE 및 상기 제2 ASCE를 포함하는 제1 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [740] 이때, 상기 제2 표적화 세포는 상기 제3 ASCE 및 상기 제4 ASCE를 포함하는 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [741] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [742] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 추가 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [743]
- [744] 상기 표적화 세포의 생산을 위한 일 예로,
- [745] 수용체 세포의 생산을 위해,
- [746] Embryonic stem cell (ESC)을 표적화 ESC로 생산하기 위해 제1 DNA donor 및 제2 DNA donor가 사용될 수 있다.
- [747] 상기 제1 DNA donor는 상기 ESC의 게놈 중 Ig light chain(IgL) locus의 Variable region(전체 V segments 및 J segments) 5' 말단을 타게팅하기 위해 사용될 제1 상동성 암, piggyBac terminal repeat(PB-TR), 프로모터, loxm2/66(제1 RRS), 제1 항생제 저항성 유전자 및 상기 ESC의 게놈 중 IgL locus의 Variable region 5' 말단 타게팅하기 위해 사용될 제2 상동성 암을 포함할 수 있다.
- [748] 상기 제2 DNA donor는 상기 ESC의 게놈 중 IgL locus의 Variable region(전체 V segments 및 J segments) 3' 말단을 타게팅하기 위해 사용될 제3 상동성 암, 프로모터, 제2 항생제 저항성 유전자(zeocin resistant gene), lox71(제2 RRS) 및 ESC의 게놈 중 IgL locus의 Variable region 3' 말단 타게팅하기 위해 사용될 제4 상동성 암을 포함할 수 있다.
- [749] 상기 제1 DNA donor가 상기 ESC의 게놈 내에 삽입된 세포는 제1 항생제를 통해 선별할 수 있다.
- [750] 상기 제2 DNA donor가 상기 ESC의 게놈 내에 삽입된 세포는 제2 항생제를

통해 선별할 수 있다.

- [751] 이때, 상기 제1 DNA donor 및 제2 DNA donor는 상기 ESC에 순차적으로, 무작위적으로 또는 동시에 도입될 수 있다.
- [752] 이때, 상기 제1 DNA donor 및 제2 DNA donor가 모두 게놈 내에 삽입된 세포는 제1 항생제 및 제2 항생제로 선별할 수 있다. 이로 인해 생선된 세포, 즉, 상기 제1 항생제 및 상기 제2 항생제에 의해 선별된 세포는 표적화 ESC일 수 있다.
- [753] 또한, 공여체 세포의 생산을 위해,
- [754] Fibroblast를 표적화 fibroblast로 생산하기 위해 제3 DNA donor 및 제4 DNA donor가 사용된다.
- [755] 상기 제3 DNA donor는 상기 fibroblast의 게놈 중 Ig light chain(IgL) locus의 Variable region(전체 V segments 및 J segments) 5' 말단을 타게팅하기 위해 사용될 제1 상동성 압, 프로모터, 형광 단백질을 암호화하는 유전자, lox66(제3 RRS) 및 상기 fibroblast의 게놈 중 IgL locus의 Variable region 5' 말단 타게팅하기 위해 사용될 제2 상동성 압을 포함 할 수 있다.
- [756] 상기 제4 vector는 상기 fibroblast의 게놈 중 Ig light chain(IgL) locus의 Variable region(전체 V segments 및 J segments) 3' 말단을 타게팅하기 위해 사용될 제3 상동성 압, 프로모터, 항생제 저항성 유전자, loxm2/71(제4 RRS) 및 상기 fibroblast의 게놈 중 Ig light chain(IgL) locus의 Variable region 3' 말단 타게팅하기 위해 사용될 제4 상동성 압을 포함할 수 있다.
- [757] 상기 제3 DNA donor가 상기 fibroblast의 게놈 내에 삽입된 세포는 형광 단백질을 통해 선별할 수 있다.
- [758] 상기 제4 DNA donor가 상기 fibroblast의 게놈 내에 삽입된 세포는 항생제를 통해 선별할 수 있다.
- [759] 이때, 상기 제3 DNA donor 및 제4 DNA donor는 상기 fibroblast에 순차적으로, 무작위적으로 또는 동시에 도입될 수 있다.
- [760] 이때, 상기 제3 DNA donor 및 제4 DNA donor가 모두 게놈 내에 삽입된 세포는 형광 단백질 및 항생제로 선별할 수 있다. 이로 인해 생선된 세포, 즉, 상기 형광 단백질 및 상기 항생제에 의해 선별된 세포는 표적화 fibroblast일 수 있다.
- [761] 생산된 상기 공여체 세포의 Ig light chain(IgL) locus를 포함하는 염색체는 제1 RRS 및 제2 RRS를 포함할 수 있다. 또한, 생산된 상기 수용체 세포의 Ig light chain(IgL) locus를 포함하는 염색체는 제3 RRS 및 제4 RRS를 포함할 수 있다.
- [762] 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제3 RRS 및 상기 제4 RRS 중 하나와 페어링(pairing)할 수 있고, 상기 제2 RRS는 상기 제3 RRS 및 상기 제4 RRS 중 나머지 하나와 페어링(pairing)할 수 있다.
- [763]
- [764] 상기에 기재한 예는 단순 예시일 뿐, 각각의 구성 요소(비표적 세포, DNA donor, 표적화된 염색체, 표적화 세포(공여체 세포 및 수용체 세포) 등)는 목적에 맞게 다양하게 변형 또는 변경할 수 있다.

[765]

[766] **ii) 마이크로세포(microcell) 생산**

[767] “마이크로세포(microcell)”는 하나의 세포가 인위적 조작, 특정 시약 또는 특정 조건에 노출되는 것에 의하여 두 개 이상으로 분리된 부분들 중 어느 하나를 의미한다. 또한, 상기 마이크로세포는 하나 이상의 염색체 또는 염색체 절편(fragment)를 포함하지만, 체세포분열 또는 감수분열 하지 못하는 세포 유사체를 의미한다. 일 예로, 상기 마이크로세포는 하나의 동물세포가 두 개 이상의 세포 또는 세포 유사체로 분리된 것일 수 있다. 다른 일 예로, 상기 마이크로세포는 하나의 동물세포가 염색체의 개수, 즉, $2n$ 개 이상으로 분리된 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 동물세포가 인간 섬유아 세포인 경우, 상기 마이크로세포는 인간 섬유아 세포가 염색체의 개수, 즉, $2n$ 개(46개) 이상으로 분리된 것일 수 있다. 이 경우, 상기 인간 섬유아 세포는 46개 이상의 마이크로세포로 분리될 수 있다.

[768] 상기 마이크로세포는 하나 이상의 염색체 또는 염색체의 절편을 포함할 수 있다.

[769] 이때, 상기 하나 이상의 염색체 또는 염색체의 절편은 원염색체 또는 원염색체의 절편일 수 있다.

[770] 상기 마이크로세포는 정상적인 체세포 분열 또는 감수 분열을 하지 못하는 세포 유사체일 수 있다.

[771] 상기 마이크로세포는 세포의 세포질의 일부를 가지고 있을 수 있다.

[772] 상기 마이크로세포는 세포의 세포막의 일부를 가지고 있을 수 있다.

[773] 상기 마이크로세포는 세포의 핵질의 일부를 가지고 있을 수 있다.

[774]

[775] 본 명세서에 개시된 일 양태에 의하면, 표적화 세포의 마이크로세포화 방법이 제공될 수 있다.

[776] “마이크로세포화”는 하나 이상의 세포를 이용해 마이크로세포를 생산하는 것을 의미한다. 이때, 상기 마이크로세포화는 하나의 세포를 다수개의 세포 또는 세포 유사체로 생산하는 것이다. 상기 마이크로세포 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.

[777] 상기 표적화 세포 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.

[778] 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.

[779] 표적화 세포로부터 마이크로세포를 제조하는 방법은 공지된 방법을 이용할 수 있다. 이는 문헌[Thorfinn Ege et al 1974; Thorfinn Ege et al 1977]에도 기재되어 있다.

[780]

[781] 일 구현예로서,

[782] 상기 마이크로세포는

[783] 표적화 세포에 미세소관 저해제를 처리하여 소핵 세포(micronucleated cell)를

- 제조하는 마이크로뉴클레이션(micronucleation); 및
- [784] 상기 소핵 세포(micronucleated cell)에 미세섬유 저해제 처리 후 원심분리(centrifugation)하여 마이크로세포를 제조하는 이뉴클레이션(enucleation);
- [785] 에 의해 제조될 수 있다.
- [786] 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [787] 이때, 상기 미세소관 저해제는 미세소관의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세소관 저해제는 콜히친, 노코다졸 및 콜세미드(colcemid) 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [788] 이때, 상기 미세섬유 저해제는 미세섬유의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세섬유 저해제는 시토칼라신 B(cytochalasin B) 일 수 있다.
- [789] 이때, 상기 원심분리(centrifugation)는 페르콜 그라디언트(percoll gradient) 하에서 진행되는 것일 수 있다.
- [790] 상기 마이크로뉴클레이션(micronucleation)에 의하여 상기 표적화 세포의 핵막은 2개 이상의 소낭으로 분리될 수 있다.
- [791] 상기 이뉴클레이션(enucleation)에 의하여 상기 표적화 세포의 세포막은 2개 이상의 소낭으로 분리될 수 있다.
- [792] 상기와 같은 방법으로 제조된 마이크로세포는 표적화된 염색체 또는 표적화된 염색체의 절편을 포함할 수 있다. 이때, 상기 표적화된 염색체 또는 표적화된 염색체의 절편은 적어도 하나 이상의 RRS를 포함할 수 있다. 또는, 상기 표적화된 염색체 또는 표적화된 염색체의 절편은 적어도 하나 이상의 ASCE를 포함할 수 있다. 이때, 상기 RRS는 상기 마이크로세포가 융합될 표적화 세포에 포함된 표적화된 염색체에 위치한 RRS와 페어링(pairing)할 수 있다. 이때, 상기 ASCE는 상기 마이크로세포가 융합될 표적화 세포에 포함된 표적화된 염색체에 위치한 ASCE와 상동성 결합을 형성할 수 있다.
- [793] 예를 들어, 상기 마이크로세포는 제1 RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS는 상기 마이크로세포가 융합될 표적화 세포에 포함된 표적화된 염색체에 위치한 제2 RRS와 페어링(pairing)할 수 있다.
- [794] 다른 예를 들어, 상기 마이크로세포는 제1 RRS 및 제2 RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 상기 마이크로세포가 융합될 표적화 세포는 제3 RRS 및 제4 RRS가 포함된 표적화된 염색체를 가질 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제3 RRS 및 제4 RRS 중 하나와 페어링(pairing)할 수 있고, 상기 제2 RRS는 상기 제3 RRS 및 제4 RRS 중 나머지 하나와 페어링(pairing)할 수 있다.
- [795]
- [796] ii-1) RRS가 삽입된 염색체를 포함하는 마이크로세포(RRS inserted chromosome included Microcell)
- [797] 본 명세서에 개시된 일 실시예에 의하면, 표적화된 염색체를 포함하는 마이크로세포 및 이의 제조 방법이 제공될 수 있다. 상기 표적화된 염색체는

단일 RRS를 포함하는 것일 수 있다. 상기 표적화된 염색체는 2개 이상의 RRS를 포함하는 것일 수 있다.

[798] 상기 RRS 및 상기 표적화된 염색체는 전술하였다.

[799] 상기 RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 마이크로세포는 표적화 세포로부터 제조될 수 있다. 상기 표적화 세포는 RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포일 수 있다. 상기 RRS를 포함하는 표적화된 염색체는 전술하였다.

[800]

[801] 일 구현예에 의하면,

[802] 상기 마이크로세포는 표적화 세포로부터 제조될 수 있다. 상기 표적화 세포는 RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.

[803] 상기 마이크로세포는

[804] RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포에 미세소관 저해제를 처리하여 소핵 세포(micronucleated cell)를 제조하는 마이크로뉴클레이션(micronucleation); 및

[805] 상기 소핵 세포(micronucleated cell)에 미세섬유 저해제 처리 후 원심분리(centrifugation)하여 마이크로세포를 제조하는 이뉴클레이션(enucleation);

[806] 에 의해 제조될 수 있다.

[807] 이 때, 상기 미세소관 저해제는 미세소관의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세소관 저해제는 콜히친, 노코다졸 및 콜세미드(colcemid) 중 어느 하나 이상일 수 있다.

[808] 이 때, 상기 미세섬유 저해제는 미세섬유의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세섬유 저해제는 시토크랄라신 B(cytochalasin B)일 수 있다.

[809] 이 때, 상기 원심분리(centrifugation)는 페르콜 그라디언트(percoll gradient) 하에서 진행되는 것일 수 있다.

[810] 상기 마이크로세포는 하나 이상의 비표적 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다.

[811] 상기 마이크로세포는 RRS를 포함하는 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 이때, 상기 마이크로세포는 하나 이상의 비표적 염색체 또는 이의 절편을 추가로 더 포함할 수 있다.

[812]

[813] 다른 일 구현예에 의하면,

[814] 상기 마이크로세포는 하나의 염색체 또는 이의 절편을 포함하는 마이크로세포로 제조될 수 있다. 상기 하나의 염색체는 RRS를 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다. 상기 하나의 염색체는 비표적 원염색체일 수 있다.

[815] 상기 하나의 염색체 또는 이의 절편을 포함하는 마이크로세포는

- [816] RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포에 미세소관 저해제를 처리하여 소핵 세포(micronucleated cell)를 제조하는 마이크로뉴클레이션(micronucleation);
- [817] 상기 소핵 세포(micronucleated cell)에 미세섬유 저해제 처리 후 원심분리(centrifugation)하여 마이크로세포를 제조하는 이뉴클레이션(enucleation); 및
- [818] 상기 마이크로세포(microcell)의 여과(filtration);
- [819] 에 의해 제조될 수 있다.
- [820] 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [821] 이 때, 상기 미세소관 저해제는 미세소관의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세소관 저해제는 콜히친, 노코다졸 및 콜세미드(colcemid) 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [822] 이 때, 상기 미세섬유 저해제는 미세섬유의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세섬유 저해제는 시토크알라신 B(cytochalasin B)일 수 있다.
- [823] 이 때, 상기 원심분리(centrifugation)은 페르콜 그라디언트(percoll gradient) 하에서 진행되는 것일 수 있다.
- [824] 이 때, 상기 여과(filtration)는 막 여과(membrane filter)에 의한 것일 수 있다.
- [825] 상기 막 여과(membrane filter)의 공극 크기(pore size)는 3 내지 10 μ m일 수 있다.
- [826] 상기 막여과(membrane filter)의 공극 크기(pore size)는 5 내지 8 μ m일 수 있다.
- [827]
- [828] 또 다른 일 구현예에 의하면,
- [829] 상기 마이크로세포는 두 개의 염색체 및 이들의 절편을 포함하는 마이크로세포로 제조될 수 있다. 상기 두 개 염색체는 RRS를 포함하는 표적화된 염색체 및/또는 비표적 원염색체일 수 있다.
- [830] 상기 두 개의 염색체 및 이들의 절편을 포함하는 마이크로세포는
- [831] RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 두 개 이상 포함하는 표적화 세포에 미세소관 저해제를 처리하여 소핵 세포(micronucleated cell)를 제조하는 마이크로뉴클레이션(micronucleation);
- [832] 상기 소핵 세포(micronucleated cell)에 미세섬유 저해제 처리 후 원심분리(centrifugation)하여 마이크로세포를 제조하는 이뉴클레이션(enucleation); 및
- [833] 상기 마이크로세포(microcell)의 여과(filtration);
- [834] 에 의해 제조될 수 있다.
- [835] 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [836] 이 때, 상기 미세소관 저해제는 미세소관의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세소관 저해제는 콜히친, 노코다졸 및 콜세미드(colcemid) 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [837] 이 때, 상기 미세섬유 저해제는 미세섬유의 신장을 저해하는 물질일 수 있다.

- 예를 들어, 상기 미세섬유 저해제는 시토크랄라신 B(cytochalasin B)일 수 있다.
- [838] 이 때, 상기 원심분리(centrifugation)는 페르콜 그라디언트(percoll gradient) 하에서 진행되는 것일 수 있다.
- [839] 이 때, 상기 여과(filtration)는 막 여과(membrane filter)에 의한 것일 수 있다.
- [840] 상기 막 여과(membrane filter)의 공극 크기(pore size)는 8 내지 15 μ m일 수 있다.
- [841]
- [842] 다른 일 구현예에 의하면,
- [843] 상기 마이크로세포는 세 개의 염색체 또는 이들의 절편을 포함하는 마이크로세포로 제조될 수 있다. 상기 세 개의 염색 염색체는 RRS를 포함하는 표적화된 염색체 및/또는 비표적 원염색체일 수 있다.
- [844] 상기 세 개의 염색체 또는 이들의 절편을 포함하는 마이크로세포는
- [845] RRS를 포함하는 표적화된 염색체를 두 개 이상 포함하는 표적화 세포에 미세소관 저해제를 처리하여 소핵 세포(micronucleated cell)를 제조하는 마이크로뉴클레이션(micronucleation);
- [846] 상기 소핵 세포(micronucleated cell)에 미세섬유 저해제 처리 후 원심분리(centrifugation)하여 마이크로세포를 제조하는 이뉴클레이션(enucleation); 및
- [847] 상기 마이크로세포(microcell)의 여과(filtration);
- [848] 에 의해 제조될 수 있다.
- [849] 이 때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [850] 이 때, 상기 미세소관 저해제는 미세소관의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세소관 저해제는 콜히친, 노코다졸 및 콜세미드(colcemid) 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [851] 이 때, 상기 미세섬유 저해제는 미세섬유의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세섬유 저해제는 시토크랄라신 B(cytochalasin B) 일 수 있다.
- [852] 이 때, 상기 원심분리(centrifugation)는 페르콜 그라디언트(percoll gradient) 하에서 진행되는 것일 수 있다.
- [853] 이 때, 상기 여과(filtration)는 막 여과(membrane filter)에 의한 것일 수 있다.
- [854] 상기 막 여과(membrane filter)의 공극 크기(pore size)는 12 내지 20 μ m일 수 있다.
- [855]
- [856] 상기 마이크로세포에 포함된 염색체의 개수는 개시된 구현예에 제한되는 것은 아니다. 상기 마이크로세포에 포함된 염색체의 개수는 막 여과 공극 크기(membrane filter pore size)에 의하여 선별될 수 있다.
- [857]
- [858] ii-2) ASCE가 삽입된 염색체를 포함하는 마이크로세포(ASCE inserted chromosome included Microcell)
- [859] 본 명세서에 개시된 일 실시예에 의하면, 표적화된 염색체를 포함하는 마이크로세포 및 이의 제조 방법이 제공될 수 있다. 상기 표적화된 염색체는

단일 ASCE를 포함하는 것일 수 있다. 상기 표적화된 염색체는 2개 이상의 ASCE를 포함하는 것일 수 있다.

- [860] 상기 ASCE 및 상기 표적화된 염색체는 전술하였다.
- [861] 상기 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 마이크로세포는 표적화 세포로부터 제조될 수 있다. 상기 표적화 세포는 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포일 수 있다. 상기 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체는 전술하였다. 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [862]
- [863] 일 구현예에 의하면,
- [864] 상기 마이크로세포는 표적화 세포로부터 제조될 수 있다. 상기 표적화 세포는 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [865] 상기 마이크로세포는
- [866] ASCE를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포에 미세소관 저해제를 처리하여 소핵 세포(micronucleated cell)를 제조하는 마이크로뉴클레이션(micronucleation); 및
- [867] 상기 소핵 세포(micronucleated cell)에 미세섬유 저해제 처리 후 원심분리(centrifugation)하여 마이크로세포를 제조하는 이뉴클레이션(enucleation);
- [868] 에 의해 제조될 수 있다.
- [869] 이 때, 상기 미세소관 저해제는 미세소관의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세소관 저해제는 콜히친, 노코다졸 및 콜세미드(colcemid) 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [870] 이 때, 상기 미세섬유 저해제는 미세섬유의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세섬유 저해제는 시토크알라신 B(cytochalasin B)일 수 있다.
- [871] 이 때, 상기 원심분리(centrifugation)는 페르콜 그라디언트(percoll gradient) 하에서 진행되는 것일 수 있다.
- [872] 상기 마이크로세포는 하나 이상의 비표적 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다.
- [873] 상기 마이크로세포는 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 이때, 상기 마이크로세포는 하나 이상의 비표적 염색체 또는 이의 절편을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [874]
- [875] 다른 일 구현예에 의하면,
- [876] 상기 마이크로세포는 하나의 염색체 또는 이의 절편을 포함하는 마이크로세포로 제조될 수 있다. 상기 하나의 염색체는 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다. 상기 하나의 염색체는 비표적 원염색체일 수 있다.
- [877] 상기 하나의 염색체 또는 이의 절편을 포함하는 마이크로세포는

- [878] ASCE를 포함하는 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포에 미세소관 저해제를 처리하여 소핵 세포(micronucleated cell)를 제조하는 마이크로뉴클레이션(micronucleation);
- [879] 상기 소핵 세포(micronucleated cell)에 미세섬유 저해제 처리 후 원심분리(centrifugation)하여 마이크로세포를 제조하는 이뉴클레이션(enucleation); 및
- [880] 상기 마이크로세포(microcell)의 여과(filtration);
- [881] 에 의해 제조될 수 있다.
- [882] 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [883] 이 때, 상기 미세소관 저해제는 미세소관의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세소관 저해제는 콜히친, 노코다졸 및 콜세미드(colcemid) 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [884] 이 때, 상기 미세섬유 저해제는 미세섬유의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세섬유 저해제는 시토크알라신 B(cytochalasin B)일 수 있다.
- [885] 이 때, 상기 원심분리(centrifugation)은 페르콜 그라디언트(percoll gradient) 하에서 진행되는 것일 수 있다.
- [886] 이 때, 상기 여과(filtration)는 막 여과(membrane filter)에 의한 것일 수 있다.
- [887] 상기 막 여과(membrane filter)의 공극 크기(pore size)는 3 내지 10 μ m일 수 있다.
- [888] 상기 막여과(membrane filter)의 공극 크기(pore size)는 5 내지 8 μ m일 수 있다.
- [889]
- [890] 또 다른 일 구현예에 의하면,
- [891] 상기 마이크로세포는 두 개의 염색체 및 이들의 절편을 포함하는 마이크로세포로 제조될 수 있다. 상기 두 개 염색체는 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체 및/또는 비표적 원염색체일 수 있다.
- [892] 상기 두 개의 염색체 및 이들의 절편을 포함하는 마이크로세포는
- [893] ASCE를 포함하는 표적화된 염색체를 두 개 이상 포함하는 표적화 세포에 미세소관 저해제를 처리하여 소핵 세포(micronucleated cell)를 제조하는 마이크로뉴클레이션(micronucleation);
- [894] 상기 소핵 세포(micronucleated cell)에 미세섬유 저해제 처리 후 원심분리(centrifugation)하여 마이크로세포를 제조하는 이뉴클레이션(enucleation); 및
- [895] 상기 마이크로세포(microcell)의 여과(filtration);
- [896] 에 의해 제조될 수 있다.
- [897] 이때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [898] 이 때, 상기 미세소관 저해제는 미세소관의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세소관 저해제는 콜히친, 노코다졸 및 콜세미드(colcemid) 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [899] 이 때, 상기 미세섬유 저해제는 미세섬유의 신장을 저해하는 물질일 수 있다.

- 예를 들어, 상기 미세섬유 저해제는 시토크랄린 B(cytochalasin B)일 수 있다.
- [900] 이 때, 상기 원심분리(centrifugation)는 페르콜 그라디언트(percoll gradient) 하에서 진행되는 것일 수 있다.
- [901] 이 때, 상기 여과(filtration)는 막 여과(membrane filter)에 의한 것일 수 있다.
- [902] 상기 막 여과(membrane filter)의 공극 크기(pore size)는 8 내지 15 μ m일 수 있다.
- [903]
- [904] 다른 일 구현예에 의하면,
- [905] 상기 마이크로세포는 세 개의 염색체 또는 이들의 절편을 포함하는 마이크로세포로 제조될 수 있다. 상기 세 개의 염색 염색체는 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체 및/또는 비표적 원염색체일 수 있다.
- [906] 상기 세 개의 염색체 또는 이들의 절편을 포함하는 마이크로세포는
- [907] ASCE를 포함하는 표적화된 염색체를 두 개 이상 포함하는 표적화 세포에 미세소관 저해제를 처리하여 소핵 세포(micronucleated cell)를 제조하는 마이크로뉴클레이션(micronucleation);
- [908] 상기 소핵 세포(micronucleated cell)에 미세섬유 저해제 처리 후 원심분리(centrifugation)하여 마이크로세포를 제조하는 이뉴클레이션(enucleation); 및
- [909] 상기 마이크로세포(microcell)의 여과(filtration);
- [910] 에 의해 제조될 수 있다.
- [911] 이 때, 상기 표적화 세포는 공여체 세포일 수 있다.
- [912] 이 때, 상기 미세소관 저해제는 미세소관의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세소관 저해제는 콜히친, 노코다졸 및 콜세미드(colcemid) 중 어느 하나 이상일 수 있다.
- [913] 이 때, 상기 미세섬유 저해제는 미세섬유의 신장을 저해하는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 미세섬유 저해제는 시토크랄린 B(cytochalasin B) 일 수 있다.
- [914] 이 때, 상기 원심분리(centrifugation)는 페르콜 그라디언트(percoll gradient) 하에서 진행되는 것일 수 있다.
- [915] 이 때, 상기 여과(filtration)는 막 여과(membrane filter)에 의한 것일 수 있다.
- [916] 상기 막 여과(membrane filter)의 공극 크기(pore size)는 12 내지 20 μ m일 수 있다.
- [917]
- [918] 상기 마이크로세포에 포함된 염색체의 개수는 개시된 구현예에 제한되는 것은 아니다. 상기 마이크로세포에 포함된 염색체의 개수는 막 여과 공극 크기(membrane filter pore size)에 의하여 선별될 수 있다.
- [919]
- [920] 상기 마이크로세포의 생산을 위한 일 예로,
- [921] 표적화 fibroblast에 콜세미드(colcemid)를 처리할 수 있다. 이 때, 상기 콜세미드 처리에 의해 마이크로뉴클레이션 유도에 따른 소핵 세포(micronucleated cell)가 생산될 수 있다.

- [922] 상기 생산된 소핵세포에 시토크랄라신 B(cytochalasin B)를 처리하고, 원심분리를 통해 마이크로세포를 분리할 수 있다.
- [923] 상기와 같은 과정을 통해 표적화 fibroblast로부터 마이크로세포를 생산 및 수득할 수 있다.
- [924]
- [925] 상기에 기재한 예는 단순 예시일 뿐, 각각의 구성 요소(표적화 세포, 마이크로세포 등)는 목적에 맞게 다양하게 변형 또는 변경할 수 있다.
- [926]
- [927] **iii) 상기 마이크로세포를 이용한 융합세포 생산**
- [928] 본 명세서에 개시된 일 양태에 의하면, 제1 융합 세포(a first fusion cell) 및 이의 제조 방법이 제공될 수 있다.
- [929] 상기 제1 융합세포는 원세포에 추가적으로 하나 이상의 염색체 또는 이의 절편(fragment)을 가지는 세포일 수 있다.
- [930] 이때, 상기 제1 융합세포는 상기 원세포가 가지는 전체 염색체 수보다 하나 이상 많은 염색체 수를 가지는 세포일 수 있다. 예를 들어, 상기 원세포의 전체 염색체 수가 $2n$ 개(40개)인 경우, 상기 제1 융합세포는 $2n+1$ 개(41개)의 염색체를 가지는 세포일 수 있다. 이 경우, 상기 제1 융합세포는 상기 원세포의 전체 염색체($2n$ 개, 즉, 40개) 및 추가적으로 하나의 염색체를 가지는 세포일 수 있다.
- [931] 상기 제1 융합세포는 적어도 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 이때, 상기 표적화된 염색체는 상기 제1 융합세포가 추가적으로 가지는 염색체일 수 있다.
- [932] 상기 제1 융합세포는 적어도 둘 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 이때, 상기 둘 이상의 표적화된 염색체 중 하나는 제1 융합세포가 가지는 원세포의 전체 염색체 중 하나일 수 있다. 상기 둘 이상의 표적화된 염색체 중 다른 하나는 제1 융합세포가 추가적으로 가지는 염색체일 수 있다.
- [933] 상기 제1 융합세포는 적어도 둘 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 이때, 상기 둘 이상의 표적화된 염색체는 상기 제1 융합세포가 추가적으로 가지는 염색체일 수 있다. 이 경우, 상기 제1 융합세포는 원세포에 추가적으로 둘 이상의 염색체를 가지는 세포일 수 있고, 상기 제1 융합세포는 원세포의 전체 염색체 및 추가적으로 둘 이상의 염색체를 가지는 세포일 수 있다.
- [934] 상기 제1 융합 세포는 하나 이상의 원세포 및 하나 이상의 마이크로세포의 융합에 의해 생산될 수 있다. 마이크로세포 및 원세포를 융합하여 제1 융합 세포를 제조하는 방법은 공지된 방법을 이용할 수 있다. 이는 문헌[Fournier RE et al 1977; McNeill CA et al 1980]에도 기재되어 있다. 예로써, Tomizuka et al., Nature Genetics, 16: 133 (1997)을 참조한다.
- [935]
- [936] 상기 제1 융합세포는 표적화 세포 및 하나 이상의 마이크로세포의 세포 융합에 의해 제조될 수 있다.

- [937] 이때, 상기 표적화 세포는 수용체 세포일 수 있다.
- [938] 이때, 상기 하나 이상의 마이크로세포는 공여체 세포로부터 생산된 것일 수 있다.
- [939] 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포) 및 상기 마이크로세포 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [940] 상기 마이크로세포는 표적화 세포(제2 표적화 세포)를 이용해 생산된 것일 수 있다.
- [941] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 동일 개체 유래일 수 있다.
- [942] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 다른 개체 유래일 수 있다. 상기 다른 개체는 동종 및 이종을 모두 포함한다.
- [943] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 인간 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [944] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 마우스 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [945] 상기 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 이때, 상기 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편은 하나 이상의 RRS를 포함할 수 있다. 또는, 상기 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편은 하나 이상의 ASCE를 포함할 수 있다. 이때, 상기 하나 이상의 RRS는 제1 표적화 세포에 포함된 하나 이상의 RRS와 페어링(pairing)될 수 있다. 또는, 상기 하나 이상의 ASCE는 제1 표적화 세포에 포함된 하나 이상의 ASCE와 상동성 결합을 형성할 수 있다.
- [946] 상기 마이크로세포가 복수개인 경우, 적어도 하나 이상의 마이크로세포가 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 이때, 상기 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편은 하나 이상의 RRS를 포함할 수 있다. 또는, 상기 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편은 하나 이상의 ASCE를 포함할 수 있다. 이때, 상기 하나 이상의 RRS는 제1 표적화 세포에 포함된 하나 이상의 RRS와 페어링(pairing)될 수 있다. 또는, 상기 하나 이상의 ASCE는 제1 표적화 세포에 포함된 하나 이상의 ASCE와 상동성 결합을 형성할 수 있다.
- [947] 일 구체예로서, 상기 제1 융합세포는 표적화 세포(제1 표적화 세포) 및 제1 마이크로세포의 세포 융합에 의해 생산된 것일 수 있다. 이때, 상기 제1 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 이때, 상기 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편은 하나 이상의 RRS(제1 RRS)를 포함할 수 있다. 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)는 하나 이상의 RRS(제2 RRS)를 포함하는 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제2 RRS와 페어링(pairing)될 수 있다.
- [948] 다른 일 구체예로서, 상기 제1 융합세포는 표적화 세포(제1 표적화 세포) 및 제1

마이크로세포의 세포 융합에 의해 생산된 것일 수 있다. 이때, 상기 제1 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 이때, 상기 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편은 둘 이상의 RRS(제1 RRS 및 제2 RRS)를 포함할 수 있다. 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)는 둘 이상의 RRS(제3 RRS 및 제4 RRS)를 포함하는 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제3 RRS 및 제4 RRS 중 하나와 페어링(pairing)될 수 있고, 상기 제2 RRS는 제3 RRS 및 제4 RRS 중 나머지 하나와 페어링(pairing)될 수 있다.

[949] 다른 일 구체예로서, 상기 제1 융합세포는 표적화 세포(제1 표적화 세포), 제1 마이크로세포 및 제2 마이크로세포의 세포 융합에 의해 생산된 것일 수 있다. 이때, 상기 제1 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 상기 제2 마이크로세포는 하나 이상의 비표적 원염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 이때, 상기 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편은 하나 이상의 RRS(제1 RRS)를 포함할 수 있다. 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)는 하나 이상의 RRS(제2 RRS)를 포함하는 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제2 RRS와 페어링(pairing)될 수 있다.

[950] 또 다른 일 구체예로서, 상기 제1 융합세포는 표적화 세포(제1 표적화 세포), 제1 마이크로세포 및 제2 마이크로세포의 세포 융합에 의해 생산된 것일 수 있다. 이때, 상기 제1 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 상기 제2 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 제1 마이크로세포에 포함된 표적화된 염색체는 상기 제2 마이크로세포에 포함된 표적화된 염색체와 동일하거나 상이할 수 있다. 이때, 상기 제1 마이크로세포에 포함된 표적화된 염색체는 하나 이상의 RRS(제1 RRS)를 포함할 수 있다. 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)는 하나 이상의 RRS(제2 RRS)를 포함하는 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제2 RRS와 페어링(pairing)될 수 있다.

[951] 다른 일 구체예로서, 상기 제1 융합세포는 표적화 세포(제1 표적화 세포), 제1 마이크로세포, 제2 마이크로세포, 제3 마이크로세포 및 제n 마이크로세포의 세포 융합에 의해 생산된 것일 수 있다. 이때, 상기 제1 마이크로세포, 제2 마이크로세포, 제3 마이크로세포 및 제n 마이크로세포 중 하나 이상의 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다.

[952]

[953] 일 구현예에 의하면,

[954] 상기 제1 융합세포의 제조방법은

[955] 표적화 세포(제1 표적화 세포) 및 하나 이상의 마이크로세포를 인접시키고; 및

[956] 상기 표적화 세포 및 상기 마이크로세포에 양전하성 표면활성물질을 처리;

- [957] 하여 세포 융합하는 것을 포함할 수 있다.
- [958] 상기 표적화 세포 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [959] 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)는 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [960] 상기 마이크로세포는 표적화 세포(제2 표적화 세포)를 이용해 생산된 것일 수 있다. 상기 마이크로세포 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [961] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 동일 개체 유래일 수 있다.
- [962] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 다른 개체 유래일 수 있다. 상기 다른 개체는 동종 및 이종을 모두 포함한다.
- [963] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 인간 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [964] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 마우스 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [965] 상기 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다.
- [966] 상기 마이크로세포가 복수개인 경우, 적어도 하나 이상의 마이크로세포가 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다.
- [967] 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포) 및 하나 이상의 마이크로세포를 인접시키는 것은 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포) 및 상기 하나 이상의 마이크로세포를 같은 배지 또는 같은 버퍼(buffer)에 위치하도록 하는 것일 수 있다.
- [968] 상기 양전하성 표명활성물질은 PEG(polyethylene glycol)일 수 있다.
- [969] 상기 마이크로세포가 복수개인 경우, 상기 복수개의 마이크로세포는 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)와 순차적으로 하나씩 세포 융합될 수 있다.
- [970] 상기 마이크로세포가 복수개인 경우, 상기 복수개의 마이크로세포는 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)와 동시에 한번에 세포 융합될 수 있다.
- [971] 상기 마이크로세포가 복수개인 경우, 상기 복수개의 마이크로세포는 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)와 무작위적으로 세포 융합될 수 있다.
- [972]
- [973] 다른 구현예에 의하면,
- [974] 상기 제1 융합세포의 제조방법은
- [975] 표적화 세포(제1 표적화 세포) 및 하나 이상의 마이크로세포를 인접시키고; 및
- [976] 상기 마이크로세포 및 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)에 미토겐(Mitogen) 및 양전하성 표면활성물질을 처리;
- [977] 하여 세포 융합하는 것을 포함할 수 있다.
- [978] 상기 표적화 세포 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.

- [979] 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)는 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [980] 상기 마이크로세포는 표적화 세포(제2 표적화 세포)를 이용해 생산된 것일 수 있다. 상기 마이크로세포 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [981] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 동일 개체 유래일 수 있다.
- [982] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 다른 개체 유래일 수 있다. 상기 다른 개체는 동종 및 이종을 모두 포함한다.
- [983] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 인간 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [984] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 마우스 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [985] 상기 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다.
- [986] 상기 마이크로세포가 복수개인 경우, 적어도 하나 이상의 마이크로세포가 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다.
- [987] 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포) 및 하나 이상의 마이크로세포를 인접시키는 것은 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포) 및 상기 하나 이상의 마이크로세포를 같은 배지 또는 같은 버퍼(buffer)에 위치하도록 하는 것일 수 있다.
- [988] 상기 미토겐(Mitogen)은 PHA-P(phytohemagglutinin-P)일 수 있다.
- [989] 상기 양전하성 표면활성물질은 PEG(polyethylene glycol)일 수 있다.
- [990] 상기 마이크로세포가 복수개인 경우, 상기 복수개의 마이크로세포는 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)와 순차적으로 하나씩 세포 융합될 수 있다.
- [991] 상기 마이크로세포가 복수개인 경우, 상기 복수개의 마이크로세포는 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)와 동시에 한번에 세포 융합될 수 있다.
- [992] 상기 마이크로세포가 복수개인 경우, 상기 복수개의 마이크로세포는 상기 표적화 세포(제1 표적화 세포)와 무작위적으로 세포 융합될 수 있다.
- [993]
- [994] iii-1) RRS가 삽입된 염색체를 포함하는 제1 융합세포(RRS inserted chromosome included a first fusion cell)
- [995] 본 명세서에 개시된 일 실시예에 의하면, 2개 이상의 표적화된 염색체를 포함하는 제1 융합 세포(a first fusion cell) 및 이의 제조 방법이 제공될 수 있다.
- [996] 상기 2개 이상의 표적화된 염색체는 적어도 하나 이상의 RRS를 각각 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [997] 상기 2개 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화 염색체 및 제2 표적화 염색체일 수 있다.

- [998] 상기 제1 표적화된 염색체는 적어도 하나 이상의 RRS를 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [999] 상기 제2 표적화된 염색체는 적어도 하나 이상의 RRS를 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [1000] 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체가 제1 RRS를 포함하고, 상기 제2 표적화된 염색체가 제2 RRS를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제2 RRS와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1001] 다른 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체가 제1 RRS 및 제2 RRS를 포함하고, 상기 제2 표적화된 염색체가 제3 RRS 및 제4 RRS를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS, 제2 RRS, 제3 RRS 및 제4 RRS는 모두 동일하거나 모두 상이할 수 있다. 또는 상기 제1 RRS, 제2 RRS, 제3 RRS 및 제4 RRS는 일부 동일하거나 일부 상이할 수 있다.
- [1002] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1003] 상기 제1 융합세포는 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1004] 상기 제1 표적화된 염색체는 제1 표적화 세포로부터 제공된 것일 수 있다. 상기 제2 표적화된 염색체는 마이크로세포로부터 제공된 것일 수 있다. 이때, 상기 마이크로세포는 상기 제2 표적화된 염색체를 포함하는 제2 표적화 세포를 이용해 생산된 것일 수 있다. 이 경우, 상기 제1 융합세포는 제1 표적화 세포의 전체 염색체 및 제2 표적화된 염색체를 가지는 융합세포일 수 있다.
- [1005] 또는 상기 제1 표적화된 염색체는 마이크로세포로부터 제공된 것일 수 있다. 상기 제2 표적화된 염색체는 제2 표적화 세포로부터 제공된 것일 수 있다. 이때, 상기 마이크로세포는 상기 제1 표적화된 염색체를 포함하는 제1 표적화 세포를 이용해 생산된 것일 수 있다. 이 경우, 상기 제1 융합세포는 제2 표적화 세포의 전체 염색체 및 제1 표적화된 염색체를 가지는 융합세포일 수 있다.
- [1006] 상기 표적화된 염색체, 표적화 세포 및 마이크로세포 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [1007]
- [1008] 일 구체예에 의하면,
- [1009] 2개 이상의 표적화된 염색체를 포함하는 제1 융합 세포(a first fusion cell)의 제조 방법은
- [1010] 제1 표적화 세포 및 하나 이상의 마이크로세포를 인접시키고; 및
- [1011] 상기 제1 표적화 세포 및 상기 마이크로세포에 양전하성 표면활성물질을 처리;
- [1012] 하여 세포 융합하는 것을 포함할 수 있다.
- [1013] 상기 제1 표적화 세포는 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1014] 상기 제1 표적화 세포는 제1 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.

- [1015] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 적어도 하나 이상의 RRS를 포함할 수 있다.
- [1016] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 RRS는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [1017] 상기 마이크로세포는 제2 표적화 세포를 이용해 생산된 것일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 상기 제2 표적화 세포는 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1018] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 동일 개체 유래일 수 있다.
- [1019] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 다른 개체 유래일 수 있다. 상기 다른 개체는 동종 및 이종을 모두 포함한다.
- [1020] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 인간 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [1021] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 마우스 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [1022] 상기 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 이때, 상기 마이크로세포는 제2 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다.
- [1023] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 적어도 하나 이상의 RRS를 포함할 수 있다.
- [1024] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 RRS는 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [1025] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 RRS는 제1 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 RRS와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1026] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 RRS는 제1 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다.
- [1027] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1028] 상기 제1 표적화 세포 및 하나 이상의 마이크로세포를 인접시키는 것은 상기 표적화 세포 및 상기 하나 이상의 마이크로세포를 같은 배지 또는 같은 버퍼(buffer)에 위치하도록 하는 것일 수 있다.
- [1029] 상기 양전하성 표명활성물질은 PEG(polyethylene glycol)일 수 있다.
- [1030] 상기 제1 표적화 세포 및 상기 마이크로세포에 양전하성 표명활성물질을 처리하는 단계에 미토겐(Mitogen)을 추가로 더 처리할 수 있다.
- [1031] 상기 미토겐(Mitogen)은 PHA-P(phytohemagglutinin-P)일 수 있다.
- [1032]
- [1033] 다른 일 구체예에 의하면,
- [1034] 2개 이상의 표적화된 염색체를 포함하는 제1 융합 세포(a first fusion cell)의

제조 방법은

- [1035] 제1 표적화 세포 및 하나 이상의 마이크로세포를 인접시키고; 및
- [1036] 상기 제1 표적화 세포 및 상기 마이크로세포에 양전하성 표면활성물질을 처리;
- [1037] 하여 세포 융합하는 것을 포함할 수 있다.
- [1038] 상기 제1 표적화 세포는 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1039] 상기 제1 표적화 세포는 제1 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1040] 상기 제1 표적화된 염색체는 적어도 둘 이상의 RRS를 포함할 수 있다.
- [1041] 이때, 상기 둘 이상의 RRS는 제1 RRS 및 제2 RRS일 수 있다.
- [1042] 이때, 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS는 각각 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [1043] 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제2 RRS와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1044] 상기 마이크로세포는 제2 표적화 세포를 이용해 생산된 것일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 상기 제2 표적화 세포는 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1045] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 동일 개체 유래일 수 있다.
- [1046] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 다른 개체 유래일 수 있다. 상기 다른 개체는 동종 및 이종을 모두 포함한다.
- [1047] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 인간 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [1048] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 마우스 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [1049] 상기 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 이때, 상기 마이크로세포는 제2 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다.
- [1050] 상기 제2 표적화된 염색체는 적어도 둘 이상의 RRS를 포함할 수 있다.
- [1051] 이때, 상기 둘 이상의 RRS는 제3 RRS 및 제4 RRS일 수 있다.
- [1052] 이때, 상기 제3 RRS 및 상기 제4 RRS는 각각 상기 표 1에 개시된 LoxP 변이체 중 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [1053] 이때, 상기 제3 RRS는 상기 제4 RRS와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1054] 이때, 상기 제3 RRS는 상기 제1 RRS 및/또는 상기 제2 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다.
- [1055] 이때, 상기 제4 RRS는 상기 제1 RRS 및/또는 상기 제2 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다.
- [1056] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.

- [1057] 상기 제1 표적화 세포 및 하나 이상의 마이크로세포를 인접시키는 것은 상기 표적화 세포 및 상기 하나 이상의 마이크로세포를 같은 배지 또는 같은 버퍼(buffer)에 위치하도록 하는 것일 수 있다.
- [1058] 상기 양전하성 표명활성물질은 PEG(polyethylene glycol)일 수 있다.
- [1059] 상기 제1 표적화 세포 및 상기 마이크로세포에 양전하성 표명활성물질을 처리하는 단계에 미토겐(Mitogen)을 추가로 더 처리할 수 있다.
- [1060] 상기 미토겐(Mitogen)은 PHA-P(phytohemagglutinin-P)일 수 있다.
- [1061]
- [1062] iii-2) ASCE가 삽입된 염색체를 포함하는 제1 융합세포(ASCE inserted chromosome included a first fusion cell)
- [1063] 본 명세서에 개시된 일 실시예에 의하면, 2개 이상의 표적화된 염색체를 포함하는 제1 융합 세포(a first fusion cell) 및 이의 제조 방법이 제공될 수 있다.
- [1064] 상기 2개 이상의 표적화된 염색체는 적어도 하나 이상의 ASCE를 각각 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [1065] 상기 2개 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화 염색체 및 제2 표적화 염색체일 수 있다.
- [1066] 상기 제1 표적화된 염색체는 적어도 하나 이상의 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [1067] 상기 제2 표적화된 염색체는 적어도 하나 이상의 ASCE를 포함하는 표적화된 염색체일 수 있다.
- [1068] 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체가 제1 ASCE를 포함하고, 상기 제2 표적화된 염색체가 제2 ASCE를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 ASCE는 상기 제2 ASCE와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1069] 다른 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체가 제1 ASCE 및 제2 ASCE를 포함하고, 상기 제2 표적화된 염색체가 제3 ASCE 및 제4 ASCE를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 ASCE, 제2 ASCE, 제3 ASCE 및 제4 ASCE는 모두 동일하거나 모두 상이할 수 있다. 또는 상기 제1 ASCE, 제2 ASCE, 제3 ASCE 및 제4 ASCE는 일부 동일하거나 일부 상이할 수 있다.
- [1070] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1071] 상기 제1 융합세포는 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1072] 상기 제1 표적화된 염색체는 제1 표적화 세포로부터 제공된 것일 수 있다. 상기 제2 표적화된 염색체는 마이크로세포로부터 제공된 것일 수 있다. 이때, 상기 마이크로세포는 상기 제2 표적화된 염색체를 포함하는 제2 표적화 세포를 이용해 생산된 것일 수 있다. 이 경우, 상기 제1 융합세포는 제1 표적화 세포의 전체 염색체 및 제2 표적화된 염색체를 가지는 융합세포일 수 있다.

- [1073] 또는 상기 제1 표적화된 염색체는 마이크로세포로부터 제공된 것일 수 있다. 상기 제2 표적화된 염색체는 제2 표적화 세포로부터 제공된 것일 수 있다. 이때, 상기 마이크로세포는 상기 제1 표적화된 염색체를 포함하는 제1 표적화 세포를 이용해 생산된 것일 수 있다. 이 경우, 상기 제1 융합세포는 제2 표적화 세포의 전체 염색체 및 제1 표적화된 염색체를 가지는 융합세포일 수 있다.
- [1074] 상기 표적화된 염색체, 표적화 세포 및 마이크로세포 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [1075]
- [1076] 일 구체예에 의하면,
- [1077] 2개 이상의 표적화된 염색체를 포함하는 제1 융합 세포(a first fusion cell)의 제조 방법은
- [1078] 제1 표적화 세포 및 하나 이상의 마이크로세포를 인접시키고; 및
- [1079] 상기 제1 표적화 세포 및 상기 마이크로세포에 양전하성 표면활성물질을 처리;
- [1080] 하여 세포 융합하는 것을 포함할 수 있다.
- [1081] 상기 제1 표적화 세포는 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1082] 상기 제1 표적화 세포는 제1 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1083] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 적어도 하나 이상의 ASCE를 포함할 수 있다.
- [1084] 상기 마이크로세포는 제2 표적화 세포를 이용해 생산된 것일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 상기 제2 표적화 세포는 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1085] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 동일 개체 유래일 수 있다.
- [1086] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 다른 개체 유래일 수 있다. 상기 다른 개체는 동종 및 이종을 모두 포함한다.
- [1087] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 인간 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [1088] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 마우스 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [1089] 상기 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 이때, 상기 마이크로세포는 제2 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다.
- [1090] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 적어도 하나 이상의 ASCE를 포함할 수 있다.
- [1091] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 ASCE는 제1 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 ASCE와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1092] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 ASCE는 제1 표적화된

- 염색체에 포함된 하나 이상의 ASCE와 서로 상동성 결합을 형성할 수 있다.
- [1093] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1094] 상기 제1 표적화 세포 및 하나 이상의 마이크로세포를 인접시키는 것은 상기 표적화 세포 및 상기 하나 이상의 마이크로세포를 같은 배지 또는 같은 버퍼(buffer)에 위치하도록 하는 것일 수 있다.
- [1095] 상기 양전하성 표명활성물질은 PEG(polyethylene glycol)일 수 있다.
- [1096] 상기 제1 표적화 세포 및 상기 마이크로세포에 양전하성 표명활성물질을 처리하는 단계에 미토겐(Mitogen)을 추가로 더 처리할 수 있다.
- [1097] 상기 미토겐(Mitogen)은 PHA-P(phytohemagglutinin-P)일 수 있다.
- [1098]
- [1099] 다른 일 구체예에 의하면,
- [1100] 2개 이상의 표적화된 염색체를 포함하는 제1 융합 세포(a first fusion cell)의 제조 방법은
- [1101] 제1 표적화 세포 및 하나 이상의 마이크로세포를 인접시키고; 및
- [1102] 상기 제1 표적화 세포 및 상기 마이크로세포에 양전하성 표명활성물질을 처리;
- [1103] 하여 세포 융합하는 것을 포함할 수 있다.
- [1104] 상기 제1 표적화 세포는 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1105] 상기 제1 표적화 세포는 제1 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1106] 상기 제1 표적화된 염색체는 적어도 둘 이상의 ASCE를 포함할 수 있다.
- [1107] 이때, 상기 둘 이상의 ASCE는 제1 ASCE 및 제2 ASCE일 수 있다.
- [1108] 이때, 상기 제1 ASCE는 상기 제2 ASCE와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1109] 상기 마이크로세포는 제2 표적화 세포를 이용해 생산된 것일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 하나 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 상기 제2 표적화 세포는 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1110] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 동일 개체 유래일 수 있다.
- [1111] 이때, 상기 제1 표적화 세포는 제2 표적화 세포와 다른 개체 유래일 수 있다. 상기 다른 개체는 동종 및 이종을 모두 포함한다.
- [1112] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 인간 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [1113] 예를 들어, 상기 제1 표적화 세포는 마우스 배아줄기세포(ES cell; embryonic stem cell)일 수 있다. 이때, 상기 제2 표적화 세포는 마우스 섬유아 세포(fibroblast cell)일 수 있다.
- [1114] 상기 마이크로세포는 하나 이상의 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다. 이때, 상기 마이크로세포는 제2 표적화된 염색체 또는 이의 절편을 포함할 수 있다.

- [1115] 상기 제2 표적화된 염색체는 적어도 둘 이상의 ASCE를 포함할 수 있다.
- [1116] 이때, 상기 둘 이상의 ASCE는 제3 ASCE 및 제4 ASCE일 수 있다.
- [1117] 이때, 상기 제3 ASCE는 상기 제4 ASCE와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1118] 이때, 상기 제3 ASCE는 상기 제1 ASCE 및/또는 상기 제2 ASCE와 서로 상동성 결합을 형성할 수 있다.
- [1119] 이때, 상기 제4 ASCE는 상기 제1 ASCE 및/또는 상기 제2 ASCE와 서로 상동성 결합을 형성할 수 있다.
- [1120] 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1121] 상기 제1 표적화 세포 및 하나 이상의 마이크로세포를 인접시키는 것은 상기 표적화 세포 및 상기 하나 이상의 마이크로세포를 같은 배지 또는 같은 버퍼(buffer)에 위치하도록 하는 것일 수 있다.
- [1122] 상기 양전하성 표면활성물질은 PEG(polyethylene glycol)일 수 있다.
- [1123] 상기 제1 표적화 세포 및 상기 마이크로세포에 양전하성 표면활성물질을 처리하는 단계에 미토겐(Mitogen)을 추가로 더 처리할 수 있다.
- [1124] 상기 미토겐(Mitogen)은 PHA-P(phytohemagglutinin-P)일 수 있다.
- [1125]
- [1126] 상기 융합세포의 생산을 위한 일 예로,
- [1127] 마이크로세포 및 표적화 세포를 특정 비율로 혼합하여 세포 융합할 수 있다.
- [1128] 이때, 상기 특정 비율(마이크로세포 : 표적화 세포)은 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9 또는 1:10일 수 있다. 또는 상기 특정 비율은 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1 또는 10:1일 수 있다.
- [1129] 이때, 상기 특정 비율은 목적에 따라 다양하게 조절할 수 있다. 예를 들어, $2n+3$ 개의 염색체를 가지는 융합세포를 생성하는 경우에 비해, $2n+1$ 개의 염색체를 가지는 융합세포를 생성시 표적화 세포 대비 마이크로세포의 양이 적을 수 있다.
- [1130] 이때, 상기 특정 비율은 목적, 세포 융합시간, 융합세포 분리 등의 전반에 걸친 다양한 요소들을 고려하여 임의의 비율로 설정할 수 있다.
- [1131]
- [1132] 상기에 기재한 예는 단순 예시일 뿐, 각각의 구성 요소(표적화 세포, 마이크로세포, 융합세포 등)는 목적에 맞게 다양하게 변형 또는 변경할 수 있다.
- [1133]
- [1134] **iv) 상기 융합세포를 이용한 인공 제조합 염색체를 포함하는 세포 생산**
- [1135] 본 명세서에 개시된 일 양태에 의하면, 인공 제조합 염색체를 포함하는 세포 및 이의 제조 방법이 제공될 수 있다.
- [1136] 상기 인공 제조합 염색체 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [1137] 상기 인공 제조합 염색체를 포함하는 세포는 상기에 기술한 제1 융합세포를

이용해 생산될 수 있다.

- [1138] 상기 제1 융합세포는 둘 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1139] 이때, 상기 둘 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.
- [1140] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1141] 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체의 재조합에 의해 생산될 수 있다.
- [1142] 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체(1)가 제1 일부(11) 및 제1 프래그먼트(12)를 포함하고, 상기 제2 표적화된 염색체(2)가 제2 일부(21) 및 제2 프래그먼트(22)를 포함하는 경우, 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제1 일부(11) 및 상기 제2 프래그먼트(22)를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체(3)일 수 있다. 또는 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제2 일부(21) 및 상기 제1 프래그먼트(12)를 포함하는 인공 재조합 염색체(4)일 수 있다(도 2 및 9).
- [1143] 다른 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체(1)가 제1 일부(11) 및 양 말단 프래그먼트(12)를 포함하고, 상기 제2 표적화된 염색체(2)가 제2 일부(21) 및 양 말단 프래그먼트(22)를 포함하는 경우, 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제1 일부(11) 및 상기 제2 표적화된 염색체의 양 말단 프래그먼트(22)를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체(3)일 수 있다. 또는 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제2 일부(21) 및 상기 제1 표적화된 염색체의 양 말단 프래그먼트(12)를 포함하는 인공 재조합 염색체(4)일 수 있다(도 3).
- [1144] 또 다른 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체(1)가 양 말단을 포함하는 일부(11) 및 제1 프래그먼트(12)를 포함하고, 상기 제2 표적화된 염색체(2)가 양 말단을 포함하는 일부(21) 및 제2 프래그먼트(22)를 포함하는 경우, 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제1 표적화된 염색체의 양 말단을 포함하는 일부(11) 및 상기 제2 프래그먼트(22)를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체(3)일 수 있다. 또는 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제2 표적화된 염색체의 양 말단을 포함하는 일부(21) 및 상기 제1 프래그먼트(12)를 포함하는 인공 재조합 염색체(4)일 수 있다(도 4 및 7).
- [1145] 다른 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체(1)가 양 말단을 포함하는 일부(11), 제1 일부(13), 제1 프래그먼트(12) 및 제2 프래그먼트를 포함하고, 상기 제2 표적화된 염색체(2)가 양 말단을 포함하는 일부(21), 제2 일부(23), 제3 프래그먼트(22) 및 제4 프래그먼트(24)를 포함하는 경우, 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제1 표적화된 염색체의 양 말단을 포함하는 일부(11), 상기 제3 프래그먼트(22), 제1 일부(13) 및 상기 제4 프래그먼트(24)를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체(3)일 수 있다. 또는 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제2 표적화된 염색체의 양 말단을 포함하는 일부(21), 상기 제1 프래그먼트(12), 제2 일부(23) 및 상기 제2

프래그먼트(14)를 포함하는 인공 재조합 염색체(4)일 수 있다(도 5 및 6).

[1146] 또 다른 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체(1)가 양 말단을 포함하는 일부(11) 및 제1 프래그먼트(12)를 포함하고, 상기 제2 표적화된 염색체(2)가 제1 일부(21) 및 제2 일부(22)를 포함하는 경우, 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제1 일부(21), 상기 제1 프래그먼트(12) 및 제2 일부(22)를 포함하는 인공 재조합 염색체(4)일 수 있다(도 8).

[1147] 다른 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체(1)가 양 말단을 포함하는 일부(11) 및 제1 프래그먼트(12)를 포함하고, 상기 제2 표적화된 염색체(2)가 양 말단을 포함하는 일부(21) 및 제2 프래그먼트(22)를 포함하는 경우, 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제1 표적화된 염색체의 양 말단을 포함하는 일부(11) 및 역위된(inverted) 제2 프래그먼트(22)를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체(3)일 수 있다. 이때, 상기 역위된 제2 프래그먼트는 상기 제2 표적화된 염색체(2)에 존재하는 제2 프래그먼트(22)의 역위(inversion)일 수 있다. 이 경우, 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함한 세포는 상기 역위된 제2 프래그먼트에 포함된 유전자를 단백질로 발현시키지 않을 수 있다. 또는, 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제2 표적화 염색체를 포함하는 상기 제1 융합세포와 비교하여 상기 제2 프래그먼트에 포함된 유전자의 발현 양상이 다를 수 있다. 또는 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제2 표적화된 염색체의 양 말단을 포함하는 일부(21) 및 역위된(inverted) 제1 프래그먼트(12)를 포함하는 인공 재조합 염색체(4)일 수 있다. 이때, 상기 역위된 제1 프래그먼트는 상기 제1 표적화된 염색체(1)에 존재하는 제1 프래그먼트(12)의 역위(inversion)일 수 있다. 이 경우, 상기 제2 인공 재조합 염색체를 포함한 세포는 상기 역위된 제1 프래그먼트에 포함된 유전자를 단백질로 발현시키지 않을 수 있다. 또는, 상기 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제1 표적화 염색체를 포함하는 상기 제1 융합세포와 비교하여 상기 제1 프래그먼트에 포함된 유전자의 발현 양상이 다를 수 있다(도 10).

[1148] 상기 인공 재조합 염색체는 RRS 및/또는 ASCE를 추가로 더 포함할 수 있다.

[1149] 상기 인공 재조합 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.

[1150]

[1151] iv-1) RRS-SSR 매개 염색체 교환(RRS-SSR mediated chromosome exchange)

[1152] 본 명세서에 개시된 일 실시예에 의하면, RRS-SSR 매개 염색체 교환 방법을 이용한 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포 및 이의 제조 방법이 제공될 수 있다(도 13 내지 도 19).

[1153] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기에 기술한 제1 융합세포를 이용해 생산될 수 있다.

[1154] 상기 제1 융합세포는 둘 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.

[1155] 상기 둘 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된

염색체일 수 있다.

- [1156] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 하나 이상의 RRS를 포함할 수 있다.
- [1157] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 하나 이상의 RRS를 포함할 수 있다.
- [1158] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 RRS는 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 RRS와 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1159] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 RRS는 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다.
- [1160] 이때, 상기 RRS는 공지의 서열일 수 있다. 일 예로, 상기 RRS는 상기 표 1에 기재한 LoxP 변이체 중 선택된 하나일 수 있다.
- [1161] 이때, 상기 페어링은 둘 이상의 LoxP 변이체의 페어링일 수 있으며, 상기 페어링은 SSR에 의한 인지될 수 있다.
- [1162] 일 예로, 상기 둘 이상의 LoxP 변이체의 페어는 Lox 71 및 Lox 66일 수 있다.
- [1163] 일 예로, 상기 둘 이상의 LoxP 변이체의 페어는 Lox m2/71 및 Lox m2/66일 수 있다.
- [1164] 일 예로, 상기 Lox m2/71 및 상기 Lox m2/66의 페어링은 SSR에 의해 인지될 수 있다.
- [1165] 일 예로, 상기 Lox 71 및 상기 Lox 66의 페어링은 SSR에 의해 인지될 수 있다.
- [1166] 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1167] 상기 인공 재조합 염색체는 하나 이상의 RRS를 포함할 수 있다.
- [1168] 상기 인공 재조합 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1169]
- [1170] 일 구체예로서,
- [1171] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제조 방법은 제1 융합세포에 SSR를 처리하는 것을 포함할 수 있다.
- [1172] 상기 제1 융합세포 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [1173] 상기 제1 융합세포는 둘 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1174] 상기 둘 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.
- [1175] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 하나 이상의 RRS(제1 RRS), 제1 프래그먼트 및 제1 일부를 포함할 수 있다.
- [1176] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 하나 이상의 RRS(제2 RRS), 제2 프래그먼트 및 제2 일부를 포함할 수 있다.
- [1177] 일 예로, 상기 제1 RRS는 Lox 71 및 Lox 66 중 하나일 수 있다. 이때, 상기 제2 RRS는 Lox 71 및 Lox 66 중 다른 하나일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 RRS는 Lox 71인 경우, 상기 제2 RRS는 Lox 66일 수 있다.

- [1178] 다른 일 예로, 상기 제1 RRS는 Lox m2/71 및 Lox m2/66 중 하나 일 수 있다. 이때, 상기 제2 RRS는 Lox m2/71 및 Lox m2/66 중 다른 하나일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 RRS는 Lox m2/71인 경우, 상기 제2 RRS는 Lox m2/66일 수 있다.
- [1179] 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제2 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다.
- [1180] 이때, 상기 제1 RRS와 상기 제2 RRS가 페어링된 사이트는 SSR에 의해 인식 또는 인지될 수 있다.
- [1181] 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1182] 상기 제1 융합세포에 SSR를 처리하는 것은 상기 제1 융합세포에 SSR을 단백질 형태로 도입 또는 전달하는 것일 수 있다.
- [1183] 이때, 상기 단백질 형태로 도입 또는 전달은 전기천공법, 미량주사법, 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징(예를 들어, 문헌[Lee, et al, (2012) Nano Lett., 12, 6322-6327]에 기재되어 있음), 지질-매개 형질감염, 나노파티클, 리포솜, 펩타이드-매개 전달 또는 이의 조합에 의해 수행될 수 있다.
- [1184] 또는 상기 제1 융합세포에 SSR를 처리하는 것은 상기 제1 융합세포에 SSR을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 형태로 도입 또는 전달하는 것일 수 있다.
- [1185] 이때, 상기 벡터는 바이러스 벡터 또는 재조합 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 바이러스는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 또는 단순포진 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [1186] 이때, 상기 벡터 형태로 도입 또는 전달은 공지된 트랜스펙션 방법(Transfection method)을 이용하여 상기 비표적 원세포에 제공될 수 있다. 예를 들어, 상기 트랜스펙션 방법(Transfection method)은 바이러스성 트랜스펙션 방법(viral transfection method), 시약 트랜스펙션 방법(reagent transfection method), 물리적 트랜스펙션 방법(physical transfection method)이 이용될 수 있다. 상기 바이러스성 트랜스펙션 방법(viral transfection method)은, 예로, 렌티바이러스(lentivirus)를 이용한 것일 수 있다. 상기 시약 트랜스펙션 방법(reagent transfection method)은, 예를 들어, 인산 칼슘(calcium phosphate), 양이온 지질(cation lipid), DEAE-덱스트란(DEAE-dextran), 폴리에틸렌이민(Polyethylenimine; PEI)을 이용한 것일 수 있다. 상기 물리적 트랜스펙션 방법(physical transfection method)은, 예를 들어, 전기 천공법(electroporation)을 이용한 것일 수 있다. 또한, 상기 트랜스펙션(transfection)은 리포솜(Liposome)을 이용한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [1187] 상기 SSR은 염색체 교환(chromosome exchange)을 유발할 수 있다.
- [1188] 일 예로, 상기 SSR은 Cre 재조합 효소(Cre Recombinase)일 수 있다. 상기 Cre 재조합 효소 아미노산 서열은 하기 표 3에 개시한다. 다만, 하기 표 3에 개시된

Cre 재조합 효소는 Lox 71 및 Lox 66에 대한 Cre 재조합 효소의 일 예로서, 이에 제한되는 것은 아니다. 다만, 하기 표 3에 개시된 Cre 재조합 효소는 Lox m2/71 및 Lox m2/66에 대한 Cre 재조합 효소의 일 예로서, 이에 제한되는 것은 아니다.

[1189]

[1190] [표3]

Cre 재조합 효소(Cre Recombinase) 아미노산 서열

No.	Target	Cre recombinase 아미노산 서열
1	Lox 71, Lox 66	SNLLTVHQNLPALPVDATSDEVKRNLMDFRDRQAFSEHT WKMLLSVCRSWAAWCKLNNRKFPAEPEDVRDYLLYLQA RGLAVKTIQQHLGQLNMLHRRSGLPRPSDSNAVSLVMRRIR KENVDAGERAKQALAFERTDFDQVRSLMENS DRCQDIRNLA FLGIAYNTLLRIAEIARIRVKDISRTDGGRMLIHIGRTKTLVST AGVEKALSLGVTKLVERWISVSGVADDPNNYLFCRVRKNG VAAPSATSQLSTRALEGIFEATHRLIYGAKDDSGQRYLAWSG HSARVGAARDMARAGVSIPEIMQAGGWTVNIVMNYIRNL DSETGAMVRLLEDGD(SEQ ID NO: 32)
2	Lox m2/71, Lox m2/66	SNLLTVHQNLPALPVDATSDEVKRNLMDFRDRQAFSEHT WKMLLSVCRSWAAWCKLNNRKFPAEPEDVRDYLLYLQA RGLAVKTIQQHLGQLNMLHRRSGLPRPSDSNAVSLVMRRIR KENVDAGERAKQALAFERTDFDQVRSLMENS DRCQDIRNLA FLGIAYNTLLRIAEIARIRVKDISRTDGGRMLIHIGRTKTLVST AGVEKALSLGVTKLVERWISVSGVADDPNNYLFCRVRKNG VAAPSATSQLSTRALEGIFEATHRLIYGAKDDSGQRYLAWSG HSARVGAARDMARAGVSIPEIMQAGGWTVNIVMNYIRNL DSETGAMVRLLEDGD(SEQ ID NO: 32)

[1191]

[1192] 상기 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 적어도 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.

[1193] 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 상기 제1 프래그먼트 및 제2 일부를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체일 수 있다. 이때, 상기 제1 인공 재조합 염색체는 상기 제1 RRS 및/또는 상기 제2 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다. 또는 상기 제1 인공 재조합 염색체는 제3 RRS를 포함할 수 있다. 상기 제3 RRS는 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS의 재조합으로 인해 생성된 RRS일 수 있다.

[1194] 또는 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 상기 제2 프래그먼트 및 제1 일부를 포함하는 제2 인공 재조합 염색체일 수 있다. 이때, 상기 제2 인공 재조합 염색체는 상기 제1 RRS 및/또는 상기 제2 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다. 또는

- 상기 제2 인공 재조합 염색체는 제3 RRS를 포함할 수 있다. 상기 제3 RRS는 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS의 재조합으로 인해 생성된 RRS일 수 있다.
- [1195] 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1196]
- [1197] 다른 일 구체예로서,
- [1198] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제조 방법은 제1 융합세포에 SSR를 처리하는 것을 포함할 수 있다.
- [1199] 상기 제1 융합세포 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [1200] 상기 제1 융합세포는 둘 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1201] 상기 둘 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.
- [1202] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 둘 이상의 RRS(제1 RRS 및 제2 RRS), 제1 프래그먼트, 제1 일부 및 제2 일부를 포함할 수 있다. 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체는 [제1 일부]-[제1 RRS]-[제1 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제2 일부]로 구성될 수 있다.
- [1203] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 둘 이상의 RRS(제3 RRS 및 제4 RRS), 제2 프래그먼트, 제3 일부 및 제4 일부를 포함할 수 있다. 일 예로, 상기 제2 표적화된 염색체는 [제3 일부]-[제3 RRS]-[제2 프래그먼트]-[제4 RRS]-[제4 일부]로 구성될 수 있다.
- [1204] 일 예로, 상기 제1 RRS는 Lox 71 및 Lox 66 중 하나일 수 있다. 이때, 상기 제3 RRS 또는 상기 제4 RRS는 Lox 71 및 Lox 66 중 다른 하나일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 RRS는 Lox 71인 경우, 상기 제3 RRS는 Lox 66일 수 있다. 또는, 상기 제1 RRS는 Lox 71인 경우, 상기 제4 RRS는 Lox 66일 수 있다.
- [1205] 다른 일 예로, 상기 제2 RRS는 Lox m2/71 및 Lox m2/66 중 하나일 수 있다. 이때, 상기 제3 RRS 또는 상기 제4 RRS는 Lox m2/71 및 Lox m2/66 중 다른 하나일 수 있다. 예를 들어, 상기 제2 RRS는 Lox m2/71인 경우, 상기 제3 RRS는 Lox m2/66일 수 있다. 또는, 상기 제2 RRS는 Lox m2/71인 경우, 상기 제4 RRS는 Lox m2/66일 수 있다.
- [1206] 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제3 RRS 또는 상기 제4 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다.
- [1207] 이때, 상기 제2 RRS는 상기 제3 RRS 또는 상기 제4 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다.
- [1208] 예를 들어, 상기 제1 RRS는 상기 제3 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있으며, 상기 제2 RRS는 상기 제4 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다. 또는, 상기 제1 RRS는 상기 제4 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있으며, 상기 제2 RRS는 상기 제3 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다.
- [1209] 이때, 상기 제1 RRS와 상기 제3 RRS 또는 상기 제4 RRS가 페어링된 사이트는

- SSR에 의해 인식 또는 인지될 수 있다.
- [1210] 이때, 상기 제2 RRS와 상기 제3 RRS 또는 상기 제4 RRS가 페어링된 사이트는 SSR에 의해 인식 또는 인지될 수 있다.
- [1211] 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1212] 상기 제1 융합세포에 SSR를 처리하는 것은 상기 제1 융합세포에 SSR을 단백질 형태 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 형태로 도입 또는 전달하는 것일 수 있다. 이때, 상기 도입 또는 전달 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [1213] 상기 SSR은 염색체 교환(chromosome exchange)을 유발할 수 있다.
- [1214] 일 예로, 상기 SSR은 Cre 재조합 효소(Cre Recombinase)일 수 있다.
- [1215] 상기 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 적어도 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.
- [1216] 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 상기 제3 일부, 상기 제1 프래그먼트 및 제4 일부를 포함하는 제1인공 재조합 염색체일 수 있다. 이때, 상기 제1 인공 재조합 염색체는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제3 RRS 및/또는 상기 제4 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다. 또는 상기 제1 인공 재조합 염색체는 제5 RRS를 포함할 수 있다. 상기 제5 RRS는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제3 RRS 및 상기 제4 RRS 중 서로 페어링된 두개의 RRS의 재조합으로 인해 생성된 RRS일 수 있다.
- [1217] 또는 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 상기 제1 일부, 상기 제2 프래그먼트 및 제2 일부를 포함하는 제2 인공 재조합 염색체일 수 있다. 이때, 상기 제2 인공 재조합 염색체는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제3 RRS 및/또는 상기 제4 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다. 또는 상기 제2 인공 재조합 염색체는 제5 RRS를 포함할 수 있다. 상기 제5 RRS는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제3 RRS 및 상기 제4 RRS 중 서로 페어링된 두개의 RRS의 재조합으로 인해 생성된 RRS일 수 있다.
- [1218] 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1219]
- [1220] 또 다른 일 구체예로서,
- [1221] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제조 방법은 제1 융합세포에 SSR를 처리하는 것을 포함할 수 있다.
- [1222] 상기 제1 융합세포 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [1223] 상기 제1 융합세포는 둘 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1224] 상기 둘 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.

- [1225] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 둘 이상의 RRS(제1 RRS 및 제2 RRS), 제1 프래그먼트, 제1 일부 및 제2 일부를 포함할 수 있다. 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체는 [제1 일부]-[제1 RRS]-[제1 프래그먼트]-[제2 RRS]-[제2 일부]로 구성될 수 있다.
- [1226] 이때, 상기 제1 프래그먼트는 제3 RRS 및 제4 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 제3 RRS는 상기 제4 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다.
- [1227] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 둘 이상의 RRS(제5 RRS 및 제6 RRS), 제2 프래그먼트, 제3 일부 및 제4 일부를 포함할 수 있다. 일 예로, 상기 제2 표적화된 염색체는 [제3 일부]-[제5 RRS]-[제2 프래그먼트]-[제6 RRS]-[제4 일부]로 구성될 수 있다.
- [1228] 이때, 상기 제2 프래그먼트는 제7 RRS 및 제8 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 제7 RRS는 상기 제8 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다.
- [1229] 일 예로, 상기 제1 RRS는 Lox 71 및 Lox 66 중 하나일 수 있다. 이때, 상기 제6 RRS는 Lox 71 및 Lox 66 중 다른 하나일 수 있다. 예를 들어, 상기 제1 RRS는 Lox 71인 경우, 상기 제6 RRS는 Lox 66일 수 있다.
- [1230] 다른 일 예로, 상기 제2 RRS는 Lox m2/71 및 Lox m2/66 중 하나일 수 있다. 이때, 상기 제5 RRS는 Lox m2/71 및 Lox m2/66 중 다른 하나일 수 있다. 예를 들어, 상기 제2 RRS는 Lox m2/71인 경우, 상기 제5 RRS는 Lox m2/66일 수 있다.
- [1231] 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제6 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다.
- [1232] 이때, 상기 제2 RRS는 상기 제5 RRS와 서로 페어링(pairing)할 수 있다.
- [1233] 이때, 상기 제1 RRS와 상기 제6 RRS가 페어링된 사이트는 SSR에 의해 인식 또는 인지될 수 있다.
- [1234] 이때, 상기 제2 RRS와 상기 제5 RRS가 페어링된 사이트는 SSR에 의해 인식 또는 인지될 수 있다.
- [1235] 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1236] 상기 제1 융합세포에 SSR를 처리하는 것은 상기 제1 융합세포에 SSR을 단백질 형태 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 형태로 도입 또는 전달하는 것일 수 있다. 이때, 상기 도입 또는 전달 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.
- [1237] 상기 SSR은 염색체 교환(chromosome exchange)을 유발할 수 있다.
- [1238] 일 예로, 상기 SSR은 Cre 재조합 효소(Cre Recombinase)일 수 있다.
- [1239] 상기 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 적어도 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.
- [1240] 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 상기 제3 일부, 역위된 제1 프래그먼트 및 제4 일부를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체일 수 있다. 이때, 상기 역위된 제1 프래그먼트는 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 상기 제1

프래그먼트의 역위일 수 있다. 이때, 상기 제1 인공 재조합 염색체는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제5 RRS 및/또는 상기 제6 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다. 또는 상기 제1 인공 재조합 염색체는 제9 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 제9 RRS는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제5 RRS 및 상기 제6 RRS 중 서로 페어링 된 두 개의 RRS의 재조합으로 인해 생성된 RRS일 수 있다.

- [1241] 또는 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 상기 제1 일부, 역위된 제2 프래그먼트 및 제2 일부를 포함하는 제2 인공 재조합 염색체일 수 있다. 이때, 상기 역위된 제2 프래그먼트는 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 상기 제2 프래그먼트의 역위일 수 있다. 이때, 상기 제2 인공 재조합 염색체는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제5 RRS 및/또는 상기 제6 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다. 또는 상기 제2 인공 재조합 염색체는 제9 RRS를 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 제9 RRS는 상기 제1 RRS, 상기 제2 RRS, 상기 제5 RRS 및 상기 제6 RRS 중 서로 페어링 된 두 개의 RRS의 재조합으로 인해 생성된 RRS일 수 있다.
- [1242] 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1243] 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 역위된 제1 프래그먼트에 포함된 유전자를 단백질로 발현시키지 않을 수 있다. 또는 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제1 표적화 염색체를 포함하는 상기 제1 융합세포와 비교하여 상기 제1 프래그먼트에 포함된 유전자의 발현 양상이 다를 수 있다.
- [1244] 상기 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 역위된 제2 프래그먼트에 포함된 유전자를 단백질로 발현시키지 않을 수 있다. 또는 상기 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제2 표적화 염색체를 포함하는 상기 제1 융합세포와 비교하여 상기 제2 프래그먼트에 포함된 유전자의 발현 양상이 다를 수 있다.
- [1245] 상기의 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 특정 조건에서 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있다.
- [1246] 상기 특정 조건은 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에 SSR를 처리하는 것일 수 있다. 이때, 상기 특정 유전자는 상기 인공 재조합 염색체에 포함된 유전자일 수 있다.
- [1247] 일 예로, 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에서, 상기 특정 유전자는 제1 인공 재조합 염색체의 역위된 제1 프래그먼트에 존재할 수 있다. 이때, 상기 특정 유전자는 역위된 형태일 수 있다. 이 경우, 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에 SSR을 처리할 수 있다. 상기 SSR이 처리된 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 역위된 제1 프래그먼트가 재역위(reinversion) 될 수 있다. 상기 재역위는 제1 프래그먼트에 포함된 제3 RRS 및 제4 RRS의 페어링 및 이를 인지하는 SSR에 의한 것일 수 있다. 상기 재역위된 제1 프래그먼트를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 특정

유전자를 단백질로 발현시킬 수 있다.

[1248] 다른 일 예로, 상기 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에서, 상기 특정 유전자는 제2 인공 재조합 염색체의 역위된 제2 프래그먼트에 존재할 수 있다. 이때, 상기 특정 유전자는 역위된 형태일 수 있다. 이 경우, 상기 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에 SSR을 처리할 수 있다. 상기 SSR이 처리된 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 역위된 제2 프래그먼트가 재역위 될 수 있다. 상기 재역위는 제2 프래그먼트에 포함된 제7 RRS 및 제8 RRS의 페어링 및 이를 인지하는 SSR에 의한 것일 수 있다. 상기 재역위 된 제2 프래그먼트를 포함하는 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 특정 유전자를 단백질로 발현시킬 수 있다.

[1249]

[1250] 또한, 상기의 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 포함하는 동물은 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 이때, 상기 특정 조건은 상기 동물에 SSR를 도입 또는 전달하는 것일 수 있다.

[1251] 또한, 상기의 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 이용해 제작된 동물은 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 이때, 상기 특정 조건은 상기 동물에 SSR를 도입 또는 전달하는 것일 수 있다.

[1252]

[1253] iv-2) ASCE-HR 매개 염색체 교환(ASCE-HR mediated chromosome exchange)

[1254] 본 명세서에 개시된 일 실시예에 의하면, ASCE-HR 매개 염색체 교환 방법을 이용한 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포 및 이의 제조 방법이 제공될 수 있다.

[1255] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기에 기술한 제1 융합세포를 이용해 생산될 수 있다.

[1256] 상기 제1 융합세포는 둘 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.

[1257] 상기 둘 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.

[1258] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 하나 이상의 ASCE를 포함할 수 있다.

[1259] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 하나 이상의 ASCE를 포함할 수 있다.

[1260] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 ASCE는 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 ASCE와 동일하거나 상이할 수 있다.

[1261] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 ASCE는 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 ASCE와 서로 상동성 결합을 형성할 수 있다.

[1262] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 ASCE 및 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 하나 이상의 ASCE는 적어도 80% 또는 그 이상의 상동성을 가지는 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산일 수 있다.

[1263] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지

유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.

[1264]

[1265] 일 구체예로서,

[1266] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제조 방법은 제1 융합세포에 상동성 재조합을 유도하는 인자를 처리하는 것을 포함할 수 있다.

[1267] 상기 제1 융합세포 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.

[1268] 상기 제1 융합세포는 둘 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.

[1269] 상기 둘 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.

[1270] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 하나 이상의 ASCE(제1 ASCE), 제1 프래그먼트 및 제1 일부를 포함할 수 있다.

[1271] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 하나 이상의 ASCE(제2 ASCE), 제2 프래그먼트 및 제2 일부를 포함할 수 있다.

[1272] 이때, 상기 제1 ASCE는 상기 제2 ASCE와 서로 상동성 결합을 형성할 수 있다.

[1273] 이때, 상기 제1 ASCE 및 상기 제2 ASCE는 적어도 80% 또는 그 이상의 상동성을 가지는 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산일 수 있다.

[1274] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.

[1275] 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자는 상기 제1 표적화된 염색체 및/또는 상기 제2 표적화된 염색체의 DSB(double strand breaking)를 발생 또는 유발하는 인자일 수 있다.

[1276] 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자는 상기 제1 표적화된 염색체 및/또는 상기 제2 표적화된 염색체의 SSB(single strand breaking)를 발생 또는 유발하는 인자일 수 있다.

[1277] 이때, 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자는 클라스토젠(clastogen; 염색체이상유발물질)일 수 있다. 상기 클라스토젠은 이온화 방사선, UV, X선, γ 선, 활성산소종, 특정 케미컬일 수 있다. 상기 특정 케미컬은, 예를 들어, 블레오마이신(bleomycin), 하이드록시요소(Hydroxyurea), 캄프토테신(Camptothecin), 4-NQO(4-nitroquinoline 1-oxide), 시스플라틴(Cisplatin), EMS 또는 MMS 등의 메틸화 시약(methylating agent) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[1278] 이때, 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자는 유전자 가위일 수 있다. 상기 유전자 가위는 ZFN(Zinc-finger nucleases), TALEN(Transcription activator-like effector nucleases) 또는 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein)일 수 있다.

[1279] 이때, 상기 유전자 가위는 단백질 형태 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을

포함하는 벡터 형태로 상기 제1 융합세포에 도입 또는 전달 될 수 있다. 상기 단백질 형태로 도입 또는 전달은 전기천공법, 미량주사법, 일시적인 세포 압축 또는 스퀴징(예를 들어, 문헌[Lee, et al, (2012) Nano Lett., 12, 6322-6327]에 기재되어 있음), 지질-매개 형질감염, 나노파티클, 리포솜, 펩타이드-매개 전달 또는 이의 조합에 의해 수행될 수 있다. 상기 벡터는 바이러스 벡터 또는 재조합 바이러스 벡터일 수 있다. 상기 바이러스는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스(AAV), 백시니아바이러스, 폭스바이러스 또는 단순포진 바이러스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이때, 상기 벡터 형태로 도입 또는 전달은 공지된 트랜스펙션 방법(Transfection method)을 이용하여 상기 비표적 원세포에 제공될 수 있다. 예를 들어, 상기 트랜스펙션 방법(Transfection method)은 바이러스성 트랜스펙션 방법(viral transfection method), 시약 트랜스펙션 방법(reagent transfection method), 물리적 트랜스펙션 방법(physical transfection method)이 이용될 수 있다. 상기 바이러스성 트랜스펙션 방법(viral transfection method)은, 예로, 렌티바이러스(lentivirus)를 이용한 것일 수 있다. 상기 시약 트랜스펙션 방법(reagent transfection method)은, 예를 들어, 인산 칼슘(calcium phosphate), 양이온 지질(cation lipid), DEAE-덱스트란(DEAE-dextran), 폴리에틸렌이민(Polyethylenimine; PEI)을 이용한 것일 수 있다. 상기 물리적 트랜스펙션 방법(physical transfection method)은, 예를 들어, 전기 천공법(electroporation)을 이용한 것일 수 있다. 또한, 상기 트랜스펙션(transfection)은 리포솜(Liposome)을 이용한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [1280] 상기 DSB(double strand breaking) 또는 SSB(single strand breaking)을 이용한 상동성 재조합은 염색체 교환(chromosome exchange)을 유발할 수 있다.
- [1281] 상기 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 적어도 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.
- [1282] 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 상기 제1 프래그먼트 및 제2 일부를 포함하는 제1인공 재조합 염색체일 수 있다. 이때, 상기 제1 인공 재조합 염색체는 상기 제1 ASCE 및/또는 상기 제2 ASCE를 추가로 더 포함할 수 있다. 또는 상기 제1 인공 재조합 염색체는 제3 ASCE를 포함할 수 있다. 상기 제3 ASCE는 상기 제1 ASCE 및 상기 제2 ASCE의 재조합으로 인해 생성된 ASCE일 수 있다.
- [1283] 또는 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 상기 제2 프래그먼트 및 제1 일부를 포함하는 제2 인공 재조합 염색체일 수 있다. 이때, 상기 제2 인공 재조합 염색체는 상기 제1 ASCE 및/또는 상기 제2 ASCE를 추가로 더 포함할 수 있다. 또는 상기 제2 인공 재조합 염색체는 제3 ASCE를 포함할 수 있다. 상기 제3 ASCE는 상기 제1 ASCE 및 상기 제2 ASCE의 재조합으로 인해 생성된 ASCE일 수 있다.
- [1284] 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 선발표지 유전자(selection marker

- gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1285]
- [1286] 다른 일 구체예로서,
- [1287] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제조 방법은 제1 융합세포에 상동성 재조합을 유도하는 인자를 처리하는 것을 포함할 수 있다.
- [1288] 상기 제1 융합세포 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [1289] 상기 제1 융합세포는 둘 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1290] 상기 둘 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.
- [1291] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 둘 이상의 ASCE(제1 ASCE 및 제2 ASCE), 제1 프래그먼트, 제1 일부 및 제2 일부를 포함할 수 있다. 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체는 [제1 일부]-[제1 ASCE]-[제1 프래그먼트]-[제2 ASCE]-[제2 일부]로 구성될 수 있다.
- [1292] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 둘 이상의 ASCE(제3 ASCE 및 제4 ASCE), 제2 프래그먼트, 제3 일부 및 제4 일부를 포함할 수 있다. 일 예로, 상기 제2 표적화된 염색체는 [제3 일부]-[제3 ASCE]-[제2 프래그먼트]-[제4 ASCE]-[제4 일부]로 구성될 수 있다.
- [1293] 이때, 상기 제1 ASCE는 상기 제3 ASCE 또는 상기 제4 ASCE와 서로 상동성 결합을 형성할 수 있다. 이 경우, 상기 제1 ASCE는 상기 제3 ASCE 또는 상기 제4 ASCE와 적어도 80% 또는 그 이상의 상동성을 가지는 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산일 수 있다.
- [1294] 이때, 상기 제2 ASCE는 상기 제3 ASCE 또는 상기 제4 ASCE와 서로 상동성 결합을 형성할 수 있다. 이 경우, 상기 제2 ASCE는 상기 제3 ASCE 또는 상기 제4 ASCE와 적어도 80% 또는 그 이상의 상동성을 가지는 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산일 수 있다.
- [1295] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1296] 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자는 상기 제1 표적화된 염색체 및/또는 상기 제2 표적화된 염색체의 DSB(double strand breaking)를 발생 또는 유발하는 인자일 수 있다.
- [1297] 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자는 상기 제1 표적화된 염색체 및/또는 상기 제2 표적화된 염색체의 SSB(single strand breaking)를 발생 또는 유발하는 인자일 수 있다.
- [1298] 이때, 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자는 클라스토젠(clastogen; 염색체이상유발물질)일 수 있다. 상기 클라스토젠은 이온화 방사선, UV, X선, γ 선, 활성산소종, 특정 케미컬일 수 있다. 상기 특정 케미컬은, 예를 들어, 블레오마이신(bleomycin), 하이드록시요소(Hydroxyurea),

캄프토테신(Camptothecin), 4-NQO(4-nitroquinoline 1-oxide), 시스플라틴(Cisplatin), EMS 또는 MMS 등의 메틸화 시약(methylating agent) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [1299] 이때, 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자는 유전자 가위일 수 있다. 상기 유전자 가위는 ZFN(Zinc-finger nucleases), TALEN(Transcription activator-like effector nucleases) 또는 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein)일 수 있다.
- [1300] 이때, 상기 유전자 가위는 단백질 형태 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 형태로 상기 제1 융합세포에 도입 또는 전달 될 수 있다. 상기 도입 또는 전달 관련 설명은 상기에 기재한 바와 같다.
- [1301] 상기 DSB(double strand breaking) 또는 SSB(single strand breaking)을 이용한 상동성 재조합은 염색체 교환(chromosome exchange)을 유발할 수 있다.
- [1302] 상기 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 적어도 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.
- [1303] 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 상기 제3 일부, 상기 제1 프래그먼트 및 제4 일부를 포함하는 제1인공 재조합 염색체일 수 있다. 이때, 상기 제1 인공 재조합 염색체는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제3 ASCE 및/또는 상기 제4 ASCE를 추가로 더 포함할 수 있다. 또는 상기 제1 인공 재조합 염색체는 제5 ASCE를 포함할 수 있다. 상기 제5 ASCE는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제3 ASCE 및 상기 제4 ASCE 중 서로 상동성 결합을 형성하는 두 개의 ASCE의 재조합으로 인해 생성된 ASCE일 수 있다.
- [1304] 또는 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 상기 제1 일부, 상기 제2 프래그먼트 및 제2 일부를 포함하는 제2 인공 재조합 염색체일 수 있다. 이때, 상기 제2 인공 재조합 염색체는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제3 ASCE 및/또는 상기 제4 ASCE를 추가로 더 포함할 수 있다. 또는 상기 제2 인공 재조합 염색체는 제5 ASCE를 포함할 수 있다. 상기 제5 ASCE는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제3 ASCE 및 상기 제4 ASCE 중 서로 상동성 결합을 형성하는 두 개의 ASCE의 재조합으로 인해 생성된 ASCE일 수 있다.
- [1305] 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1306]
- [1307] 또 다른 일 구체예로서,
- [1308] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제조 방법은 제1 융합세포에 상동성 재조합을 유도하는 인자를 처리하는 것을 포함할 수 있다.
- [1309] 상기 제1 융합세포 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [1310] 상기 제1 융합세포는 둘 이상의 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1311] 상기 둘 이상의 표적화된 염색체는 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체일 수 있다.

- [1312] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 둘 이상의 ASCE(제1 ASCE 및 제2 ASCE), 제1 프래그먼트, 제1 일부 및 제2 일부를 포함할 수 있다. 일 예로, 상기 제1 표적화된 염색체는 [제1 일부]-[제1 ASCE]-[제1 프래그먼트]-[제2 ASCE]-[제2 일부]로 구성될 수 있다.
- [1313] 이때, 상기 제1 프래그먼트는 제3 ASCE 및 제4 ASCE를 추가로 더 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 제3 ASCE는 상기 제4 ASCE와 서로 상동성 결합을 형성할 수 있다.
- [1314] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 둘 이상의 ASCE(제5 ASCE 및 제6 ASCE), 제2 프래그먼트, 제3 일부 및 제4 일부를 포함할 수 있다. 일 예로, 상기 제2 표적화된 염색체는 [제3 일부]-[제5 ASCE]-[제2 프래그먼트]-[제6 ASCE]-[제4 일부]로 구성될 수 있다.
- [1315] 이때, 상기 제2 프래그먼트는 제7 ASCE 및 제8 ASCE를 추가로 더 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 제7 ASCE는 상기 제8 ASCE와 서로 상동성 결합을 형성할 수 있다.
- [1316] 상기 제1 ASCE는 상기 제6 ASCE와 서로 상동성 결합을 형성할 수 있다. 이 경우, 상기 제1 ASCE는 상기 제6 ASCE와 적어도 80% 또는 그 이상의 상동성을 가지는 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산일 수 있다.
- [1317] 상기 제2 ASCE는 상기 제5 ASCE와 서로 상동성 결합을 형성할 수 있다. 이 경우, 상기 제2 ASCE는 상기 제5 ASCE와 적어도 80% 또는 그 이상의 상동성을 가지는 뉴클레오타이드를 포함하는 핵산일 수 있다.
- [1318] 상기 제1 표적화된 염색체 및 제2 표적화된 염색체는 각각 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1319] 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자는 상기 제1 표적화된 염색체 및/또는 상기 제2 표적화된 염색체의 DSB(double strand breaking)를 발생 또는 유발하는 인자일 수 있다.
- [1320] 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자는 상기 제1 표적화된 염색체 및/또는 상기 제2 표적화된 염색체의 SSB(single strand breaking)를 발생 또는 유발하는 인자일 수 있다.
- [1321] 이때, 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자는 클라스토젠(clastogen; 염색체이상유발물질)일 수 있다. 상기 클라스토젠은 이온화 방사선, UV, X선, γ 선, 활성산소종, 특정 케미컬일 수 있다. 상기 특정 케미컬은, 예를 들어, 블레오마이신(bleomycin), 하이드록시요소(Hydroxyurea), 캄프토테신(Camptothecin), 4-NQO(4-nitroquinoline 1-oxide), 시스플라틴(Cisplatin), EMS 또는 MMS 등의 메틸화 시약(methylating agent) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [1322] 이때, 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자는 유전자 가위일 수 있다. 상기 유전자 가위는 ZFN(Zinc-finger nucleases), TALEN(Transcription activator-like

effector nucleases) 또는 CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein)일 수 있다.

- [1323] 이때, 상기 유전자 가위는 단백질 형태 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 형태로 상기 제1 융합세포에 도입 또는 전달 될 수 있다. 상기 도입 또는 전달 관련 설명은 상기에 기재한 바와 같다.
- [1324] 상기 DSB(double strand breaking) 또는 SSB(single strand breaking)을 이용한 상동성 재조합은 염색체 교환(chromosome exchange)을 유발할 수 있다.
- [1325] 상기 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 적어도 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.
- [1326] 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 상기 제3 일부, 역위된 제1 프래그먼트 및 제4 일부를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체일 수 있다. 이때, 상기 역위된 제1 프래그먼트는 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 상기 제1 프래그먼트의 역위일 수 있다. 이때, 상기 제1 인공 재조합 염색체는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제5 ASCE 및/또는 상기 제6 ASCE를 추가로 더 포함할 수 있다. 또는 상기 제1 인공 재조합 염색체는 제9 ASCE를 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 제9 ASCE는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제5 ASCE 및 상기 제6 ASCE 중 서로 페어링 된 두 개의 ASCE의 재조합으로 인해 생성된 ASCE일 수 있다.
- [1327] 또는 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 상기 제1 일부, 역위된 제2 프래그먼트 및 제2 일부를 포함하는 제2 인공 재조합 염색체일 수 있다. 이때, 상기 역위된 제2 프래그먼트는 상기 제2 표적화된 염색체에 포함된 상기 제2 프래그먼트의 역위일 수 있다. 이때, 상기 제2 인공 재조합 염색체는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제5 ASCE 및/또는 상기 제6 ASCE를 추가로 더 포함할 수 있다. 또는 상기 제2 인공 재조합 염색체는 제9 ASCE를 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 제9 ASCE는 상기 제1 ASCE, 상기 제2 ASCE, 상기 제5 ASCE 및 상기 제6 ASCE 중 서로 페어링 된 두 개의 ASCE의 재조합으로 인해 생성된 ASCE일 수 있다.
- [1328] 이때, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene) 및/또는 트랜스포존 ITR(Transposon ITR) 서열을 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1329] 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 역위된 제1 프래그먼트에 포함된 유전자를 단백질로 발현시키지 않을 수 있다. 또는 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제1 표적화 염색체를 포함하는 상기 제1 융합세포와 비교하여 상기 제1 프래그먼트에 포함된 유전자의 발현 양상이 다를 수 있다.
- [1330] 상기 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 역위된 제2 프래그먼트에 포함된 유전자를 단백질로 발현시키지 않을 수 있다. 또는 상기 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제2 표적화 염색체를 포함하는 상기 제1 융합세포와 비교하여 상기 제2 프래그먼트에 포함된 유전자의 발현

양상이 다를 수 있다.

- [1331] 상기의 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 특정 조건에서 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있다.
- [1332] 상기 특정 조건은 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에 상동성 재조합을 유도하는 인자를 처리하는 것일 수 있다. 이때, 상기 특정 유전자는 상기 인공 재조합 염색체에 포함된 유전자일 수 있다.
- [1333] 일 예로, 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에서, 상기 특정 유전자는 제1 인공 재조합 염색체의 역위된 제1 프래그먼트에 존재할 수 있다. 이때, 상기 특정 유전자는 역위된 형태일 수 있다. 이 경우, 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에 상동성 재조합을 유도하는 인자를 처리할 수 있다. 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자가 처리된 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 역위된 제1 프래그먼트가 재역위(reinversion) 될 수 있다. 상기 재역위는 제1 프래그먼트에 포함된 제3 ASCE 및 제4 ASCE의 상동성 결합에 의한 것일 수 있다. 상기 재역위 된 제1 프래그먼트를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 특정 유전자를 단백질로 발현시킬 수 있다.
- [1334] 다른 일 예로, 상기 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에서, 상기 특정 유전자는 제2 인공 재조합 염색체의 역위된 제2 프래그먼트에 존재할 수 있다. 이때, 상기 특정 유전자는 역위된 형태일 수 있다. 이 경우, 상기 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에 상동성 재조합을 유도하는 인자를 처리할 수 있다. 상기 상동성 재조합을 유도하는 인자가 처리된 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 역위된 제2 프래그먼트가 재역위 될 수 있다. 상기 재역위는 제2 프래그먼트에 포함된 제7 ASCE 및 제8 ASCE의 상동성 결합에 의한 것일 수 있다. 상기 재역위 된 제2 프래그먼트를 포함하는 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 특정 유전자를 단백질로 발현시킬 수 있다.
- [1335]
- [1336] 또한, 상기의 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 포함하는 동물은 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 이때, 상기 특정 조건은 상기 동물에 상동성 재조합을 유도하는 인자를 도입 또는 전달하는 것일 수 있다.
- [1337] 또한, 상기의 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 이용해 제작된 동물은 특정 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 이때, 상기 특정 조건은 상기 동물에 상동성 재조합을 유도하는 인자를 도입 또는 전달하는 것일 수 있다.
- [1338]
- [1339] 본 출원에 의해 개시되는 인공 재조합 염색체 제조 방법은, AiCE (Artificial interspecies chromosoeme segment exchange) 기술로 명명될 수 있다. 상기 AiCE는 인공 재조합 염색체를 제조하기 위하여, 제1 표적화된 염색체의 제1 프래그먼트가 제2 표적화된 염색체의 제2 프래그먼트와 교체되는 것이다. 상기

AiCE는 인공 재조합 염색체를 제조하기 위하여, 제1 표적화된 염색체의 제1 프래그먼트는 제2 표적화된 염색체의 제3 프래그먼트와 교체되고, 제1 표적화된 염색체의 제2 프래그먼트는 제3 표적화된 염색체의 제4 프래그먼트와 교체되는 것이다. 이때, 상기 인공 재조합 염색체 제조는 프래그먼트의 개수에 제한되지 않는다. 예를 들어, 제1 표적화된 염색체의 제1 프래그먼트, 제2 표적화된 염색체의 제2 프래그먼트, 제3 표적화된 염색체의 제3 프래그먼트가 상기 인공 재조합 염색체의 제조에 이용될 수 있다. 예를 들어, 제1 표적화된 염색체의 제1 프래그먼트, 제2 표적화된 염색체의 제2 프래그먼트, 제3 표적화된 염색체의 제3 프래그먼트, 제n 표적화된 염색체의 제n 프래그먼트가 상기 인공 재조합 염색체의 제조에 이용될 수 있다.

[1340]

[1341] iv-3) 재조합을 위한 구성요소 제거

[1342] 본 명세서에 개시된 다른 일 양태로서, 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포 및 이의 제조 방법은 재조합을 위한 구성요소를 제거하는 단계를 추가로 더 포함할 수 있다(도 20).

[1343] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제조 방법은 RRS-SSR 매개 염색체 교환 방법 또는 ASCE-HR 매개 염색체 교환 방법을 이용한 것일 수 있다.

[1344] 상기 RRS-SSR 매개 염색체 교환 방법 및 상기 ASCE-HR 매개 염색체 교환 방법 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.

[1345] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제조 방법은 재조합을 위한 구성요소를 제거하는 단계를 추가로 더 포함할 수 있다.

[1346] 이때, 상기 재조합을 위한 구성요소는 RRS 또는 ASCE일 수 있다.

[1347] 이때, 상기 재조합을 위한 구성요소는 인공 재조합 염색체에 포함된 것일 수 있다.

[1348] 상기 재조합을 위한 구성요소를 제거하는 단계는 트랜스포손(transposon) 시스템을 이용하는 것일 수 있다. 상기 트랜스포손 시스템은 당업계에서 공지된 방법을 이용할 수 있다. 상기 공지된 방법은 Fraser, MJ et al.("Acquisition of Host Cell DNA Sequences by Baculoviruses: Relationship Between Host DNA Insertions and FP Mutants of Autographa californica and Galleria mellonella Nuclear Polyhedrosis Viruses", 1983, Journal of Virology. 47 (2): 287-300.); Sarkar, A. et al.("Molecular evolutionary analysis of the widespread piggyBac transposon family and related "domesticated" sequences", 2003, Molecular Genetics and Genomics. 270 (2): 173-180); Bouallegue, M et al.("Molecular Evolution of piggyBac Superfamily: From Selfishness to Domestication", 2017, Genome Biology and Evolution. 9 (2): 323-339); Grabundzija I et al.("Comparative analysis of transposable element vector systems in human cells", 2010, Mol. Ther. 18 (6): 1200-1209); Cadinanos, J and Bradley, A("Generation of an inducible and optimized piggyBac transposon system", 2007, Nucleic Acids Research. 35 (12): e87); Izsvak Z and Ivics Z("Sleeping beauty

transposition: biology and applications for molecular therapy", 2004, Mol. Ther. 9 (2): 147-156); Mates L et al.("Molecular evolution of a novel hyperactive Sleeping Beauty transposase enables robust stable gene transfer in vertebrates", 2009, Nat. Genet. 41 (6): 753-761); 및 Yusa, K. et al.("A hyperactive piggyBac transposase for mammalian applications", 2011, Proceedings of the National Academy of Sciences. 108 (4): 1531-1536) 등을 참고할 수 있으며, 다만 이에 제한된 것을 아니다.

- [1349] 상기 방법(재조합을 위한 구성요소를 제거하는 단계가 추가된 방법)에 의해 생성된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 재조합을 위한 구성요소가 포함되지 않은 적어도 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.
- [1350] 이때, 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 RRS가 포함되지 않은 적어도 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.
- [1351] 이때, 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 ASCE가 포함되지 않은 적어도 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.
- [1352] 이하에서, 상기 재조합을 위한 구성요소가 포함되지 않은 인공 재조합 염색체는 설명의 편의를 위해 최종 인공 재조합 염색체로 기재한다.
- [1353]
- [1354] 일 구체예로서,
- [1355] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제조 방법은
- [1356] a) 제1 융합세포에 SSR를 처리; 및
- [1357] b) a) 단계에 의해 생성된 세포(제2 융합세포)에 트랜스포세이즈(Transpoase) 또는 이를 암호화하는 핵산을 처리
- [1358] 하는 것을 포함할 수 있다.
- [1359]
- [1360] 또는 다른 일 구체예로서,
- [1361] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제조 방법은
- [1362] a) 제1 융합세포에 상동성 재조합을 유도하는 인자를 처리; 및
- [1363] b) a) 단계에 의해 생성된 세포(제2 융합세포)에 트랜스포세이즈(Transpoase) 또는 이를 암호화하는 핵산을 처리
- [1364] 하는 것을 포함할 수 있다.
- [1365]
- [1366] 상기 a) 제1 융합세포에 SSR를 처리 및 상기 a) 제1 융합세포에 상동성 재조합을 유도하는 인자를 처리 관련 설명은 상기 iv-1 및 iv-2에서 기술한 바와 같다.
- [1367] 상기 a) 단계에 의해 생성된 세포(제2 융합세포)는 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포일 수 있다.
- [1368] 이때, 상기 인공 재조합 염색체는 적어도 하나 이상의 RRS 또는 ASCE를 포함하는 인공 재조합 염색체일 수 있다.
- [1369] 이때, 상기 인공 재조합 염색체는 적어도 하나 이상의 트랜스포손 ITR 서열을

포함할 수 있다.

- [1370] 이때, 상기 인공 재조합 염색체는 선발표지 유전자(selection marker gene)를 추가로 더 포함할 수 있다.
- [1371] 상기 제2 융합세포는 적어도 하나 이상의 RRS 또는 ASCE를 포함하는 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.
- [1372] 상기 제2 융합세포는 적어도 하나 이상의 트랜스포손 ITR 서열을 포함하는 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.
- [1373] 상기 트랜스포제(Transposase)는 Piggy Bac 트랜스포제(PB 트랜스포제) 또는 Sleeping Beauty 트랜스포제(SB 트랜스포제)일 수 있다.
- [1374] 이때, 상기 PB 트랜스포제의 아미노산 서열은, 하기 표 4에 개시한다. 다만, 하기 표 4에 개시된 PB 트랜스포제는 일 예로서, 이에 제한되는 것은 아니다.

[1375]

[1376] [표4]

Piggy Bac Transposase 아미노산 서열

No.	Piggy Bac Transposase 아미노산 서열
1	MGSSLDDEHILSALLQSDDELVGEDSDSEISDHVSEDDVQSDTEEFIDE VHEVQPTSSGSEILDEQNVIEQPGSSLASNRILTLPQRTIRGKNKHCWSTS KSTRRSRVSA LNIVRSQRGPTRMCRNIYDPLLCKLFFTDEIISEIVKWTN AEISLKRRESMTGATFRDTNEDEIYAFFGILVMTAVRKDNHMSTDDLFD RSLSMVYVSVMRDRDFDLIRCLRMDDKSIRPTLRENDVFTPVRKIWDLF IHQCIQNYTPGAHLTIDEQLLGFRGRCPFRMYIPNKPSKYGIKILMMCD GTYKMINGMPYLGRGTQTNGVPLGEYYVKELSKPVHGSCRNITCDNWF TSIPLAKNLLQEPYKLTIVGTVRSNKREIPEVLKNSRSPVGTSMFCFDGP LTLVSYKPKPAKMVYLLSSCEDASINESTGKPMVMYYNQTKGGVDT LDQMCSVMTCRKTNRWPMALLYGMINIACINSFIIYSHNVSSKGEKVQ SRKKFMRNLYMSLTSSFMKRLEAPTLKRYLRDNISNILPNEVPGTSDDS TEEPVMKKRTYCTYCPKIRKANASCKKCKKVICREHNIDMCQSCF(SEQ ID NO: 33)

[1377]

- [1378] 상기 트랜스포제(Transposase) 또는 이를 암호화하는 핵산을 처리하는 단백질 형태 또는 이를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 형태로 도입 또는 전달하는 것일 수 있다. 이때, 상기 도입 또는 전달 관련 설명은 상기 기술한 바와 같다.

- [1379] 상기 방법으로 제조된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 적어도 하나 이상의 최종 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다.

- [1380] 이때, 상기 하나 이상의 최종 인공 재조합 염색체는 RRS를 포함하지 않는 인공 재조합 염색체일 수 있다.
- [1381] 이때, 상기 하나 이상의 최종 인공 재조합 염색체는 ASCE를 포함하지 않는 인공 재조합 염색체일 수 있다.
- [1382] 이하에서, 상기 하나 이상의 최종 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 설명의 편의를 위해 최종 재조합 세포로 기재한다.
- [1383]
- [1384] 상기 융합세포를 이용한 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 생산 방법을 위한 일 예는,
- [1385] 제1 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포와 제2 표적화된 염색체를 포함하는 마이크로세포의 세포 융합을 통해 생산된 융합세포에 Cre 재조합효소를 처리하여 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 생산할 수 있다.
- [1386] 이때, 상기 융합세포는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체를 포함할 수 있다.
- [1387] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 제1 RRS 및 제2 RRS를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 RRS 및 제2 RRS 사이에 하나 이상의 유전자(설명 편의를 위해 하기에 유전자 A로 표기)가 포함될 수 있다.
- [1388] 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 제3 RRS 및 제4 RRS를 포함할 수 있다. 이때, 상기 제3 RRS 및 제4 RRS 사이에 하나 이상의 유전자(설명 편의를 위해 하기에 유전자 B로 표기)가 포함될 수 있다.
- [1389] 이때, 상기 제1 표적화된 염색체에 포함된 유전자 A는 상기 제2 표적화된 염색체 포함된 유전자 B와 동일한 유전자 또는 상이한 유전자일 수 있다.
- [1390] 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 제1 RRS는 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 제3 RRS와 서로 페어링하고, 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 제2 RRS는 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 제4 RRS와 서로 페어링할 수 있다.
- [1391] 또는, 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 제1 RRS는 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 제4 RRS와 서로 페어링하고, 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 제2 RRS는 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 제3 RRS와 서로 페어링할 수 있다.
- [1392] 상기 페어링은 상기 Cre 재조합효소에 의해 인지될 수 있다. 그 결과, 재조합이 유도될 수 있다.
- [1393] 상기 페어링 및 Cre 재조합효소에 의한 재조합에 의해 인공 재조합 염색체가 생산될 수 있다.
- [1394] 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제1 표적화된 염색체의 유전자 A가 유전자 B로 교환된 형태일 수 있다.
- [1395] 또는 상기 인공 재조합 염색체는 상기 제2 표적화된 염색체의 유전자 B가 유전자 A로 교환된 형태일 수 있다.

[1396] 상기 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 추가로 트랜스포세이즈를 더 처리할 수 있다.

[1397] 이때, 상기 트랜스포세이즈의 처리는 상기 인공 재조합 염색체에 존재하는 RRS를 제거할 수 있다.

[1398]

[1399] 상기에 기재한 예는 단순 예시일 뿐, 각각의 구성 요소(표적화된 염색체, 표적화 세포, 마이크로세포, 융합 세포, 인공 재조합 염색체, 재조합효소, 인공 재조합 염색체를 가지는 세포 등)는 목적에 맞게 다양하게 변형 또는 변경할 수 있다.

[1400]

[1401] **v) 선별 방법(selection methods)**

[1402] 본 명세서에 개시된 일 양태에 의하면, 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 생산 방법은 특정 세포의 선별 방법을 추가로 더 포함할 수 있다.

[1403] 상기 특정 세포는 표적화 세포, 마이크로세포, 제1 융합세포, 제2 융합세포 및/또는 최종 재조합 세포일 수 있다.

[1404] 상기 표적화 세포, 마이크로세포, 제1 융합세포, 제2 융합세포 및 최종 재조합 세포 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.

[1405] 상기 선별 방법은 상기에 기술한 i) 내지 iv)에 추가로 더 포함될 수 있다.

[1406]

[1407] 상기 선별 방법은 역위 유전자를 이용해 특정 세포를 선별하는 것일 수 있다.

[1408] 이때, 상기 역위 유전자는 역위된(inverted) 선발표지 유전자(selection marker gene)일 수 있다. 상기 역위된(inverted) 선발표지 유전자(selection marker gene)는 선발표지 유전자(selection marker gene)의 역위(inversion) 형태일 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.

[1409] 이때, 상기 특정 세포는 표적화 세포, 마이크로세포, 제1 융합세포, 제2 융합세포 및/또는 최종 재조합 세포일 수 있다.

[1410]

[1411] 일 구현예에 의하면,

[1412] 상기 특정 세포는 재역위된(reinverted) 항생제 저항성 유전자에 의해 선별될 수 있다.

[1413] 상기 항생제 저항성 유전자는 하이그로마이신 저항성 유전자(hygromycin resistant gene), 네오마이신 저항성 유전자(neomycin resistant gene), 카나마이신 저항성 유전자(kanamycin resistant gene), 블라스티사이딘 저항성 유전자(blasticidin resistant gene), 제오신 저항성 유전자(zeocin resistant gene) 또는 퓨로 Δ TK 유전자(puro Δ TK gene) 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[1414] 예를 들어, donor DNA가 삽입된 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포를

선별하는 경우, 상기 donor DNA는 역위된 항생제 저항성 유전자 및 FRT를 포함할 수 있다. 상기 donor DNA가 삽입된 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포에 재조합효소인 flippase(FLP)를 처리하면, 상기 역위된 항생제 저항성 유전자가 재역위(reinversion)될 수 있다. 그 결과, 재역위된 항생제 저항성 유전자는 정상적인 발현이 가능하고, FLP가 처리된 세포 중 donor DNA가 삽입된 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포를 항생제 처리를 통해 선별할 수 있다.

[1415]

[1416] 다른 일 구현예에 의하면,

[1417] 상기 특정 세포는 재역위된(reinverted) 형광 단백질 유전자에 의해 선별될 수 있다.

[1418] 상기 형광 단백질 유전자는 GFP 유전자(GFP gene), YFP 유전자(YFP gene), RFP 유전자(RFP gene) 또는 mCherry 유전자(mCherry gene) 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[1419] 예를 들어, donor DNA가 삽입된 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포를 선별하는 경우, 상기 donor DNA는 역위된 GFP 유전자 및 FRT를 포함할 수 있다. 상기 donor DNA가 삽입된 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포에 재조합효소인 flippase(FLP)를 처리하면, 상기 역위된 GFP 유전자가 재역위(reinversion)될 수 있다. 그 결과, 재역위된 GFP 유전자는 정상적인 발현이 가능하고, FLP가 처리된 세포 중 donor DNA가 삽입된 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포를 형광 단백질 검출을 통해 선별할 수 있다.

[1420]

[1421] 또 다른 일 구현예에 의하면,

[1422] 상기 특정 세포는 역위된(inverted) 형광 단백질 유전자에 의해 선별될 수 있다.

[1423] 상기 형광 단백질 유전자는 GFP 유전자(GFP gene), YFP 유전자(YFP gene), RFP 유전자(RFP gene) 또는 mCherry 유전자(mCherry gene) 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[1424] 예를 들어, donor DNA가 삽입된 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포를 선별하는 경우, 상기 donor DNA는 mCherry 유전자 및 FRT를 포함할 수 있다. 상기 donor DNA가 삽입된 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포에 재조합효소인 flippase(FLP)를 처리하면, 상기 mCherry 유전자가 역위(inversion)될 수 있다. 그 결과, 역위된 mCherry 유전자는 정상적인 발현이 불가능하고, FLP가 처리된 세포 중 donor DNA가 삽입된 표적화된 염색체를 포함하는 표적화 세포를 형광 단백질 검출을 통해 선별할 수 있다.

[1425]

[1426] 상기 선별 방법은 선별 마커(selection marker)를 이용해 특정 세포를 선별하는 것일 수 있다.

[1427] 이때, 상기 선별 마커(selection marker)는 선발표지 유전자(selection marker

gene)일 수 있다. 상기 선발표지 유전자(selection marker gene) 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.

- [1428] 이때, 상기 특정 세포는 표적화 세포, 마이크로세포, 제1 융합세포, 제2 융합세포 및/또는 최종 재조합 세포일 수 있다.
- [1429]
- [1430] 일 구현예에 의하면,
- [1431] 상기 특정 세포는 형광 단백질 검출에 의하여 선별될 수 있다.
- [1432] 상기 형광 단백질 검출을 위하여, 상기 특정 세포에 포함된 적어도 하나 이상의 염색체는 형광 단백질 유전자를 포함할 수 있다.
- [1433] 이때, 적어도 하나 이상의 염색체는 표적화된 염색체, 인공 재조합 염색체 및/또는 최종 재조합 염색체일 수 있다. 상기 표적화된 염색체, 인공 재조합 염색체 및 최종 재조합 염색체 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [1434] 상기 형광 단백질 유전자는 GFP 유전자(GFP gene), YFP 유전자(YFP gene), RFP 유전자(RFP gene) 또는 mCherry 유전자(mCherry gene) 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [1435]
- [1436] 일 구체예에 의하면,
- [1437] 특정 세포 및 비표적 원세포가 혼합된 배지(media)에서, 형광 단백질의 검출에 의하여 상기 특정 세포를 선별할 수 있다.
- [1438] 예를 들어, 상기 특정 세포가 표적화된 세포인 경우, 상기 표적화된 세포는 GFP 유전자(GFP gene)가 삽입된 표적화된 염색체를 포함할 수 있다. 이때, 녹색 형광(green fluorescence)의 검출을 통하여 비표적 원세포로부터 특정 세포, 즉, 표적화 세포를 선별할 수 있다.
- [1439] 둘 이상의 특정 세포가 혼합된 배지(media)에서, 형광 단백질의 검출에 의하여 원하는 하나의 특정 세포를 선별할 수 있다.
- [1440] 이때, 상기 둘 이상의 특정 세포는 표적화 세포, 마이크로세포, 제1 융합세포, 제2 융합세포 및 최종 재조합 세포 중 선택된 둘 이상일 수 있다.
- [1441] 예를 들어, 상기 둘 이상의 특정 세포가 제1 융합세포 및 제2 융합세포인 경우, 상기 제2 융합세포는 mCherry 유전자(mCherry gene)가 삽입된 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다. 이때, mCherry 형광(mCherry fluorescence)의 검출을 통하여 제1 융합세포로부터 원하는 하나의 특정 세포, 즉, 제2 융합세포를 선별할 수 있다.
- [1442]
- [1443] 다른 구현예에 의하면,
- [1444] 상기 특정 세포는 항생제 저항성에 의하여 선별될 수 있다.
- [1445] 상기 항생제 저항성 검출을 위하여, 상기 특정된 세포에 포함된 적어도 하나 이상의 염색체는 항생제 저항성 유전자를 포함할 수 있다.
- [1446] 이때, 적어도 하나 이상의 염색체는 표적화된 염색체, 인공 재조합 염색체

및/또는 최종 재조합 염색체일 수 있다. 상기 표적화된 염색체, 인공 재조합 염색체 및 최종 재조합 염색체 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.

[1447] 상기 항생제 저항성 유전자는 하이그로마이신 저항성 유전자(hygromycin resistant gene), 네오마이신 저항성 유전자(neomycin resistant gene), 카나마이신 저항성 유전자(kanamycin resistant gene), 블라스티사이딘 저항성 유전자(blasticidin resistant gene), 제오신 저항성 유전자(zeocin resistant gene) 또는 퓨로 Δ TK 유전자(puro Δ TK gene) 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[1448]

[1449] 일 구체예에 의하면,

[1450] 특정 세포 및 비표적 원세포가 혼합된 배지(media)에서, 항생제 저항성 검출에 의하여 상기 특정 세포를 선별할 수 있다.

[1451] 예를 들어, 상기 특정 세포가 표적화된 세포인 경우, 상기 표적화된 세포는 하이그로마이신 저항성 유전자(hygromycin resistant gene)가 삽입된 특정된 염색체를 포함할 수 있다. 이 때, 하이그로마이신(hygromycin)에 대한 항생제 저항성 검출을 통하여 비표적 원세포로부터 특정 세포, 즉, 표적화 세포를 선별할 수 있다.

[1452] 둘 이상의 특정 세포가 혼합된 배지(media)에서, 항생제 저항성 검출에 의하여 원하는 하나의 특정 세포를 선별할 수 있다.

[1453] 이 때, 상기 둘 이상의 특정 세포는 표적화 세포, 마이크로세포, 제1 융합세포, 제2 융합세포 및 최종 재조합 세포 중 선택된 둘 이상일 수 있다.

[1454] 예를 들어, 상기 둘 이상의 특정 세포가 제1 융합세포 및 제2 융합세포인 경우, 상기 제2 융합세포는 네오마이신 저항성 유전자(neomycin resistant gene)가 삽입된 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다. 이 때, 네오마이신(neomycin)에 대한 항생제 저항성 검출을 통하여 제1 융합세포로부터 원하는 하나의 특정 세포, 즉, 제2 융합세포를 선별할 수 있다.

[1455]

[1456] 또 다른 구체예에 의하면,

[1457] 상기 특정 세포는 dCas9-리포터(deadCas9-Reporter; dCas9-Reporter)에 의하여 선별될 수 있다. 상기 리포터(Reporter)는 표지자를 포함할 수 있다. 상기 Reporter는, 예를 들어, 형광 표지자를 포함할 수 있다. 상기 리포터(Reporter)는 압타머(Aptamer) 및/또는 작용제(agent)를 더 포함할 수 있다. 상기 압타머(Aptamer) 및/또는 작용제(agent)는 특정 물질에 결합력(binding affinity)을 제공할 수 있다.

[1458] 상기 압타머(Aptamer)는, 예를 들어, dCas9에 결합력(binding affinity)을 가지는 것일 수 있다.

[1459] 상기 작용제(agent)는, 예를 들어, dCas9에 결합력(binding affinity)을 가지는 것일 수 있다. 상기 Agent는, 예를 들어, 항-dCas9 항체(anti-dCas9 antibody) 또는

항체 변이체(antibody variant)일 수 있다. 상기 항체 변이체(antibody variant)는, 예를 들어, Fab(antigen-binding fragment), F(ab)'₂, 단일특이성 Fab₂(Monospecific Fab₂), 이중특이성 Fab₂(Bispecific Fab₂), 삼중특이성 Fab₂(Trispecific Fab₂), 1가 Ig(Monovalent Ig), scFv(single-chain variable fragment), 이중특이성 이중체(Bispecific Diabody), scFv-Fc(single-chain variable fragment-fragment crystallizable), Minibody, IgNAR(immunoglobulin new antigen receptor), V-NAR(Variable-New Antigen Receptor), hIgG(heavy chain Immunoglobulin G), 및 VhH(variable domain of heavy chain antibody) 중 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[1460]

[1461] 상기 dCas9-리포터 검출을 위하여, 상기 특정 세포에 gRNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 처리할 수 있다.

[1462] 상기 gRNA은 gRNA 표적 서열(gRNA target sequence)에 결합하는 것일 수 있다. 상기 gRNA 표적 서열(gRNA target sequence)은 gRNA에 대한 센스(sense) 서열을 포함할 수 있다. 상기 gRNA 표적 서열(gRNA target sequence)은 gRNA에 대한 안티센스(antisense) 서열을 포함할 수 있다. 상기 gRNA 표적 서열(gRNA target sequence)은 비표적 원염색체에는 존재하지 않으나, 표적화된 염색체 또는 인공 재조합 염색체에는 존재하는 서열 중 선택될 수 있다. 상기 gRNA 표적 서열(gRNA target sequence)은 donor DNA에 의하여 비표적 원염색체의 표적 서열에 삽입된 것일 수 있다. 상기 비표적 원염색체 및 상기 표적 서열은 전술하였다.

[1463] 상기 gRNA 표적 서열 및/또는 gRNA의 후보군은 in silico 고안을 통하여 추출할 수 있다.

[1464]

[1465] 일 구체예에 의하면,

[1466] 특정 세포 및 비표적 원세포가 혼합된 배지(media)에서, dCas9-리포터(dCas9-Reporter) 검출에 의하여 상기 특정 세포를 선별할 수 있다.

[1467] 예를 들어, 상기 특정 세포는 gRNA 표적 서열을 포함하는 표적화된 염색체 또는 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다. 이때, gRNA, dCas9 및 리포터 압타머(Reporter Aptamer)를 처리하고, 상기 리포터 압타머(Reporter Aptamer)에 포함된 표지자 검출을 통하여 비표적 원세포로부터 특정 세포를 선별할 수 있다.

[1468] 둘 이상의 특정 세포가 혼합된 배지(media)에서, dCas9-리포터(dCas9-Reporter) 검출에 의하여 원하는 하나의 특정 세포를 선별할 수 있다.

[1469] 예를 들어, 상기 둘 이상의 특정 세포가 마이크로세포의 집합이고, 상기 원하는 하나의 특정 세포가 표적화된 염색체를 포함하는 마이크로세포인 경우, 상기 표적화된 염색체는 gRNA 표적 서열을 포함할 수 있다. 이때, gRNA, dCas9 및 리포터 압타머(Reporter Aptamer)를 처리하고, 상기 리포터 압타머(Reporter Aptamer)에 포함된 표지자 검출을 통하여 마이크로세포의 집합으로부터

표적화된 염색체를 포함하는 마이크로세포를 선별할 수 있다.

[1470]

[1471] 또 다른 구현예에 의하면,

[1472] 상기 특정 세포는 FISH(Fluorescence in situ hybridization)에 의하여 선별될 수 있다. 상기 FISH의 일 예로, 항체-리포터를 이용할 수 있다. 상기 항체-Reporter는 염색체의 특이 응축 구조 및/또는 염색체의 특정 서열에 대한 항체의 결합력을 이용하여 표적 서열을 검출하는 것이다. 상기 항체-리포터를 이용한 FISH는 공지된 방법을 이용할 수 있다.

[1473] 상기 특정 세포는 항체 표적 서열(antibody target sequence)을 포함하는 염색체를 포함할 수 있다.

[1474] 이때, 상기 항체 표적 서열(antibody target sequence)을 포함하는 염색체는 표적화된 염색체, 인공 재조합 염색체 및/또는 최종 재조합 염색체일 수 있다. 상기 표적화된 염색체, 인공 재조합 염색체 및 최종 재조합 염색체 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.

[1475] 상기 FISH 검출을 위하여, 상기 특정 세포에 항체-Reporter를 처리할 수 있다. 상기 항체-리포터는 1차 항체 및 리포터의 연결된 구조체를 의미할 수 있다. 뿐만 아니라, 상기 항체-리포터는 1차 항체의 일 영역에 결합력을 가지는 2차 항체 및 리포터의 연결된 구조체를 의미할 수 있다. 이 경우, 항체-리포터의 처리는 1차 항체 처리 이후, 2차 항체-리포터 구조체를 시계열적으로 제공해주는 것을 포함할 수 있다.

[1476] 상기 항체는 염색체 상의 항체 표적 서열(antibody target sequence)에 결합하는 것일 수 있다.

[1477] 상기 항체 표적 서열 및/또는 항체의 후보군은 *in silico* 고안을 통하여 추출할 수 있다.

[1478]

[1479] 일 구체예에 의하면,

[1480] 둘 이상의 특정 세포가 혼합된 배지(media)에서, FISH 검출에 의하여 원하는 하나의 특정 세포를 선별할 수 있다.

[1481] 이때, 상기 둘 이상의 특정 세포는 표적화 세포, 마이크로세포, 제1 융합세포, 제2 융합세포 및 최종 재조합 세포 중 선택된 둘 이상일 수 있다.

[1482] 예를 들어, 상기 둘 이상의 특정 세포가 제1 융합세포 및 제2 융합세포인 경우, 상기 제2 융합세포는 항체 표적 서열을 포함하는 인공 재조합 염색체를 포함할 수 있다. 이때, 항체-리포터를 처리하고, 상기 리포터에 포함된 표지자 검출을 통하여 제1 융합 세포로부터 제2 융합 세포를 선별할 수 있다. 상기 항체는 항체 표적 서열(antibody target sequence)에 결합하는 것일 수 있다. 상기 항체 표적 서열은 상기 인공 재조합 염색체의 일 영역이다.

[1483]

[1484] 본 명세서에 의해 개시되는 내용의 일 태양은 하나 이상의 인공 재조합

- 염색체를 포함하는 세포를 이용한 동물의 생산 방법에 관한 것일 수 있다.
- [1485] 상기 동물의 생산 방법은 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 이용한 것일 수 있다.
- [1486] 상기 동물은 비인간 동물일 수 있다.
- [1487] 이때, 상기 비인간 동물은 마우스, 래트, 토끼, 염소, 양, 돼지, 소, 말 또는 원숭이 등일 수 있으나, 이에 제한된 것을 아니다.
- [1488] 상기 동물은 형질전환 비인간 동물일 수 있다.
- [1489] 이때, 상기 형질전환은 하나 이상의 인공 재조합 염색체에 의한 것일 수 있다.
- [1490] 이때, 상기 형질전환 비인간 동물은 야생형 비인간 동물과 비교하여 하나 이상의 다른 표현형(phenotype)을 가지는 것일 수 있다. 상기 하나 이상의 다른 표현형은 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체에 의한 것일 수 있다.
- [1491] 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [1492] 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 제2 융합세포 또는 최종 재조합 세포일 수 있다.
- [1493] 상기 제2 융합세포 및 상기 최종 재조합 세포 관련 설명은 상기에 기술한 바와 같다.
- [1494]
- [1495] 체세포 핵 이식(Somatic cell nuclear transfer; SCNT)
- [1496] 본 명세서에 개시된 일 실시예에 의하면, 상기 제2 융합세포 또는 상기 최종 재조합 세포로부터 제작된 산자를 제공한다.
- [1497] 본 명세서에 개시된 다른 실시예에 의하면, 상기 제2 융합세포 또는 상기 최종 재조합 세포로부터 산자 제작 방법을 제공한다.
- [1498] 상기 제2 융합세포 또는 상기 최종 재조합 세포로부터 제작된 산자는 SCNT를 통해 제작될 수 있다. 상기 SCNT는 상기 제2 융합세포 또는 상기 최종 재조합 세포로부터 공여 핵을 수득하고, 탈핵 난자에 상기 공여 핵을 이식하여 복제란을 제작하고, 상기 복제란을 대리모의 자궁에 이식하여 산자를 발생시키는 것으로, 상기 SCNT는 공지의 방법을 이용한 것일 수 있다. 상기 공지된 방법은 Campbell KH et al.("Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line", 1996, Nature. 380 (6569): 64-66); Gupta, M. K et al.("Transgenic Chicken, Mice, Cattle, and Pig Embryos by Somatic Cell Nuclear Transfer into Pig Oocytes", 2013, Cellular Reprogramming. 15 (4): 322-328); 또는 Li, J et al.("Human embryos derived by somatic cell nuclear transfer using an alternative enucleation approach", 2009, Cloning and Stem Cells. 11 (1): 39-50) 등을 등을 참고할 수 있으며, 다만 이에 제한된 것을 아니다.
- [1499]
- [1500] 배아(embryo)로부터 발생
- [1501] 본 명세서에 개시된 일 실시예에 의하면, 상기 제2 융합세포 또는 상기 최종

제조합 세포로부터 제작된 산자를 제공한다.

[1502] 본 명세서에 개시된 다른 실시예에 의하면, 상기 제2 융합세포 또는 상기 최종 제조합 세포로부터 산자 제작 방법을 제공한다.

[1503] 상기 제2 융합세포 또는 상기 최종 제조합 세포로부터 제작된 산자는 배아(embryo)의 발생을 통해 제작될 수 있다. 상기 배아(embryo)의 발생은 배아(embryo)를 대리모의 자궁에 착상시켜 상기 배아(embryo)로부터 산자를 발생시키는 것으로, 공지된 방법을 이용한 것일 수 있다.

[1504] 이때, 상기 배아(embryo)는 상기 제2 융합세포 또는 상기 최종 제조합 세포일 수 있다.

[1505]

[1506] 배반포 주입 (Blastocyst Injection)

[1507] 본 명세서에 개시된 일 실시예에 의하면, 상기 제2 융합세포 또는 상기 최종 제조합 세포로부터 제작된 산자를 제공한다.

[1508] 본 명세서에 개시된 다른 실시예에 의하면, 상기 제2 융합세포 또는 상기 최종 제조합 세포로부터 산자 제작 방법을 제공한다.

[1509] 상기 제2 융합세포 또는 상기 최종 제조합 세포로부터 제작된 산자는 배반포 주입 (Blastocyst Injection)을 통해 제작될 수 있다. 상기 배반포 주입(Blastocyst Injection)은 유전자 조작된 배아 줄기세포(embryonic stem cell; ES cell)를 포배에 이식하여 키메라 배반포(Chimeric Blastocyst)를 제작하고, 상기 키메라 배반포(Chimeric Blastocyst)를 대리모의 자궁에 착상시켜 산자를 발생시키는 것으로, 공지된 방법을 이용한 것일 수 있다.

[1510] 이때, 상기 유전자 조작된 배아 줄기세포(embryonic stem cell; ES cell)는 상기 제2 융합세포 또는 상기 최종 제조합 세포일 수 있다.

[1511]

[1512] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 상세히 설명하고자 한다.

[1513] 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들의 실시예에 의해 제한되거나 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 있어 자명할 것이다.

[1514]

[1515] 실시예 **1. 단일 RRS를 이용한 인공 제조합 염색체의 생산 및 이를 이용한 형질전환 동물 제조**

[1516] 본 실시예는 본 명세서에 의해 개시되는 염색체를 이용한 형질전환 도입 방법을 증명하기 위한 구체적인 실험예로, 염색체 간의 제조합을 통해 특정 위치에 목적 유전자를 삽입된 인공 제조합 염색체를 가지는 세포 및 이를 이용한 형질전환 마우스 생산 방법에 관한 것이다. 하기에 설명은 단일 RRS를 이용해 IgH(Immunoglobulin heavy) locus의 Variable region의 말단에 형광 단백질 유전자가 삽입된 세포 및 이를 이용한 형질전환 마우스 제조에 대한 전반적인 실시예로, 인공 제조합 염색체를 이용한 일 예일뿐, 이에 제한되지 않는다.

목적하는 인공 재조합 염색체는 하기에 기재된 실시예를 기초로 하여 다양하게 변경하여 실시함으로 생산할 수 있으며, 또한, 하기에 기재된 실시예 외에도 다양한 방법을 추가하여 실시함으로서 생산할 수 있다.

[1517]

[1518] 실시예 1-1. 표적화 세포 제작을 위한 벡터 설계(Vector Construction)

[1519] Mouse embryonic stem cell (mESC)을 표적화 mESC로 생산하기 위해 제1 DNA donor(제1 vector)가 설계되었고, Human fibroblast를 표적화 human fibroblast로 생산하기 위해 제2 DNA donor(제2 vector)가 설계되었다.

[1520] PCR reaction에 사용된 taq은 general PCR taq으로 GoTaq G2 green (Promega, USA) 그리고 blunt-end 생산용 taq은 PrimeSTAR (Takara, Japan)을 사용하였으며 thermocycler는 SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하였다. 클론 생산 및 DNA 염기서열 분석에 사용된 T-vector는 T-blunt vector (Solgent, Korea)를 사용하였으며 Competent cell은 HIT Competent Cells (RBC Bioscience, USA)를 사용하였다. DNA 재조합에 사용된 모든 제한 효소는 New England Biolabs (NEB) 사 제품을 사용하였으며, DNA ligation에 사용된 ligase는 T4 DNA ligase (Takara, Japan)를 사용하였다.

[1521] Mouse embryonic stem cell (ESC) 타게팅에 사용될 제1 DNA donor(제1 vector)는 mouse의 IgH locus의 Variable region (IgHV)의 5' 말단 타게팅에 사용될 flanking region sequence (M002), neomycin 저항성 유전자(NeoR), loxp, mouse의 IgHV 5' 말단 타게팅에 사용될 flanking region sequence (M001), negative selection에 사용될 TK 유전자, 박테리아 positive selection에 사용될 ampicillin 저항성 유전자(AmpR) 그리고 replication origin으로 구성된다. NeoR의 경우 EcoRI site 포함하는 SV40 promoter forward gene specific primer (GSP) (표 5. SEQ ID NO: 1) 그리고 loxp 서열과 SalI site를 포함하는 bridge, reverse primers (표 5. SEQ ID NO: 2, 3)를 이용하여 overhang-PCR 방법으로 pCMV6-AC-GFP vector를 주형으로 증폭하였다. M001은 SalI과 XhoI site를 포함하는 GSP (표 5. SEQ ID NO: 4, 5), 그리고 M002는 BamHI과 EcoRI을 포함하는 GSP (표 5. SEQ ID NO: 6, 7)를 이용하여 J1 mouse genomic DNA를 주형으로 PCR 증폭하였다. 모든 PCR product는 T-blunt vector에 ligation 후 클로닝하여 DNA 염기서열을 확인 하였다. 모든 클론으로부터 얻은 플라스미드는 양 말단 제한효소 site에 작용하는 제한효소를 이용하여 잘라내고 BamHI과 XhoI이 처리된 pOSdupdel vector에 T4 DNA ligase를 이용하여 연결하였다(도 21).

[1522] Human fibroblast 타게팅에 사용될 제2 DNA donor(제2 vector)는 human의 IgH locus의 Variable region (IgHV)의 5' 말단 타게팅에 사용될 flanking region sequence (H002), turboGFP-NeoR, loxp, human의 IgHV 5' 말단 타게팅에 사용될 flanking region sequence (H001), negative selection에 사용될 TK 유전자, 박테리아 positive selection에 사용될 AmpR 그리고 replication origin으로 구성된다. TurboGFP-NeoR의 경우 주형 vector(pCMV6-AC-GFP)의 multi cloning site

(MCS)를 제거하기 위하여 CMV promoter와 turboGFP-NeoR의 PCR products를 blunt end ligation 하였다. CMV promoter는 HindIII site를 포함하는 forward GSP (표 5. SEQ ID NO: 8)와 reverse GSP (표 5. SEQ ID NO: 9)로 PrimeSTAR를 이용하여 overhang-PCR 하였고, turboGFP-NeoR는 forward GSP (표 5. SEQ ID NO: 10) 와 loxp 서열 그리고 SalI site를 포함하는 reverse primers (표 5. SEQ ID NO: 2, 3)로 PrimeSTAR를 이용하여 overhang-PCR하였다. H001은 SalI과 XhoI site를 포함하는 GSP (표 5. SEQ ID NO: 11, 12), 그리고 H002는 BamHI과 HindIII를 포함하는 GSP (표 5. SEQ ID NO: 13, 14)를 이용하여 human fibroblast genomic DNA를 주형으로 PCR 증폭하였다. 모든 PCR products는 T-blunt vector에 ligation 후 클로닝하여 DNA 염기서열을 확인 하였다. 모든 클론으로부터 얻은 플라스미드는 양 말단 제한 효소 site에 작용하는 제한효소를 이용하여 잘라내고 BamHI과 XhoI 처리된 pOSdupdel vector에 T4 DNA ligase를 이용하여 연결하였다 (도 22).

[1523]

[1524] [표5]

백터 제조에 이용된 프라이머 및 그의 DNA 서열

SEQ ID NO:	프라이머	DNA 서열
1	Neo ^R -EcoRI-forward	gaattcGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTG
2	Neo ^R -loxp-bridge	CTTATCATGTCTGTATACCGTCGcgccaccataacttcgtata gcatacattatacgaagtatcggtcgacgctcgg
3	Neo ^R -SalI-reverse	CCGACGTCGACCGATAACTT
4	M001-SalI-forward	ACGCgtcgacAGGATTTGGACCTGAGCATACT
5	M001-XhoI-reverse	CCGctcgagGAGGCCAAGAGAGGCTAAAGCC
6	M002-BamHI-forward	CGCggatccCATTCTCCCATCTCCAATTTAT
7	M002-EcoRI-reverse	GgaattcTTTTGTAACCCCTAGACAGATG
8	CMV-HindIII-forward	aagcttCCGCCATGTTGACATTG
9	CMV-reverse	CGGCCGCCCTATAGTG (5'-phosphorylated)
10	GFP-Neo-forward	AGATGGAGAGCGACGAGAGCGGCCT (5'-phosphorylated)
11	H001-SalI-forward	ACGCgtcgacTGCGTGAGATCTTTTCTTGGGG
12	H001-XhoI-reverse	CCGctcgagTCCACACACCCAAGTCATTCGA
13	H002-BamHI-forward	CGCggatccCTGAAGCCAACCAAGTTTAGGA
14	H002-HindIII-reverse	CCCaaagcttCACATGGTGAACCCAAACTC
15	CMV-XhoI-forward	ATCctcgagGACATTGATTATTGACTAG

16	CMV-KpnI-r everse	ATTggtaccCTCGGCCGCCCTATAG
17	Hygro-loxm2/ 71-KpnI-forw ard	ATAggtaccTACCGTTCGTATATGGTTTCTTATACGA AGTTATGAATTCCACCATGAAAAAGCCTGAACTC AC
18	Hygro-lox66- SallI-reverse	ATCgtcgacTACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGA AGTTATGGATCCTAAGATACATTGATG
19	PuroΔTK-lox 71-XhoI-forw ard	ATTctcgagATAACTTCGTATAATGTATGCTATACGA ACGGTAATCGATCCCCAGCATGCCTGCTATTGTCT TC
20	PuroΔTK-lox m2/66-HindII I-reverse	CTCaagcttATAACTTCGTATATGGTTTCTTATACGA ACGGTACTTAAGCACCATGGGGACCGAGTACAAG CCCAC
21	Neo-HindIII-f orward	CGCaagcttGTGTGTCAGTTAGGGTGTG
22	Neo-SallI-reve rse	ATCgtcgacTAAGATACATTGATGAGTTTG

[1525]

[1526] 실시예 1-2. 단일 RRS가 삽입된 염색체를 포함하는 세포 제조

[1527] 실시예 1-2-1. loxP가 삽입된 인간 염색체를 포함하는 표적화 인간 세포 제조

[1528] 사용된 human dermal fibroblast(hDF)는 세포바이오(Seoul, Korea)에서 구매하였다. 이 세포의 증식 및 유지를 위한 기본 배양액으로 10% fetal bovine serum (FBS; Corning, Mannasas, VA, USA), 1% penicillin-streptomycin (Corning, Mannasas, VA, USA)가 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Corning, Mannasas, VA, USA)배지를 사용하였으며, 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 배양하였다. Transient transfection은 lipofectamine 3000(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 세포수를 1×10⁶ cells로 하여 FBS와 항생제가 들어가지 않은 DMEM배지를 첨가하였다. 여기에 NotI(New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) enzyme으로 single cut한 제2 DNA donor(제2 vector) 10μg을 첨가한 후 lipofectamin 3000 reagent를 섞어준 후 상온에서 5분간 정치 시킨 후 transfection 하였다. 세포는 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 24시간 내지 48시간동안 배양하였다(도 25).

[1529] human DF에 제2 DNA donor(제2 vector)의 삽입 여부를 확인하기 위해, 제2 DNA donor(제2 vector) 내에 존재하는 antibiotics resistance gene을 사용하여 세포를 선별하였다. human DF에 삽입된 제2 DNA donor(제2 vector) 내에 존재하는Neomycin resistance gene의 발현을 통해 세포를 선별하였다. 약물은

G418(Life technologies, NY, USA)을 사용하였으며, G418의 세포 선별 농도는 Cell counting kit-8(CCK-8; Dogindo, Kumamoto, Japan)로 측정하였다. hDF에 제2 DNA donor(제2 vector)를 Transfection시키고, 48시간 후에 G418을 400 μ g/ml로 처리하였다. 세포의 선별 과정은 4 내지 6주간 진행되었으며, 형성된 Loxp inserted clone을 fulling하여 배양하였다. 선별된 hDF는 형광 현미경(Olympus Corporation, Tokyo, Japan)을 통해 GFP발현을 통해 확인하였다(도 25).

[1530] 그 결과, 선별한 human dermal fibroblast에서 제2 DNA donor(제2 vector)에 tagging 된 GFP의 발현이 확인되었다. 이를 바탕으로 제2 DNA donor(제2 vector)가 human dermal fibroblast 내에 삽입되어 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[1531]

[1532] *실시예 1-2-2. loxP가 삽입된 마우스 염색체를 포함하는 표적화 마우스 세포 제조*

[1533] 사용된 J1 mouse embryonic stem cell(J1 mESC)은 macrogen(Seoul, Korea)에서 기증 받았다. J1 mESC은 0.1% gelatin이 coating 된 dish를 사용하였으며, 이 세포의 증식 및 유지를 위한 기본 배양액 2i 배지를 사용하였는데, 이 배양액은 FBS가 없는 N2B27배지에 MEK inhibitor PD0325901 (1 μ M) and GSK3 inhibitor CHIR99021 (3 μ M) (both from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1,000 U/ml LIF (Millipore, Billerica, MA, USA)을 첨가하여 만들었다, 세포는 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 배양하였다. Transient transfection은 lipofectamine 3000을 사용하여 수행하였다. 세포 수를 1 \times 10⁶ cells로 하여 FBS와 항생제가 들어가지 않은 Opti-MEM (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) 배지를 첨가하였다. 여기에 NotI으로 single cut한 제1 DNA donor(제1 vector) 10 μ g을 첨가한 후 lipofectamine 3000 reagent를 섞어 준 후 상온에서 5분간 정치시킨 후 transfection 하였다. 세포는 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 24시간 내지 48시간동안 배양하였다(도 26).

[1534] mESC에 제1 DNA donor(제1 vector)의 삽입 여부를 확인하기 위해, 제1 DNA donor(제1 vector) 내에 존재하는 Neomycin resistance gene의 발현을 통해 세포를 선별하였다. 약물은 G418(Life technologies, Grand island, NY, USA)을 사용하였으며, G418의 세포 선별 농도는 Cell counting kit-8(CCK-8; Dogindo, Kumamoto, JAPAN)로 측정하였다. mESC에 제1 DNA donor(제1 vector)를 Transfection 하고 48시간 후에 G418을 150 μ g/ml로 처리하였다. 세포의 선별 과정은 4 내지 6주간 진행되었으며, 형성된 Loxp inserted clone을 fulling하여 배양하였다. 선별된 mESC는 형광현미경을 통해 mCherry발현을 통해 확인하였다(도 26).

[1535] 그 결과, 선별한 mES Cell에서 제1 DNA donor(제1 vector)에 tagging 된 mCherry의 발현이 확인되었다. 이를 바탕으로 제1 DNA donor(제1 vector)가 mES Cell 내에 삽입되어 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[1536]

[1537] 실시예 1-3. 표적화 인간 세포를 이용한 마이크로세포 제조

[1538] Micronuclei의 형성은 colcemid(Life technologies, Grand island, NY, USA)를 사용하여 진행하였다. G418을 사용하여 선별이 끝난 human dermal fibroblast을 100mm dish에 1×10^6 개를 넣어 준 후, 다음날 20% FBS가 담긴 DMEM으로 배지를 교환해 준 후 colcemid $0.1 \mu\text{g/ml}$ 로 처리하고, 5% CO_2 , 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. Micronucleation이 유도된 Human세포를 tryLE(Life technologies, Grand island, NY, USA)을 사용하여 떼어준 후, Serum-free DMEM로 씻어준 후 1000rpm, 5분간 원심분리(LABOGENE CO., Ltd, KOREA) 하였다. 원심분리가 끝난 세포는 미리 데워 둔 serum-free DMEM : percoll ((Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1:1 (v:v))에 부유하고, cytochalsin B(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 최종 농도가 $10 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 처리하였다. 16000g, 34°C 내지 37°C에서 1시간 내지 1시간 30분 동안 원심분리(LABOGENE) 하여 whole cell과 microcell을 분리하였다. 분리된 whole cell과 microcell을 50ml tube로 옮기고 serum-free DMEM을 넣어 준 후, 500g에서 10분간 원심분리 한다. 상등액은 조심스레 제거하고 tube표면에 붙은 pellet을 serum-free DMEM 10ml을 넣어주고 $8 \mu\text{m}$ filter(GE healthcare, CHICAGO, IL, USA)를 이용하여 $8 \mu\text{m}$ 이하 크기의 microcell을 분리한다. 분리한 microcell이 포함된 상등액은 다시 400g에서 10분간 원심분리한다. 원심분리된 microcell은 $8 \mu\text{m}$ filter 사용 방법과 동일한 방법으로 $5 \mu\text{m}$ filter를 사용하였다. 최종 분리된 microcell은 Nikon eclipse TS100 광학 현미경(Nikon Instruments, Melville, NY, USA)을 통해 counting하였다.

[1539] 그 결과, human dermal fibroblast에 colcemid 처리 후 micronuclei가 형성됨을 광학현미경으로 확인하였으며, 이것은 기존 논문에 기재된 모습과 동일함을 확인하였다. 또한 형성된 micronuclei를 cytochalasin B을 통해 Enuclation 시키고 microcell의 크기 별 분리 과정 시 광학 현미경 관찰을 통해 사이즈 별로 분리됨을 확인하였다. 이를 통해서 표적화 인간 세포, 즉, human dermal fibroblast로부터 microcell의 생성 및 분리가 잘 되었음을 확인하였다(도 27).

[1540]

[1541] 실시예 1-4. 마이크로세포-표적화 마우스 세포의 융합세포 제조

[1542] 분리된 microcell(human microcell)과 수용체 세포로 사용할 mESC를 준비한다. mESC는 TryLE를 처리하고 원심분리 한다. 원심분리된 mESC를 1XDPBS (Welgene, Korea)로 Washing하여 주고 Hemacytometer를 사용하여 세포 수를 계산한다. human microcell과 mESC의 융합은 HVJ-E protein(Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였으며, suspension method 방법으로 진행하였다. 계산된 human microcell과 mESC의 비율은 1:4가 되도록 사용하였다. 각각 준비된 human microcell과 mESC는 차가운 1x cell fusion buffer $500 \mu\text{l}$ 을 이용하여 washing 하여 준다. Buffer에 담긴 human microcell과 mESC를 300g로 5분간 4°C에서 원심분리 한다. mESC의 2×10^5 당 1x cell fusion buffer를 $25 \mu\text{l}$ 씩 넣어주고, human

microcell에도 동일한 volume의 1× cell fusion buffer를 넣어준다. mESC와 human microcell을 섞어주고 HVJ-E protein을 5 내지 10 μ l을 넣어준 후 얼음에서 5분간 방치한다. Mixture를 37°C water bath에서 15분간 방치한다. 이때 5분 간격으로 tapping해 준다. Human microcell과 mESC의 세포 융합이 끝난 후 300g에서 5분간 원심분리하여 남아있는 HVJ-E protein을 제거한다. 융합된 세포는 mESC의 배양 배지가 담긴 dish에 넣어 준 후, 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

[1543] 그 결과, human microcell과 mESC의 세포 융합 과정 후 배양 배지에 넣어준 후 현미경 관찰 시, mESC와 microcell과 융합되는 모습을 관찰할 수 있었다. HVJ-E protein을 사용한 방법이 suspension method(mESC의 세포 증식 모양이 colony 형태이기 때문에 single 세포로 실험을 진행하기 위해 수행)라, 실시간 융합 과정은 확인할 수 없으나, 간접적으로 확인할 수 있다 (도 28).

[1544]

[1545] 실시에 1-5. 융합세포를 이용한 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포 제조

[1546] 실시에 1-5-1. 융합세포를 이용한 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포 제조

[1547] 실시예 1-4에서 제조된 융합세포 내에 인공 재조합 염색체를 생산하기 위해, 상기 융합세포의 수를 1×10⁶ cells로 하여 FBS와 항생제가 들어가지 않은 opti-MEM배지 100 μ l를 첨가하였다. 여기에 Cre 재조합효소를 발현시키기 위해 pCMV-Cre(System Biosciences, LLC, Palo Alto, CA, USA) vector 10 μ g을 첨가하여 125V, 5ms, 2 pulse로 transfection 하였다. 2i배지 300 μ l 첨가하여 세포를 잘 섞어 준 후 100mm dish에 세포를 넣어 준 후, 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 48시간동안 배양하여 염색체간 재조합을 유도하였다.

[1548] 48시간 후, 융합세포에 pCMV-Cre vector를 transfection 하지 않은 그룹(-Cre)과 pCMV-Cre vector를 transfection 해 준 그룹(+Cre) 모두 G418 150 μ g/ml을 처리하였다. 10일 내지 14일동안 세포를 선별하였으며, 2일 내지 3일 간격으로 배지 교환 시 G418 150 μ g/ml을 함께 처리하였다. 선별된 세포의 관찰은 형광 현미경(Olympus)을 통해 확인하였다.

[1549] 그 결과, 융합세포에서 Cre recombinase에 의해 loxp site의 specific한 translocation이 발생함을 확인하였다. 즉, human microcell을 통해 hDF의 염색체(제2 DNA donor에 의해 삽입된 GFP 유전자를 포함하는 염색체)가 mESC 내로 이동하였고, hDF의 염색체(제2 DNA donor에 의해 삽입된 GFP 유전자를 포함하는 염색체)에 위치한 loxP와 mESC의 염색체(제1 DNA donor에 의해 삽입된 mCherry 유전자를 포함하는 염색체)에 위치한 loxP의 페어링 및 Cre recombinase에 의해 재조합된 인공 재조합 염색체가 생성되었다. 생성된 인공 재조합 염색체는 mcherry의 발현이 이루어지던 mESC의 염색체에서 단독으로 GFP 발현이 일어남을 통해 확인하였다. 이를 통해, human microcell을 통한 chromosome의 transfer 및 Cre-loxP를 이용한 염색체간 재조합이 가능함을 확인하였다(도 29 내지 도 31).

[1550]

[1551] 실시예 1-5-2. *FISH(Fluorescence In Situ Hybridization)*를 이용한 인공 제조합 염색체 확인

[1552] *FISH(Fluorescence In Situ Hybridization)*의 과정

[1553] Mouse BAC probe와 human BAC probe를 제작하기 위하여 Mouse는 RP23-192K16 그리고 human은 CTD-2572o2를 사용하였다. Plasmid Maxi kit (Qiagen, Germany)를 이용하여 BAC DNA를 준비하고 Tag FISH Tag™ DNA Multicolor Kit (Thermo Fisher, USA)를 이용하여 BAC probe를 제작하였다. Mouse BAC probe는 alexa 488 형광 dye를 labeling 하였고, human BAC probe는 alexa 555 형광 dye를 labeling 하였다 (도 34).

[1554] Fluorescence In Situ Hybridization의 사용된 슬라이드는, 세포의 중기염색체의 확산을 위해 colcemid(Life technologies, Grand island, NY, USA)와 hypotonic solution(75Mm KCl)을 처리 하였으며, methanol : acetic acid (3:1)을 이용하여 고정하는 기본적인 방법으로 제작하였다.

[1555] FISH실험은 FISH Tag™ DNA Multicolor Kit (Thermo Fisher, USA) 기본 지침에 따라 진행하였다. 슬라이드를 0.05 % pepsin (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) /10mM HCl 용액에서 37°C에서 10 분 동안 투과화 시켰다. 실온에서 1분간 에탄올 시리즈 (70 %, 85 %, 100 %)를 통해 탈수시킨 후 공기 건조시켰다. 하이브리드 화를 위해, 슬라이드를 70 % 포름 아미드(Sigma Aldrich), 2× SSC(Sigma Aldrich), pH 7.0에서 72°C에서 2 분 동안 변성시키고, 각각 -20°C 에탄올 시리즈 (70 %, 80 %, 95 %)를 통해 2 분 동안 탈수시키고, 공기 건조하였다. Human BAC probe와 mouse BAC probe의 최종 농도를 각각 4ng/μl으로 하였으며, 각 DNA probe 2.5μl와 65 % 포름 아미드, 2× SSC를 72°C에서 5 분 동안 변성시키고 얼음에서 냉각하였으며, 각 슬라이드에 10μl을 처리하고 유리 coverslip을 덮어 준 후 rubber cement로 사면을 밀봉하였다. 습윤한 상태가 유지되는 챔버에서 37°C에서 하룻밤 동안 하이브리드 화를 수행 하였다. 그 후, 슬라이드를 2× SSC에 담가 커버 슬립을 제거하고, 실온에서 0.4× SSC로 평형화시키고, 73°C에서 2 분 동안 0.4× SSC에 배치 한 후, 실온에서 인산 완충 식염수 (PBS)를 첨가 하여 세척하였다. 핵 염색은 Vectashield mounting medium과 DAPI(Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)를 사용하였다.

[1556] Airyscan 을 사용하여 LSM 800 공초점 현미경(Carl Zeiss, Germany) 하에서 슬라이드를 확인하였다. 40× / 1.2 Plan-Apochromat 대물 렌즈, 63× / 1.4 NA Plan-Apochromat 오일 대물 렌즈로 슬라이드를 관찰하였으며, 공초점 현미경 이미지는 Zeiss Zen Blue 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[1557]

[1558] *FISH(Fluorescence In Situ Hybridization)*의 결과

[1559] 인공 제조합 염색체를 포함하는 세포를 선별한 후, human 14번 염색체 특이적인 Human BAC probe(alexa 555)및 mouse 12번 염색체에 특이적인 mouse

BAC probe(alexa 488)를 사용하여 FISH 실험을 수행하였다. 세포의 염색체는 DAPI 염색을 통해 40배율에서 확인하였으며, 63배율의 오일 대물렌즈를 통하여 확인하였다. 인공 재조합 염색체를 포함하는 융합세포에서 Human BAC probe(alexa 555)와 mouse BAC probe(alexa 488)가 같은 위치에서 형광 발광하는 것으로 보아 4.1Mb의 mouse 12번 염색체 말단부위가 human의 14번 염색체 말단으로 이동한 것이 확인되었다 (도 34 및 도 35).

[1560]

[1561] 실시예 1-6. 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 이용한 형질전환 동물 제조

[1562] 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 이용해 형질전환 동물을 제조하기 위해, 상기 실시예 1-5에서 수득한 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에 FIAU를 처리한다. 처리 후 수득한 세포는 배반포 주입(Blastocyst Injection)을 통해 포배에 이식하여 키메릭 배반포(Chimeric Blastocyst)를 제작한다. 제작된 키메릭 배반포(Chimeric Blastocyst)는 대리모의 자궁에 착상시켜 마우스 산자를 발생시킨다. 생산된 마우스 산자는 키메릭 형질전환 마우스이고, 키메릭 형질전환 마우스의 교배를 이용해 heterozygous 형질전환 마우스 또는 homozygous 형질전환 마우스를 제조한다.

[1563] 생산된 형질전환 마우스는 마우스의 게놈 상의 IgHV 5'말단에 GFP 유전자가 포함된 마우스이다. 이때, 상기 형질전환 마우스는 배반포 주입 외에도 다양한 방법으로 생산 가능하다.

[1564]

[1565] 실시예 2. 두 개의 RRS를 이용한 인공 재조합 염색체의 생산 및 이를 이용한 형질전환 동물 제조

[1566] 본 실시예는 본 명세서에 의해 개시되는 염색체를 이용한 형질전환 도입 방법을 증명하기 위한 구체적인 실험예로, 염색체 간의 재조합을 통해 특정 위치에 목적 유전자를 삽입된 인공 재조합 염색체를 가지는 세포 및 이를 이용한 형질전환 마우스 생산 방법에 관한 것이다. 하기에 설명은 두 개의 RRS를 이용해 IgH(Immunoglobulin heavy) locus의 Variable region의 말단에 항생제 저항성 유전자가 삽입된 세포 및 이를 이용한 형질전환 마우스 제조에 대한 전반적인 실시예로, 인공 재조합 염색체를 이용한 일 예일뿐, 이에 제한되지 않는다. 목적하는 인공 재조합 염색체는 하기에 기재된 실시예를 기초로 하여 다양하게 변경하여 실시함으로써 생산할 수 있으며, 또한, 하기에 기재된 실시예 외에도 다양한 방법을 추가하여 실시함으로써 생산할 수 있다.

[1567]

[1568] 실시예 2-1. 표적화 세포 제작을 위한 벡터 설계(Vector Construction)

[1569] Mouse embryonic stem cell (mESC)을 표적화 mESC로 생산하기 위해 제1 DNA donor(제1 vector)가 설계되었고, Human fibroblast를 표적화 human fibroblast로 생산하기 위해 제2 DNA donor(제2 vector)가 설계되었다.

[1570] PCR reaction에 사용된 taq은 general PCR taq으로 GoTaq G2 green (Promega,

USA) 그리고 blunt-end 생산용 taq은 PrimeSTAR (Takara, Japan)을 사용하였으며 thermocycler는 SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하였다. 클론 생산 및 DNA 염기서열 분석에 사용된 T-vector는 T-blunt vector (Solgent, Korea)를 사용하였으며 Competent cell은 HIT Competent Cells (RBC Bioscience, USA)를 사용하였다. DNA 재조합에 사용된 모든 제한 효소는 New England Biolabs (NEB) 사 제품을 사용하였으며, DNA ligation에 사용된 ligase는 T4 DNA ligase (Takara, Japan)를 사용하였다.

- [1571] Mouse embryonic stem cell (ESC) 타게팅에 사용될 제1 DNA donor(제1 vector)는 M002, CMV promoter, Loxm2/71, hygromycin 저항성 유전자 (HygroR), lox66, M001, negative selection에 사용될 TK 유전자, 박테리아 positive selection에 사용될 AmpR 그리고 replication origin으로 구성된다. CMV promoter의 경우 XhoI site를 포함하는 forward GSP (표 5. SEQ ID NO: 15)와 KpnI site를 포함하는 reverse GSP (표 5. SEQ ID NO: 16)를 이용하여 pCMV6-AC-GFP vector를 주형으로 overhang-PCR하였다. HygroR의 경우 KpnI site 그리고 loxm2/71를 포함하는 forward GSP (표 5. SEQ ID NO: 17)와 lox66그리고 SalI site를 포함하는 reverse GSP (표 5. SEQ ID NO: 18)를 이용하여 pSecTag2-hygroA vector를 주형으로 overhang-PCR 하였다. CMV promoter와 HygroR PCR product는 T-blunt vector에 ligation 후 클로닝하여 DNA 염기서열을 확인 하였다. 두 클론으로부터 얻은 플라스미드는 양 말단 제한효소 site에 작용하는 제한효소를 이용하여 잘라내고 XhoI과 SalI이 처리된 실시예 1-1의 제1 vector에 T4 DNA ligase를 이용하여 연결하였다(도 23).
- [1572] Human fibroblast 타게팅에 사용될 제2 DNA donor(제2 vector)는 H002, lox71, inverted puro Δ TK, loxm2/66, NeoR, H001, negative selection에 사용될 TK 유전자, 박테리아 positive selection에 사용될 AmpR 그리고 replication origin으로 구성된다. Inverted puro Δ TK의 경우 XhoI site 그리고 lox71을 포함하는 forward GSP (표 5. SEQ ID NO: 19)와 loxm2/66그리고 HindIII를 포함하는 reverse GSP (표 5. SEQ ID NO: 20)를 이용하여 합성DNA를 주형으로 overhang-PCR하였다. NeoR의 경우 HindIII를 포함하는 forward GSP (표 5. SEQ ID NO: 21)와 SalI을 포함하는 reverse GSP (표 5. SEQ ID NO: 22)를 이용하여 pCMV6-AC-GFP vector를 주형으로 overhang-PCR하였다. Lox71-Inverted puro Δ TK-loxm2/66과 NeoR PCR product는 T-blunt vector에 ligation 후 클로닝하여 DNA 염기서열을 확인 하였다. 두 클론으로부터 얻은 플라스미드를 양 말단 제한 효소 site에 작용하는 제한 효소를 이용하여 잘라내고 XhoI과 SalI이 처리된 실시예 1-1의 제2 vector에 T4 DNA ligase를 이용하여 연결하였다(도 24).

[1573]

[1574] 실시예 2-2. 2개의 RRS가 삽입된 염색체를 포함하는 세포 제조

[1575] 실시예 2-2-1. 2개의 loxP가 삽입된 인간 염색체를 포함하는 표적화 인간 세포 제조

- [1576] 사용된 human normal foreskin fibroblast cell line(BJ)은 ATCC(Manassas, VA, USA)에서 구매하였다. 이 세포의 증식 및 유지를 위한 기본 배양액으로 10% fetal bovine serum (FBS; Corning, Mannasas, VA, USA), 1% penicillin-streptomycin (Corning, Mannasas, VA, USA)가 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Corning, Mannasas, VA, USA)배지를 사용하였으며, 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 배양하였다. Transient transfection은 Nepa21(NEPAGENE Co., Ltd., Chiba, Japan) electroporator을 사용하여 수행하였다. 세포 수를 1×10⁶ cells로 하여 FBS와 항생제가 들어가지 않은 opti-MEM배지 100 μ l를 첨가하였다. 여기에 NotI으로 single cut한 제2 DNA donor(제2 vector) 10 μ g을 첨가하여 150V, 7.5ms, 2 pulse로 transfection 하였다. 10% FBS가 첨가된 배지를 300 μ l 첨가하여 세포를 잘 섞어 준 후 100mm dish에 세포를 넣어 준 후 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 24시간 내지 48시간동안 배양하였다.
- [1577] human 세포주인 BJ에 제2 DNA donor(제2 vector)의 삽입 여부를 확인하기 위해, 제2 DNA donor(제2 vector) 내에 존재하는 antibiotics resistance gene을 사용하여 세포를 선별하였다. BJ세포주는 삽입된 제2 DNA donor(제2 vector) 내에 존재하는 Neomycin resistance gene의 발현을 통해 세포를 선별하였다. 약물은 G418(Life technologies, NY, USA)을 사용하였으며, G418의 세포 선별 농도는 Cell counting kit-8(CCK-8; Dogindo, Kumamoto, JAPAN)로 측정하였다. BJ세포에 제2 DNA donor(제2 vector)를 Transfection시키고 48시간 후에 G418을 300 μ g/ml로 처리하였다. 세포의 선별 과정은 4 내지 6주간 진행되었으며, 형성된 Loxp inserted clone을 fulling하여 배양하였다.
- [1578] 그 결과, 제2 DNA donor(제2 vector)에 삽입되어 있는 antibiotic-resistance gene의 발현을 확인함으로써, control 그룹은 모두 선별기간동안 세포가 모두 사멸 되었으나, 제2 DNA donor(제2 vector)를 삽입한 그룹에서는 선별 기간 동안 colony가 확인되었다. 지속적인 antibiotic의 첨가에 의해서도 세포의 증식과 유지가 지속되는 것으로 보아 제2 DNA donor(제2 vector)의 발현이 지속으로 일어나고 있음을 알 수 있었다.
- [1579]
- [1580] 실시예 2-2-2. 2개의 loxP가 삽입된 마우스 염색체를 포함하는 표적화 마우스 세포 제조
- [1581] 사용된 J1 mouse embryonic stem cell(J1 mESC)은 macrogen(Seoul, Korea)에서 기증 받았다. J1 mESC은 0.1% gelatin이 coating 된 dish를 사용하였으며, 이 세포의 증식 및 유지를 위한 기본 배양액 2i 배지를 사용하였는데, 이 배양액은 FBS가 없는 N2B27배지에 MEK inhibitor PD0325901 (1 μ M) and GSK3 inhibitor CHIR99021 (3 μ M) (both from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1,000 U/ml LIF (Millipore, Billerica, MA, USA)을 첨가하여 만들었다. 세포는 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 배양하였다. Transient transfection은

Nepa21(NEPAGENE Co., Ltd., Chiba, Japan) electroporator을 사용하여 수행하였다. 세포 수를 1×10^6 cells로 하여 FBS와 항생제가 들어가지 않은 opti-MEM배지 $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 여기에 NotI으로 single cut한 제1 DNA donor(제1 vector) $10 \mu\text{g}$ 을 첨가하여 125V, 5ms, 2 pulse로 transfection하였다. 2배지 $300 \mu\text{l}$ 첨가하여 세포를 잘 섞어 준 후 100mm dish에 세포를 넣어 준 후 5% CO_2 , 37°C 의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 24시간 내지 48시간동안 배양하였다.

- [1582] mESC에 제1 DNA donor(제1 vector)의 삽입 여부를 확인하기 위해, 제1 DNA donor(제1 vector) 내에 존재하는 Hygromycin resistance gene의 발현을 통해 세포를 선별하였다. 약물은 hygromycin B(Fujifilm Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, JAPAN)을 사용하였으며, hygromycin의 세포 선별 농도는 Cell counting kit-8(CCK-8; Dogindo, Kumamoto, JAPAN)로 측정하였다. mESC에 제1 DNA donor(제1 vector)를 Transfection 하고 48시간 후에 hygromycin을 $32 \mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 처리하였다. 세포의 선별 과정은 4 내지 6주간 진행되었으며, 형성된 Loxp inserted clone을 fulling하여 배양하였다.
- [1583] 그 결과, 제1 DNA donor(제1 vector)에 삽입되어 있는 antibiotic-resistance gene의 발현을 확인함으로써, control 그룹은 모두 선별기간 동안 세포가 모두 사멸 되었으나, 제1 DNA donor(제1 vector)를 삽입한 그룹에서는 선별 기간 동안 colony가 확인되었다. 지속적인 antibiotic의 첨가에 의해서도 세포의 증식과 유지가 지속되는 것으로 보아 targeting vector의 발현이 지속으로 일어나고 있음을 알 수 있었다.

[1584]

[1585] 실시예 2-3. 표적화 인간 세포를 이용한 마이크로세포 제조

- [1586] Micronuclei의 형성은 colcemid(Life technologies, Grand island, NY, USA)를 사용하여 진행하였다. G418을 사용하여 선별이 끝난 human normal foreskin fibroblast cell line(BJ)을 100mm dish에 1×10^6 개를 넣어 준 후, 다음날 20% FBS가 담긴 DMEM으로 배지를 교환해 준 후 colcemid $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리하고, 5% CO_2 , 37°C 의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. Micronucleation이 유도된 Human세포를 tryLE(Life technologies, Grand island, NY, USA)을 사용하여 떼어준 후, Serum-free DMEM로 씻어준 후 1000rpm, 5분간 원심분리(LABOGENE CO., Ltd, KOREA) 하였다. 원심분리가 끝난 세포는 미리 데워 둔 serum-free DMEM : percoll ((Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1:1 (v:v))에 부유하고, cytochalsin B(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 최종 농도가 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 처리하였다. 16000g, 34°C 내지 37°C 에서 1시간 내지 1시간 30분 동안 원심분리(LABOGENE) 하여 whole cell과 microcell을 분리하였다. 분리된 whole cell과 microcell을 50ml tube로 옮기고 serum-free DMEM을 넣어 준 후, 500g에서 10분간 원심분리 한다. 상등액은 조심스레 제거하고 tube표면에 붙은 pellet을 serum-free DMEM 10ml을 넣어주고 $8 \mu\text{m}$

filter(GE healthcare, CHICAGO, IL, USA)를 이용하여 8 μ m 이하 크기의 microcell을 분리한다. 분리한 microcell이 포함된 상등액은 다시 400g에서 10분간 원심분리한다. 원심분리된 microcell은 8 μ m filter 사용 방법과 동일한 방법으로 5 μ m filter를 사용하였다. 최종 분리된 microcell은 Nikon eclipse TS100 광학 현미경(Nikon Instruments, Melville, NY, USA)을 통해 counting하였다.

[1587] 그 결과, human normal foreskin fibroblast cell line(BJ)에 colcemid 처리 후 micronuclei가 형성됨을 광학현미경으로 확인하였으며, 이것은 기존 논문에 기재된 모습과 동일함을 확인하였다. 또한 형성된 micronuclei를 cytochalasin B을 통해 Enucleation 시키고 microcell의 크기 별 분리 과정 시 광학 현미경 관찰을 통해 사이즈 별로 분리됨을 확인하였다. 이를 통해서 표적화 인간 세포, 즉, human normal foreskin fibroblast cell line(BJ)으로부터 microcell의 생성 및 분리가 잘 되었음을 확인하였다.

[1588]

[1589] 실시예 2-4. 마이크로세포-표적화 마우스 세포의 융합세포 제조

[1590] 분리된 microcell(human microcell)과 수용체 세포로 사용할 mESC를 준비한다. mESC는 TryLE를 처리하고 원심분리 한다. 원심분리 된 mESC를 1 \times DPBS (Welgene, Korea)로 Washing하여 주고 Hemacytometer를 사용하여 세포 수를 계산한다. human microcell과 mESC의 융합은 HVJ-E protein(Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하였으며, suspension method 방법으로 진행하였다. 계산된 human microcell과 mESC의 비율은 1:4가 되도록 사용하였다. 각각 준비된 human microcell과 mESC는 차가운 1 \times cell fusion buffer 500 μ l을 이용하여 washing 하여 준다. Buffer에 담긴 human microcell과 mESC를 300g로 5분간 4 $^{\circ}$ C에서 원심분리 한다. mESC의 2 \times 10⁵ 당 1 \times cell fusion buffer를 25 μ l씩 넣어주고, human microcell에도 동일한 volume의 1 \times cell fusion buffer를 넣어준다. mESC와 human microcell을 섞어주고 HVJ-E protein을 5 내지 10 μ l을 넣어준 후 얼음에서 5분간 방치한다. Mixture를 37 $^{\circ}$ C water bath에서 15분간 방치한다. 이때 5분 간격으로 tapping해 준다. Human microcell과 mESC의 세포 융합이 끝난 후 300g에서 5분간 원심분리하여 남아있는 HVJ-E protein을 제거한다. 융합된 세포는 mESC의 배양 배지가 담긴 dish에 넣어 준 후, 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

[1591] 그 결과, human microcell과 mESC의 세포 융합 과정 후 배양 배지에 넣어준 후 현미경 관찰 시, mESC와 microcell과 융합되는 모습을 관찰할 수 있었다. HVJ-E protein을 사용한 방법이 suspension method(mESC의 세포 증식 모양이 colony 형태이기 때문에 single 세포로 실험을 진행하기 위해 수행)라, 실시간 융합 과정은 확인할 수 없으나, 간접적으로 확인할 수 있다.

[1592]

[1593] 실시예 2-5. 융합세포를 이용한 인공 제조합 염색체를 포함하는 세포 제조

[1594] 실시예 2-4에서 제조된 융합세포 내에 인공 제조합 염색체를 생산하기 위해,

상기 융합세포의 수를 1×10^6 cells로 하여 FBS와 항생제가 들어가지 않은 opti-MEM배지 $100 \mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 여기에 Cre 재조합효소를 발현시키기 위해 pCMV-Cre(System Biosciences, LLC, Palo Alto, CA, USA) vector $10 \mu\text{g}$ 을 첨가하여 125V, 5ms, 2 pulse로 transfection 하였다. 2i배지 $300 \mu\text{l}$ 첨가하여 세포를 잘 섞어 준 후 100mm dish에 세포를 넣어 준 후, 5% CO_2 , 37°C 의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 48시간동안 배양하였다.

- [1595] 48시간 후, 융합세포를 6well plate에 5×10^4 개의 세포씩 분주한 후, puromycin $0.6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리하였다. Puromycin의 농도는 Cell counting kit-8(CCK-8; Dogindo, Kumamoto, Japan)을 사용하여 적정 농도를 결정하였다. 세포는 일주일 동안 배양하였으며, 2일 내지 3일 간격으로 새로운 배지와 puromycin을 함께 처리하였다. 세포의 고정과 염색은 Crystal violet(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 사용하였으며, 대략 $70 \mu\text{m}$ 크기의 mESC의 colony를 counting하였다. 그래프는 GraphPad PRISM(version 5.01)을 이용하여 그렸으며, 3 그룹간의 통계적 유의성은 one-way ANOVA을 통해 산출되었다.
- [1596] 그 결과, 인공 재조합 염색체를 포함한 세포 선별 과정은 상기 실시예 2-1에서도 설명이 되었지만, 융합세포에 처리된 Cre recombinase에 의해 뒤집혀 있던 puromycin-resistance gene의 정상적인 발현에 의해 선별하였다. 즉, human microcell을 통해 human 세포주인 BJ의 염색체(제2 DNA donor에 의해 삽입된 Inverted puro Δ TK 유전자를 포함하는 염색체)가 mESC 내로 이동하였고, BJ의 염색체(제2 DNA donor에 의해 삽입된 Inverted puro Δ TK 유전자를 포함하는 염색체)에 위치한 두 개의 loxP(제1 loxP 및 제2 loxP)와 mESC의 염색체(제1 DNA donor에 의해 삽입된 hygromycin 저항성 유전자를 포함하는 염색체)에 위치한 두 개의 loxP(제3 loxP 및 제4 loxP)의 페어링(제1 loxP과 제4 loxP의 페어링; 및 제2 loxP 및 제3 loxP의 페어링) 및 Cre recombinase에 의해 재조합 된 인공 재조합 염색체가 생성되었다. 생성된 인공 재조합 염색체는 re-inverted puro Δ TK 유전자를 포함하며, 각 그룹에 puromycin을 처리하여 세포의 생존을 확인하였다. 그 결과 Cre recombinase의 발현이 이루어진 그룹에서 mESC의 증식이 일어남을 확인할 수 있었다. 이를 통해 인공 재조합 염색체 생성에 의해 정상적으로 발현됨을 알 수 있다 (도 32 및 도 33).

[1597]

[1598] 실시예 2-6. 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 이용한 형질전환 동물 제조

[1599] 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 이용해 형질전환 동물을 제조하기 위해, 상기 실시예 2-5에서 수득한 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에 FIAU를 처리한다. 처리 후 수득한 세포는 배반포 주입(Blastocyst Injection)을 통해 포배에 이식하여 키메릭 배반포(Chimeric Blastocyst)를 제작한다. 제작된 키메릭 배반포(Chimeric Blastocyst)는 대리모의 자궁에 착상시켜 마우스 산자를 발생시킨다. 생산된 마우스 산자는 키메릭 형질전환 마우스이고, 키메릭 형질전환 마우스의 교배를 이용해 heterozygous 형질전환 마우스 또는

homozygous 형질전환 마우스를 제조한다.

[1600] 생산된 형질전환 마우스는 마우스의 게놈 상의 puro Δ TK 유전자가 포함된 마우스이다. 이때, 상기 형질전환 마우스는 배반포 주입 외에도 다양한 방법으로 생산 가능하다.

[1601]

[1602] 실시예 3. 인공 재조합 염색체를 이용한 형질전환 동물 제조

[1603] 본 실시예는 Humanized mouse의 제조 방법에 관한 것으로, 특정 유전자가 인간화된 염색체, 즉, 인공 재조합 염색체를 가지는 형질전환 마우스에 관한 것이다. 하기에 설명은 IgH(Immunoglobulin heavy) locus의 Variable region가 인간화된 형질전환 마우스 제조에 대한 전반적인 실시예로, 인공 재조합 염색체를 이용한 일 예일뿐, 이에 제한되지 않는다. 목적하는 인공 재조합 염색체는 하기에 기재된 실시예를 기초로 하여 다양하게 변경하여 실시함으로써 생산할 수 있으며, 또한, 하기에 기재된 실시예 외에도 다양한 방법을 추가하여 실시함으로써 생산할 수 있다.

[1604]

[1605] 실시예 3-1. 표적화 세포 제작을 위한 벡터 설계(Vector Construction)

[1606] Mouse embryonic stem cell (mESC)을 표적화 mESC로 생산하기 위해 제1 DNA donor(제1 vector) 및 제2 DNA donor(제2 vector)가 준비된다.

[1607] 상기 제1 vector는 mouse IgH locus의 Variable region(전체 V segments, D segments 및 J segments) 5' 말단을 타게팅하기 위해 사용될 제1 상동성 암, piggyBac terminal repeat(PB-TR), 프로모터, loxm2/66(제1 RRS), 블라스티사이드 저항성 유전자(blasticidin resistant gene), 프로모터, FRT 및 mouse IgH locus의 Variable region 5' 말단 타게팅하기 위해 사용될 제2 상동성 암을 포함한다.

[1608] 상기 제2 vector는 mouse IgH locus의 Variable region(전체 V segments, D segments 및 J segments) 3' 말단을 타게팅하기 위해 사용될 제3 상동성 암, 역위된(inverted) 하이그로마이신 저항성 유전자(hygromycin resistant gene), FRT, lox71(제2 RRS), 프로모터, neomycin 저항성 유전자(NeoR), piggyBac terminal repeat(PB-TR) 및 mouse IgH locus의 Variable region 3' 말단 타게팅하기 위해 사용될 제4 상동성 암을 포함한다.

[1609] Human fibroblast를 표적화 Human fibroblast로 생산하기 위해 제3 DNA donor(제3 vector) 및 제4 DNA donor(제4 vector)가 사용된다.

[1610] 상기 제3 vector는 human IgH locus의 Variable region(전체 V segments, D segments 및 J segments) 5' 말단을 타게팅하기 위해 사용될 제5 상동성 암, 프로모터, 블라스티사이드 저항성 유전자(blasticidin resistant gene), lox66(제3 RRS), 프로모터, FRT, piggyBac terminal repeat(PB-TR) 및 human IgH locus의 Variable region 5' 말단 타게팅하기 위해 사용될 제6 상동성 암을 포함한다.

[1611] 상기 제4 vector는 human IgH locus의 Variable region(전체 V segments, D segments 및 J segments) 3' 말단을 타게팅하기 위해 사용될 제7 상동성 암,

piggyBac terminal repeat(PB-TR), 역위된(inverted) 하이그로마이신 저항성 유전자(hygromycin resistant gene), FRT, 역위된(inverted) 퓨로 Δ TK 유전자(puro Δ TK gene), loxm2/71(제4 RRS), 프로모터, neomycin 저항성 유전자(NeoR) 및 human IgH locus의 Variable region 3' 말단 타게팅하기 위해 사용될 제8 상동성 암을 포함한다.

[1612] 이때, 상기 DNA donor의 설계는 목적에 따라 다양하게 설계될 수 있으며, 선별 과정을 위해서 다양한 요소를 추가로 포함하도록 설계 변경이 가능하다.

[1613]

[1614] 실시에 3-2. RRS가 삽입된 염색체를 포함하는 세포 제조

[1615] 실시예 3-2-1. RRS가 삽입된 인간 염색체를 포함하는 표적화 인간 세포 제조

[1616] 사용되는 human fibroblast는 10% fetal bovine serum (FBS; Corning, Mannasas, VA, USA), 1% penicillin-streptomycin (Corning, Mannasas, VA, USA)가 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Corning, Mannasas, VA, USA)배지 및 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 증식 및 유지를 위해 배양한다. Transient transfection은 lipofectamine 3000(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 또는 Nepa21(NEPAGENE Co., Ltd., Chiba, Japan) electroporator을 사용하여 수행한다. Transient transfection을 위해 1×10⁶ cells을 FBS와 항생제가 들어가지 않은 배지에 준비한다. 여기에 제3 vector 10 μ g을 첨가한 후 lipofectamin 3000 reagent를 섞고 상온에서 5분간 정치 시킨 후 transfection 한다. 또는 제3 vector 10 μ g을 첨가하고 150V, 7.5ms, 2 pulse로 transfection 한다. Transfection된 세포는 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 24시간 내지 48시간동안 배양한다.

[1617] 제3 vector의 human IgH locus의 Variable region 5' 말단에 삽입 여부를 확인하기 위해, transfection된 세포에 블라스티사이드를 처리하여 세포의 생존 여부로 제3 vector의 삽입을 확인한다. 블라스티사이드 처리 후 생존 세포를 수득하고, 수득한 세포에 제4 vector를 제3 vector와 동일한 방법으로 transfection 한다. transfection된 세포는 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 24시간 내지 48시간동안 배양한다. 제4 vector의 human IgH locus의 Variable region 3' 말단에 삽입 여부를 확인하기 위해, transfection된 세포에 G418(Life technologies, NY, USA)을 처리하여 세포의 생존 여부로 제4 vector의 삽입을 확인한다. G418 처리 후 생존 세포를 수득한다.

[1618] 제3 vector 및 제4 vector가 같은 염색체(human IgH locus를 가지는 염색체)에 삽입 여부를 확인하기 위해, G418 처리 후 수득한 세포에 재조합효소인 flippase(FLP)를 처리한다. 제3 vector 및 제4 vector가 같은 염색체에 삽입된 경우, 두 벡터 내에 존재하는 FRT와 처리한 FLP에 의해 재조합이 유도되어 human IgH locus의 Variable region이 역위된다. 이를 확인하기 위해, FRT-FLP 재조합이 유도된 세포에 제오신을 처리하여 세포의 생존 여부로 같은 염색체 내 제3 vector 및 제4 vector의 삽입을 확인한다. 제오신 처리 후 생존한 세포를 수득한다.

수득한 세포는 lox66(제3 RRS) 및 loxm2/71(제4 RRS)가 human IgH locus의 Variable region의 양 말단에 각각 삽입된 염색체를 포함하는 세포이다. 이러한 선별 과정은 일반적으로 체세포는 두 개의 대립 유전자를 가지므로, 두 개의 대립 유전자에 상기 제3 vector 및 제4 vector 중 하나만 삽입되는 경우를 제외하기 위한 것이다.

[1619] 이때, 상기 벡터의 도입은 벡터가 여러 개일 경우, 순차적으로 또는 무작위적으로 수행 가능하며, 또한 동시에 도입 가능하다. 상기 벡터가 도입된 세포의 선별 과정은 벡터에 삽입된 요소에 따라 다양하게 변형 가능하다.

[1620]

[1621] *실시예 3-2-2. RRS가 삽입된 마우스 염색체를 포함하는 표적화 마우스 세포 제조*

[1622] 사용되는 mouse embryonic stem cell(mESC)은 기본 배양액 2i 배지를 사용하였는데, 이 배양액은 FBS가 없는 N2B27배지에 MEK inhibitor PD0325901 (1 μ M) and GSK3 inhibitor CHIR99021 (3 μ M) (both from Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1,000 U/ml LIF (Millipore, Billerica, MA, USA)을 첨가한 기본 배양액(2i 배지) 및 세포는 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 증식 및 유지를 위해 배양한다. Transient transfection은 lipofectamine 3000 또는 Nepa21(NEPAGENE Co., Ltd., Chiba, Japan) electroporator을 사용하여 수행한다. Transient transfection을 위해 1 \times 10⁶ cells을 FBS와 항생제가 들어가지 않은 배지에 준비한다. 여기에 제1 vector 10 μ g을 첨가한 후 lipofectamin 3000 reagent를 섞고 상온에서 5분간 정치 시킨 후 transfection 한다. 또는 제1 vector 10 μ g을 첨가하고 125V, 5ms, 2 pulse 로 transfection 한다. Transfection된 세포는 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 24시간 내지 48시간동안 배양한다.

[1623] 제1 vector의 mouse IgH locus의 Variable region 5' 말단에 삽입 여부를 확인하기 위해, transfection된 세포에 블라스티사이드를 처리하여 세포의 생존 여부로 제1 vector의 삽입을 확인한다. 블라스티사이드 처리 후 생존 세포를 수득하고, 수득한 세포에 제2 vector를 제1 vector와 동일한 방법으로 transfection 한다. transfection된 세포는 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 24시간 내지 48시간동안 배양한다. 제2 vector의 mouse IgH locus의 Variable region 3' 말단에 삽입 여부를 확인하기 위해, transfection된 세포에 G418(Life technologies, NY, USA)을 처리하여 세포의 생존 여부로 제2 vector의 삽입을 확인한다. G418 처리 후 생존 세포를 수득한다.

[1624] 제1 vector 및 제2 vector가 같은 염색체(mouse IgH locus를 가지는 염색체)에 삽입 여부를 확인하기 위해, G418 처리 후 수득한 세포에 재조합효소인 flippase(FLP)를 처리한다. 제1 vector 및 제2 vector가 같은 염색체에 삽입된 경우, 두 벡터 내에 존재하는 FRT와 처리한 FLP에 의해 재조합이 유도되어 mouse IgH locus의 Variable region이 역위된다. 이를 확인하기 위해, FRT-FLP 재조합이

유도된 세포에 제오신을 처리하여 세포의 생존 여부로 같은 염색체 내 제1 vector 및 제2 vector의 삽입을 확인한다. 제오신 처리 후 생존한 세포를 수득한다. 수득한 세포는 loxm2/66(제1 RRS) 및 lox71(제2 RRS)가 mouse IgH locus의 Variable region의 양 말단에 각각 삽입된 염색체를 포함하는 세포이다. 이러한 선별 과정은 일반적으로 체세포는 두 개의 대립 유전자를 가지므로, 두 개의 대립 유전자에 상기 제1 vector 및 제2 vector 중 하나만 삽입되는 경우를 제외하기 위한 것이다.

[1625] 이때, 상기 벡터의 도입은 벡터가 여러 개일 경우, 순차적으로 또는 무작위적으로 수행 가능하며, 또한 동시에 도입 가능하다. 상기 벡터가 도입된 세포의 선별 과정은 벡터에 삽입된 요소에 따라 다양하게 변형 가능하다.

[1626]

[1627] 실시예 3-3. 표적화 인간 세포를 이용한 마이크로세포 제조

[1628] Micronuclei의 형성은 colcemid(Life technologies, Grand island, NY, USA)를 사용하여 진행한다. 상기 선별된 표적화 인간 세포(lox66(제3 RRS) 및 loxm2/71(제4 RRS)가 human IgH locus의 Variable region의 양 말단에 각각 삽입된 염색체를 포함하는 세포)를 1×10^6 cells가 되도록 배양하여 준비한 후, 다음날 20% FBS가 담긴 DMEM으로 배지를 교환한 후 colcemid $0.1 \mu\text{g/ml}$ 로 처리하고, 5% CO_2 , 37°C 의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 48시간 동안 배양한다. Micronucleation이 유도된 표적화 인간 세포를 tryLE(Life technologies, Grand island, NY, USA)을 사용하여 떼어준 후, Serum-free DMEM로 씻어준 후 1000rpm, 5분간 원심분리(LABOGENE CO., Ltd, KOREA) 한다. 원심분리가 끝난 세포는 미리 데워 둔 serum-free DMEM : percoll ((Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) (1:1 (v:v))에 부유하고, cytochalsin B(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)의 최종 농도가 $10 \mu\text{g/ml}$ 이 되도록 처리한다. 16000g, 34°C 내지 37°C 에서 1시간 내지 1시간 30분 동안 원심분리(LABOGENE) 하여 whole cell과 microcell을 분리한다. 분리된 whole cell과 microcell을 50ml tube로 옮기고 serum-free DMEM을 넣어 준 후, 500g에서 10분간 원심분리 한다. 상등액은 조심스레 제거하고 tube표면에 붙은 pellet을 serum-free DMEM 10ml을 넣어주고 $8 \mu\text{m}$ filter(GE healthcare, CHICAGO, IL, USA)를 이용하여 $8 \mu\text{m}$ 이하 크기의 microcell을 분리한다. 분리한 microcell이 포함된 상등액은 다시 400g에서 10분간 원심분리 한다. 원심분리 된 microcell은 $8 \mu\text{m}$ filter 사용 방법과 동일한 방법으로 $5 \mu\text{m}$ filter를 사용한다. 최종 분리된 microcell은 Nikon eclipse TS100 광학 현미경(Nikon Instruments, Melville, NY, USA)을 통해 counting 한다. 이를 통해 표적화 인간 세포로부터 마이크로세포를 수득한다.

[1629]

[1630] 실시예 3-4. 마이크로세포-표적화 마우스 세포의 융합세포 제조

[1631] 분리한 인간 마이크로세포와 recipient cell로 사용할 표적화 마우스 세포(loxm2/66(제1 RRS) 및 lox71(제2 RRS)가 mouse IgH locus의 Variable

region의 양 말단에 각각 삽입된 염색체를 포함하는 세포)를 준비한다. 표적화 마우스 세포에 TryLE를 처리하고 원심분리 한다. 원심분리 된 표적화 마우스 세포를 1×DPBS로 Washing하여 주고 Hemacytometer를 사용하여 세포 수를 계산한다. 인간 마이크로세포와 표적화 마우스 세포의 융합은 HVJ-E protein(Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan)을 사용하며, suspension method 방법으로 진행한다. 인간 마이크로세포와 표적화 마우스 세포의 비율은 1:4가 되도록 사용한다. 각각 준비된 인간 마이크로세포와 표적화 마우스 세포는 차가운 1x cell fusion buffer 500 μ l을 이용하여 washing 한다. Buffer에 담긴 인간 마이크로세포와 표적화 마우스 세포를 300g로 5분간 4°C에서 원심분리 한다. 표적화 마우스 세포 2×10⁵ cells 당 1× cell fusion buffer를 25 μ l씩 넣어주고, 인간 마이크로세포에도 동일한 volume의 1× cell fusion buffer를 넣어준다. 표적화 마우스 세포와 인간 마이크로세포를 섞어주고 HVJ-E protein을 5 내지 10 μ l을 넣어준 후 얼음에서 5분간 방치한다. Mixture를 37°C water bath에서 15분간 방치한다. 이때 5분 간격으로 tapping 한다. 인간 마이크로세포와 표적화 마우스 세포의 세포 융합이 끝난 후 300g에서 5분간 원심분리 하여 남아있는 HVJ-E protein을 제거한다. 융합세포는 표적화 마우스 세포의 배양 배지 및 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 48시간 동안 배양한다. 제조된 융합세포는 표적화 인간 염색체(lox66(제3 RRS) 및 loxm2/71(제4 RRS)가 삽입된 human IgH locus의 Variable region이 포함된 염색체) 및 표적화 마우스 염색체(loxm2/66(제1 RRS) 및 lox71(제2 RRS)가 삽입된 mouse IgH locus의 Variable region이 포함된 염색체)를 포함하는 세포이다.

[1632]

[1633] 실시예 3-5. 융합세포를 이용한 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포 제조

[1634] 인간 마이크로세포와 표적화 마우스 세포를 융합 시키고 48시간 동안 융합세포를 안정화 시킨다. 1×10⁶ cells의 융합세포에 FBS와 항생제가 들어가지 않은 opti-MEM배지 100 μ l를 첨가하였다. 여기에 pCMV-Cre(System Biosciences, LLC, Palo Alto, CA, USA) vector 10 μ g을 첨가하여 125V, 5ms, 2 pulse로 transfection 한다. 2배지 300 μ l 첨가하여 세포와 잘 섞고, 100mm dish로 이동시키고 5% CO₂, 37°C의 95% 습윤 상태가 유지되는 배양기에서 48시간동안 배양한다.

[1635] Cre 재조합효소가 처리된 융합세포에 인공 재조합 염색체가 생성되었는지 확인하기 위해, Cre 재조합효소가 처리된 융합세포에 항생제(Puromycin, G418 및 하이그로마이신)를 처리한다. Cre 재조합효소가 처리된 융합세포는 Cre 재조합효소에 의해 표적화 인간 염색체(lox66(제3 RRS) 및 loxm2/71(제4 RRS)가 삽입된 human IgH locus의 Variable region이 포함된 염색체) 및 표적화 마우스 염색체(loxm2/66(제1 RRS) 및 lox71(제2 RRS)가 삽입된 mouse IgH locus의 Variable region이 포함된 염색체) 간의 재조합이 유도된다. 표적화 마우스 염색체 내에 제1 RRS와 표적화 인간 염색체 내에 제4 RRS가 서로 페어링하고, 표적화

마우스 염색체 내에 제2 RRS와 표적화 인간 염색체 내에 제3 RRS가 서로 페어링한다. 상기 RRS의 페어링을 Cre 재조합효소가 인지하여 재조합이 유도된다.

- [1636] 그 결과, 표적화 마우스 염색체의 mouse IgH locus의 Variable region이 human IgH Variable region로 교체된 제1 인공 재조합 염색체 및 표적화 인간 염색체의 human IgH locus의 Variable region이 mouse IgH Variable region로 교체된 제2 인공 재조합 염색체가 생성된다. 상기 제1 인공 재조합 염색체는 human IgH locus의 Variable region를 제외한 나머지 부분은 마우스 유전자(예를 들어, mouse IgH locus의 Constant region은 마우스 유전자이다.)를 가진다. 상기 제2 인공 재조합 염색체는 mouse IgH locus의 Variable region을 제조한 나머지 부분은 인간 유전자(예를 들어, human IgH locus의 Constant region은 인간 유전자이다.)를 가진다.
- [1637] 항생제(Puromycin, G418 및 하이그로마이신) 처리 후 생존한 세포를 수득하였다. 수득한 세포는 제1 인공 재조합 염색체 및 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포이며, 표적화 인간 염색체 및 표적화 마우스 염색체를 포함하지 않는 세포이다.
- [1638] 생성된 제1 인공 재조합 염색체는 제5 RRS 및 제6 RRS를 포함할 수 있다. 제5 RRS 및 제6 RRS는 제1 RRS 및 제4 RRS 간의 재조합과 제2 RRS 및 제3 RRS 간의 재조합에 의해 생성된 RRS이다. 또한, 생성된 제2 인공 재조합 염색체는 제7 RRS 및 제8 RRS를 포함할 수 있다. 제7 RRS 및 제8 RRS는 제1 RRS 및 제4 RRS 간의 재조합과 제2 RRS 및 제3 RRS 간의 재조합에 의해 생성된 RRS이다.
- [1639] 수득한 제1 인공 재조합 염색체 및 제2 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에 piggyBac 트랜스포세이즈를 처리하여 제1 인공 재조합 염색체 및 제2 인공 재조합 염색체에 포함된 RRS(제5 RRS, 제6 RRS, 제7 RRS 및 제8 RRS), 퓨로 Δ TK 유전자(puro Δ TK gene), neomycin 저항성 유전자(NeoR), 하이그로마이신 저항성 유전자(hygromycin resistant gene) 및 FRT를 제거한다. 이때, RRS(제5 RRS, 제6 RRS, 제7 RRS 및 제8 RRS), 퓨로 Δ TK 유전자(puro Δ TK gene), neomycin 저항성 유전자(NeoR), 제오신 저항성 유전자(zeocin resistant gene) 및 FRT가 제거된 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 Fialuridine (FIAU)를 처리하여 선별한다.
- [1640] 상기 인공 재조합 염색체는 RRS의 위치, 방향, 페어링(pairing)에 따라 다양하게 재조합 될 수 있다. 목적하는 인공 재조합 염색체의 생산을 위해서, 앞서 설명은 DNA donor의 설계를 변경함으로써 생산 가능하다.
- [1641]
- [1642] 실시예 3-6. 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 이용한 형질전환 동물 제조
- [1643] 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 이용해 형질전환 동물을 제조하기 위해, 상기 실시예 3-5에서 수득한 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포에 FIAU를 처리한다. 처리 후 수득한 세포는 배반포 주입(Blastocyst Injection)을 통해 포배에 이식하여 키메라 배반포(Chimeric Blastocyst)를 제작한다. 제작된

키메릭 배반포(Chimeric Blastocyst)는 대리모의 자궁에 착상시켜 마우스 산자를 발생시킨다. 생산된 마우스 산자는 키메릭 형질전환 마우스이고, 키메릭 형질전환 마우스의 교배를 이용해 heterozygous 형질전환 마우스 또는 homozygous 형질전환 마우스를 제조한다.

[1644] 생산된 형질전환 마우스는 게놈 상에 IgH locus의 Variable region이 인간화되어 있으며, 상기 형질전환 마우스는 인간화 항체 및/또는 완전 인간 항체를 생산에 이용될 수 있다.

[1645] 이때, 상기 형질전환 마우스는 배반포 주입 외에도 다양한 방법으로 생산가능하다.

[1646]

[1647] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다. 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 특허청구범위의 범위에 속한다.

[1648]

서열목록 Free Text

[1649] SEQ ID NO: 1 내지 22는 프라이머 서열이며, SEQ ID NO: 23 내지 31은 RRS 서열이고, SEQ ID NO: 32 및 33은 재조합효소의 아미노산 서열이다.

청구범위

- [청구항 1] 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법으로, 상기 방법은
- i) 제1 표적화 세포 및 제2 표적화 세포를 생산하고, 상기 제1 표적화 세포는 제1 표적화된 염색체를 포함하며, 상기 제2 표적화 세포는 제2 표적화된 염색체를 포함하고, 이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 제1 일부, 제1 RRS(a first recombinase recognition sequence; a first RRS) 및 제1 프래그먼트(a first fragment)를 포함하며, 상기 제1 RRS는 상기 제1 일부와 상기 제1 프래그먼트의 사이에 위치하고, 이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 제2 일부, 제2 RRS(a second recombinase recognition sequence; a second RRS) 및 제2 프래그먼트(a second fragment)를 포함하며, 상기 제2 RRS는 상기 제2 일부와 상기 제2 프래그먼트의 사이에 위치하고;
 - ii) 상기 제2 표적화 세포를 이용해 하나 이상의 마이크로세포(microcell)를 생산하며, 상기 하나 이상의 마이크로세포는 상기 제2 표적화된 염색체 또는 제2 표적화된 염색체의 절편(fragment)를 포함하고, 이때, 상기 제2 표적화된 염색체의 절편은 제2 RRS(a second recombinase recognition sequence; a second RRS) 및 제2 프래그먼트(a second fragment)를 포함하고;
 - iii) 상기 하나 이상의 마이크로세포 및 상기 제1 표적화 세포를 이용해 융합세포를 생산하고, 상기 융합세포는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체, 또는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체의 절편을 포함하며; 및
 - iv) 상기 융합세포에 SSR(site specific recombinase)를 처리하여 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 생산하고, 상기 SSR은 상기 융합세포에 포함된 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 RRS의 페어링(pairing)을 인지하여 재조합을 유도하며, 이때, 상기 재조합에 의해 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 프래그먼트가 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 프래그먼트와 교환되고, 이에 따라, 상기 제1 일부 및 상기 제2 프래그먼트를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체가 생성되는, 것을 포함하는 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.

- [청구항 2] 제1항에 있어서,
 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 제2 인공 재조합 염색체를 더 포함하고,
 이때, 상기 제2 인공 재조합 염색체는 상기 제2 일부 및 상기 제1 프래그먼트를 포함하는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
 상기 제1 일부는 상기 제1 표적화된 염색체의 양쪽의 텔로미어 말단 중 하나를 포함하는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
 상기 제1 프래그먼트는 상기 제1 표적화된 염색체의 양쪽의 텔로미어 말단 중 나머지 하나를 포함하는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
 상기 제2 일부는 상기 제2 표적화된 염색체의 양쪽의 텔로미어 말단 중 하나를 포함하는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서,
 상기 제2 프래그먼트는 상기 제2 표적화된 염색체의 양쪽의 텔로미어 말단 중 나머지 하나를 포함하는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
 상기 제1 RRS는 loxP 및 loxP 변이체 중 선택된 하나이고,
 상기 제2 RRS는 loxP 및 loxP 변이체 중 선택된 하나이며,
 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제2 RRS와 페어링(pairing)할 수 있는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 8] 제7항에 있어서,
 상기 SSR은 Cre recombinase이고,
 이때, 상기 SSR은 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS를 인지할 수 있는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,
 상기 제1 RRS는 FRT, attP, attB, ITR 및 이들의 변이체 중 선택된 하나이고,
 상기 제2 RRS는 FRT, attP, attB, ITR 및 이들의 변이체 중 선택된 하나이며,
 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제2 RRS와 페어링(pairing)할 수 있는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.

- [청구항 10] 제9항에 있어서,
 상기 SSR은 flippase(FLP), 인테그레이즈(integrase) 및
 트랜스포세이즈(transposase) 중 선택된 하나이고,
 이때, 상기 SSR은 상기 제1 RRS 및 상기 제2 RRS를 인지할 수 있는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 11] 제1항에 있어서,
 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 체세포 분열
 또는 감수 분열을 할 수 있는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 12] 제1항에 있어서,
 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제2 표적화된
 염색체를 포함하지 않는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 13] 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법으로,
 상기 방법은
 i) 제1 표적화 세포 및 제2 표적화 세포를 생산하고,
 상기 제1 표적화 세포는 제1 표적화된 염색체를 포함하며, 상기 제2
 표적화 세포는 제2 표적화된 염색체를 포함하고,
 상기 제1 표적화된 염색체는 제1 일부, 제1 RRS(a first recombinase
 recognition sequence; a first RRS), 제1 프래그먼트(a first fragment), 제2
 RRS(a second recombinase recognition sequence; a second RRS) 및 제2
 일부를 포함하며,
 이때, 상기 제1 일부는 상기 제1 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단
 중 하나를 포함하고, 상기 제2 일부는 상기 제1 표적화된 염색체의 양쪽
 텔로미어 말단 중 나머지 하나를 포함하며,
 이때, 상기 제1 프래그먼트는 상기 제1 RRS와 상기 제2 RRS 사이에
 위치하고,
 상기 제2 표적화된 염색체는 제3 일부, 제3 RRS(a third recombinase
 recognition sequence; a third RRS), 제2 프래그먼트(a second fragment), 제4
 RRS(a fourth recombinase recognition sequence; a fourth RRS) 및 제4 일부를
 포함하며,
 이때, 상기 제3 일부는 상기 제2 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단
 중 하나를 포함하고, 상기 제4 일부는 상기 제2 표적화된 염색체의 양쪽
 텔로미어 말단 중 나머지 하나를 포함하고,
 이때, 상기 제2 프래그먼트는 상기 제3 RRS와 상기 제4 RRS 사이에
 위치하고;
 ii) 상기 제2 표적화 세포를 이용한 하나 이상의 마이크로세포(microcell)을
 생산하며,

상기 하나 이상의 마이크로세포는 상기 제2 표적화된 염색체 또는 제2 표적화된 염색체의 절편(fragment)를 포함하고, 이때, 상기 제2 표적화된 염색체의 절편은 제3 RRS, 제2 프래그먼트 및 제4 RRS를 포함하고;

iii) 상기 하나 이상의 마이크로세포 및 상기 제1 표적화 세포를 이용한 융합세포 생산하고,

상기 융합세포는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체, 또는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체의 절편을 포함하며; 및

iv) 상기 융합세포에 SSR(site specific recombinase)를 처리하여 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포 생산하고,

상기 SSR은 상기 융합세포에 포함된 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제3 RRS의 페어링(pairing) 및 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제4 RRS의 페어링(pairing)을 인지하여 재조합을 유도하며,

이때, 상기 재조합에 의해 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 프래그먼트가 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 프래그먼트와 교환되고,

이에 따라, 상기 제1 일부, 상기 제2 프래그먼트 및 상기 제2 일부를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체가 생성되는,

것을 포함하는 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.

[청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 제2 인공 재조합 염색체를 더 포함하고,
이때, 상기 제2 인공 재조합 염색체는 상기 제3 일부, 상기 제1 프래그먼트, 상기 제4 일부를 포함하는,
하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.

[청구항 15] 제13항에 있어서,
상기 제1 일부는 상기 제1 표적화된 염색체의 동원체를 포함하는,
하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.

[청구항 16] 제13항에 있어서,
상기 제3 일부는 상기 제2 표적화된 염색체의 동원체를 포함하는,
하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.

[청구항 17] 제13항에 있어서,
상기 제1 프래그먼트는 상기 제1 표적화된 염색체의 동원체를 포함하고,
상기 제2 프래그먼트는 상기 제2 표적화된 염색체의 동원체를 포함하는,
하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.

- [청구항 18] 제13항에 있어서,
 상기 제1 RRS는 loxP 및 loxP 변이체 중 선택된 하나이고,
 상기 제3 RRS는 loxP 및 loxP 변이체 중 선택된 하나이며,
 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제3 RRS와 페어링(pairing)할 수 있는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 19] 제13항에 있어서,
 상기 제2 RRS는 loxP 및 loxP 변이체 중 선택된 하나이고,
 상기 제4 RRS는 loxP 및 loxP 변이체 중 선택된 하나이며,
 이때, 상기 제2 RRS는 상기 제4 RRS와 페어링(pairing)할 수 있는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 20] 제18항 또는 제19항에 있어서,
 상기 SSR은 Cre recombinase인,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 21] 제13항에 있어서,
 상기 제1 RRS는 FRT, attP, attB, ITR 및 이들의 변이체 중 선택된 하나이고,
 상기 제3 RRS는 FRT, attP, attB, ITR 및 이들의 변이체 중 선택된 하나이며,
 이때, 상기 제1 RRS는 상기 제3 RRS와 페어링(pairing)할 수 있는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 22] 제13항에 있어서,
 상기 제2 RRS는 FRT, attP, attB, ITR 및 이들의 변이체 중 선택된 하나이고,
 상기 제4 RRS는 FRT, attP, attB, ITR 및 이들의 변이체 중 선택된 하나이며,
 이때, 상기 제2 RRS는 상기 제4 RRS와 페어링(pairing)할 수 있는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 23] 제21항 또는 제22항에 있어서,
 상기 SSR은 flippase(FLP), 인테그레이즈(integrase) 및
 트랜스포세이즈(transposase) 중 선택된 하나인,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 24] 제13항에 있어서,
 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 체세포 분열
 또는 감수 분열을 할 수 있는,
 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 25] 제13항에 있어서,
 상기 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포는 상기 제2
 프래그먼트에 존재하는 유전자를 단백질로 발현하는,

- 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포의 제작 방법.
- [청구항 26] 하나 이상의 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 이용한 형질전환 비인간 동물의 제작 방법으로,
상기 방법은
- i) 제1 표적화 세포 및 제2 표적화 세포를 생산하고,
상기 제1 표적화 세포는 배아 줄기 세포이고,
상기 제1 표적화 세포는 제1 표적화된 염색체를 포함하며, 상기 제2 표적화 세포는 제2 표적화된 염색체를 포함하고,
이때, 상기 제1 표적화된 염색체는 제1 일부, 제1 RRS(a first recombinase recognition sequence; a first RRS) 및 제1 프래그먼트(a first fragment)를 포함하며, 상기 제1 RRS는 상기 제1 일부와 상기 제1 프래그먼트의 사이에 위치하고,
이때, 상기 제2 표적화된 염색체는 제2 일부, 제2 RRS(a second recombinase recognition sequence; a second RRS) 및 제2 프래그먼트(a second fragment)를 포함하며, 상기 제2 RRS는 상기 제2 일부와 상기 제2 프래그먼트의 사이에 위치하고;
 - ii) 상기 제2 표적화 세포를 이용해 하나 이상의 마이크로세포(microcell)를 생산하며,
상기 하나 이상의 마이크로세포는 상기 제2 표적화된 염색체 또는 제2 표적화된 염색체의 절편(fragment)를 포함하고, 이때, 상기 제2 표적화된 염색체의 절편은 제2 RRS(a second recombinase recognition sequence; a second RRS) 및 제2 프래그먼트(a second fragment)를 포함하고;
 - iii) 상기 하나 이상의 마이크로세포 및 상기 제1 표적화 세포를 이용해 융합세포를 생산하고,
상기 융합세포는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체, 또는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체의 절편을 포함하며;
 - iv) 상기 융합세포에 SSR(site specific recombinase)를 처리하여 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 생산하고,
상기 SSR은 상기 융합세포에 포함된 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 RRS의 페어링(pairing)을 인지하여 재조합을 유도하며,
이때, 상기 재조합에 의해 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 프래그먼트가 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 프래그먼트와 교환되고,
이에 따라, 상기 제1 일부 및 상기 제2 프래그먼트를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체가 생성되며; 및
 - v) 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 포함하는 키메라

배반포(Chimeric Blastocyst)를 대리모의 자궁에 착상시켜 산자를 생산하고,

이때, 상기 키메라 배반포는 상기 제1 인공 제조합 염색체를 포함하는 세포를 배반포에 주입하여 생산된, 것을 포함하는 형질전환 비인간 동물의 제작 방법.

[청구항 27] 하나 이상의 인공 제조합 염색체를 포함하는 세포를 이용한 형질전환 비인간 동물의 제작 방법으로,

상기 방법은

i) 제1 표적화 세포 및 제2 표적화 세포를 생산하고,

상기 제1 표적화 세포는 배아 줄기 세포이고,

상기 제1 표적화 세포는 제1 표적화된 염색체를 포함하며, 상기 제2 표적화 세포는 제2 표적화된 염색체를 포함하고,

상기 제1 표적화된 염색체는 제1 일부, 제1 RRS(a first recombinase recognition sequence; a first RRS), 제1 프래그먼트(a first fragment), 제2 RRS(a second recombinase recognition sequence; a second RRS) 및 제2 일부를 포함하며,

이때, 상기 제1 일부는 상기 제1 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단 중 하나를 포함하고, 상기 제2 일부는 상기 제1 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단 중 나머지 하나를 포함하며,

이때, 상기 제1 프래그먼트는 상기 제1 RRS와 상기 제2 RRS 사이에 위치하고,

상기 제2 표적화된 염색체는 제3 일부, 제3 RRS(a third recombinase recognition sequence; a third RRS), 제2 프래그먼트(a second fragment), 제4 RRS(a fourth recombinase recognition sequence; a fourth RRS) 및 제4 일부를 포함하며,

이때, 상기 제3 일부는 상기 제2 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단 중 하나를 포함하고, 상기 제4 일부는 상기 제2 표적화된 염색체의 양쪽 텔로미어 말단 중 나머지 하나를 포함하고,

이때, 상기 제2 프래그먼트는 상기 제3 RRS와 상기 제4 RRS 사이에 위치하고;

ii) 상기 제2 표적화 세포를 이용해 하나 이상의 마이크로세포(microcell)를 생산하며,

상기 하나 이상의 마이크로세포는 상기 제2 표적화된 염색체 또는 제2 표적화된 염색체의 절편(fragment)를 포함하고, 이때, 상기 제2 표적화된 염색체의 절편은 제3 RRS, 제2 프래그먼트 및 제4 RRS를 포함하고;

iii) 상기 하나 이상의 마이크로세포 및 상기 제1 표적화 세포를 이용해 융합세포를 생산하고,

상기 융합세포는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체,

또는 상기 제1 표적화된 염색체 및 상기 제2 표적화된 염색체의 절편을 포함하며;

iv) 상기 융합세포에 SSR(site specific recombinase)를 처리하여 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 생산하고,

상기 SSR은 상기 융합세포에 포함된 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제3 RRS의 페어링(pairing) 및 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 RRS와 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제4 RRS의 페어링(pairing)을 인지하여 재조합을 유도하며,

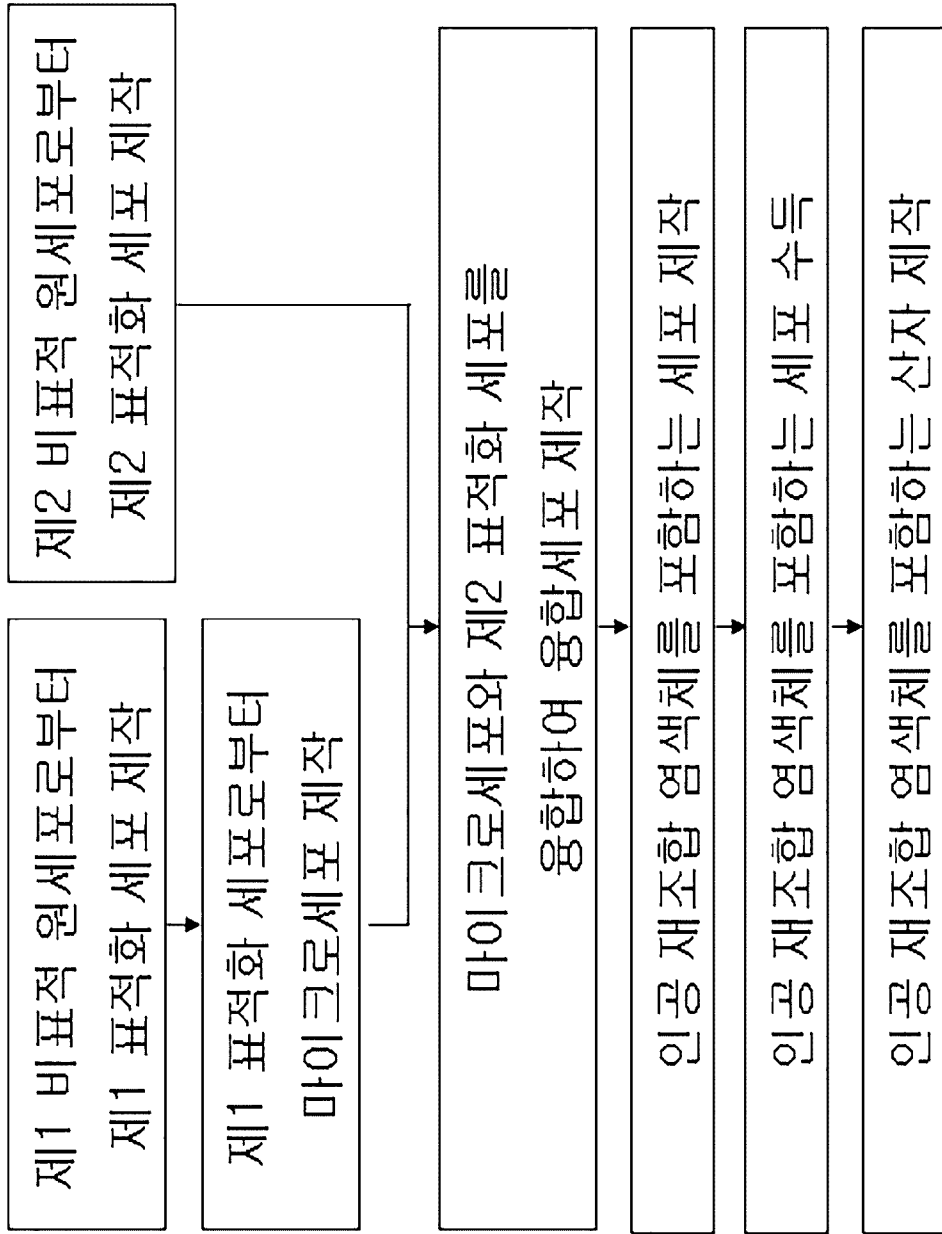
이때, 상기 재조합에 의해 상기 제1 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제1 프래그먼트가 상기 제2 표적화된 염색체에 존재하는 상기 제2 프래그먼트와 교환되고,

이에 따라, 상기 제1 일부, 상기 제2 프래그먼트 및 상기 제2 일부를 포함하는 제1 인공 재조합 염색체가 생성되며; 및

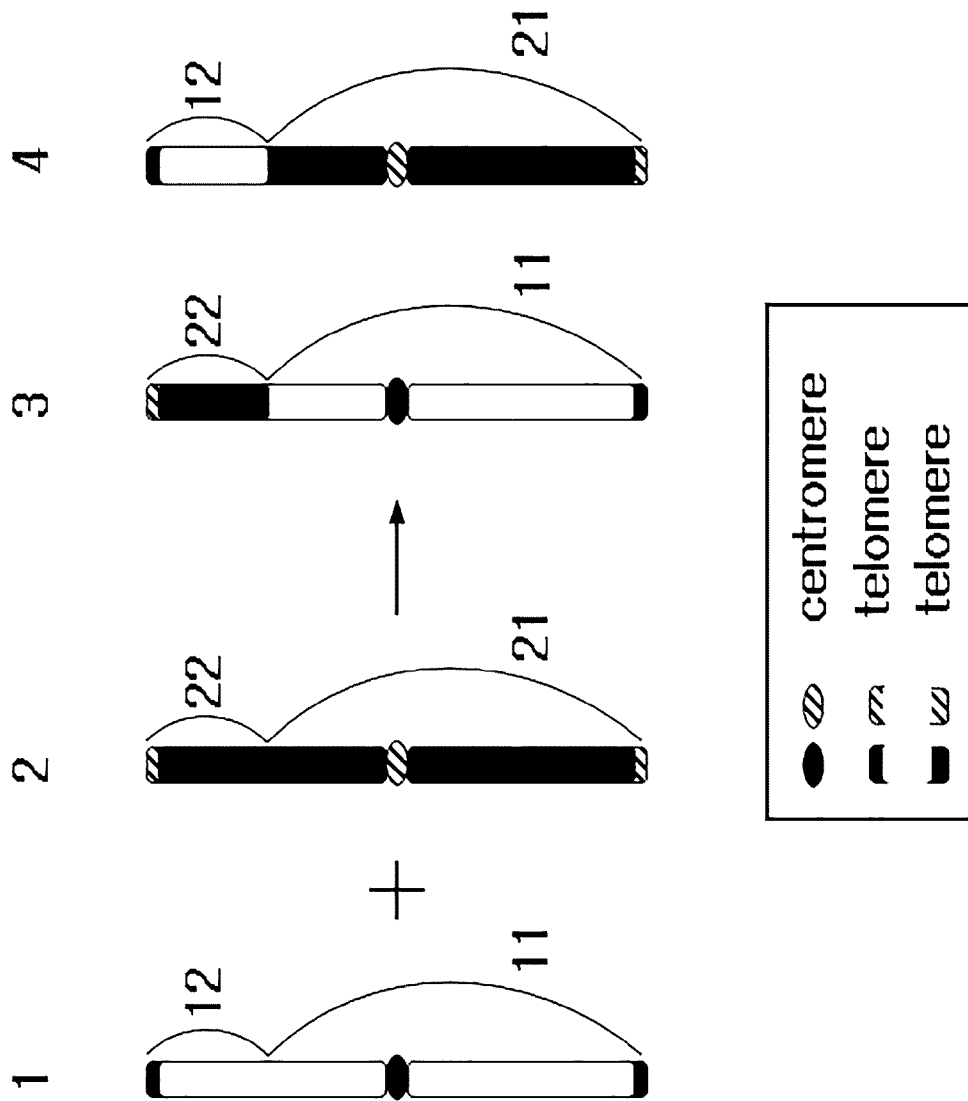
v) 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 포함하는 키메릭 배반포(Chimeric Blastocyst)를 대리모의 자궁에 착상시켜 산자를 생산하고,

이때, 상기 키메릭 배반포는 상기 제1 인공 재조합 염색체를 포함하는 세포를 배반포에 주입하여 생산된, 것을 포함하는 형질전환 비인간 동물의 제작 방법.

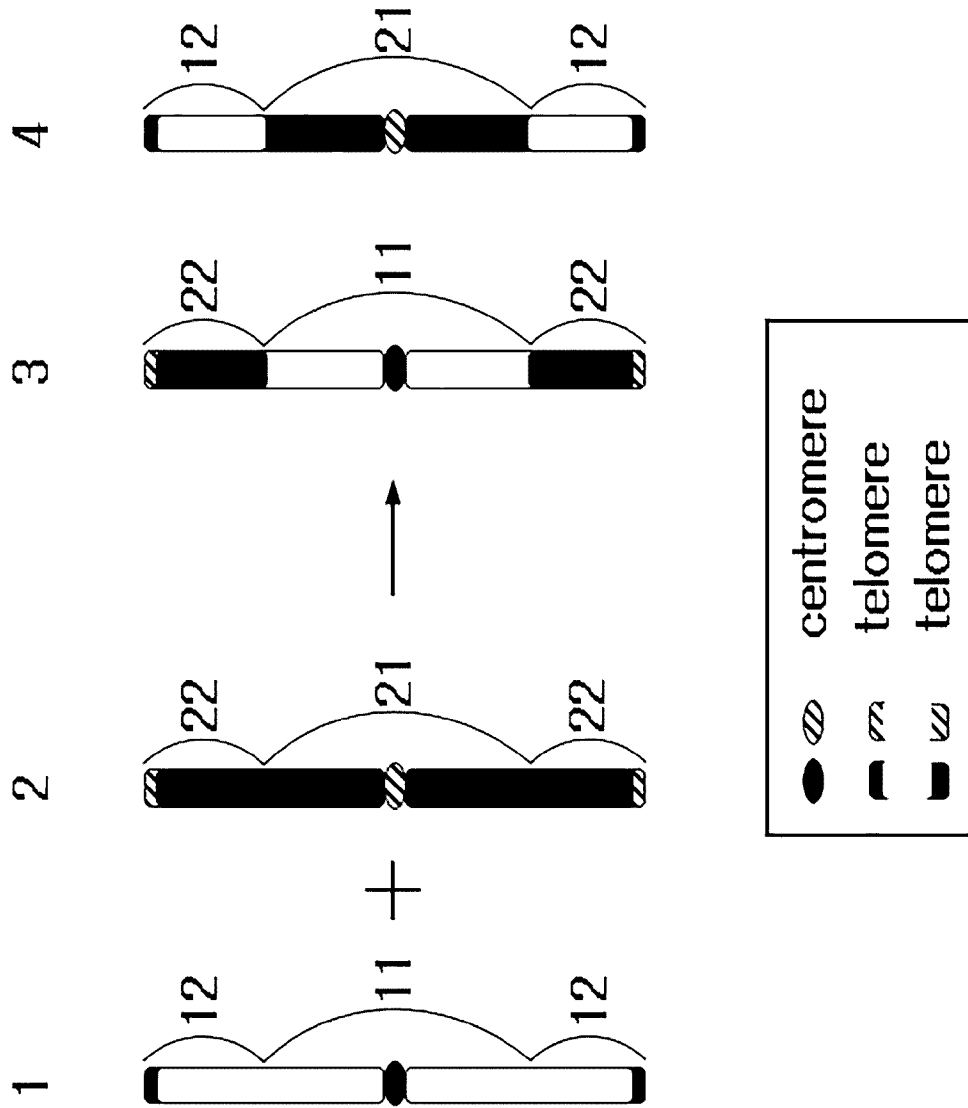
[도1]



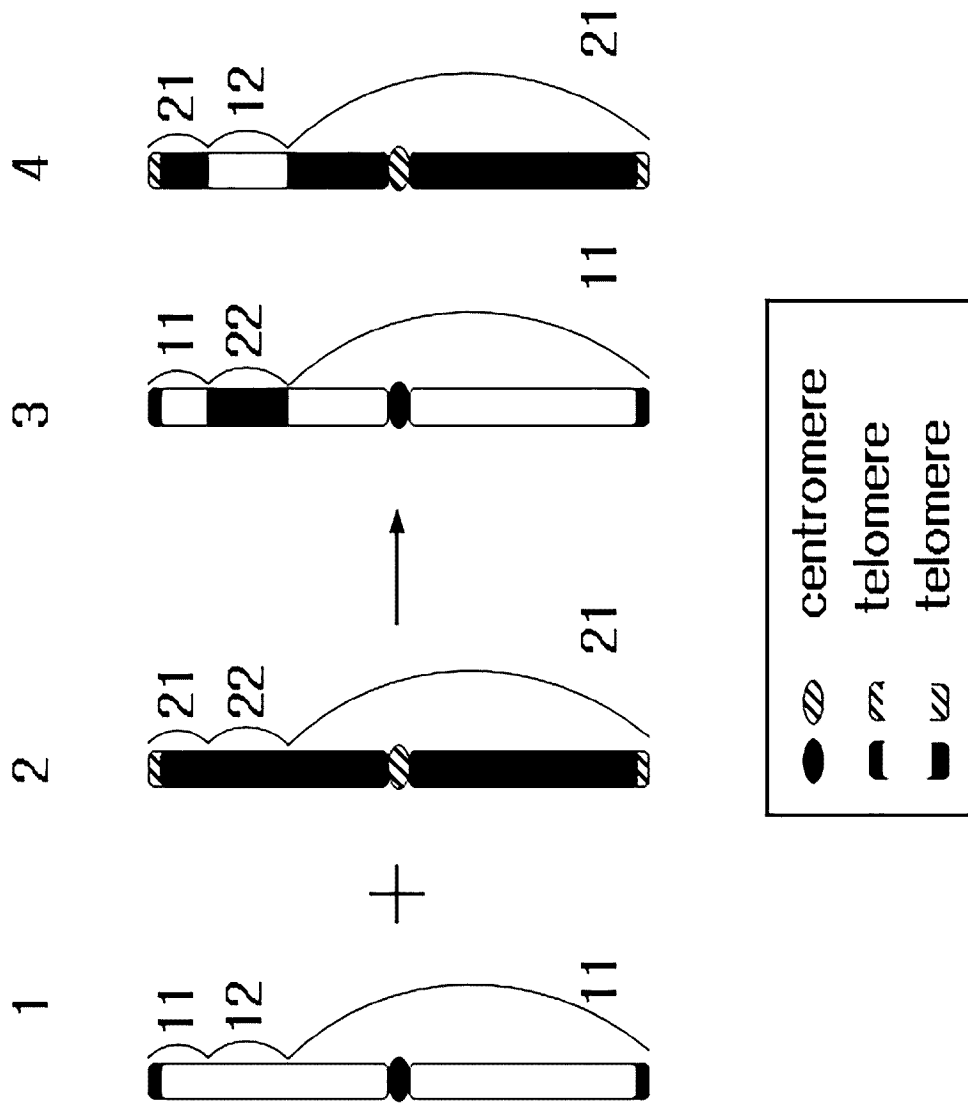
[도2]



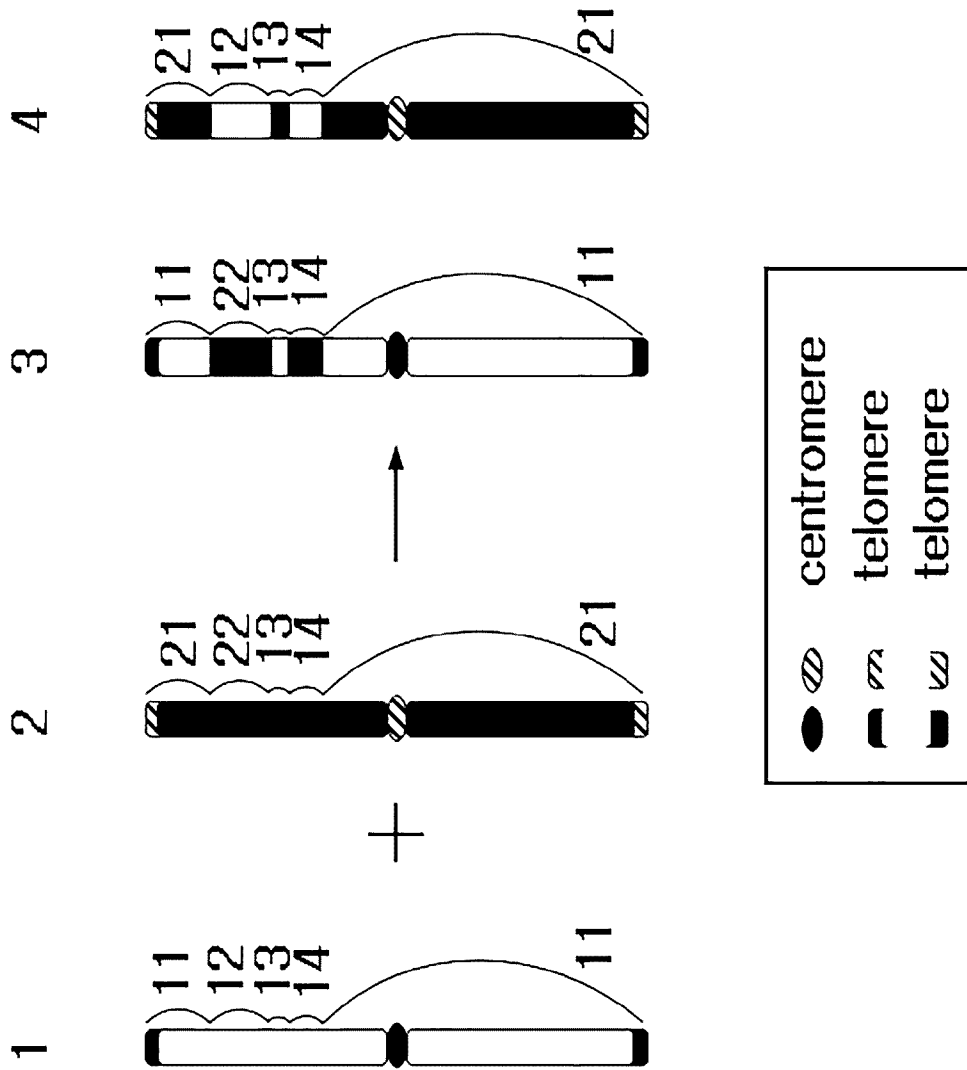
[도3]



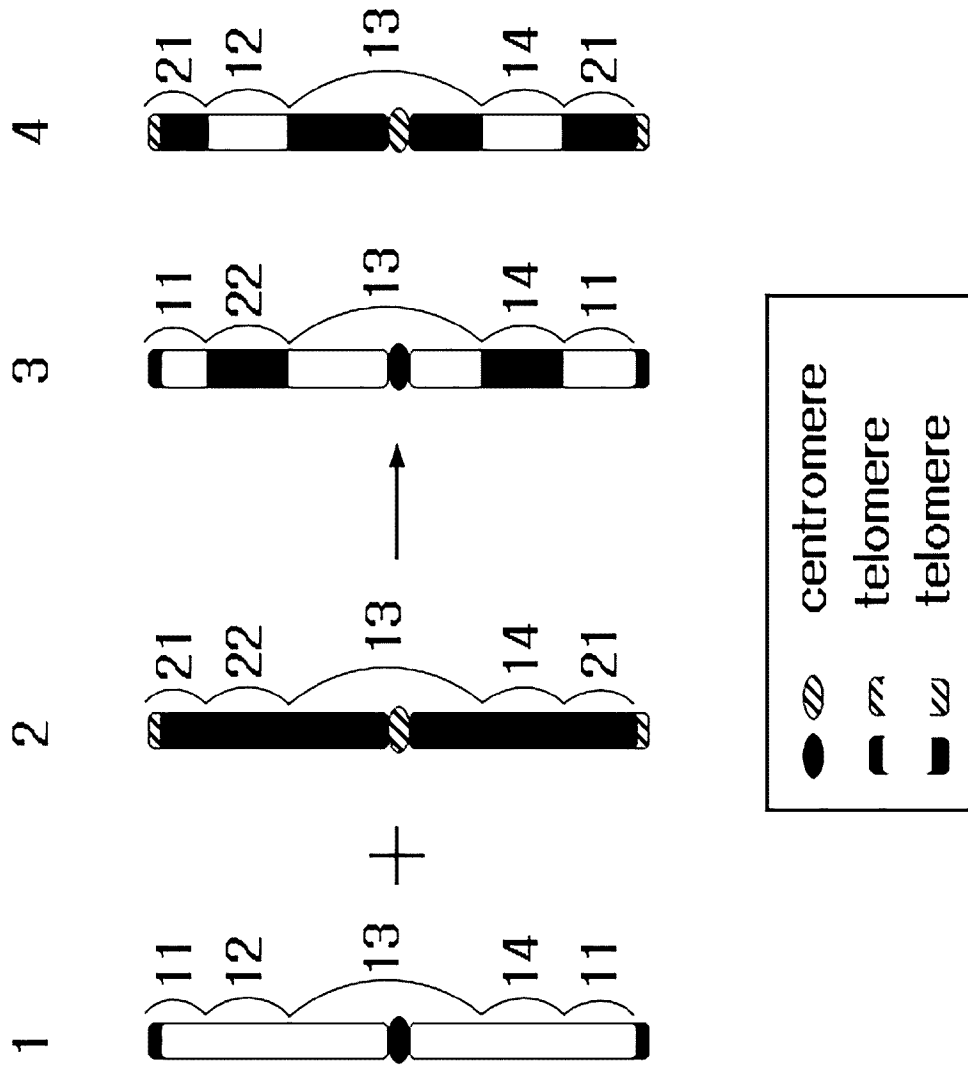
[도4]



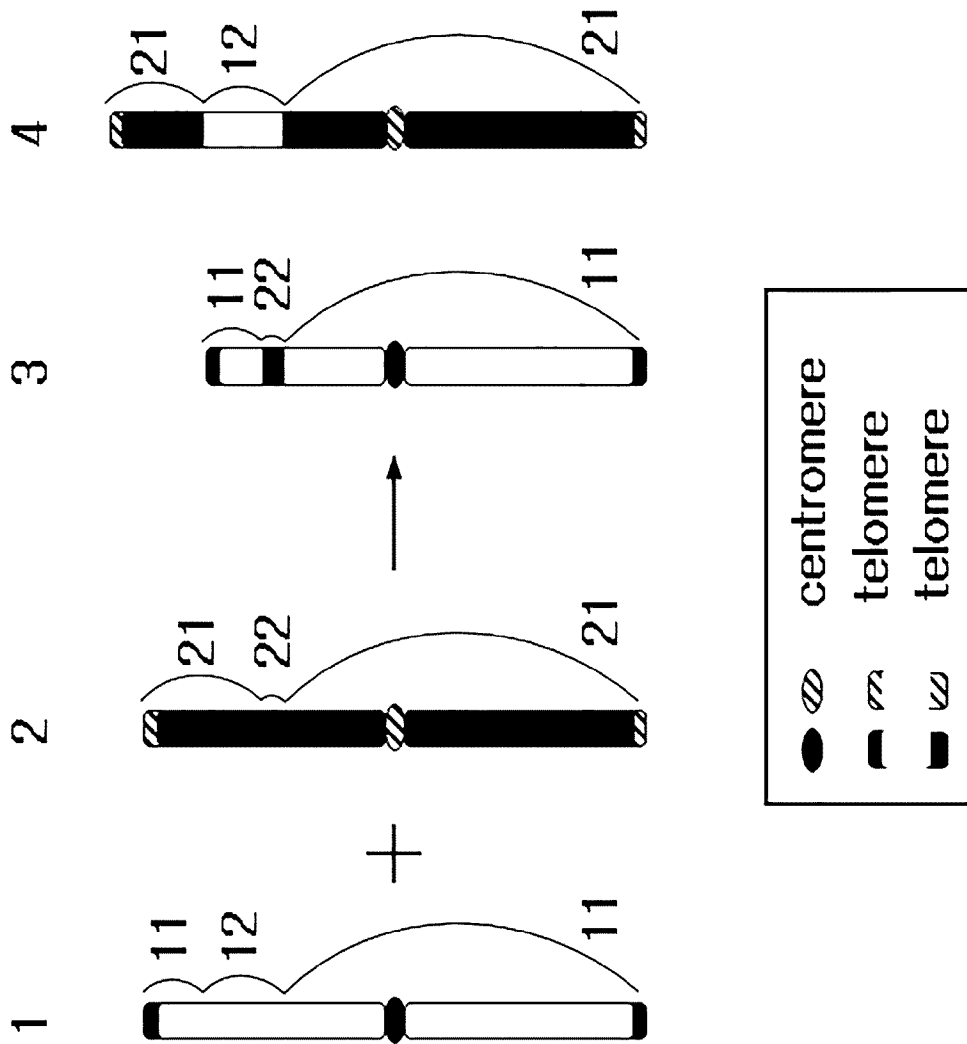
[도5]



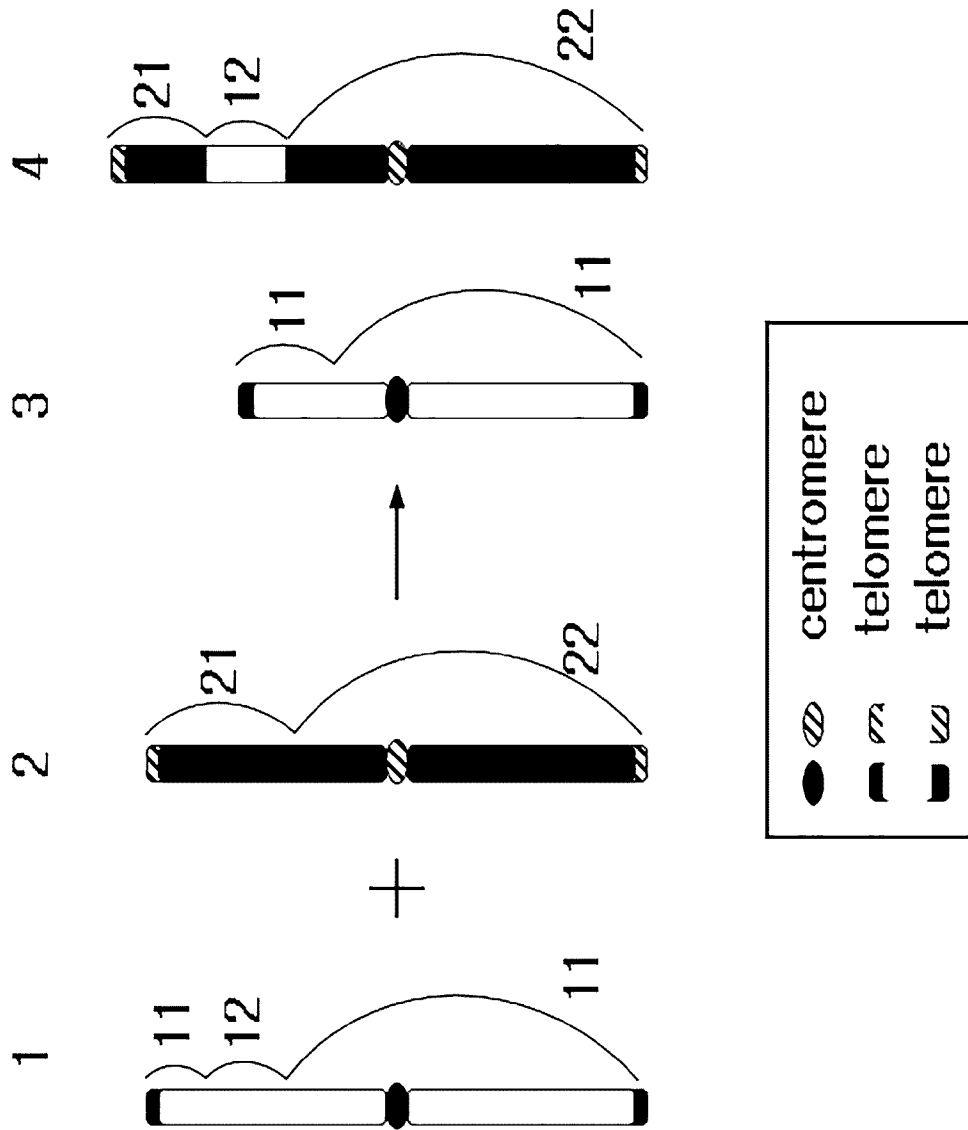
[도6]



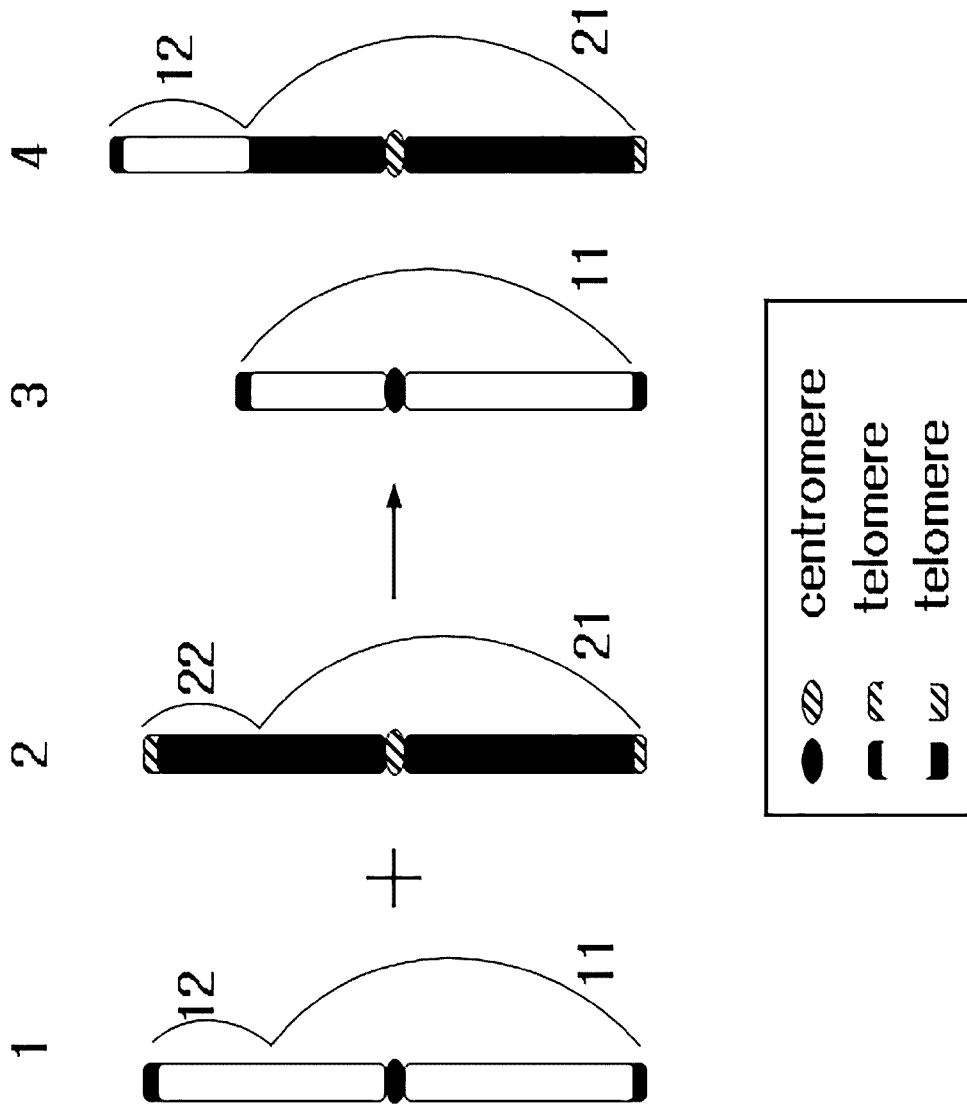
[도7]



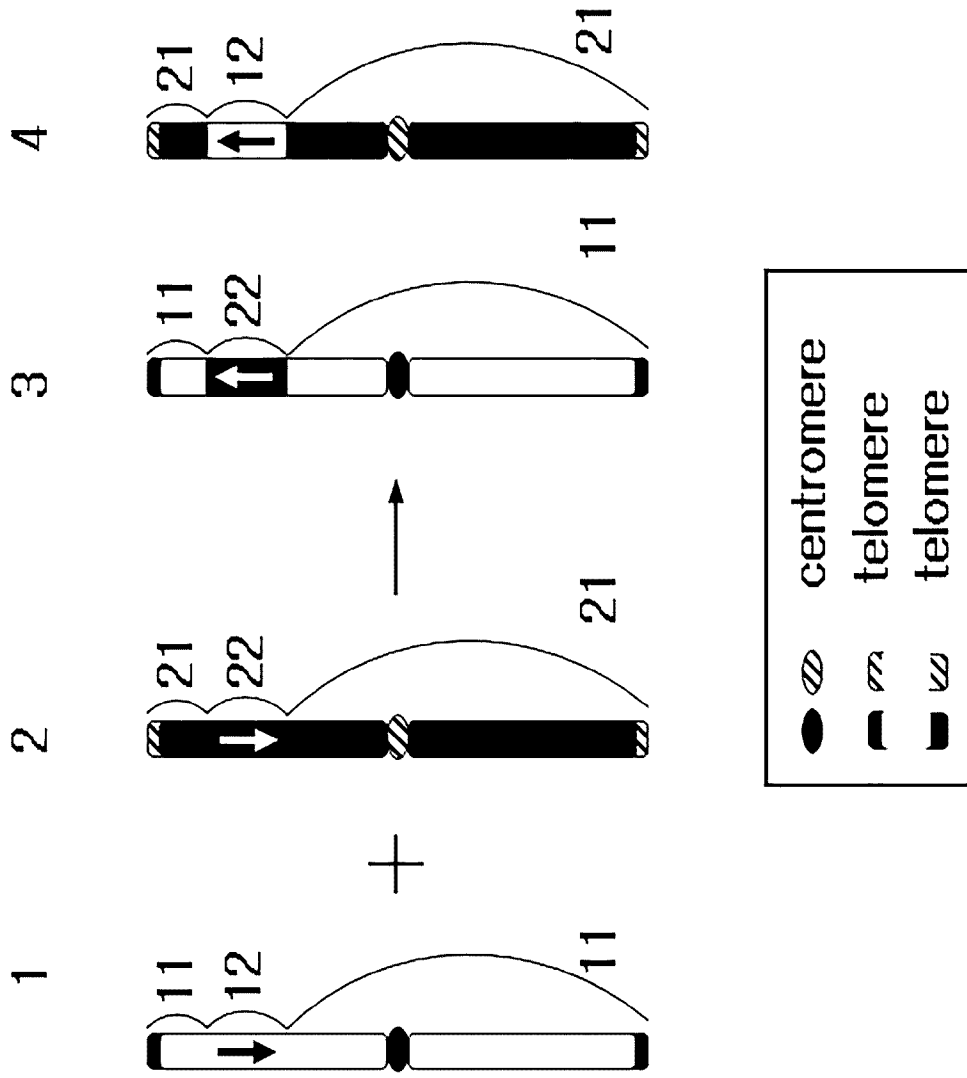
[도8]



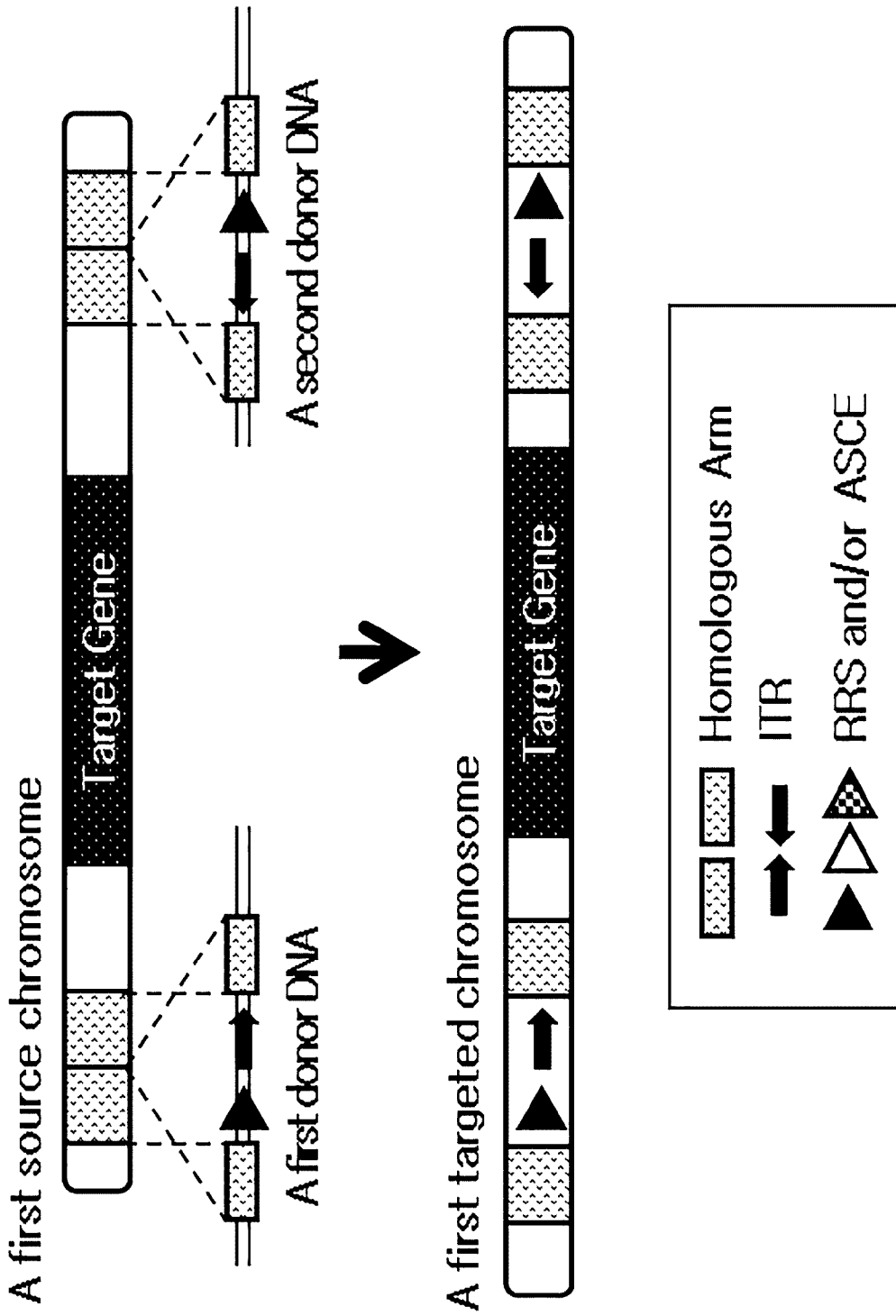
[도9]



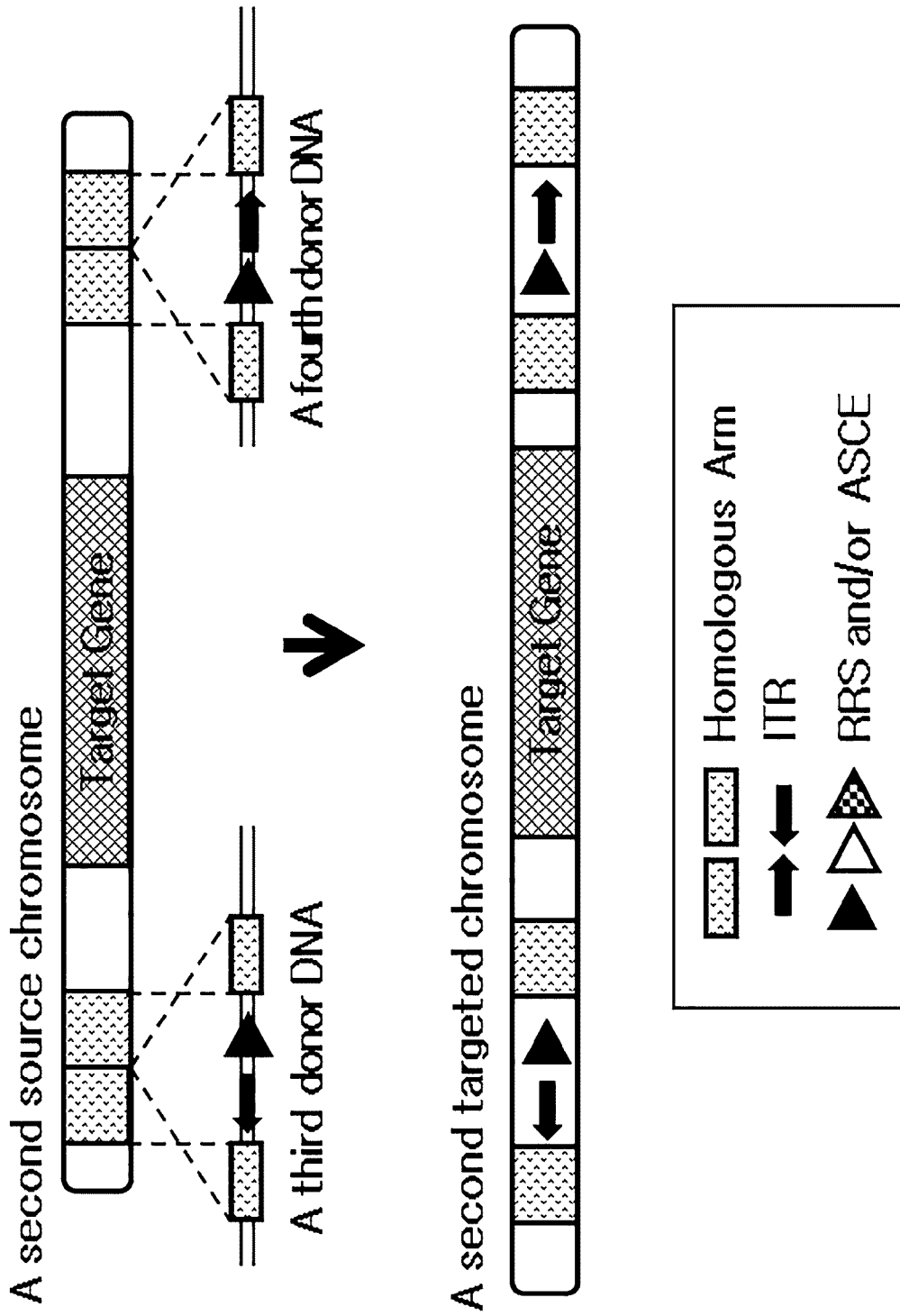
[도10]



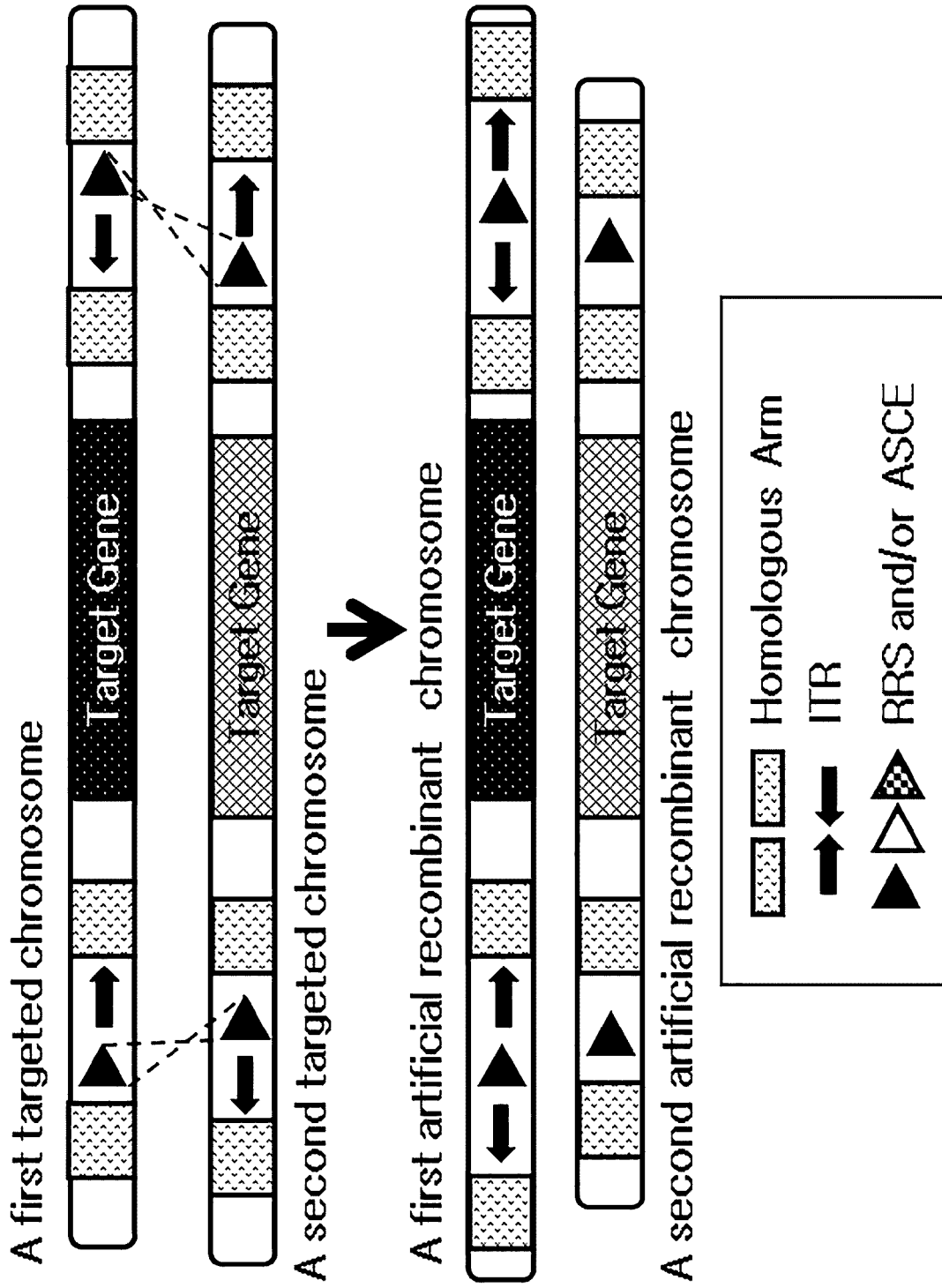
[도 11]



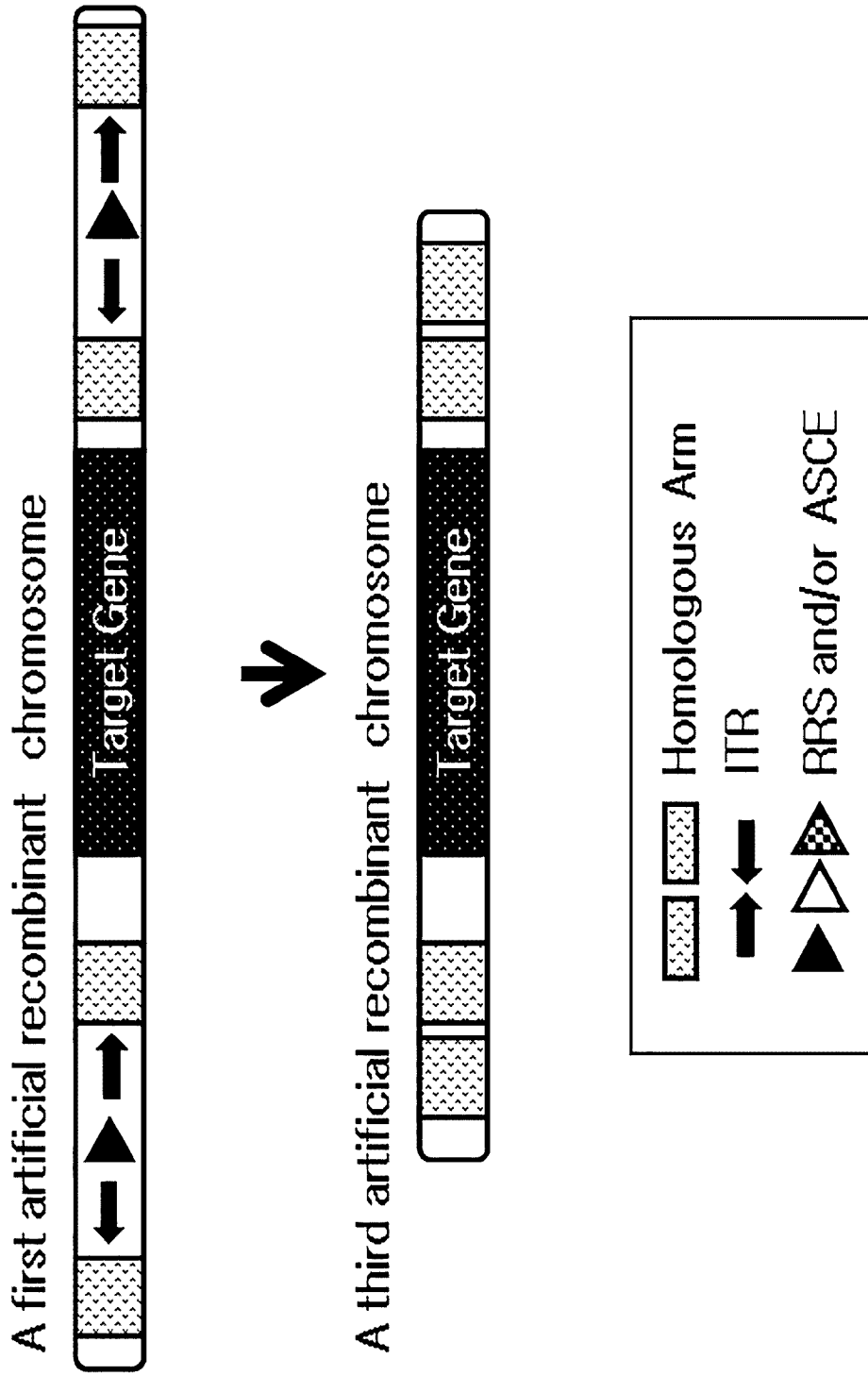
[도 12]



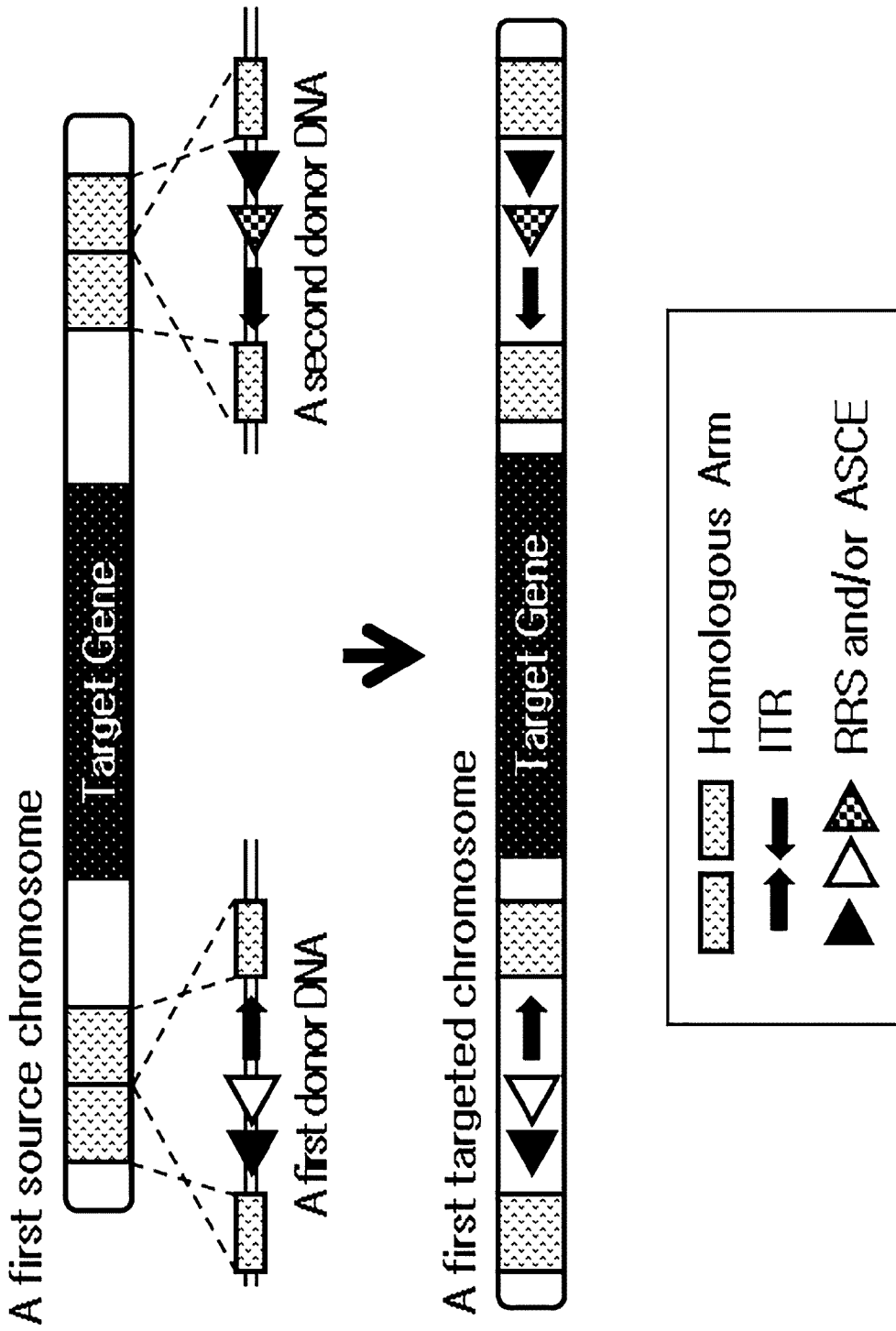
[도13]



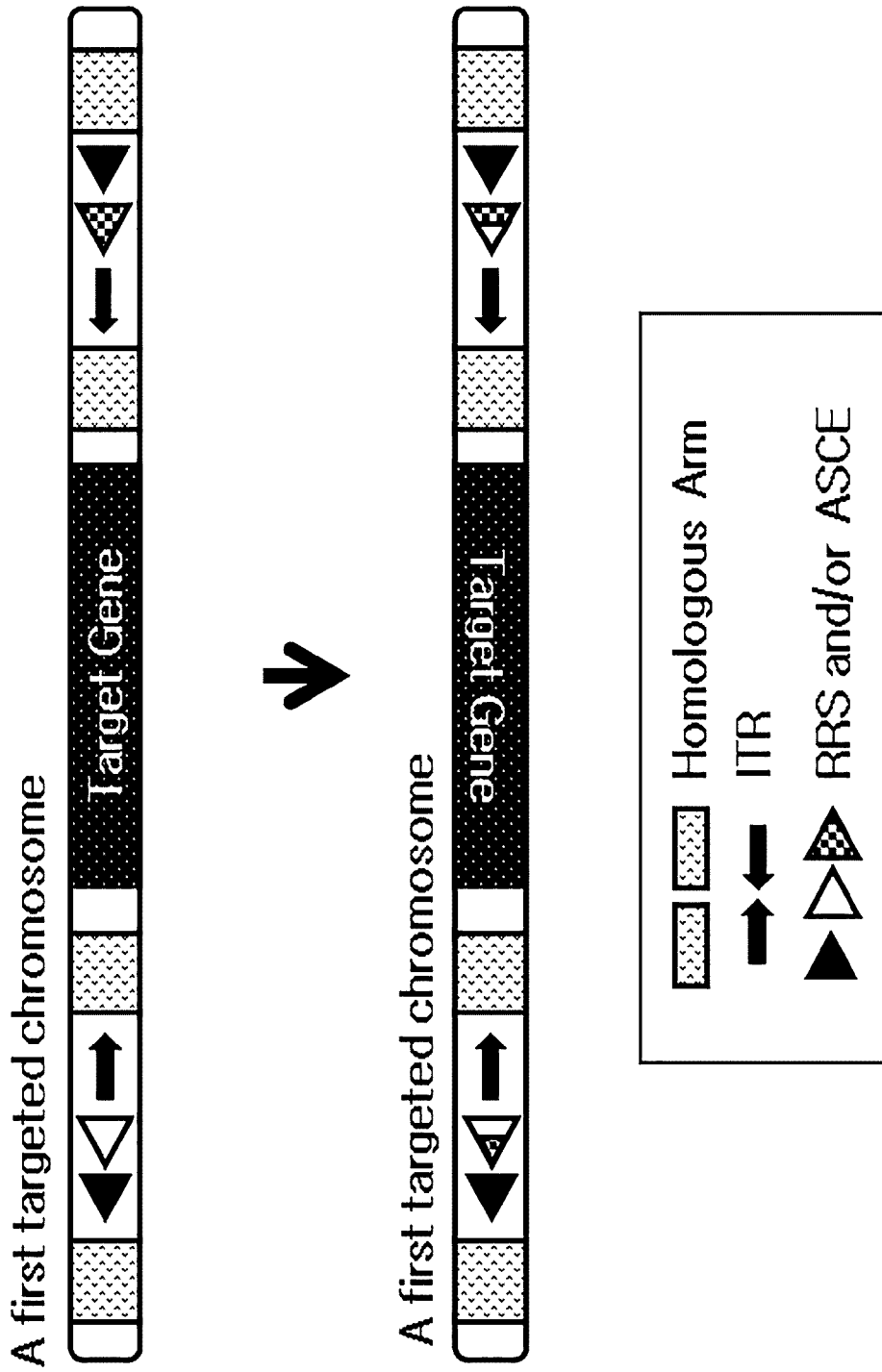
[도14]



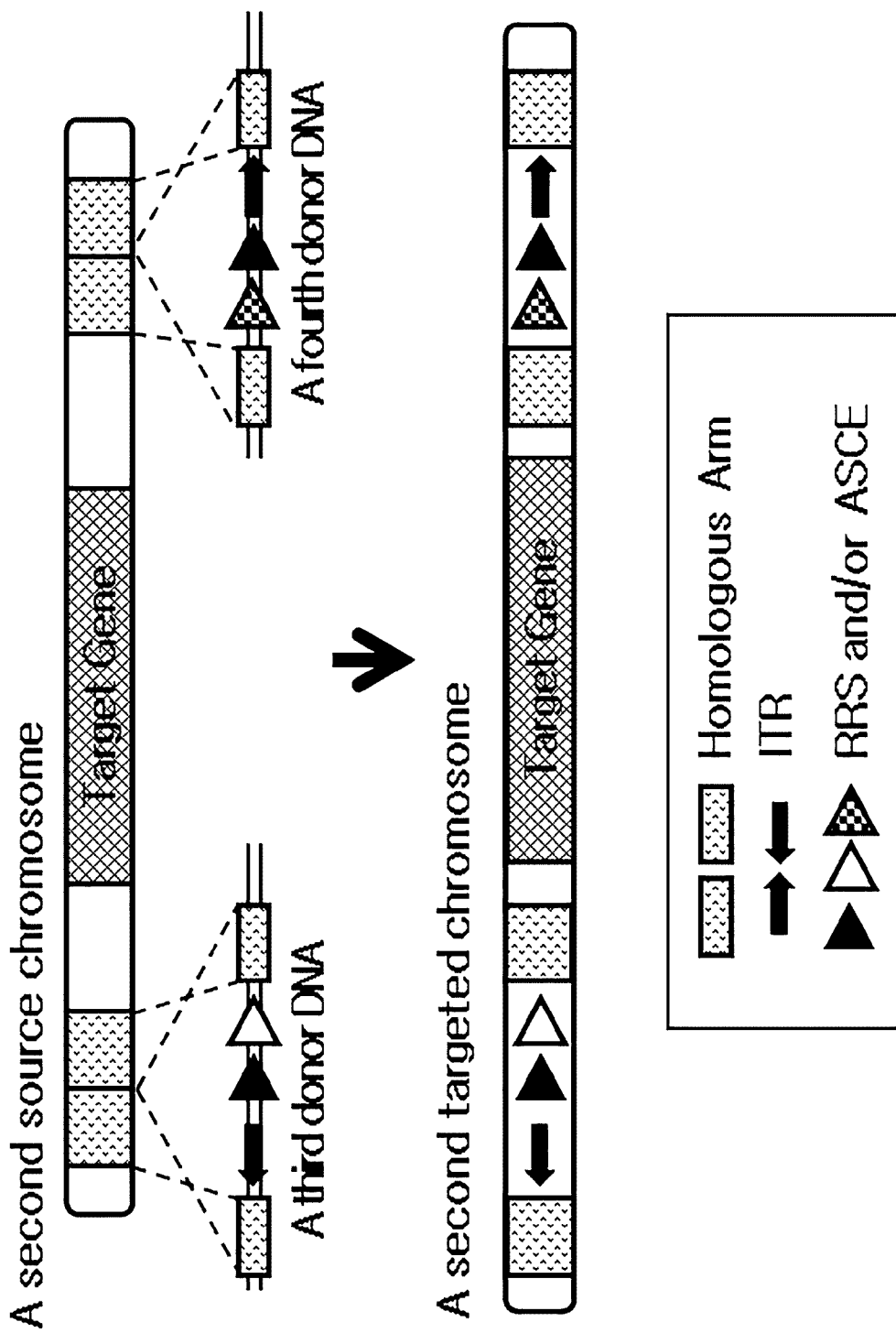
[도 15]



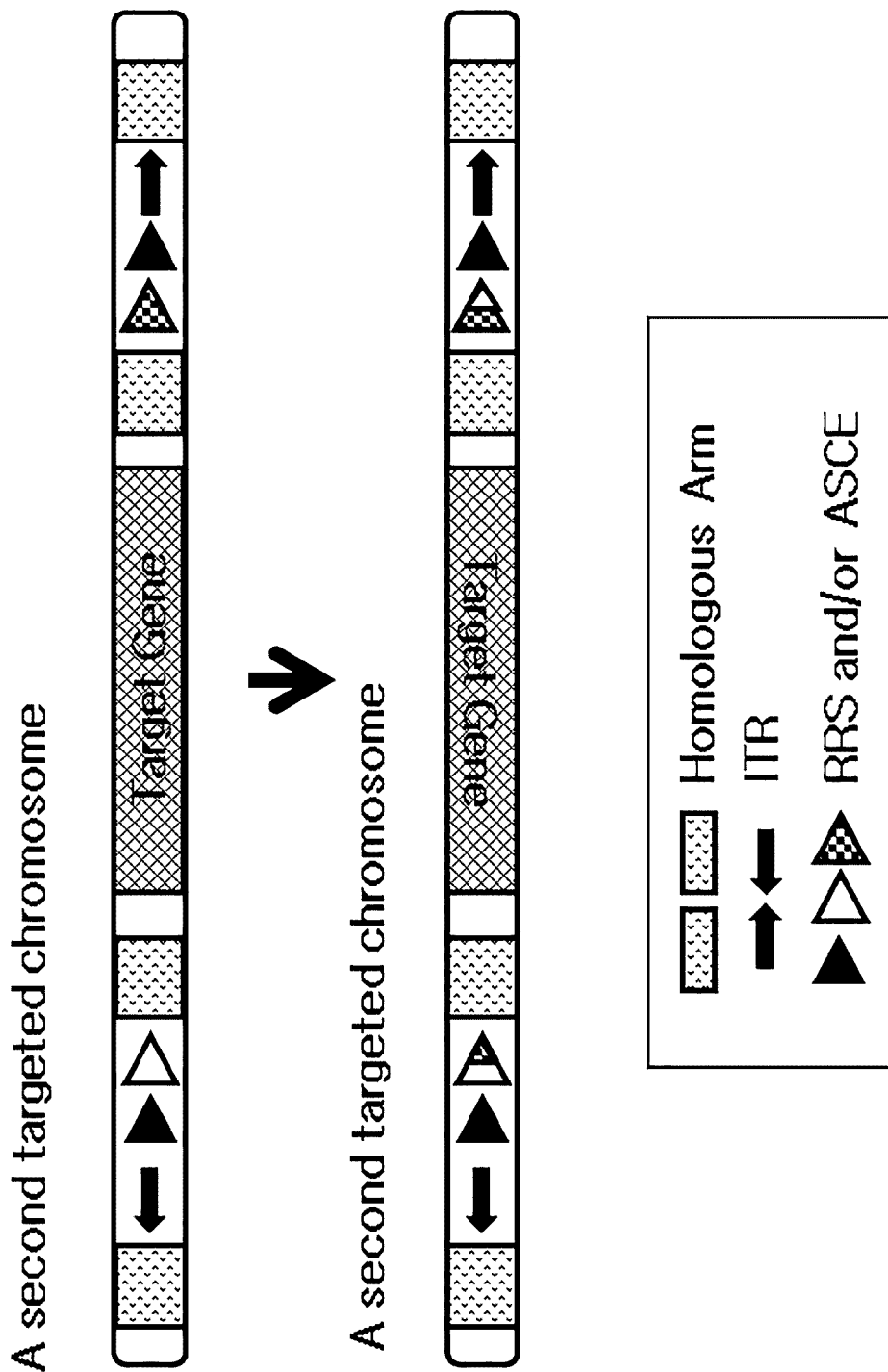
[도16]



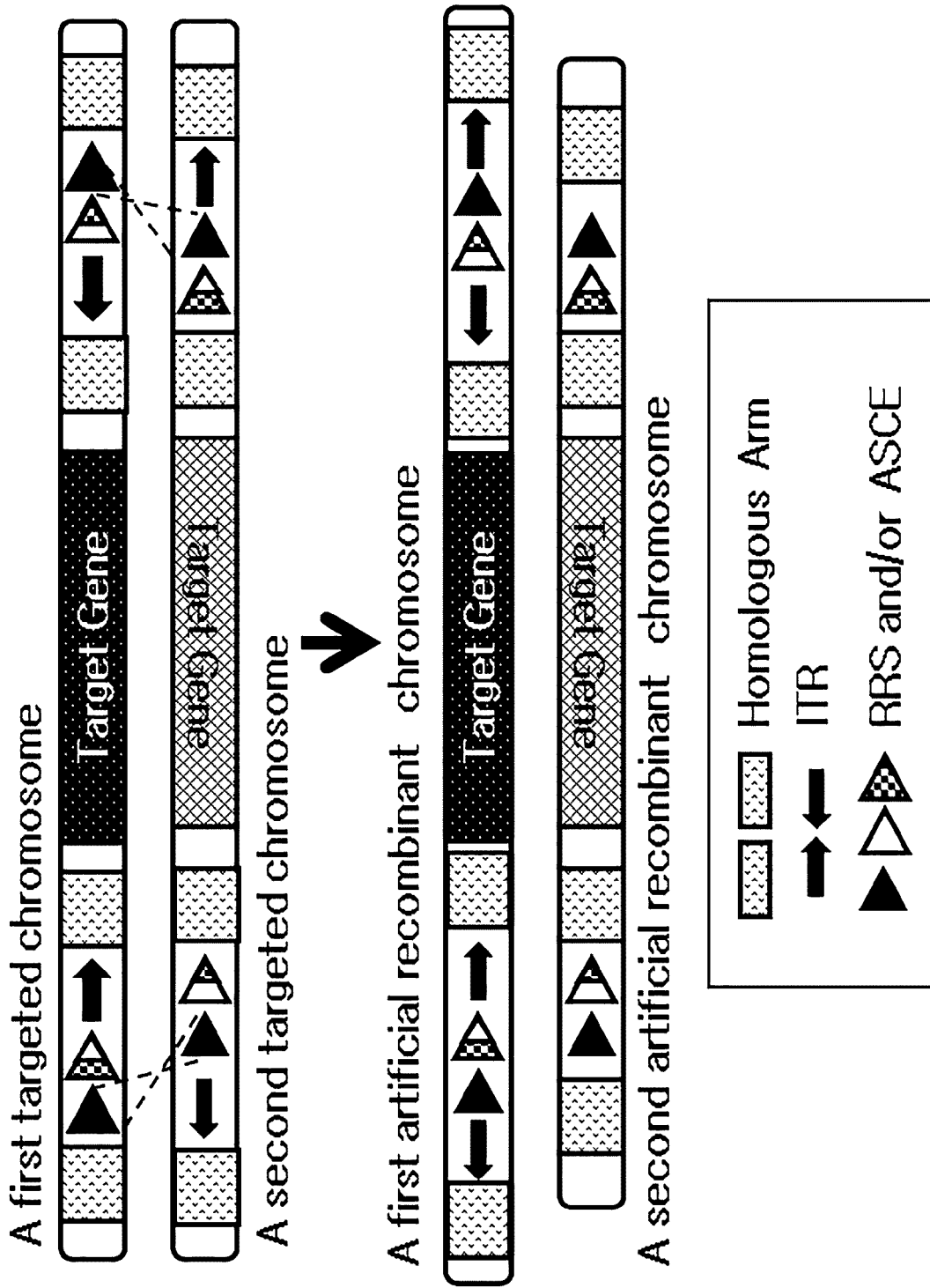
[도17]



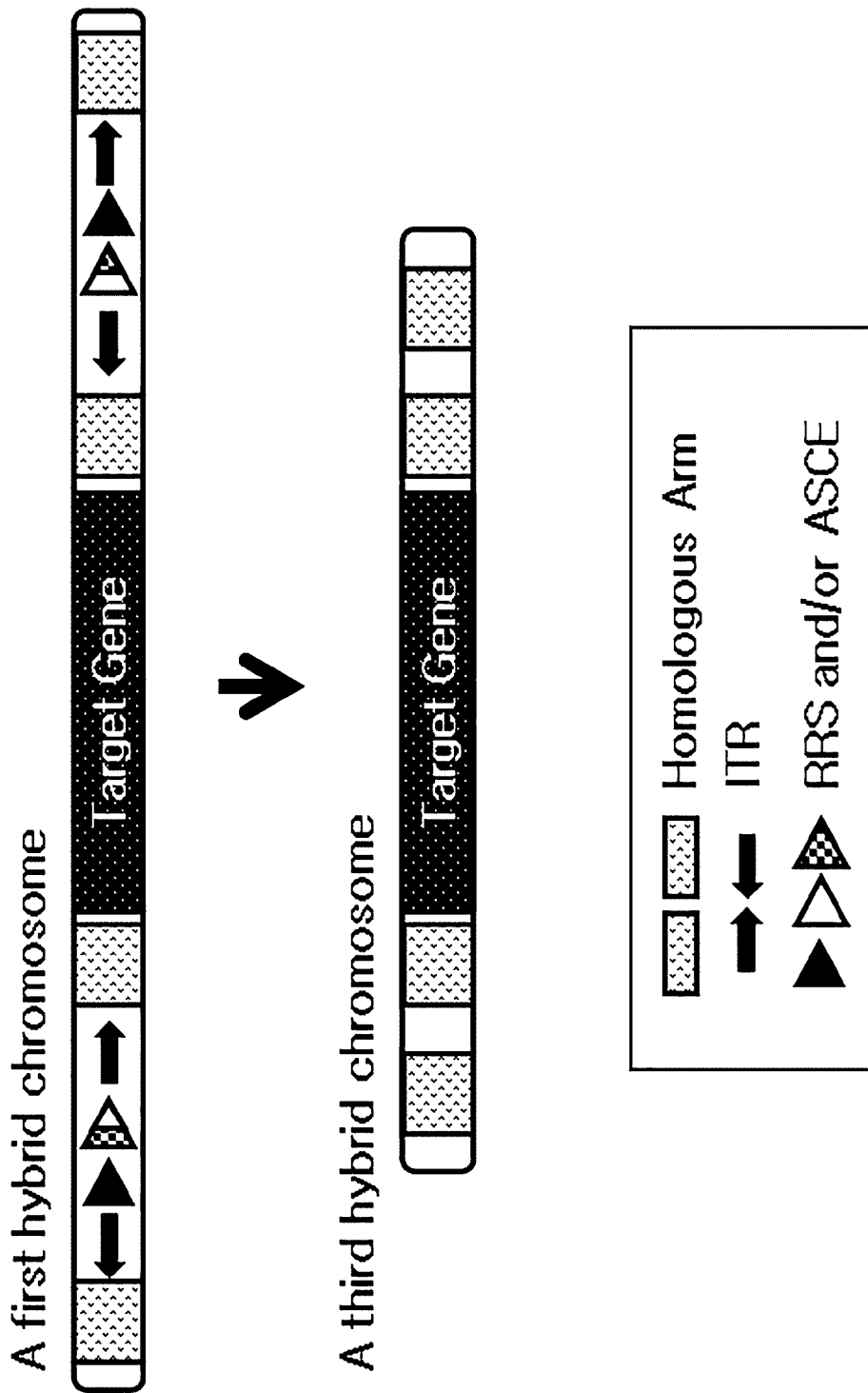
[도18]



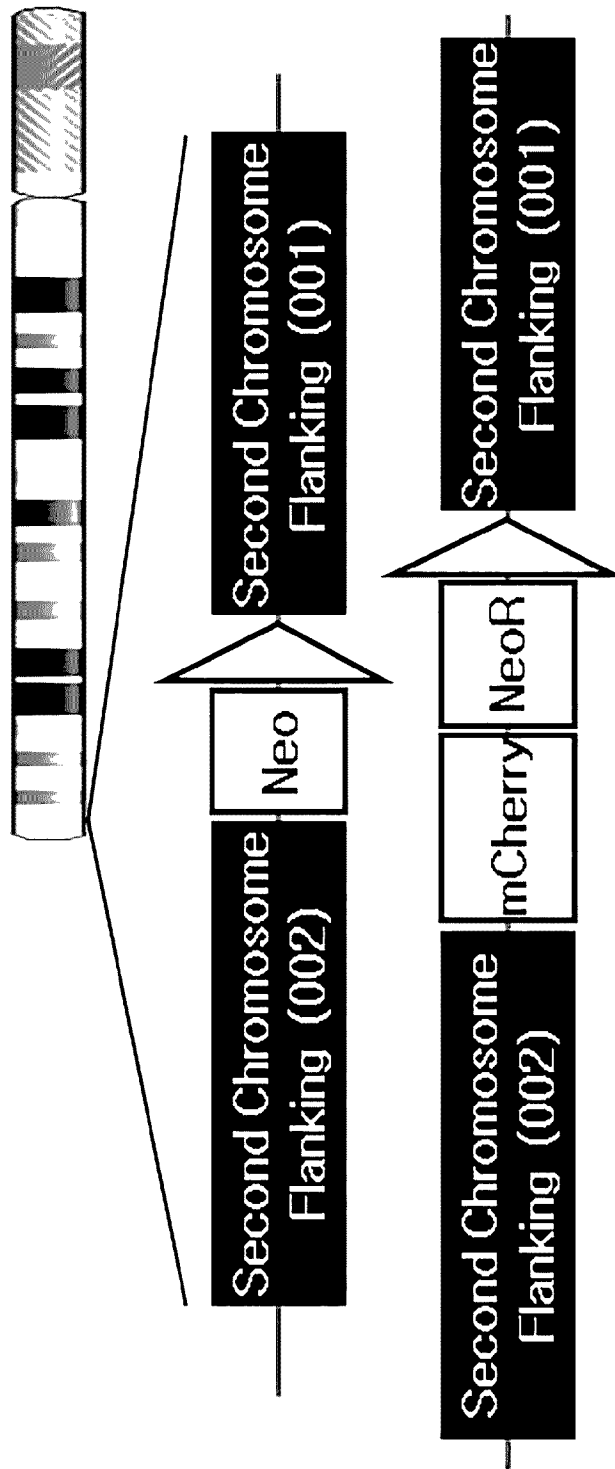
[도 19]



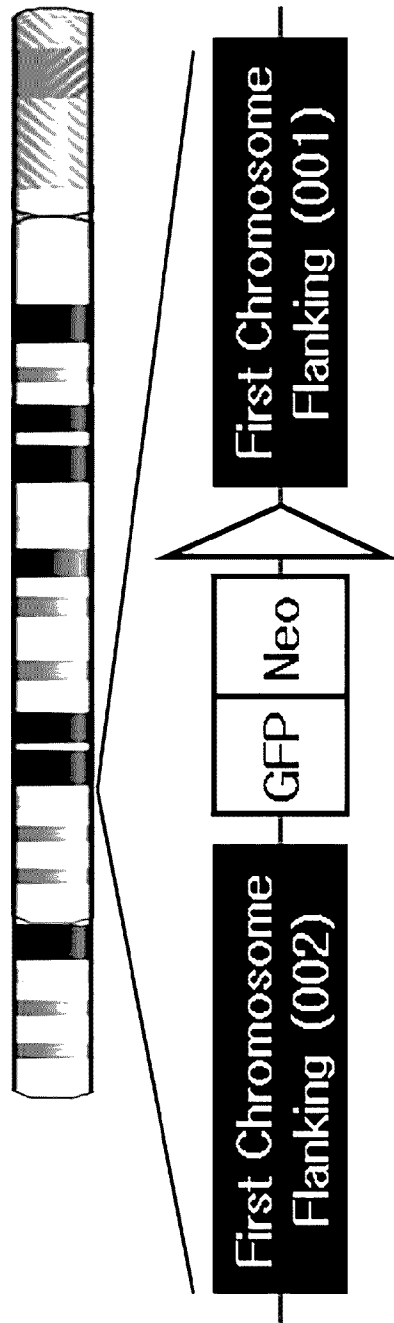
[도20]



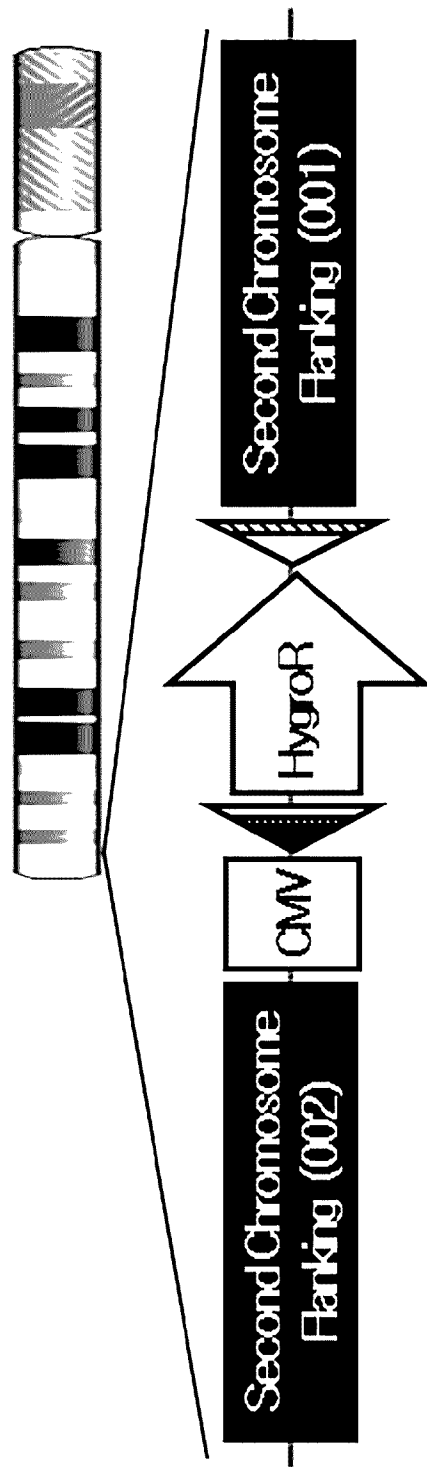
[도21]



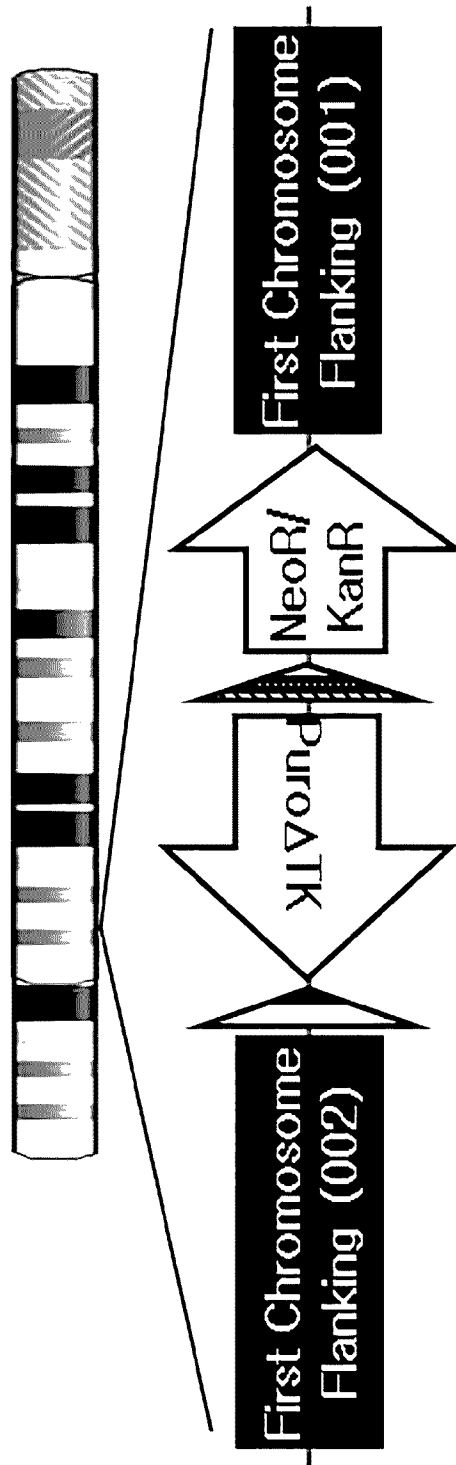
[도22]



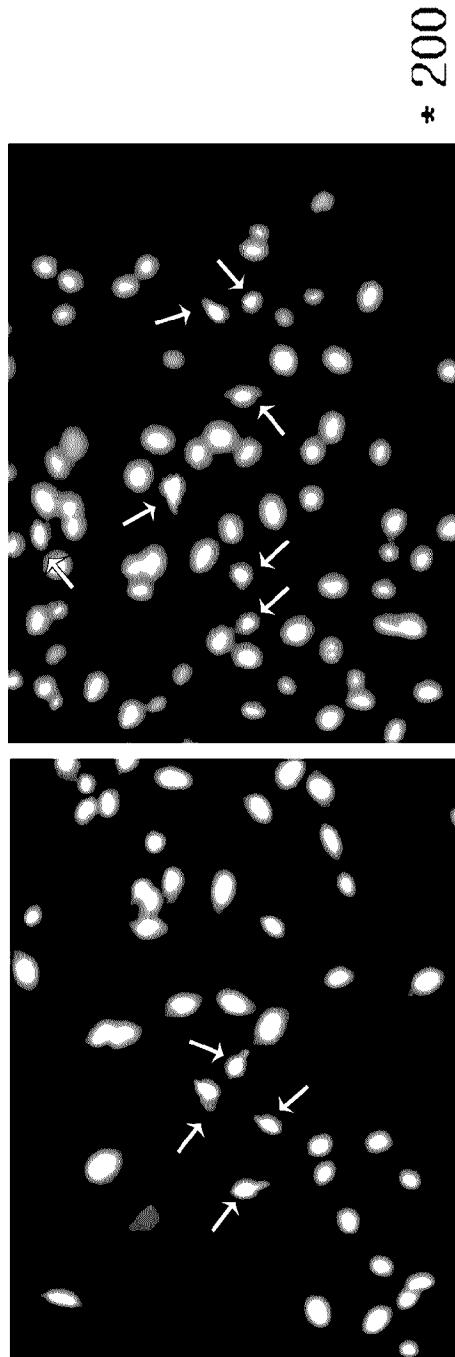
[도23]



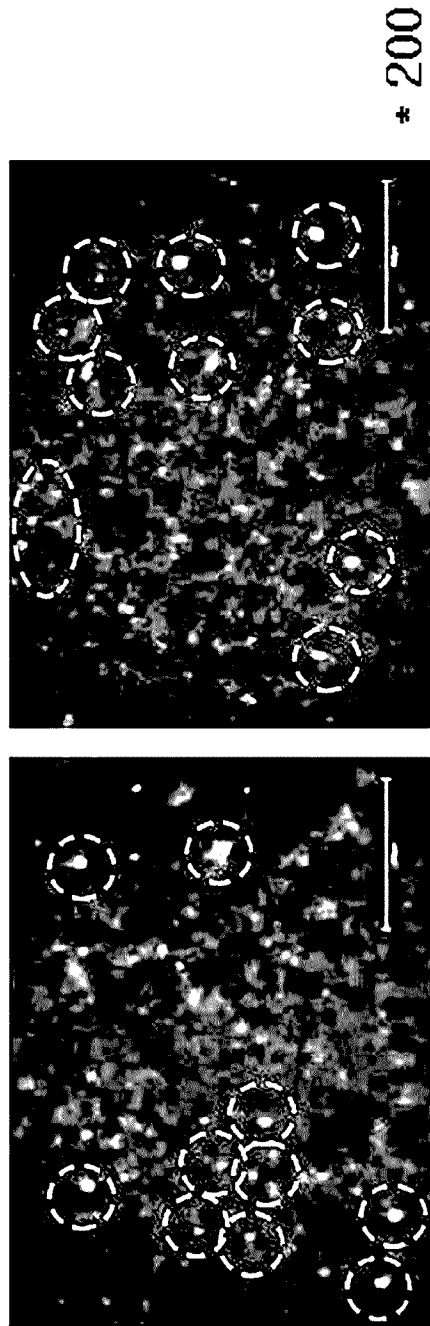
[도24]



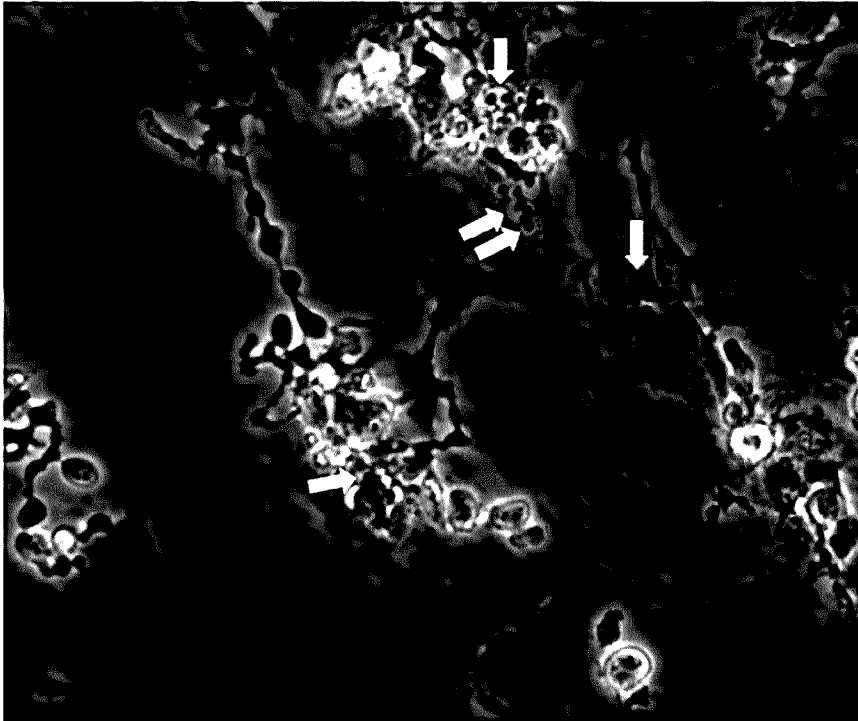
[도25]



[도26]

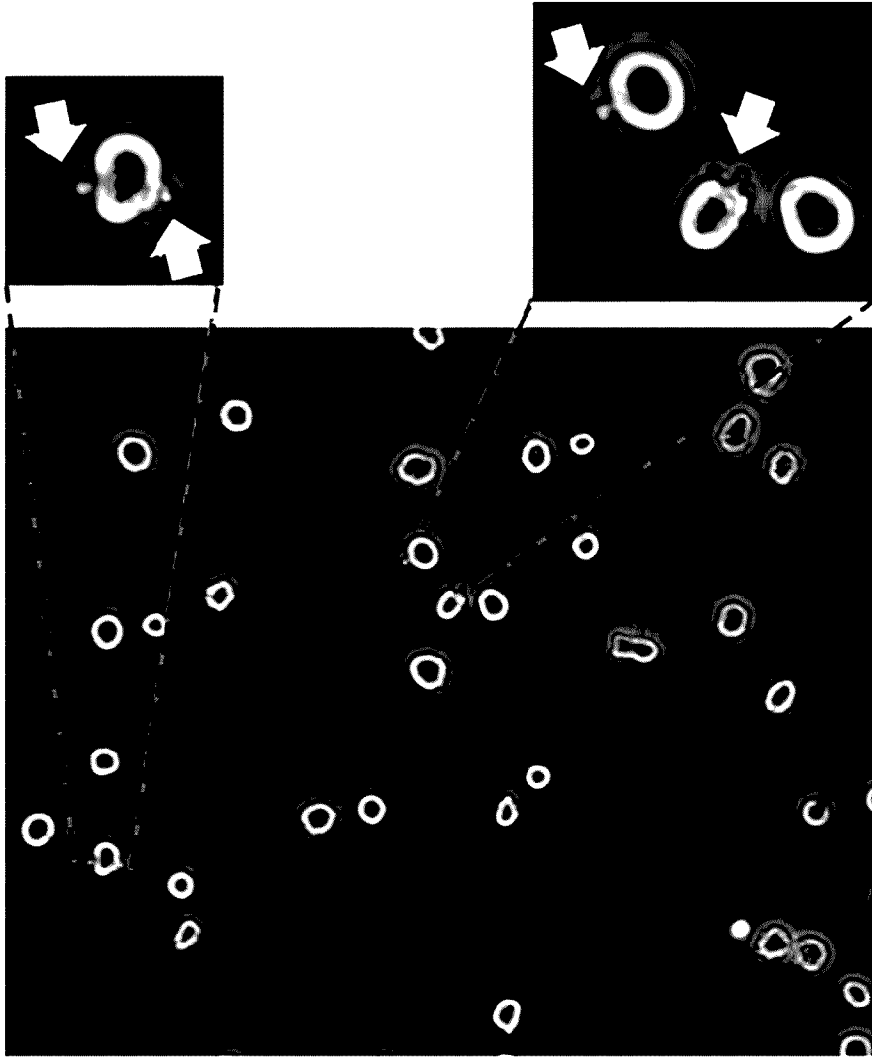


[도27]

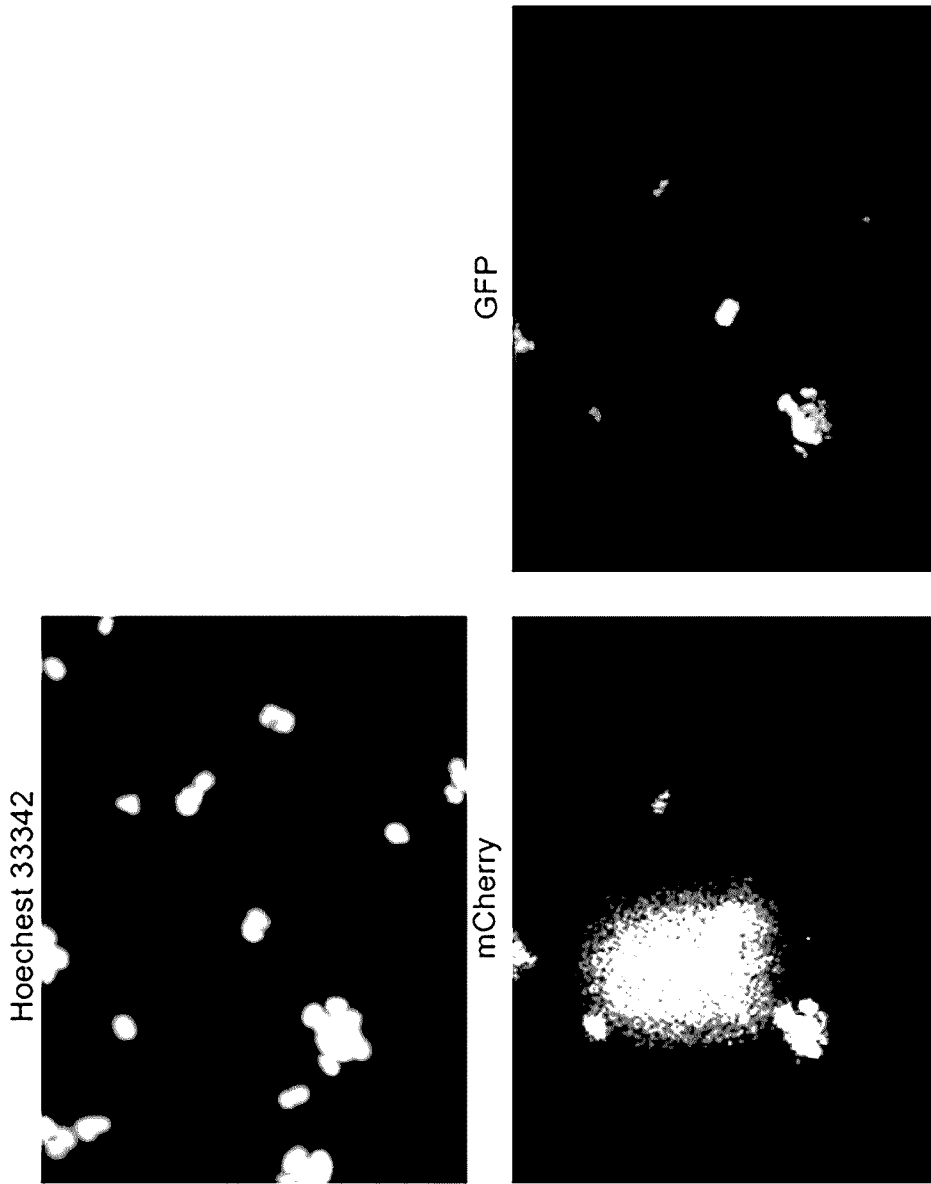


* 400

[도28]

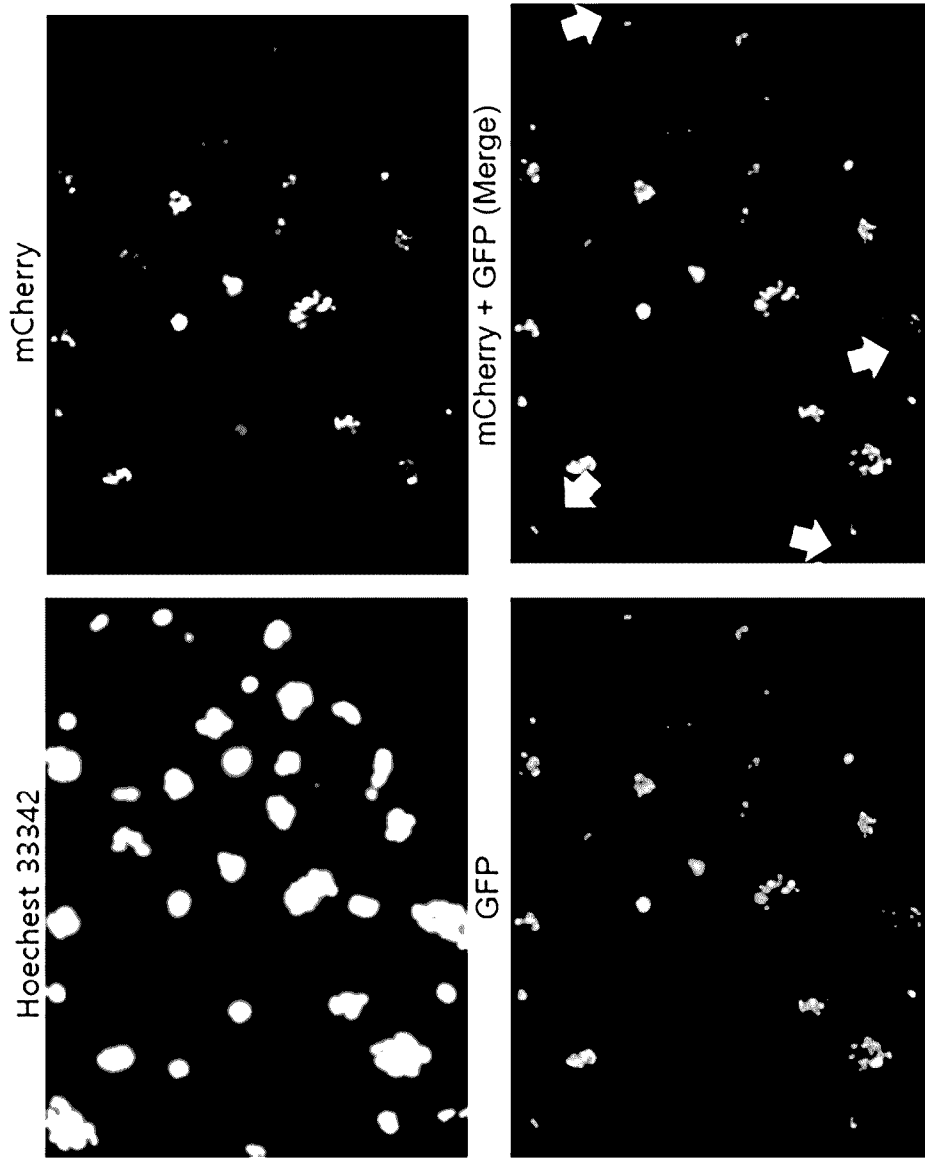


[도29]



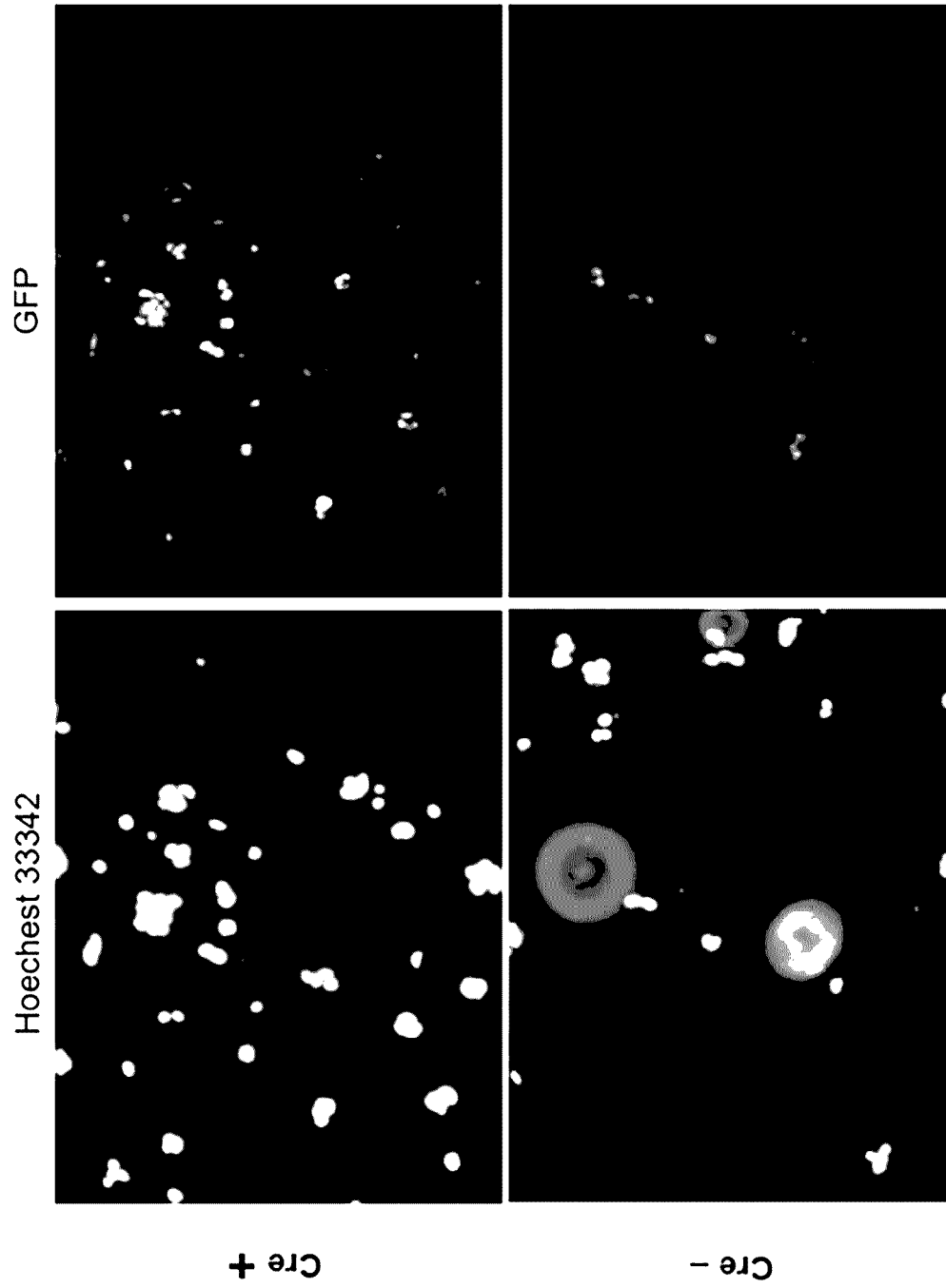
hTVC-GFP microcells
mTVC mCherry
HVJ-E fusion, Cre -

[도30]

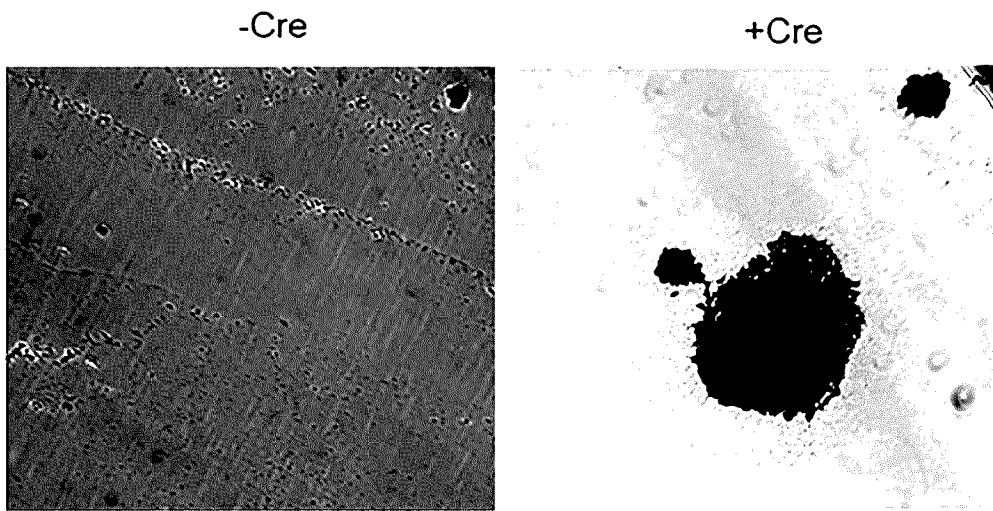


HTVC-GFP microcells
mTVC mCherry
HVJ-E fusion, Cre +

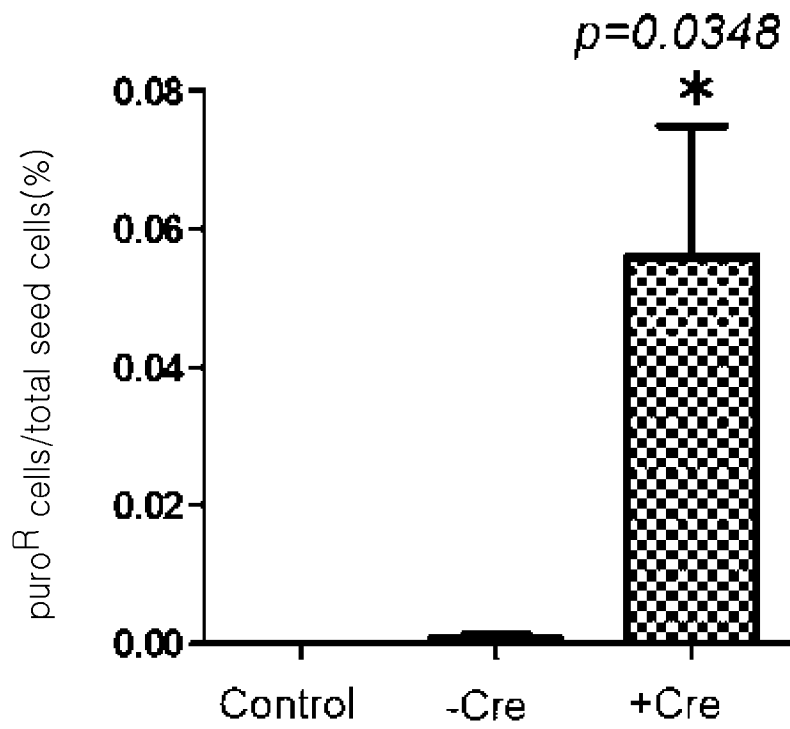
[도31]



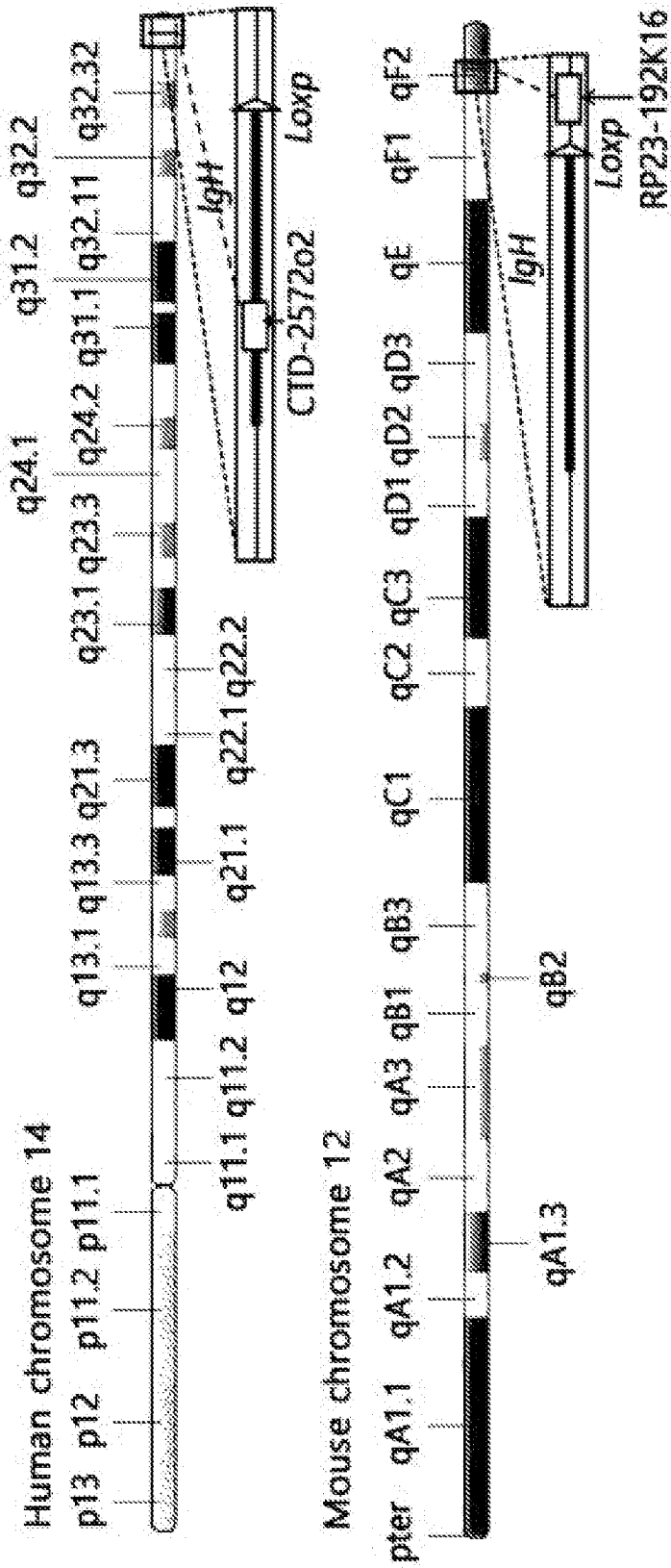
[도32]



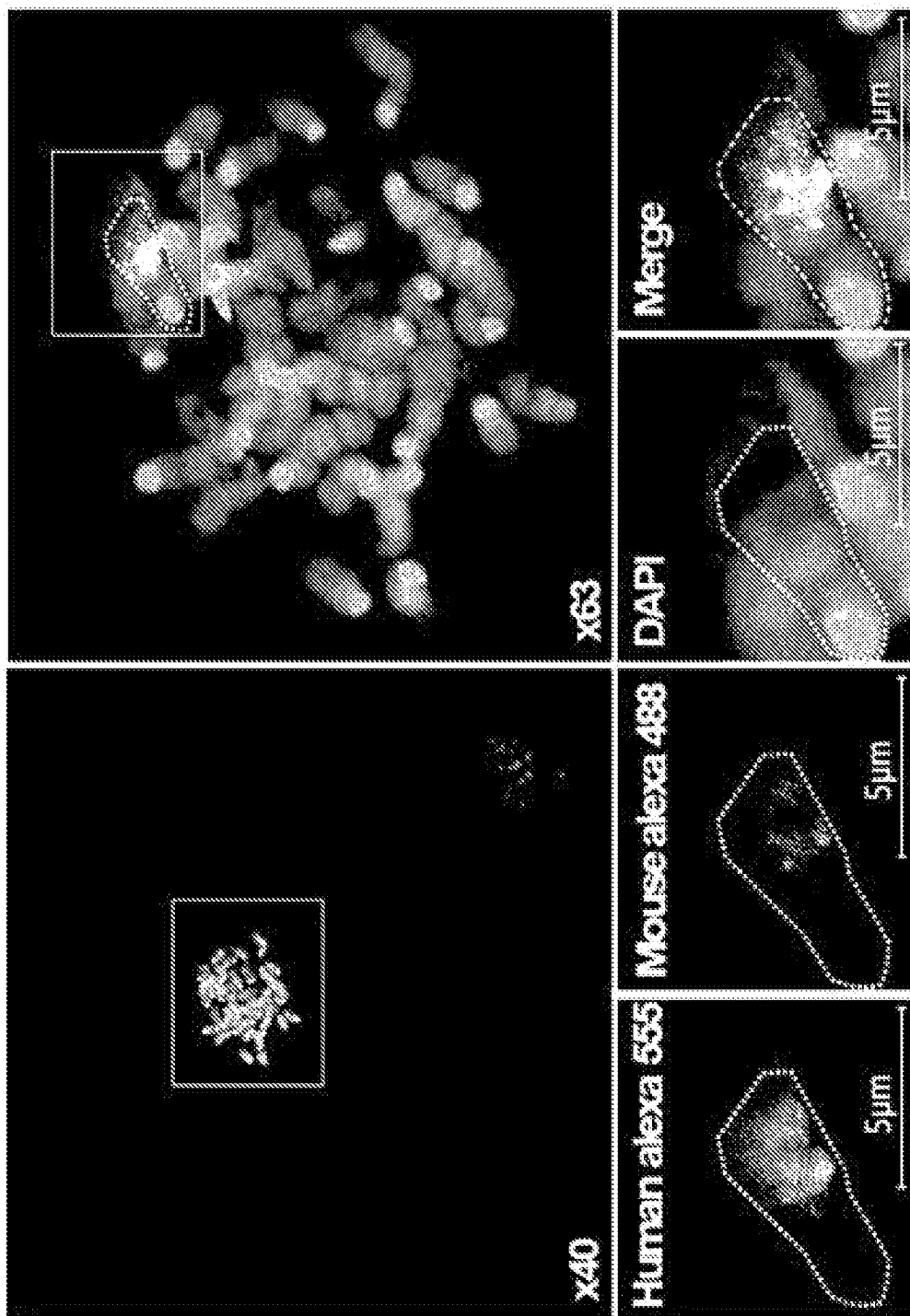
[도33]



[534]



[535]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/015351

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/16(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/16; A01K 067/027; C12N 015/85; C12N 15/00; C12N 15/09; C12N 15/63; C12N 5/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
 Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: recombination, chromosome, RRS, SSR, telomere, centromere, MMCT
 (Microcell-Mediated Chromosome Transfer)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 7371568 B1 (TOMIZUKA, K. et al.) 13 May 2008 See abstract; column 6; figure 59; claims 1, 6, 8-13.	1-27
X	KAZUKI, Y. et al. Humanized UGT2 and CYP3A transchromosomal rats for improved prediction of human drug metabolism. Proceedings of the National Academy of Sciences. 04 February 2019, vol. 116, no. 8, pages 3072-3081 See abstract; figure 1; page 3073.	1-27
X	OSHIMURA, M. et al. A pathway from chromosome transfer to engineering resulting in human and mouse artificial chromosomes for a variety of applications to bio-medical challenges. Chromosome Research. 2015, vol. 23, pages 111-133 See abstract; figures 1-2.	1-27
X	SATO, D. et al. Human and mouse artificial chromosome technologies for studies of pharmacokinetics and toxicokinetics. Drug metabolism and pharmacokinetics. 2018, vol. 33, pages 17-30 See abstract; figures 1-2; pages 17-18.	1-27
A	US 2005-0125850 A1 (LUO, L. et al.) 09 June 2005 See abstract; claims 1-25.	1-27



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 FEBRUARY 2020 (24.02.2020)

Date of mailing of the international search report

25 FEBRUARY 2020 (25.02.2020)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
 Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu,
 Daejeon, 35208, Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2019/015351

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2005-0048666 A (KIRIN BEER KABUSHIKI KAISHA) 24 May 2005 See abstract; claims 37-46.	1-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/015351

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 7371568 B1	13/05/2008	AU 5304299 A	14/03/2000
		EP 1106061 A1	13/06/2001
		EP 1106061 A4	14/04/2004
		JP 3732407 B2	05/01/2006
		TW 1255853 B	01/06/2006
		US 2009-0007282 A1	01/01/2009
		US 2011-0151518 A1	23/06/2011
		US 7868223 B2	11/01/2011
		US 8124406 B2	28/02/2012
		WO 00-10383 A1	02/03/2000
		US 2005-0125850 A1	09/06/2005
KR 10-2005-0048666 A	24/05/2005	AU 2003-271095 A1	23/04/2004
		AU 2003-271095 B2	11/06/2009
		CA 2501068 A1	15/04/2004
		CA 2501068 C	16/12/2014
		CN 1717483 A	04/01/2006
		EP 1559782 A1	03/08/2005
		EP 1559782 A4	21/06/2006
		EP 1559782 B1	21/12/2016
		JP 2010-004887 A	14/01/2010
		JP 5175814 B2	03/04/2013
		US 2006-0185025 A1	17/08/2006
		US 2012-0093785 A1	19/04/2012
		US 8703482 B2	22/04/2014
		WO 2004-031385 A1	15/04/2004

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12N 5/16(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12N 5/16; A01K 067/027; C12N 015/85; C12N 15/00; C12N 15/09; C12N 15/63; C12N 5/00 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 재조합(recombinant), 염색체(chromosome), RRS, SSR, 텔로미어(telomere), 동원체(centromere), MMCT(Microcell-Mediated Chromosome Transfer)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	US 7371568 B1 (TOMIZUKA, K. 등) 2008.05.13 요약; 컬럼 6; 도면 59; 청구항 1, 6, 8-13	1-27
X	KAZUKI, Y. 등, `Humanized UGT2 and CYP3A transchromosomal rats for improved prediction of human drug metabolism`, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2019.02.04, 116권, 8호, 페이지 3072-3081 초록; 도면 1; 페이지 3073	1-27
X	OSHIMURA, M. 등, `A pathway from chromosome transfer to engineering resulting in human and mouse artificial chromosomes for a variety of applications to bio-medical challenges`, Chromosome Research, 2015, 23권, 페이지 111-133 초록; 도면 1-2	1-27
X	SATOH, D. 등, `Human and mouse artificial chromosome technologies for studies of pharmacokinetics and toxicokinetics`, Drug metabolism and pharmacokinetics, 2018, 33권, 페이지 17-30 초록; 도면 1-2; 페이지 17-18	1-27
A	US 2005-0125850 A1 (LUO, L. 등) 2005.06.09 요약; 청구항 1-25	1-27
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후 “X”에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2020년 02월 24일 (24.02.2020)	국제조사보고서 발송일 2020년 02월 25일 (25.02.2020)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-8150 	

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2005-0048666 A (기린 비루 가부시키가이샤) 2005.05.24 요약; 청구항 37-46	1-27

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 7371568 B1	2008/05/13	AU 5304299 A EP 1106061 A1 EP 1106061 A4 JP 3732407 B2 TW I255853 B US 2009-0007282 A1 US 2011-0151518 A1 US 7868223 B2 US 8124406 B2 WO 00-10383 A1	2000/03/14 2001/06/13 2004/04/14 2006/01/05 2006/06/01 2009/01/01 2011/06/23 2011/01/11 2012/02/28 2000/03/02
US 2005-0125850 A1	2005/06/09	US 7282621 B2	2007/10/16
KR 10-2005-0048666 A	2005/05/24	AU 2003-271095 A1 AU 2003-271095 B2 CA 2501068 A1 CA 2501068 C CN 1717483 A EP 1559782 A1 EP 1559782 A4 EP 1559782 B1 JP 2010-004887 A JP 5175814 B2 US 2006-0185025 A1 US 2012-0093785 A1 US 8703482 B2 WO 2004-031385 A1	2004/04/23 2009/06/11 2004/04/15 2014/12/16 2006/01/04 2005/08/03 2006/06/21 2016/12/21 2010/01/14 2013/04/03 2006/08/17 2012/04/19 2014/04/22 2004/04/15