



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0088522
(43) 공개일자 2023년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/90 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 5/0789 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/907 (2013.01)
A61K 48/0016 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7019595(분할)
(22) 출원일자(국제) 2017년07월21일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2019-7005072
원출원일자(국제) 2017년07월21일
심사청구일자 2020년07월14일
(85) 번역문제출일자 2023년06월09일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2017/054446
(87) 국제공개번호 WO 2018/015936
국제공개일자 2018년01월25일
(30) 우선권주장
62/365,126 2016년07월21일 미국(US)

(71) 출원인
맥스시티 인코포레이티드
미국 메릴랜드 (우편번호 20850) 락빌 키 웨스트
애비뉴 9713 스위트 400
(72) 발명자
리, 린홍
미국 20878 메릴랜드 게이썬스부르크 퍼스트필드
로드 22 스위트 250 맥스시티 인코포레이티드 (내)
알렌, 코넬
미국 20878 메릴랜드 게이썬스부르크 퍼스트필드
로드 22 스위트 250 맥스시티 인코포레이티드 (내)
폐슈와, 마두수단
미국 20878 메릴랜드 게이썬스부르크 퍼스트필드
로드 22 스위트 250 맥스시티 인코포레이티드 (내)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

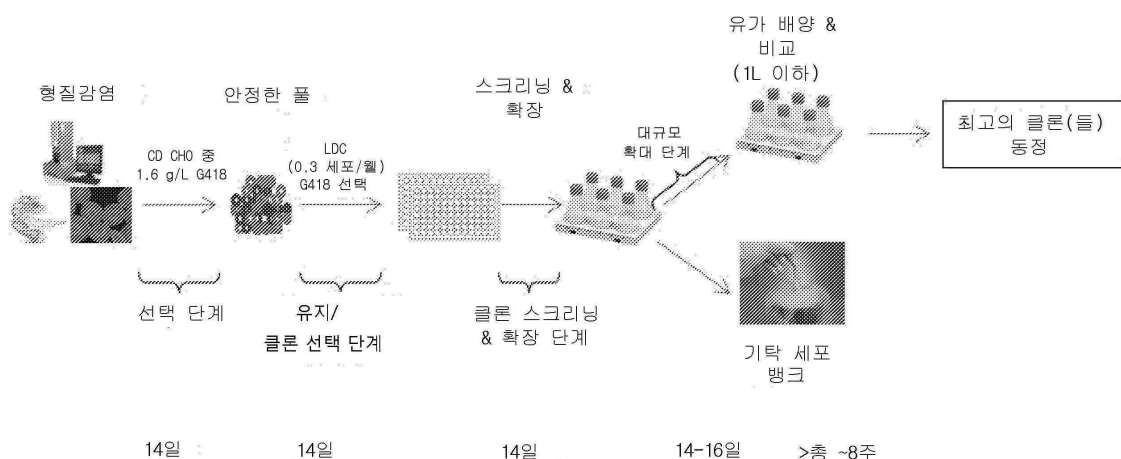
전체 청구항 수 : 총 81 항

(54) 발명의 명칭 계놈 DNA를 변경하기 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

본 조성물 및 방법은 내인성 계놈 DNA 영역의 서열 변형에 관한 것이다. 특정 양태는 (a) DNA 올리고; (b) DNA 분해제; 및 (c) 캡핑되고/거나 폴리아데닐화되는 표적화 RNA를 포함하는 조성물로 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 것을 포함하는, 세포에서 표적 계놈 DNA 영역의 부위-특이적 서열 변형을 위한 방법으로서, 도너 DNA는 (i) 표적 계놈 DNA 영역에 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동성 영역 및 (ii) 서열 변형 영역을 포함하며; 계놈 DNA 서열은 표적 계놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)

C12N 5/0647 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

세포에서 표적 게놈 DNA 영역의 부위-특이적 서열 변형 방법으로서,

(a) DNA 올리고; (b) DNA 분해제; 및 (c) 캡핑되고/거나 폴리아데닐화되는 표적화 RNA를 포함하는 조성물로 전기천공에 의해 상기 세포를 형질감염시키는 것을 포함하며;

상기 DNA 올리고는

(i) 상기 표적 게놈 DNA 영역에 상동성인 DNA 서열을 포함하는 상동성 영역; 및

(ii) 서열 변형 영역을 포함하며;

상기 게놈 DNA 서열이 상기 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형되는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 전기천공이 유동 전기천공 장치를 사용하는 유동 전기천공인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, DNA 분해제가 뉴클레아제인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 뉴클레아제가 Cas9를 포함하는 방법.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 뉴클레아제가 부위-특이적 뉴클레아제인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 표적화 RNA가 가이드 RNA를 포함하는 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, 표적화 RNA가 캡핑되고 폴리아데닐화되는 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중의 어느 한 항에 있어서, 표적화 RNA가 시험관 내에서 캡핑되고 폴리아데닐화되는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, 올리고가 단일-가닥인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, DNA 올리고 및 표적화 RNA가 표적 게놈 DNA 영역의 동일한 가닥에 상보적인 방법.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 있어서, DNA 올리고가 10개 초과인 핵산인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, DNA 올리고가 10-800개 핵산인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, DNA 올리고가 10-600개 핵산인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, DNA 올리고가 10-200개 핵산인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, DNA 올리고가 10-100개 핵산인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, DNA 올리고가 10-50개 핵산인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중의 어느 한 항에 있어서, 조성물 중 DNA 올리고의 농도가 10 $\mu\text{g/mL}$ 를 초과하는 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 조성물 중의 DNA 올리고의 농도가 약 10 내지 약 500 $\mu\text{g/mL}$ 인 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 조성물 중의 DNA 올리고의 농도가 약 35 내지 약 300 $\mu\text{g/mL}$ 인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 조성물 중의 DNA 올리고의 농도가 약 35 내지 약 200 $\mu\text{g/mL}$ 인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 있어서, 조성물이 비-바이러스성인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포가 포유동물 세포인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 세포가 인간 세포인 방법.

청구항 24

제22항에 있어서, 세포가 섬유모세포인 방법.

청구항 25

제22항에 있어서, 포유동물 세포가 말초혈 림프구인 방법.

청구항 26

제22항에 있어서, 포유동물 세포가 확장된 T 세포인 방법.

청구항 27

제22항에 있어서, 포유동물 세포가 줄기 세포인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 줄기 세포가 조혈 줄기 세포인 방법.

청구항 29

제27항에 있어서, 세포가 중간엽 줄기 세포인 방법.

청구항 30

제22항에 있어서, 포유동물 세포가 일차 세포인 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중의 어느 한 항에 있어서, 게놈 DNA 서열이 질환-관련 유전자를 포함하는 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중의 어느 한 항에 있어서, 게놈 DNA 서열이 *HBB* 유전자를 포함하는 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 서열 변형이 *HBB* 유전자의 6번째 코돈을 글루탐산 코돈으로 변경하는 게놈 DNA의 수정인 방법.

청구항 34

제31항에 있어서, 질환이 만성 육아종병인 방법.

청구항 35

제31항 또는 제34항에 있어서, 게놈 DNA 서열이 *gp91phox* 유전자를 포함하는 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중의 어느 한 항에 있어서, 올리고가 적어도 10개 핵산의 상동성 서열을 포함하는 방법.

청구항 37

제36항에 있어서, 올리고가 적어도 20개 핵산의 상동성 서열을 포함하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 올리고가 적어도 30개 핵산의 상동성 서열을 포함하는 방법.

청구항 39

제1항 내지 제38항 중의 어느 한 항에 있어서, 서열 변형 효율이 3%를 초과하는 방법.

청구항 40

제39항에 있어서, 서열 변형 효율이 5%를 초과하는 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 서열 변형 효율이 10%를 초과하는 방법.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중의 어느 한 항에 있어서, 전기천공 후 세포 생존력이 적어도 30%인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 전기천공 후 세포 생존력이 적어도 40%인 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 전기천공 후 세포 생존력이 적어도 50%인 방법.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중의 어느 한 항에 있어서, DNA 서열 변형이 하나 이상의 정지 코돈인 방법.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중의 어느 한 항에 있어서, 조성물이 상이한 상동성 서열을 갖는 2개 이상의 DNA 올리고를 포함하는 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 조성물이 2개 이상의 DNA 분해제를 포함하는 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 조성물이 2개 이상의 부위-특이적 DNA 분해제를 포함하며; 상기 DNA 분해제는 상이한 게놈 부위를 표적으로 하는 방법.

청구항 49

제1항 내지 제48항 중의 어느 한 항에 있어서, 서열 변형이 게놈 서열의 하나 이상의 염기 쌍을 변경시키는 방법.

청구항 50

제1항 내지 제48항 중의 어느 한 항에 있어서, 서열 변형이 게놈 서열의 하나 이상의 염기 쌍을 첨가하는 방법.

청구항 51

제1항 내지 제48항 중의 어느 한 항에 있어서, 서열 변형이 게놈 서열의 하나 이상의 염기 쌍을 결실시키는 방법.

청구항 52

제1항 내지 제51항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포가 환자로부터 분리된 세포인 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 세포가 저온보존되는 방법.

청구항 54

제52항에 있어서, 세포가 상기 세포의 형질감염 전 1주 이내의 기간에 환자로부터 분리되는 방법.

청구항 55

제52항에 있어서, 세포가 상기 세포의 형질감염 전 1일 이내의 기간에 환자로부터 분리되는 방법.

청구항 56

제52항 내지 제55항 중의 어느 한 항에 있어서, 분리된 세포가 냉동되지 않은 방법.

청구항 57

제52항 내지 제56항 중의 어느 한 항에 있어서, 분리된 세포가 2개 이상의 상이한 세포 유형을 포함하는 방법.

청구항 58

제52항 내지 제56항 중의 어느 한 항에 있어서, 2개 이상의 상이한 세포 유형이 상이한 다능성 단계의 2개 이상의 세포 유형을 포함하는 방법.

청구항 59

제52항 내지 제58항 중의 어느 한 항에 있어서, 서열 변형 효율이 3%를 초과하는 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 서열 변형 효율이 5%를 초과하는 방법.

청구항 61

제60항에 있어서, 서열 변형 효율이 10%를 초과하는 방법.

청구항 62

제52항 내지 제61항 중의 어느 한 항에 있어서, 전기천공 후 세포 생존력이 적어도 30%인 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 전기천공 후 세포 생존력이 적어도 40%인 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 전기천공 후 세포 생존력이 적어도 50%인 방법.

청구항 65

제52항 내지 제64항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포가 대상체의 골수로부터 분리되는 방법.

청구항 66

제52항 내지 제65항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포가 줄기 세포를 포함하는 방법.

청구항 67

제66항에 있어서, 줄기 세포가 조혈 줄기 세포를 포함하는 방법.

청구항 68

제67항에 있어서, 줄기 세포가 세포 표면 마커 CD34+를 포함하는 방법.

청구항 69

제1항 내지 제68항 중의 어느 한 항에 있어서, 클론 분리되고 선택된 세포를 확장시켜 DNA 서열 변형을 갖는 클론 세포를 생성시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 세포가 대규모 제작을 위해 확장되는 방법.

청구항 71

제69항 또는 제70항에 있어서, 세포가 1L 초과 부피로 확장되는 방법.

청구항 72

제71항에 있어서, 세포가 3L 이상의 부피로 확장되는 방법.

청구항 73

제1항 내지 제72항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포가 혈청-비함유 배지에서 배양되는 방법.

청구항 74

제1항 내지 제73항 중의 어느 한 항에 있어서, 서열 변형을 위한 세포를 스크리닝하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 75

제1항 내지 제74항 중의 어느 한 항에 있어서, 형질감염된 세포를 냉동시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 76

제1항 내지 제75항 중의 어느 한 항에 있어서, 사전 냉동된 형질감염 세포를 확장시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 77

표적 게놈 DNA 서열의 게놈 DNA 서열 변형을 포함하는 안전한 세포주를 생성하는 방법으로서, 상기 방법은

(a) DNA 올리고; (b) DNA 분해제; 및 (c) 캡핑되고/거나 폴리아데닐화되는 표적화 RNA를 포함하는 조성물로 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 단계로서;

도너 DNA가

(i) 표적 게놈 DNA 영역에 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동성 영역; 및

(ii) 서열 변형 영역을 포함하는, 단계;

상기 표적 게놈 DNA 영역에서 상기 게놈 DNA 서열 변형을 위한 형질감염된 세포를 스크리닝하는 단계;

스크리닝된 형질감염 세포를 제한 효소에 의해 분리하여 클론 세포를 수득하는 단계;

분리된 형질감염 세포를 확장시켜 상기 게놈 DNA 서열 변형을 포함하는 안전한 세포주를 생성시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 78

제77항의 방법에 의해 생성된 세포주.

청구항 79

제1항 내지 제78항 중의 어느 한 항의 방법을 이용하여 생성된 전기천공된 세포.

청구항 80

유효량의 제79항의 전기천공된 세포 또는 제78항의 세포주를 투여함으로써 질환 또는 질병을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 81

유효량의 제79항의 전기천공된 세포 또는 제78항의 세포주를 투여하는 것을 포함하는 임상 연구 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2016년 6월 21일 출원된 미국 가출원 62/365,126의 이익을 주장한다. 참조된 출원의 전체 내용은 본원에 참조로 통합된다.

배경 기술

[0003] 발명의 배경

[0004] 1. 발명의 분야

[0005] 본 발명은 일반적으로 생명공학 분야에 관한 것이다. 더욱 특히, 이는 게놈 DNA를 변경하기 위한 신규한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

[0006] 2. 관련 기술의 설명

[0007] 표적화된 게놈 엔지니어링은 세포 내부의 DNA를 따라 특이적 부위에서 지시된 방식으로 내인성 DNA를 편집 또는 변경하는 것을 포함한다. 유전자 복구 및 상동성-유도된 유전자 변경의 엄청난 가능성에도 불구하고, 현재 게놈 엔지니어링 방법은 매우 낮은 복구 또는 편집 효율을 제공하며, 해로운 또는 원하지 않는 DNA 서열 및 결과가 도입될 가능성을 갖는다.

[0008] 내인성 게놈 서열의 변형은 발전된 치료학적 적용은 물론 발전된 연구 방법을 제공할 수 있다. 현재, 시험관 내에서 유전자 기능 파괴의 가장 일반적인 방법은 RNA 간섭 (RNAi)이다. 그러나, 이러한 방법은 한계가 있다. 예를 들어, RNAi는 상당한 표적 이탈 효과 및 독성을 나타낼 수 있다. 또한, RNAi는 많은 내인성 과정의 세포 메카니즘에 관련되며, 관심 경로에 아주 매우 관련될 수 있는 메카니즘 예컨대, RNAi를 인공적으로 수행하는 것은 오해의 소지가 있거나 잘못된 결과로 이어질 수 있다. 세포의 게놈 서열을 변형시키는 효율적이고 비독성인 메카니즘은 유전자 녹-다운을 위한 더욱 정확한 방법일 것이다.

[0009] 내인성 게놈 서열을 변형시키는 효율적이고 비독성인 방법은 또한, 생체외 요법에서 발전을 제공할 수 있는데, 환자로부터 세포를 분리하고, 게놈을 변형시켜 돌연변이를 보정하고, 환자 자신의 세포를 다시 이식하여 치료 효과를 달성할 수 있기 때문이다. 현재의 방법은 이러한 결과를 달성하기에는 너무 비효율적이거나 너무 독성이다. 효율적이고, 비독성이며 안정한 부위-특이적 게놈 DNA 변형을 허용하는 기술에 대한 요구가 본 분야에 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 내인성 표적 게놈 DNA 서열의 서열 변형 또는 보정에 관한 조성물 및 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 조성물 및 방법은 내인성 표적 게놈 DNA 서열의 서열 변형 또는 보정에 관한 것이다. 특정 양태는 세포에서 표적 게놈 DNA 영역의 부위-특이적 서열 변형을 위한 방법으로서, (a) DNA 올리고, (b) DNA 분해제; 및 (c) 캡핑되고/거나 폴리아데닐화되는 표적화 RNA를 포함하는 조성물로 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 것을 포함하며; 여기에서 DNA 올리고는 (i) 표적 게놈 DNA 영역에 상동성인 DNA 서열을 포함하는 상동성 영역; 및 (ii) 서열 변형 영역을 포함하며; 게놈 DNA 서열이 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형되는, 방법에 관한 것이다.

[0012] 추가의 양태는 세포에서 표적 게놈 DNA 영역의 부위-특이적 서열 변형을 위한 방법으로서, (a) DNA 올리고; (b) DNA 분해제; 및 (c) 캡핑되고/거나 폴리아데닐화되는 표적화 RNA를 포함하는 조성물로 전기천공에 의해 줄기 세포를 형질감염시키는 것을 포함하며; 여기에서 DNA 올리고는 (i) 표적 게놈 DNA 영역에 상동성인 DNA 서열을 포함하는 상동성 영역; 및 (ii) 서열 변형 영역을 포함하며; 게놈 DNA 서열은 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형되며, 세포는 줄기 세포 또는 이들의 후손인 방법에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 세포는 일차 세포이다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "일차"는 불멸화되지 않으며 생 조직으로부터 직접 취해지는 세포를 지칭한다. 이들 세포는 집단 더블링(population doubling)을 거의 겪지 않으며, 따라서 조직의 주요 작용 성분을 더욱 대표하며, 이들 세포는 연속 (종양 또는 인공 불멸화된) 세포주 대비 상기 조직으로부터 유래되며, 따라서 생체내 상태에 대해 더욱 대표적인 모델에 해당한다.

[0013] 일부 구체예에서, DNA 올리고 및 표적화 RNA는 표적 게놈 DNA 영역의 동일한 가닥에 상보적이다. 일부 구체예에서, DNA 분해제는 뉴클레아제이다. 일부 구체예에서, 뉴클레아제는 Cas9를 포함한다. 일부 구체예에서, 뉴클레아제는 Cpf1, CasX 또는 CasY를 포함한다. 일부 구체예에서, 표적화 RNA는 가이드 RNA를 포함한다. 일부 구체예에서, 표적화 RNA는 캡핑되고도 폴리아데닐화된다. 일부 구체예에서, 표적화 RNA는 시험관내에서 캡핑되고/거나 폴리아데닐화된다.

[0014] 용어 "서열 변형" 또는 "DNA 보정"은 DNA 서열에 대한 변화이며, 내인성 게놈 DNA 서열에 대한 또는 이의 첨가, 변화 또는 결실을 포함할 수 있다. 예를 들어, 표적 게놈 서열에 있어서, 도너 DNA는 표적 게놈 서열에 대해 상보적인, 동일한 또는 상동성인 서열 및 서열 변형 또는 보정 영역을 포함한다. 서열 변형 영역은 전형적으로 상동성 말단 사이에 위치한다. 서열 변형은 표적 게놈 서열에 대해 상보적이지 않거나 낮은 정도의 상동성을 가지며, 표적 게놈 서열의 변형을 함유한다.

- [0015] "상동성" 또는 "동일성" 또는 "유사성"은 2개 펩티드 또는 2개 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 지칭한다. 용어 "상동성 영역"은 표적 게놈 DNA 서열과 특정 정도의 상동성을 갖는 도너 DNA의 영역을 지칭한다. 상동성은 비교 목적을 위해 정렬될 수 있는 각 서열에서 위치를 비교함으로써 측정될 수 있다. 비교된 서열의 위치를 동일한 염기 또는 아미노산이 차지하는 경우, 그러면 분자는 그 위치에서 상동성이다. 서열들간의 상동성 정도는 서열들에 의해 공유된 매칭 또는 상동성 위치의 수의 함수이다. "관련되지 않은" 또는 "비-상동성" 서열은 본 발명의 서열 중 하나와 40% 미만의 동일성을 공유하나, 바람직하게는, 25% 미만의 동일성을 공유한다.
- [0016] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 영역 (또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역)은 또 다른 서열에 대해 특정 백분율(예를 들어, 적어도 또는 최대 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)의 "서열 동일성" 또는 "상동성"을 갖는다는 것은 정렬할 때, 염기 (또는 아미노산)의 백분율이 두 개의 서열 비교에서 동일한 것을 의미한다. 이러한 정렬 및 상동성 또는 서열 동일성 퍼센트는 당해기술에 공지된 소프트웨어 프로그램 예를 들어, 문헌 [Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology]에 기술된 것들을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0017] 일부 구체예에서, 올리고는 단일-가닥이다. 단일-가닥 올리고는 DNA에 대한 세포의 내약성을 증가시키고 세포의 DNA-유도된 독성을 감소시킬 것으로 여겨진다.
- [0018] 특정 구체예에서, 도너 DNA의 상동 영역은 100% 상동성이거나 표적 게놈 서열과 동일하다. 추가의 구체예에서, 도너 DNA의 상동성 영역은 85, 90, 95, 또는 99% 상동성이다.
- [0019] 특정 구체예에서, 도너 DNA는 표적 게놈 DNA 서열에 상동인 적어도 또는 최대 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 75, 100, 150 및 200개 잔기의 핵산 서열 (또는 이에 속하는 추론가능한 임의의 범위)을 포함한다. 특정 구체예에서, 도너 DNA는 게놈 DNA 서열과 동일한 적어도 약 10개 또는 적어도 약 15개 또는 적어도 약 20개 핵산 서열을 포함한다. 이러한 맥락에서, 용어 "동일한 서열"은 게놈 DNA의 서열과 정확하게 매칭되는 서열을 지칭한다. 동일한 서열은 DNA 서열 변형의 5' 말단인 영역 및 DNA 서열 변형의 3' 말단인 영역에 존재할 수 있다. 예시적인 실례로서, 도너 DNA가 적어도 10개 핵산의 상동성 서열을 포함하는 경우, 도너 DNA는 서열 변형의 양 측면 상에 예를 들어, 5개 핵산의 상동성 서열을 포함할 수 있다. 유사하게는, 10개 핵산의 상동성 서열을 포함하는 도너 DNA는 예를 들어, 서열 변형의 양 측면 상에 예를 들어, 5개 핵산의 상보적 서열을 포함할 수 있다.
- [0020] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상보적"은 뉴클레오티드들 간의 왓슨-크릭 염기 쌍을 나타내며, 특히 3개의 수소 결합에 의해 연결된 시토신 및 구아닌 잔기 및 2개의 수소 결합에 의해 아데닌 잔기에 연결된 티민 또는 우라실 잔기를 갖는 서로에게 수소 결합된 뉴클레오티드를 지칭한다. 일반적으로, 핵산은 특이적 제2 뉴클레오티드 서열에 "상보성 퍼센트"를 갖는 것으로 기술된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 뉴클레오티드 서열은 지정된 제2 뉴클레오티드 서열에 80%, 90% 또는 100% 상보성을 가질 수 있으며, 이는 서열의 10개 뉴클레오티드 중 8개, 10개 뉴클레오티드 중 9개 또는 10개 뉴클레오티드 중 10개가 지정된 제2 뉴클레오티드 서열에 상보적임을 나타낸다. 예를 들어, 뉴클레오티드 서열 3'-TCGA-5'는 뉴클레오티드 서열 5'-AGCT-3'에 100% 상보적이다. 추가로, 뉴클레오티드 서열 3'-TCGA-는 뉴클레오티드 서열 5'-TTAGCTGG-3'의 영역에 100% 상보적이다. 2개의 상보적인 뉴클레오티드 서열이 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함함은 당업자에게 인지될 것이다.
- [0021] 용어 "형질감염"은 생-활성 물질 예컨대, 핵산, 단백질, 효소 또는 소분자를 세포 내로 도입시키는 방법을 나타낸다. 핵산은 플라스미드 또는 올리고머로서 전달된 DNA, 및/또는 RNA 또는 이의 조합물일 수 있다.
- [0022] 용어 "전기천공"은 외부에서 가해진 전기장이 세포에 가해지는 형질감염의 방법을 지칭한다. 특정 구체예에서, 이용된 전기천공 방법은 정적 전기천공이다.
- [0023] 특정 구체예에서, 세포는 유동 전기천공을 사용하여 전기천공된다. 유동 전기천공은 세포 현탁액을 이동시키고 유체 챔버 또는 유체 흐름 경로를 포함하는 장치 내로 분자를 로딩하고 (상기 유체 챔버 또는 유체 흐름 경로는 유체 챔버 또는 유체 흐름 경로의 측면을 따라 배치된 전극으로 이루어지고, 유체 챔버 또는 유체 흐름 경로 내부의 생물학적 입자를 전기천공에 적합한 전기장으로 처리하도록 구성됨); 장치 밖으로 전기천공된 세포 현탁액을 이동시키는 것을 포함한다. 용어 "유동 전기천공"은 유체 챔버 흐름 경로 내부의 세포의 전기천공을 지칭한다. 이러한 방법은 특히 대규모 부피의 세포에 효과적이다. 대조적으로 정적 전기천공은 마주하는 전극 사이의 거리 및 액체를 가로지르는 이동 전기와 관련된 제한으로 인해 한 세트의 제한된 부피의 세포의 전기천공을 포함한다.
- [0024] 특정 양태에서, 세포 내로 발현 작제물을 형질감염시키는 것은 흐름 챔버에서 전기장을 통해 세포 현탁액을 유

동시키는 것을 포함하며, 전기장은 흐름 챔버를 적어도 부분적으로 규정하는 반대로 하전된 전극을 마주함으로써 생성되며, 여기에서 흐름 챔버의 내열성은 대략 와트당 10℃ 미만이다. 다른 특정 양태에서, 세포를 형질감염시키는 것은 전기천공될 세포 현탁액을 함유하기 위한 챔버를 포함하는 유동 전기천공 장치를 사용하는 것을 포함하며; 챔버는 반대로 하전가능한 전극을 마주시킴으로써 적어도 부분적으로 규정되며; 챔버의 내열성은 대략 와트당 10℃ 미만이다.

[0025] 특정 양태에서, 세포 내로 발현 작제물을 형질감염시키는 것은 챔버에서 전기장으로 세포 현탁액을 전기천공시키거나 노출시키는 것을 포함하며, 전기장은 챔버를 적어도 부분적으로 규정하는 반대로 하전된 전극을 마주시킴으로써 생성되며, 여기에서 챔버의 내열성은 대략 와트당 10℃ 미만이다. 다른 특정 양태에서, 세포를 형질감염시키는 것은 전기천공될 세포 현탁액을 함유하기 위한 챔버를 포함하는 전기천공 장치를 사용하는 것을 포함하며; 챔버는 반대로 하전가능한 전극을 마주시킴으로써 적어도 부분적으로 규정되며; 챔버의 내열성은 대략 와트당 10℃ 미만이다.

[0026] 특정 양태에서, 챔버의 내열성은 대략 와트당 0.1℃ 내지 와트당 10℃이다. 예를 들어, 챔버의 내열성은 대략 와트당 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10℃, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위일 수 있다.

[0027] 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 적어도 1mm, 적어도 2mm, 적어도 3 mm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격 또는 범위로 이격될 수 있다. 기재된 구체예 중 임의의 구체예에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가질 수 있다. 예를 들어, 비율은 대략 1 대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값 또는 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 적어도 1mm 이격되어 있다. 다른 양태에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 적어도 3mm 이격되어 있다. 더욱 추가의 양태에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 대략 3mm 내지 대략 2cm 이격되어 있다. 예를 들어, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 대략 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10mm 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격을 두고 이격될 수 있거나, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로로부터 대략 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2.0cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격으로 이격될 수 있다. 이들 구체예의 일부 양태에서, 전기천공된 세포는 이에 의해 실질적으로 열 분해되지 않는다.

[0028] 기재된 구체예 중 임의의 구체예에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가질 수 있다. 예를 들어, 비율은 대략 1 대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값 또는 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 적어도 1mm 이격되어 있다. 다른 양태에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 적어도 3mm 이격되어 있다. 더욱 추가의 양태에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 대략 3mm 내지 대략 2cm 이격되어 있다. 예를 들어, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 대략 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10mm 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격을 두고 이격될 수 있거나, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로로부터 대략 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2.0cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격으로 이격될 수 있다. 이들 구체예의 일부 양태에서, 전기천공된 세포는 이에 의해 실질적으로 열 분해되지 않는다.

[0029] 임의의 기재된 구체예에서, 장치는 냉각 요소를 추가로 포함하여 열을 소멸시킬 수 있다. 예를 들어, 냉각 요소는 열전 냉각 요소를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 냉각 요소는 전극과 접촉해서 흐르는 냉각 유체를 포

함할 수 있다. 또 다른 예로서, 냉각 요소는 전극과 작동적으로 관련된 열 싱크를 포함할 수 있다. 챔버의 내열성은 대략 와트당 3℃ 미만일 수 있다. 일부 구체예에서, 챔버의 내열성은 대략 와트당 0.5℃ 내지 와트당 4℃이거나, 챔버의 내열성은 대략 와트당 1℃ 내지 와트당 3℃이다. 예를 들어, 챔버의 내열성은 대략 와트당 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 또는 4.0 ℃, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값일 수 있다.

[0030] 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 것을 포함하는 특정 방법에서, 상기 방법은 0.5 kV/cm 초과와 강도를 갖는 전기장에 세포 현탁액을 노출시키는 것을 포함한다. 예를 들면, 전기장은 대략 3.5 kV/cm 초과와 강도를 가질 수 있다. 특정 양태에서, 전기장은 대략 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 또는 3.5 kV/cm 초과, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값의 강도를 갖는다.

[0031] 일부 구체예에서, 세포를 형질감염시키는 것은, 전기천공될 세포 현탁액의 연속 흐름을 수용하고 일시적으로 함유하도록 구성된 전기천공 구역을 갖는 흐름 채널을 규정하는 벽; 흐름 채널과 유체 소통하는 유입구 흐름 포털로서, 이에 의해 현탁액이 유입구 흐름 포털을 통해 흐름 채널 내로 도입될 수 있는 유입구 흐름 포털; 흐름 채널과 유체 소통하는 배출구 흐름 포털로서, 이에 의해 현탁액이 배출구 포털을 통해 흐름 채널로부터 배출될 수 있는 배출구 흐름 포털을 포함하는 유동 전기천공 장치를 사용하는 것을 포함하며; 벽은 흐름 채널의 제1 벽의 실질적 부분을 형성하는 제1 전극 및 제1 벽과 마주하는 흐름 채널의 제2 벽의 실질적인 부분을 형성하는 제2 전극을 포함하는 전기천공 구역 내의 흐름 채널을 규정하며, 제1 및 제2 전극은 전기 에너지 공급원과 전기 소통하도록 위치하는 경우 이들 사이에 전기장이 형성하며 이들 사이를 통해 현탁액이 흐를 수 있게 하며, 흐름 채널의 내열성은 대략 와트당 10℃ 미만이다.

[0032] 특정 이러한 구체예에서, 제1 및 제2 전극 또는 마주하는 반대로 하전가능한 전극은 서로 적어도 1mm 이격된다. 게다가, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가질 수 있다. 특정 구체예에서, 챔버는 대략 1 대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값 또는 범위의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가질 수 있다. 특정 구체예에서, 본원에 기재된 전기천공 방법에 의해 전기천공된 세포는 이에 의해 실질적으로 열분해되지 않는다. 본원에 기재된 특정 구체예에서, 챔버는 흐름 챔버이다.

[0033] 일부 양태에서, 전기천공 장치는 전기천공될 세포 현탁액을 수용하는 챔버로서, 마주하는 반대로 하전가능한 전극에 의해 적어도 부분적으로 규정되는 챔버를 포함하며, 여기에서 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 갖는다. 특정 양태에서, 상기 비율은 대략 1 대 70cm이다. 기타 특정 양태에서, 상기 비율은 대략 1 대 50cm이다. 예를 들어, 비율은 대략 1 대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값일 수 있다. 본원에 기재된 특정 구체예에서, 챔버는 흐름 챔버이다.

[0034] 일부 구체예에서, 유동 전기천공 장치는 전기천공될 세포 현탁액의 연속 흐름을 수용하고 일시적으로 함유하도록 구성된 흐름 채널을 규정하는 벽; 흐름 채널과 유체 소통하는 유입구 흐름 포털로서, 이에 의해 현탁액이 유입구 흐름 포털을 통해 흐름 채널 내로 도입될 수 있는 유입구 흐름 포털; 흐름 채널과 유체 소통하는 배출구 흐름 포털로서, 이에 의해 현탁액이 배출구 포털을 통해 흐름 채널로부터 배출될 수 있는 배출구 흐름 포털을 포함하며; 벽은 흐름 채널의 제1 벽의 적어도 일부를 형성하는 제1 전극 및 제1 벽과 마주하는 흐름 채널의 제2 벽의 적어도 일부를 형성하는 제2 전극을 포함하는 흐름 채널을 규정하며, 제1 및 제2 전극은 전기 에너지 공급원과 전기 소통하도록 위치하는 경우 이들 사이에 전기장이 형성되며 이들 사이를 통해 현탁액이 흐를 수 있게 하며, 흐름 채널의 내열성은 대략 와트당 10℃ 미만이다. 특정 양태에서, 흐름 챔버의 내열성은 대략 와트당 0.1℃ 내지 와트당 10℃이다. 예를 들어, 흐름 채널의 내열성은 대략 와트당 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10℃, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 내열성일 수 있다. 제1 및 제2 전극은 서로 적어도

1mm, 적어도 2mm, 적어도 3 mm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격 또는 범위로 이격될 수 있다. 기재된 구체예 중 임의의 구체예에서, 흐름 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가질 수 있다. 예를 들어, 비율은 대략 1 대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값 또는 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 흐름 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 제1 및 제2 전극은 서로 적어도 1mm 이격되어 있다. 다른 양태에서, 흐름 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 제1 및 제2 전극은 서로 적어도 3mm 이격되어 있다. 더욱 추가의 양태에서, 흐름 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 제1 및 제2 전극은 서로 대략 3mm 내지 대략 2cm 이격되어 있다. 예를 들어, 제1 및 제2 전극은 서로 대략 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10mm 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격을 두고 이격될 수 있거나, 제1 및 제2 전극은 서로로부터 대략 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2.0cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격으로 이격될 수 있다. 이들 구체예의 일부 양태에서, 흐름 채널에서 전기천공된 세포는 이에 의해 실질적으로 열 분해되지 않는다.

[0035] 특정 기술된 방법 및 장치에서, 챔버의 내열성은 대략 와트당 0.1℃ 내지 대략 와트당 4℃이다. 일부 양태에서, 챔버의 내열성은 대략 와트당 1.5℃ 내지 대략 와트당 2.5℃이다. 예를 들어, 챔버의 내열성은 대략 와트당 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 또는 4.0 ℃, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 내열성일 수 있다.

[0036] 특정 기재된 방법 및 장치에서, 유동 전기천공 장치는 입자를 포함하는 현탁액의 연속 흐름을 수용하고 일시적으로 함유하도록 구성된 흐름 채널을 규정하는 벽; 흐름 채널과 유체 소통하는 유입구 흐름 포털로서, 이에 의해 현탁액이 유입구 흐름 포털을 통해 흐름 채널 내로 도입될 수 있는 유입구 흐름 포털; 흐름 채널과 유체 소통하는 배출구 흐름 포털로서, 이에 의해 현탁액이 배출구 흐름 포털을 통해 흐름 채널로부터 배출될 수 있는 배출구 흐름 포털을 포함하며; 벽은 흐름 채널의 제1 벽을 형성하는 제1 전극 플레이트 및 제1 벽과 마주하는 흐름 채널의 제2 벽을 형성하는 제2 전극 플레이트를 포함하는 흐름 채널을 규정하며, 현탁액과 접촉하는 전극의 영역 및 전극 사이의 간격은 흐름 채널의 내열성이 대략 와트당 4℃ 미만인 되도록 선택되며; 한 쌍의 전극이 전기 에너지 공급원과 전기 소통하게 위치하며, 이에 의해 전기장이 전극 사이에 형성되며, 이에 의해 흐름 채널을 통해 흐르는 입자의 현탁액이 전극 사이에 형성된 전기장으로 처리될 수 있다. 특정 양태에서, 흐름 채널을 규정하는 전극 플레이트는 전기적으로 비전도성 물질로부터 형성되며 제1 및 제2 전극 플레이트 사이에 배치되어 공간 분리 관계로 전극 플레이트를 유지시키는 가스켓을 추가로 포함하며, 가스켓은 여기에서 채널을 규정하여 흐름 채널의 마주보는 측벽을 형성한다. 가스켓은 예를 들어, 제1 및 제2 전극 플레이트의 각각에 대한 밀봉을 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 장치는 복수의 흐름 채널을 포함하며, 가스켓은 복수의 채널 각각의 마주보는 측벽을 형성하는 복수의 채널을 포함한다. 일부 양태에서, 유입구 흐름 포털 및 배출구 흐름 포털 중 하나는 전극 플레이트 중 하나에 형성된 보어 (bore)를 포함하며, 흐름 채널과 유체 소통한다. 유입구 흐름 포털 및 배출구 흐름 포털 중 다른 하나는 전극 플레이트 중 하나에 형성된 보어를 포함할 수 있으며, 흐름 채널과 유체 소통한다. 특정 양태에서, 유입구 흐름 포털 및 배출구 흐름 포털은 전극 플레이트 중 다른 하나에 형성된 보어를 포함하며, 흐름 채널과 유체 소통한다. 임의의 기재된 구체예에서, 장치는 흐름 채널과 작동적으로 연관된 냉각 요소를 추가로 포함하여 열을 소멸시킬 수 있다. 예를 들어, 냉각 요소는 열전 냉각 요소를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 냉각 요소는 전극과 접촉해서 흐르는 냉각 유체를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 냉각 요소는 전극과 작동적으로 관련된 열 싱크를 포함할 수 있다. 흐름 채널의 내열성은 대략 와트당 3℃ 미만일 수 있다. 일부 구체예에서, 흐름 채널의 내열성은 대략 와트당 0.5℃ 내지 와트당 4℃이거나, 흐름 채널의 내열성은 대략 와트당 1℃ 내지 와트당 3℃이다. 예를 들어, 흐름 채널의 내열성은 대략 와트당 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 또는 4.0 ℃, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값일 수 있다.

[0037] 특정 기재된 방법 및 장치에서, 제1 전극은 가늘고 긴 전기 전도성 구조를 포함할 수 있으며, 제2 전극은 관형의 전기 전도성 구조를 포함하며; 여기에서 전극은 제2의 관형 전극이 이격된 관계로 제1 전극을 둘러싸도록 동

심으로 정렬되며; 여기에서 흐름 채널은 제1 및 제2 전극 사이에 규정된 환형 공간 내에 배치된다. 전극은 흐름 채널을 규정하는 벽의 적어도 일부를 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 제1 및 제2 전극을 유지하기 위한 동심 환형 공간은 이격된 동심 관계에 있다. 특정 양태에서, 장치는 제2의 예컨대, 장치와 일렬로 또는 평행하게 정렬된다.

- [0038] 유동 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 것을 포함하는 특정 방법에서, 흐름 채널은 대략 와트당 10℃ 미만의 내열성을 갖는다. 유동 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 것을 포함하는 일부 방법에서, 방법은 흐름 채널을 통해 전기천공될 세포 현탁액을 흐르게 하고, 흐름 채널을 통해 흐르면서 현탁액을 전기장에 노출시키는 것을 포함하며, 전기장은 0.5 kV/cm보다 큰 강도를 갖는다. 예를 들면, 전기장은 대략 3.5 kV/cm보다 큰 강도를 가질 수 있다. 특정 양태에서, 전기장은 대략 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 또는 3.5 kV/cm 초과, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값의 강도를 갖는다.
- [0039] 유동 전기천공 장치에 관한 기재된 구체예에서, 유동 전기천공에 대해 기술된 파라미터 및 파라미터 범위는 본원에 기술된 방법에 사용된 정적 전기천공 장치에 적용가능한 것으로 특히 고려된다. 특정 구체예에서, 유동 전기천공이 사용되며, 정적 전기천공 또는 비-유동 전기천공은 제외된다. 추가의 특정 구체예에서, 정적 전기천공이 사용되며 유동 전기천공은 제외된다.
- [0040] 임의의 기재된 방법은 형질감염된 세포의 제한 회색을 이용하여 단일 세포 콜로니를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "제한 회색"은 각 배양에서 단일 세포를 달성하기 위한 목표로 세포 배양물을 현저하게 회색하는 공정을 지칭한다. 이러한 분리된 단일 세포가 재생성되는 경우, 생성된 배양물은 단지 원래 세포의 클론만을 함유할 것이다. 예를 들어, 다중-웰 플레이트를 사용하여 단일 세포 배양물 또는 콜로니를 수득할 수 있다. 예를 들어, 제한 회색은 환자 세포 유래된 iPS 연구(예를 들어, 낮척혈구 환자의 수복)에 사용될 수 있다. 제한 회색 방법을 이용하는 iPS 세포는 보정된 헤모글로빈-발현 세포에 대해 변형되고, 분리되고 환자로의 투여를 위해 확장될 수 있다.
- [0041] 임의의 기재된 방법에서, 클론 분리되고 선택된 세포를 확장시켜 특정 게놈 DNA 서열 변형을 갖는 클론 세포를 생성시키는 것을 포함하는 단계가 이용될 수 있다.
- [0042] 클론 분리된 세포의 확장을 포함하는 기재된 방법에서, 확장은 대규모 제작을 위한 것일 수 있다. 예를 들어, 세포는 1L 초과로 부피로 확장될 수 있거나, 세포는 3L 초과로 부피로 확장될 수 있다. 특정 양태에서, 세포는 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 또는 3.0 L, 또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 값보다 큰 부피로 확장된다.
- [0043] 임의의 기재된 방법에서, 형질감염되고 선택되거나 스크리닝된 세포를 냉동시키는 것을 포함하는 추가의 단계가 이용될 수 있다. 심지어 미리 냉동된 형질감염되고 선택되고/스크리닝된 세포를 확장시키는 추가의 단계가 또한 이용될 수 있다.
- [0044] 기재된 방법에서, 세포 배양은 당업자에게 공지된 임의의 추가적인 성분을 포함할 수 있으며, 이는 배양되는 세포 유형을 기반으로 하여 당업자에 의해 용이하게 선택될 것이다. 예를 들어, 세포는 소듐 부티레이트 또는 유사한 염에서 배양될 수 있다.
- [0045] 기재된 방법에서, 클론 분리되고 선택되거나 스크리닝된 세포를 확장시켜 게놈 DNA 서열 변형을 갖는 클론 세포를 생성하는 것을 포함하는 추가의 단계가 이용될 수 있다.
- [0046] 추가의 양태는, 표적 게놈 DNA 서열의 게놈 DNA 서열 변형 또는 보정을 포함하는 안정한 세포주를 생성하는 방법으로서, 방법이 (a) DNA 올리고 및 (b) 분해제를 포함하는 조성물로 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 단계로서, 도너 DNA는 (i) 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동성 영역; 및 (ii) 서열 변형 영역을 포함하는 단계; 표적 게놈 DNA 영역에서 게놈 DNA 서열 변형에 대해 형질감염된 세포를 스크리닝하는 단계; 제한 회색에 의해 스크리닝된 형질감염 세포를 분리하여 클론 세포를 수득하는 단계; 분리된 형질감염 세포를 확장시켜 게놈 DNA 서열 변형을 포함하는 안정한 세포주를 생성시키는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0047] 본 기재내용은 또한 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 세포주 또는 전기천공된 세포를 제공한다.
- [0048] 추가의 양태는 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 유효량의 세포주 또는 전기천공된 세포를 투여함으로써 질환 또는 질병을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0049] 본원에 기술된 구체예가 배제될 수 있음이 특히 고려된다. 범위가 기술된 경우, 특정 범위가 배제될 수 있음이

추가로 고려된다.

- [0050] 본원의 명세서에 사용된 바와 같은, 단수 형태는 하나 이상을 의미할 수 있다. 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 용어 "포함하는"과 함께 사용되는 경우 단수형태의 용어는 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다.
- [0051] 청구범위에서 용어 "또는"의 사용은, 비록 본 명세서는 양자 중 하나 및 "및/또는" 만을 의미하는 정의를 지지하지만, 양자 중 하나만 또는 양자가 서로 배타적임을 나타내는 것으로 명백히 지정되지 않는 경우 "및/또는"의 의미로 사용된다. 본원에 사용된 바와 같은 "또 다른"은 적어도 제2의 또는 그 초과를 의미할 수 있다.
- [0052] 본 출원에 전반에 걸쳐, 용어 "약"은 값이 장치에 대한 오차의 고유의 변화를 포함함을 나타내는데 사용되며, 방법은 연구 대상 중에서 존재하는 값 또는 변화를 측정하는데 사용된다.
- [0053] 본 발명의 기타 목적, 특징 및 이점은 하기 상세한 설명으로부터 자명해질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 특정 실시예는, 본 발명의 바람직한 구체예를 나타내면서, 단지 예시로서 제공됨이 이해되어야 하는데, 왜냐하면 본 발명의 사상 및 범위 내에 다양한 변경 및 변형이 본 상세한 설명으로부터 당업자에게 자명하게 될 것이기 때문이다.

도면의 간단한 설명

- [0054] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하며, 본 발명의 특정 양태를 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 제시된 특정 구체예의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조하여 더욱 잘 이해될 수 있다.

도 1: Maxcyte STX 정적 및 유동 전기천공 형질감염 기법을 이용한 안정한 세포주 개발 공정. 도면은 안정한 세포 생성의 작업 흐름을 묘사한다. 전기천공 후, 세포는 전기천공 절차로부터 회수를 위해 허용되는 선택 없이 일정 기간 동안 배양될 수 있다(도면에서 묘사되지 않음). 전기 천공 후, 세포는 선택 제제(선택 단계)의 존재하에 세포를 배양함으로써 선택된다. 선택 단계 후, 세포는 제한 희석 클로닝을 가능하게 하는 선택 제제의 존재하에 더 낮은 밀도에서 배양된다(유지/클론 선택 단계). 클론 집단의 생성 후, 클론은 외인성 폴리펩티드 발현을 위해 스크리닝되며 확장된다(클론 스크리닝 및 확장 단계). 스크리닝 후, 요망되는 활성을 갖는 클론은 냉동보존과 같은 장기간 저장에 제공되거나 생산 목적 (대규모 확대 단계)을 위해 더 큰 규모로 성장된다.

도 2a-c: DNA 형질감염은 세포에 대한 구별된 세포독성을 갖는다. 도 2에 도시된 것은 DNA 및 mRNA 형질감염된 말초혈 림프구(PBL) 및 K562 세포의 생존력(도 2a), DNA 및 mRNA 형질감염된 PBL 및 K562 세포의 GFP 발현(도 2b), 및 DNA 및 mRNA 형질감염된 PBL 및 K562 세포의 세포 수(도 2c)이다. 데이터는 DNA 형질감염이 K562에 대한 세포독성을 초래하지 않으나, 휴지 PBL에서도 강한 세포독성을 유도하지 않음을 입증한다.

도 3: mRNA-CRISPR 형질감염은 K562 및 PBL의 AAVS1 부위에서 게놈 DNA 편집을 유발하였다. 도 3은 휴지 PBL 세포 대 K562 세포의 Ce1-1 검정에 의한 유전자 편집의 비교를 묘사한다. 세포는 전기천공되지 않거나(-EP), mRNA-CRISPR(각각 cas9 및 gRNA)으로 전기천공되었다(+EP). 이러한 전기영동 겔에서의 샘플을 하기와 같이 로딩하였다: 레인 1: 마커; 레인 2: PBL의 -EP; 레인 3: PBL의 +EP; 레인 4: K562의 -EP; 레인 5: K562의 +EP. 보정된 AAVS-1 부위의 절단 생성물은 298 및 170 염기쌍이며, 어미 밴드는 468 염기쌍이다. 편집율은 (분해된 밴드의 밀도)/[(분해된 밴드의 밀도 + 어미 밴드의 밀도)로서 계산되었다. 휴지기 전기천공된 휴지 PBL 및 K562 세포는 각각 46 및 49%의 편집율을 보여주었다.

도 4: mRNA-CRISPR 형질감염은 K562의 AAVS1 부위에서 게놈 DNA 편집을 유발하였다. 도 4는 이중 실험 결과의 전기영동 겔이 mRNA-CRISPR (Cas9 및 가이드 RNA)로의 세포의 전기천공에 의한 유전자 편집의 일관성을 보여줌을 묘사하며, 이는 Ce1-1 검정에 의해 각각 59 및 52%의 DNA 편집을 유발한다. 보정된 AAVS-1 부위의 절단 생성물은 298 및 170개 염기쌍이며, 어미 밴드는 468개 염기쌍이다. 편집율은 (분해된 밴드의 밀도)/[(분해된 밴드의 밀도 + 어미 밴드의 밀도)로서 계산되었다.

도 5: mRNA-CRISPR 형질감염은 PBL 및 확장된 T 세포의 AAVS1 부위에서 게놈 DNA 편집을 유발하였다. 도 5에는 휴지 PBL 세포 대 확장된 T 세포의 비교가 묘사되어 있다. 세포를 형질감염시키지 않거나(-EP), GFP-mRNA로 형질감염시키거나, mRNA-CRISPR로 형질감염시켰다(Cas9+gRNA, c+g). 샘플을 PBL의 마커, -EP, GFP 및 c+g, 및 확장된 T 세포의 -EP 및 c+g의 서열에 로딩시켰다. 보정된 AAVS-1 부위의 절단 생성물은 298 및 170개 염기쌍이며, 어미 밴드는 468개 염기쌍이다. 편집율은 (분해된 밴드의 밀도)/[(분해된 밴드의 밀도 + 어미 밴드의 밀도)로서 계산되었다. Cas9 및 가이드 RNA로 전기천공된 PBL 및 확장된 T 세포는 각각 32 및 45% 편집을 나타내었다.

도 6: mRNA-CRISPR 형질감염의 단일-가닥-DNA-올리고 크기 의존성은 K562의 AAVS1 부위에서 Hind III 서열 통합을 유발하였다. 세포를 형질감염시키지 않거나(-EP), mRNA-CRISPR 단독으로 형질감염시키거나(c+g), mRNA-CRISPR 플러스 지시된 바와 같이 다양한 크기를 갖는 단일-가닥-DNA-올리고로 형질감염시켰다. 샘플을 마커, c+g, c+g+26mer, c+g+50mer, c+g+70mer 및 c+g+100mer의 서열로 로딩하였다. 6개 뉴클레오티드를 인식하는 HindIII는 HindIII 분해 부위를 발생시키는 AAVS1 부위 내에 위치하였다. AAVS-1 부위와 통합된 올리고 도너 서열의 절단 생성물은 298개 및 170개 염기쌍이며, 어미 밴드는 468개 염기쌍이다. 통합율은 (분해된 밴드의 밀도)/[(분해된 밴드의 밀도 + 어미 밴드의 밀도)로서 계산되었다. 50, 70 및 100개 핵산 도너 올리고는 각각 43, 35 및 34% 통합을 나타내었으며, 20개 핵산은 0% 통합을 나타내었다.

도 7: mRNA-CRISPR 올리고 형질감염은 확장된 T 세포의 AAVS1 부위에서 Hind III 서열 통합을 유발하였다. 세포를 mRNA-CRISPR 단독으로 또는 mRNA-CRISPR 플러스 50mer 단일 가닥 올리고(c + g + o)로 형질 감염시켰다. PCR 앰플리콘은 HindIII로 분해되거나(+H3) 분해되지 않았다(-H3). 샘플을 하기와 같이 로딩하였다: 1) 마커; 2) c+g-H3; 3) c+g+H3; 4) c+g+o-H3; 5) c+g+o+H3. 도너 올리고는 6개 뉴클레오티드를 AAVS1 부위로 통합시키고 이는 HindIII 분해 부위를 발생시켰다. AAVS-1 부위와 통합된 올리고 도너 서열의 절단 생성물은 298개 및 170개 염기쌍이며, 어미 밴드는 468개 염기쌍이다. 통합율은 (분해된 밴드의 밀도)/[(분해된 밴드의 밀도 + 어미 밴드의 밀도)로서 계산되었다. 도너 올리고로 형질감염된 확장된 T 세포는 15-30% 통합을 나타내었다.

도 8A-C: MaxCyte 시스템에 의한 mRNA 형질감염은 인간 확장된 T 세포에 대한 낮은 세포독성을 갖는다. 도 7에서와 같이 동일한 확장된 t 세포의 생존력 및 세포 증식(도 8a), 형질감염 후 확장된 T 세포의 증식(도 8b), 및 형질감염 후 확장된 T 세포의 GFP 발현(도 8c). 데이터는 mRNA로서의 뉴클레아제와 단일-가닥-올리고 DNA가 6개 뉴클레오티드 통합을 매개할 뿐만 아니라(도 7), 확장된 T 세포에 대한 낮은 세포독성을 보여줌을 입증한다.

도 9: 조혈 줄기 세포(HSC)의 표현형 및 GFP 발현. 전기천공은 해동 후 2일째에 수행하였다. 데이터는 mRNA로의 형질감염이 CD34+ HSC에 대한 DNA로의 형질감염보다 더욱 효과적임을 나타낸다.

도 10A-D: HSC의 DNA-GFP 형질감염은 HSC에 대한 mRNA-GFP 형질감염보다 훨씬 더 높은 세포독성을 갖는다. HSC 세포는 해동 후 2일째에 전기천공시켰다. 도 10에는 mRNA/DNA 형질감염된 CD34+ 인간 HSC의 생존력(도 10a), 증식(도 10b), GFP 발현(도 10c), 및 GFP 평균 형광 강도(MFI)(도 10d)가 도시되어 있다.

도 11A-C: mRNA-Cas9/gRNA 플러스 상이한 크기의 단일 가닥 도너 DNA 올리고로의 HSC의 형질감염은 낮은 세포독성을 갖는다. HSC 세포는 해동 후 2일에 전기천공시켰다. 도 11에는 지시된 핵산 길이의 다양한-크기의 DNA 단일-가닥 올리고 및 mRNA-Cas9/gRNA에 의해 형질감염된 HSC의 생존력(도 11a), 표준화된 생존력(도 11b) 및 증식(도 11c)이 도시되어 있다.

도 12: mRNA-CRISPR 형질감염은 CD34+ 조혈 줄기 세포의 AAVS1 부위에서 게놈 DNA 편집을 유발하였다. 세포는 형질감염되지 않거나(-EP), mRNA-GFP로 형질감염되거나 (GFP), mRNA-CRISPR로 4회 반복 형질감염되었다(C+G 1, 2, 3, 4). 전기영동 겔의 샘플을 하기와 같이 로딩하였다: 1) 마커; 2) -EP; 3) GFP; 4) C+G-1; 5) C+G-2; 6) C+G-3; 7) C+G-4. 편집된 AAVS-1 부위의 절단 생성물은 298개 및 170개 염기쌍이며, 어미 밴드는 468개 염기쌍이다. 편집율은 (분해된 밴드의 밀도)/[(분해된 밴드의 밀도 + 어미 밴드의 밀도)로서 계산되었다. Cas9를 인코딩하는 mRNA 및 가이드 RNA로 형질감염된 HSC는 4개의 상이한 실험에서 43, 60, 54, 및 52% 편집을 나타내었다.

도 13A-B: mRNA-CRISPR 올리고 형질감염은 형질감염 후 2일째에 CD34+ 조혈 줄기 세포의 AAVS1 부위에서 Hind III 서열 통합을 유발하였다. 세포는 형질감염되지 않거나(-EP), GFP-mRNA로 형질감염되거나(GFP), mRNA-CRISPR 단독으로 형질감염되거나(C+G), mRNA-CRISPR 플러스 다양한 크기-올리고(26mer, 50mer, 70mer 및 100mer와 지시된 올리고 농도의 100mer)로 형질감염되었다. 전기영동 겔의 샘플을 하기와 같이 로딩하였다: 1) 마커; 2) -EP -H3; 3) -EP +H3; 4) GFP -H3; 5) GFP +H3; 6) C+G -H3; 7) C+G +H3; 8) 26mer -H3; 9) 26mer +H3; 10) 50mer -H3; 및 11) 50mer +H3. 도 13b의 샘플은 하기와 같이 전기영동 겔 로딩하였다: 1) 마커; 2) 70mer -H3; 3) 70mer +H3; 4) 100mer-30 μ g/mL -H3; 5) 100mer-30 μ g/mL +H3; 6) 100mer-100 μ g/mL -H3; 7) 100mer-100 μ g/mL +H3; 8) 100mer-200 μ g/mL -H3; 9) 100mer-200 μ g/mL +H3. 통합된 AAVS-1 부위의 절단 생성물은 298개 및 170개 염기쌍이며, 어미 밴드는 468개 염기쌍이다. 통합율은 (분해된 밴드의 밀도)/[(분해된 밴드의 밀도 + 어미 밴드의 밀도)로서 계산되었다. 25mer 핵산 DNA 올리고로 형질감염된 HSC는 0% 통합을 나타내는 반면, 50mer 및 70mer 핵산 올리고로 형질감염된 HSC는 각각 9 및 23% 통합을 나타냈다. 30 μ g/mL의 100개 뉴클레오티드 올리고로 형질감염된 HSC는 이 시점에서 0% 통합을 나타낸 반면 (형질감염 후 4일째에 13%, 데이

터 미도시됨), 100 $\mu\text{g/mL}$ 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 동일한 올리고로 형질감염된 HSC는 각각 28 및 43% 통합을 나타냈다.

도 14: 가이드 RNA는 통합 특이성을 제공한다. AAVS1 부위를 표적으로 하는 gRNA를 갖는 올리고는 AAVS1에 통합되나, 낮적혈구 질환 (SCD) 로커스에는 통합되지 않는다. 세포는 전기천공되지 않거나(-EP) mRNA-CRISPR 플러스 도너 올리고 (c+g+o)로 전기천공되었다. -/+H는 HindIII 엔도뉴클레아제의 부재(-) 또는 존재(+)를 나타낸다. 전기영동 겔의 샘플을 하기와 같이 로딩하였다: 1) 마커; 2) -EP +H; 3) c+g+o-H; 4) c+g+o+H; 5) -EP +H; 6) c+g+o-H; 7) c+g+o+H. 레인 2-4는 AAVS1 로커스로부터 게놈 DNA를 나타내며, 레인 5-7은 SCD 로커스로부터의 게놈 DNA를 나타낸다. 통합된 AAVS1 부위의 절단 생성물은 298개 및 170개 염기쌍이며, 어미 밴드는 468개 염기쌍이다. 통합율은 (분해된 밴드의 밀도)/[(분해된 밴드의 밀도 + 어미 밴드의 밀도)로서 계산되었다. DNA 올리고 및 AAVS1 로커스-특이적 가이드 RNA로 형질감염된 K562 세포는 AAVS1 부위로 특이적으로 통합되며 SCD 로커스에는 통합되지 않는다. AAVS1 로커스에서의 통합율은 20%이었다.

도 15a-b: AAVS1(도 15A) 및 SCD 로커스(도 15B)를 표적으로 하는 2개의 가이드 RNA를 사용한 부위-특이적 통합. 도 15b에 도시된 바와 같이, 도너 DNA의 부위-특이적 통합은 SCD 로커스에서 달성되었다. 이들 결과는 실시예 2에 추가로 기술된다.

도 16A-B: 서열 변형 영역(대문자 및 음영 없음) 및 상동성 영역(소문자 및 음영)을 갖는 예시적인 도너 DNA 올리고. 도 16a는 정지 코돈이 표적 게놈 DNA 내로 첨가로서 삽입되는 예를 보여준다. 도 16b는 표적 게놈 DNA에서 단일 염기가 변경된 예를 보여준다(SEQ ID NOs:1-4).

도 17: 형질감염 후 1일째에 eGFP를 인코딩하는 mRNA로의 HSC의 효율적인 형질감염. 대조군 세포(형질감염 없음, 왼쪽 두개 현미경 사진) 및 형질감염된 세포를 제시하였다(오른쪽 두개 현미경 사진). 세포는 두 대조군 및 형질감염된 세포 모두에서 생존가능하다. eGFP(하단, 오른쪽)의 100%에 가까운 발현은 mRNA 형질감염으로의 효율적인 형질감염 효율을 입증한다.

도 18: 전기천공은 HSC의 AAVS1 부위에서 효율적인 유전자 편집을 매개한다. HSC는 mRNA 포물레이션 중의 cas9(c) 및 gRNA(g)로 형질감염되었다. Cel-1 검정은 유전자 편집 분석을 위해 수행하였다. 레인 1은 마커이다. 레인 2는 대조군 HSC(-EP)이다. 레인 3은 GFP-mRNA 형질감염된 HSC이다. 레인 4 내지 7은 Cas9/gRNA로의 HSC의 쿼드레이트(quadrate) 형질감염이다.

도 19: gp91phox에서 가장 우세한 돌연변이('핫스팟')는 엑손 7의 위치 676C에서 T로의 돌연변이이다. CRISPR 및 도너 DNA 단일-가닥 올리고의 사용으로 T 돌연변이를 다시 C로 보정하여, 보정 후 CGD의 정지 코돈으로부터 다시 226번의 아미노 부위를 Arg로 보정하여, gp91 발현을 복원할 것이다. CGD 환자로부터 유래된 EBV-형질전환된 B 세포를 사용함으로써, gp91에 대한 FITC-컨주게이팅된 항체로의 형질감염 후 5일째에 검정할 경우 공동 형질감염은 실질적으로 gp91 발현을 1% 기저 노이즈 수준(하단 왼쪽)으로부터 10% 상향조절된 수준(하단 오른쪽)으로 복원하였다. 형질감염은 세포 해동 후 2일째에 수행되었다.

도 20a-c는 X-연결된 CGD 환자로부터 유래된 B-LCL에서 단일유전자 돌연변이 복구에서 gRNA의 폴리 A의 효과를 보여준다. (a)에는 다양한 기간에 효소적으로 첨가된 다양한 길이의 폴리 A를 함유하는 gRNA로의 CRISPR/ssOND 형질감염 후 환자 B-LCL의 생존력이 도시되어 있다. (b)에는 다양한 기간에 효소적으로 첨가된 다양한 길이의 폴리 A를 함유하는 gRNA로의 CRISPR/ssOND 형질감염 후 환자 B-LCL의 증식이 도시되어 있다. (c)에는 다양한 기간에 효소적으로 첨가된 다양한 길이의 폴리 A를 함유하는 gRNA로의 CRISPR/ssOND 형질감염 후 환자 B-LCL의 Gp91 복구가 도시되어 있다. 모든 gRNA는 ARCA (T7 Ultra)로의 캡핑으로 제조되었다. 캡핑 후, 5-40 min 폴리 A 첨가는 돌연변이 복구 효율을 향상시켰다.

도 21a-c는 유전자 복구에서 캡핑 및 폴리 A 첨가의 효과를 보여준다. (a)에는 다양하게 변형된 gRNA로의 CRISPR/ssOND 형질감염 후 환자 B-LCL의 생존력이 도시되어 있다. (b)에는 다양하게 변형된 gRNA로의 CRISPR/ssOND 형질감염 후 환자 B-LCL의 증식이 도시되어 있다. (c)에는 다양하게 변형된 gRNA로의 CRISPR/ssOND 형질감염 후 환자 B-LCL의 Gp91 복구가 도시되어 있다. 이들 실험에서 TranscriptionAid 키트가 사용된다. 캡핑(ARCA에 의한)은 생존력 및 세포 증식을 돕는다(세포 증식에 있어서 3-4배 증가). 캡핑 및 폴리 A 테일링의 조합은 테일링(폴리 아데닐화) 또는 비(no) 테일링 중 어느 하나와 조합된 비(no) 캡핑과 동일한 유전자 복구를 가질 수 있다. 종합하면, 캡핑 및 테일링 조합은 복구된 세포의 수를 증가시킨다.

도 22는 다양하게 변형된 gRNA로의 CRISPR/ssOND 형질감염 후 전체 복구된 세포를 보여준다. 캡핑(ARCA에 의한)은 생존력 및 세포 증식을 돕는다(세포 증식에 있어서 5배 증가). 캡핑 및 폴리 A 테일링의 조합은 테일링 또는 비 테일링 중 어느 하나와 조합된 비(no) 캡핑과 동일한 유전자 복구를 가질 수 있다. 종합하면, gRNA

의 캡핑 및 테일링 조합은 복구된 세포의 수를 증가시킨다.

도 23은 도너 DNA 올리고 설계의 계략도이다. 상단 올리고 1에서, gRNA 및 올리고는 게놈 DNA 듀플렉스의 같은 가닥에 상보적이다. 하단 올리고 2에서, gRNA 및 올리고는 게놈 DNA 듀플렉스의 상이한 가닥에 상보적이다.

도 24는 돌연변이 복구 효율에 대한 ssDNA 올리고머의 선택 효과를 보여준다. 적용된 단일 가닥 DNA(ssDNA) 올리고머 및 gRNA가 게놈 DNA 듀플렉스의 같은 가닥에 상보적인 경우(올리고 1), 더 높은 복구 효율이 관찰되었다. 적용된 ssDNA 올리고머 및 gRNA가 게놈 DNA 듀플렉스의 상이한 가닥에 상보적인 경우(올리고 2), 더 낮은 복구 효율이 관찰되었다. gRNA는 CGD 케이스에서는 센스를 표적으로 하며, SCID 케이스에 있어서 안티 센스를 표적으로 한다.

도 25a-c는 상이한 키트로부터 제조된 gRNA로의 유전자 복구에서 일관성을 보여준다. (a)에는 다양한 로트 번호를 갖는 3개 키트로부터 제조된 gRNA로의 CRISPR/ssOND 형질감염 후 환자 B-LCL의 생존력이 도시되어 있다. (b)에는 다양한 로트 번호를 갖는 3개 키트로부터 제조된 gRNA로의 CRISPR/ssOND 형질감염 후 환자 B-LCL의 증식 도시되어 있다. (c)에는 다양한 로트 번호를 갖는 3개 키트로부터 제조된 gRNA로의 CRISPR/ssOND 형질감염 후 환자 B-LCL의 gp91 복구가 도시되어 있다. 다양한 키트 및 다양한 로트 번호로 제조된 gRNA를 이용한 일관되고 효율적인 유전자 복구가 입증되었다.

도 26은 효소 반응 없이 첨가된 폴리 A 테일링 gRNA로의 CRISPR/ssOND 형질감염 후 환자 B-LCL의 gp91 복구를 보여준다. 사용된 전방향 프라이머는 다음과 같다: 5'-TTAATACGACTCACTATAGGCACCCAGATGAATTGTACGT-3' (SEQ ID NO:5). 20T에 대한 역방향 프라이머는 다음과 같다: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGCACCAGCTCGGTGCC-3' (SEQ ID NO:6). 30T에 대한 역방향 프라이머는 다음과 같다: 5'-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTAAAGCACCAGCTCGGTGCC-3' (SEQ ID NO:7). 이러한 데이터는 RNA 생성을 위한 주형으로서 앰플리콘을 증식하는데 사용된 역방향 프라이머에서 폴리 T 첨가를 통해 폴리 A를 첨가하는 것이 가능함을 입증한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 본원에 기술된 방법은 DNA 서열을 변형/보정하기 위해 DNA 올리고 및 DNA 분해제를 사용한다. 본원에 기술된 방법은 낮은 독성 및 높은 혼입 효율의 DNA 서열 변형을 제공하는 것으로 여겨진다.

[0056] **핵산**

[0057] **B. 올리고**

[0058] 구체에는 DNA 올리고 및 DNA 분해제를 포함하는 조성물로 세포를 전기천공시킴에 의한 표적 게놈 DNA 서열의 서열 변형에 관한 것이다. 일부 구체예에서, DNA 올리고는 단일-가닥이다.

[0059] 용어 "내인성 게놈 DNA"는 세포의 크로모솜 DNA를 지칭한다. 용어 "표적 게놈 DNA 서열"은 DNA 서열 변형이 유도되는 내인성 게놈 DNA 부위를 지칭한다. DNA 서열 변형은 하나의 특이적 부위 또는 다중 특이적 부위에서 표적 게놈 DNA 서열의 하나 이상의 염기를 변경시키는 것일 수 있다. 변경은 표적 게놈 DNA 서열의 적어도, 최대, 또는 정확하게 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40개 염기쌍 또는 이에 속하는 추론가능한 임의의 범위의 염기쌍을 상이한 적어도, 최대 또는 정확하게는 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40개 염기쌍 또는 이에 속하는 추론가능한 임의의 범위의 염기쌍으로 변경하는 것을 포함할 수 있다. 결실은 적어도, 최대 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 또는 500개 염기쌍 또는 이에 속하는 임의의 추론가능한 범위의 결실일 수 있다. 첨가는 적어도, 최대 또는 정확히 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40개 또는 그 초과 염기쌍 또는 이에 속하는 임의의 추론가능한 범위의 첨가일 수 있다. 서열 변형 또는 보정은 서열 변경이 다중 방식으로 표적 게놈 DNA를 변경시키는 경우, 변화 및 결실, 변화 및 첨가, 등으로서 분류될 수 있다. 한 구체예에서, 서열 변경은 정지 코돈이다. 추가의 구체예에서, DNA 서열 변형은 하나 이상의 정지 코돈이다. 추가의 구체예에서, DNA 서열의 변형은 1, 2, 3, 4, 5개 또는 10개 정지 코돈이다. 서열 변형이 정지 코돈인 경우, 유전자 편집의 효율성 및/또는 신뢰성이 증가될 수 있다.

[0060] 용어 "올리고" 또는 "올리고뉴클레오타이드"는 폴리뉴클레오타이드 예컨대, 테옥시리보핵산(DNA), 및 적절한 경우, 리보핵산(RNA)을 지칭한다. 본 용어는 또한, 동등물로서 뉴클레오타이드 유사체로부터 및 기술된 구체예에 적용 가능한 경우, 단일(센스 또는 안티센스) 및 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드로부터 제조된 RNA 또는 DNA의 유도체, 변이체 및 유사체를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 테옥시리보뉴클레오타이드는 테옥시아데노신, 테옥시시티딘, 테옥시구아노신 및 테옥시티미딘을 포함한다. 명료성을 위해서, 본원에서 DNA 또는 RNA일 수 있는 핵산의

뉴클레오타이드를 언급할 경우, 용어 "아데노신", "시티딘", "구아노신" 및 "티미딘"이 사용된다. 핵산이 RNA인 경우, 우라실 염기를 갖는 뉴클레오타이드는 우리딘인 것으로 이해된다.

[0061] 용어 "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용되며 폴리머 형태의 임의의 길이의 뉴클레오타이드, 즉 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 또는 이의 유사체를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 임의의 3-차원 구조를 가질 수 있으며, 공지된 또는 비공지된 임의의 기능을 수행할 수 있다. 하기는 폴리뉴클레오타이드의 비제한적 예이다: 유전자 또는 유전자 단편(예를 들어, 프로브, 프라이머, EST 또는 SAGE 태그), 엑손, 인트론, 메신저 RNA(mRNA), 트랜스퍼 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, dsRNA, siRNA, miRNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 분리된 DNA, 임의의 서열의 분리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 폴리뉴클레오타이드의 어셈블리 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 성분(예를 들어, 당)에 의해 중단될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 중합 후 예컨대, 라벨링 성분과의 컨주게이션에 의해 추가로 변형될 수 있다. 본 용어는 또한 이중- 및 단일-가닥 분자 둘 모두를 지칭한다. 달리 명시되거나 요구되는 않는 한, 폴리뉴클레오타이드인 본 발명의 임의의 구체예는 이중-가닥 형태 및 이중-가닥 형태를 구성하는 것으로 공지되거나 예측되는 각각의 2개의 상보적인 단일-가닥 형태 둘 모두를 포함한다.

[0062] 본원에 기술된 DNA 올리고는 표적 게놈 DNA 서열에 상보적인 서열 및 표적 게놈 DNA 서열의 서열 변형을 포함한다.

[0063] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상보적"은 뉴클레오타이드들 간의 왓슨-크릭 염기 쌍을 나타내며, 특히 3개의 수소 결합에 의해 연결된 시토신 및 구아닌 잔기 및 2개의 수소 결합에 의해 아데닌 잔기에 연결된 티민 또는 우라실 잔기를 갖는 서로에게 수소 결합된 뉴클레오타이드를 지칭한다. 일반적으로, 핵산은 지정된 제2 뉴클레오타이드 서열에 대한 "상보성 퍼센트"를 갖는 것으로서 기술된 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 서열이 지정된 제2 뉴클레오타이드 서열에 80%, 90% 또는 100% 상보성을 가질 수 있으며, 이는 서열의 10개 뉴클레오타이드 중 8개, 10개 뉴클레오타이드 중 9개 또는 10개 뉴클레오타이드 중 10개가 지정된 제2 뉴클레오타이드 서열에 상보적임을 나타낸다. 예를 들어, 뉴클레오타이드 서열 3'-TCGA-5'는 뉴클레오타이드 서열 5'-ACGT-3'에 100% 상보적이다. 추가로, 뉴클레오타이드 서열 3'-TCGA-는 뉴클레오타이드 서열 5'-TTAGCTGG-3'의 영역에 100% 상보적이다. 2개의 상보적인 뉴클레오타이드 서열이 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 당업자에게 인지될 것이다.

[0064] 특정 구체예에서, 올리고는 표적 게놈 DNA 서열에 상보적인 서열의 적어도 약 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 또는 50개 핵산을 포함한다. 특정 구체예에서, 올리고는 게놈 DNA 서열에 상보적인 적어도 약 20개의 핵산 서열을 포함한다. 이러한 맥락에서, 용어 "상보적 서열"은 게놈 DNA의 서열과 정확하게 매칭되는 서열을 지칭한다. 상보적 서열은 DNA 서열 변형의 5' 말단인 영역 및 DNA 서열 변형의 3' 말단인 영역에 존재할 수 있다. 예시적인 실례로서, 올리고가 적어도 20개 핵산의 상보적 서열을 포함하는 경우, 올리고는 예를 들어, 각 측면의 서열 변형에 10개 핵산의 상보적 서열을 포함할 수 있다. 유사하게는, 10개 핵산의 상보적 서열을 포함하는 올리고는 예를 들어, 각 측면의 서열 변형에 5개 핵산의 상보적 서열을 포함할 수 있다.

[0065] DNA 올리고는 약 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 또는 600개 핵산 내지 약 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500개 핵산 길이, 또는 이의 추론가능한 임의의 범위일 수 있다. 특정 구체예에서, 올리고는 20개 초과인 핵산, 또는 21, 22, 23, 24, 25, 30, 또는 40개 초과인 핵산이다. 특정 구체예에서, 올리고는 약 30 내지 300개 핵산, 약 25 내지 약 200개 핵산, 약 25 내지 약 150개 핵산, 약 25 내지 약 100개 핵산, 또는 약 40 내지 약 100개 핵산이다.

[0066] 전기천공 절차 동안 올리고 농도는 전기천공 챔버 및/또는 샘플 용기에서 올리고의 최종 농도일 수 있다. 올리고 농도는 약 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 내지 약 350, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 또는 5000 $\mu\text{g/mL}$ 또는 이에 속하는 임의의 추론가능한 범위일 수 있다. 특정 구체예에서, 올리고의 농도는 적어도 30 $\mu\text{g/mL}$ 이다. 추가의 구체예에서, 올리고의 농도는 적어도, 최대 또는 정확히 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 또는 200 $\mu\text{g/mL}$ 또는 이에 속하는 임의의 추론가능한 범위이다.

[0067] C. DNA 분해제

- [0068] 본 발명은 DNA 올리고 및 DNA 분해제로 전기천공에 의해 세포를 형질감염시킴으로써 표적 게놈 DNA 서열을 변형시키는 방법을 제공한다. 용어 "DNA 분해제"는 핵산의 뉴클레오타이드 서브유닛 간의 결합(즉, 포스포디에스테르 결합)을 절단할 수 있는 제제를 지칭한다. 특정 구체예에서, DNA 분해제는 RNA로 인코딩된다. RNA에 대한 DNA 분해제 제공은 형질감염 후 세포의 생존력 증가 및 서열 변형 효율성 증가 중 하나 이상을 수행할 수 있는 것으로 여겨진다. 다른 구체예에서, DNA 분해제는 효소 활성을 갖는 단백질, 효소 또는 소분자 모방체이다.
- [0069] 한 구체예에서, DNA 분해제는 트랜스포사제이다. 예를 들어, 규정된 DNA 서열을 척추동물의 크로모솜으로 정확하게 도입시키도록 설계된 합성 DNA 트랜스포손(예를 들어, "슬립핑 뷰티" 트랜스포손 시스템)이 사용될 수 있다. 슬립핑 뷰티 트랜스포손 시스템은 척추동물 게놈으로 DNA의 특이적 서열을 삽입하도록 설계된 트랜스포손 및 슬립핑 뷰티(SB) 트랜스포사제로 구성된다. DNA 트랜스포손은 단순한 잘라 붙이기 방식으로 한 DNA 부위로부터 다른 부위로 전위시킨다. 전위는 규정된 DNA 세그먼트가 하나의 DNA 분자로부터 절제되어 동일하거나 상이한 DNA 분자 또는 게놈의 또 다른 부위로 이동되는 정밀한 과정이다.
- [0070] 모든 다른 Tc1/마리너-유형 트랜스포사제가 하는 바와 같이, SB 트랜스포사제는 트랜스포손을 수령체 DNA 서열의 TA 디뉴클레오타이드 염기 쌍으로 삽입시킨다. 삽입 부위는 동일한 DNA 분자 또는 또 다른 DNA 분자 (또는 크로모솜)의 다른 부위일 수 있다. 인간을 포함하는 포유동물 게놈에서, 대략 2억개 TA 부위가 존재한다. TA 삽입 부위는 트랜스포손 통합 과정에서 중복된다. TA 서열의 이러한 중복은 전위의 특징이며 일부 실험에서 메카니즘을 확인하는데 사용된다. 트랜스포사제는 트랜스포손 내부에서 인코딩될 수 있거나 트랜스포사제는 또 다른 공급원에 의해 공급될 수 있으며, 이 경우 트랜스포손은 비-자율적 요소가 된다. 비-자율적 트랜스포손이 유전자 도구로서 가장 유용한데 왜냐하면 삽입 후 이들은 독립적으로 계속해서 절제 및 재삽입될 수 없기 때문이다. 인간 게놈 및 기타 포유동물 게놈에서 확인된 DNA 트랜스포손 모두는 비-자율적인데, 왜냐하면 이들이 트랜스포사제 유전자를 함유함에도 불구하고, 유전자는 비-작용성이며 트랜스포손을 이동시킬 수 있는 트랜스포사제를 생성시킬 수 없기 때문이다.
- [0071] 추가의 구체예에서, DNA 분해제는 인테그라제이다. 예를 들어, phiC31 인테그라제는 박테리오파지 phiC31의 게놈 내부에 인코딩된 서열-특이적 재조합효소이다. phiC31 인테그라제는 부착 부위(att)로 불리는 2개의 34개 염기쌍 서열 사이의 재조합을 매개한다 (하나는 과아지에서 발견되고, 다른 하나는 박테리아 숙주에서 발견됨). 이러한 세린 인테그라제는 포유동물 세포를 포함하는 많은 다양한 세포 유형에서 효과적으로 작용하는 것으로 밝혀졌다. phiC31 인테그라제의 존재하에, attB-함유 도너 플라스미드는 천연 attP 부위(슈도-attP 부위로 불림)에 대한 서열 유사성을 갖는 부위에서의 재조합을 통해 표적 게놈으로 단방향적으로 통합될 수 있다. phiC31 인테그라제는 임의의 크기의 플라스미드를 단일 복사체로서 통합시킬 수 있으며, 보조인자를 필요로 하지 않는다. 통합된 전이유전자는 안정하게 발현되고 유전된다.
- [0072] 특정 구체예에서, DNA 분해제는 뉴클레아제이다. 뉴클레아제는 핵산을 가수분해하는 효소이다. 뉴클레아제는 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로서 분류될 수 있다. 엔도뉴클레아제는 DNA 또는 RNA 분자 내부의 핵산 사이의 결합의 가수분해를 촉매하는 임의의 효소 군이다. 엑소뉴클레아제는 DNA 또는 RNA 사슬의 말단으로부터 단일 뉴클레오타이드의 가수분해를 촉매하는 임의의 효소 군이다. 뉴클레아제는 또한 DNA 또는 RNA를 특이적으로 분해하는 지의 여부에 따라 분류될 수 있다. DNA의 가수분해를 특이적으로 촉매하는 뉴클레아제는 데옥시리보뉴클레아제 또는 DN아제로서 언급될 수 있는 반면, RNA의 가수분해를 특이적으로 촉매하는 뉴클레아제는 리보뉴클레아제 또는 RN아제로서 언급될 수 있다. 일부 뉴클레아제는 단일-가닥 또는 이중-가닥 핵산 서열에 특이적이다. 일부 효소는 엑소뉴클레아제 및 엔도뉴클레아제 특성 둘 모두를 갖는다. 또한, 일부 효소는 DNA 및 RNA 서열 둘 모두를 분해할 수 있다. 용어 "뉴클레아제"는 핵산 서열을 가수분해하는 임의의 효소를 일반적으로 지칭하는데 본원에서 사용된다.
- [0073] 최적의 반응 조건은 다양한 뉴클레아제에 따라 다르다. 고려되어야 하는 요소는 온도, pH, 효소 보조인자, 염 조성, 이온 강도 및 안정화제를 포함한다. 시중에서 입수가능한 뉴클레아제의 공급업체(예를 들어, Promega Corp.; New England Biolabs, Inc.)는 각 효소에 대한 최적 조건에 대한 정보를 제공한다. 대부분의 뉴클레아제는 인큐베이션 온도에서 측정될 때 pH 7.2 내지 pH 8.5에서 사용된다. 또한, 대부분의 뉴클레아제는 37°C에서 최대 활성을 보여준다; 그러나, 소수개의 효소는 최적의 활성을 위해 더 높거나 낮은 온도를 필요로 한다(예를 들어, Taq I, 65°C; Sma I, 25°C). DNA 농도 또한 요인이 될 수 있는데, 높은 DNA 농도는 효소 활성을 감소시킬 수 있으며, 너무 희석된 DNA 농도는 효소의 K_m 아래로 떨어뜨려 효소 활성에 또한 영향을 끼칠 수 있기 때문이다.
- [0074] 뉴클레아제의 비제한적인 예로는 DN아제 I, 벤조나제, 엑소뉴클레아제 I, 엑소뉴클레아제 III, 녹두

뉴클레아제, 뉴클레아제 BAL 31, RN아제 I, S1 뉴클레아제, 람다 엑소뉴클레아제, RecJ 및 T7 엑소뉴클레아제를 포함한다. DN아제 I은 비특이적으로 DNA를 절단하여 5'-포스포릴화 말단 및 3'-하이드록실화 말단을 갖는 디-, 트리- 및 올리고뉴클레오티드 생성물을 방출시키는 엔도뉴클레아제이다. DN아제 I은 단일- 및 이중-가닥 DNA, 크로마틴, 및 RNA:DNA 하이브리드에 작용한다. 엑소뉴클레아제 I은 3'에서 5' 방향으로 단일-가닥 DNA로부터 뉴클레오티드 제거를 촉매한다. 엑소뉴클레아제 III는 이중 DNA의 3'-하이드록실 말단으로부터 모노뉴클레오티드의 단계적 제거를 촉매한다. 엑소뉴클레아제 III는 또한, 단일-가닥 겹을 생성하기 위해 이중 DNA에 닉(nick)으로 작용한다. 단일 가닥 DNA는 엑소뉴클레아제 III에 내성이다. 녹두 뉴클레아제는 DNA의 말단으로부터 단일-가닥 연장을 저하시킨다. 녹두 뉴클레아제는 또한 RNA 엔도뉴클레아제이다. 뉴클레아제 BAL 31은 이중 DNA의 3' 및 5' 말단 모두를 분해한다. 뉴클레아제 BAL 31은 또한 이중 DNA 및 RNA의 닉, 겹 및 단일-가닥 영역에서 절단시키는 고도로 특이적인 단일-가닥 엔도뉴클레아제이다. RN아제 I은 모든 RNA 디뉴클레오티드에서 절단될 단일 가닥 특이적 RNA 엔도뉴클레아제이다. S1 뉴클레아제는 단일-가닥 DNA와 RNA를 엔도뉴클레아제로 분해하여 5'-포스포릴-말단 생성물을 생성시킨다. 이중-가닥 핵산(DNA:DNA, DNA:RNA 또는 RNA:RNA)은 극도로 높은 농도의 효소를 사용하는 것을 제외하고 S1 뉴클레아제 분해에 대해 내성이다. 람다 엑소뉴클레아제는 이중 DNA로부터 5' 모노뉴클레오티드의 제거를 촉매한다. 이의 바람직한 기질은 5'-포스포릴화된 이중 가닥 DNA이지만, 람다 엑소뉴클레아제는 또한 매우 감소된 수준으로 단일-가닥 및 비-포스포릴화된 기질을 분해할 것이다. 람다 엑소뉴클레아제는 닉 또는 겹에서 DNA 분해를 개시할 수 없으며, RecJ는 5'으로부터 3' 방향으로 DNA로부터 데옥시-뉴클레오티드 모노포스페이트의 제거를 촉매하는 단일-가닥 DNA 특이적 엑소뉴클레아제이다. T7 엑소뉴클레아제는 이중 DNA의 5' 모노뉴클레오티드의 제거를 촉매한다. T7 엑소뉴클레아제는 이중 가닥 DNA의 5' 말단으로부터 또는 겹 및 닉에서 뉴클레오티드 제거를 촉매한다.

[0075] 제한 엔도뉴클레아제는 본 발명의 방법과 관련하여 사용될 수 있는 뉴클레아제의 또 다른 예이다. 제한 엔도뉴클레아제 및 이들의 인식 서열의 비제한적 예는 표 1에 제공되어 있다.

[0076] 표 1. 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열

효소	인식 서열	SEQ ID NO:	효소	인식 서열	SEQ ID NO:
AatII	GACGTC		Fnu4H I	GCNGC	
Acc65 I	GGTACC		Fok I	GGATG	
Acc I	GTMKAC		Fse I	GGCCGGCC	
Aci I	CCGC		Fsp I	TGCGCA	
Acl I	AACGTT		Hae II	RGCGCY	
Afe I	AGCGCT		Hae III	GGCC	
Afl II	CTTAAG		Hga I	GACGC	
Afl III	ACRYGT		Hha I	GCGC	

[0077]

효소	인식 서열	SEQ ID NO:	효소	인식 서열	SEQ ID NO:
Age I	ACCGGT	8	Hinc II	GTYRAC	
Ahd I	GACNNNNNGTC		Hind III	AAGCTT	
Alu I	AGCT		Hinf I	GANTC	
Alw I	GGATC		HinP1 I	GCGC	
AlwNI	CAGNNNCTG		Hpa I	GTTAAC	
Apa I	GGGCCC		Hpa II	CCGG	
ApaLI	GTGCAC		Hph I	GGTGA	
Apo I	RAATTY		Kas I	GGCGCC	
Asc I	GGCGCGCC	9	Kpn I	GGTACC	
Ase I	ATTAAT		Mbo I	GATC	
Ava I	CYCGRG		Mbo II	GAAGA	
Ava II	GGWCC		Mfe I	CAATTG	
Avr II	CCTAGG		Mlu I	ACGCGT	
Bae I	NACNNNNGTAPYCN		Mly I	GAGTCNNNNN	18
BamHI	GGATCC		Mnl I	CCTC	
Ban I	GGYRCC	10	Msc I	TGGCCA	
Ban II	GRGCYC		Mse I	TTAA	
Bbs I	GAAGAC		Msl I	CAYNNNNNRTG	19
Bbv I	GCAGC		MspA1 I	CMGCKG	
BbvCI	CCTCAGC		Msp I	CCGG	
Bcg I	CGANNNNNNTGC		Mwo I	GCNNNNNNNGC	20
BciV I	GTATCC	11	Nae I	GCCGGC	
Bcl I	TGATCA		Nar I	GGCGCC	
Bfa I	CTAG		Nci I	CCSGG	
Bgl I	GCCNNNNNNGGC		Nco I	CCATGG	
Bgl II	AGATCT		Nde I	CATATG	
Blp I	GCTNAGC		NgoMI V	GCCGGC	
Bmr I	ACTGGG		Nhe I	GCTAGC	
Bpm I	CTGGAG		Nla III	CATG	

[0078]

효소	인식 서열	SEQ ID NO:	효소	인식 서열	SEQ ID NO:
BsaA I	YACGTR		Nla IV	GGNNCC	
BsaB I	GATNNNNATC	12	Not I	GCGGCCGC	
BsaH I	GRCGYC		Nru I	TCGCGA	
Bsa I	GGTCTC		Nsi I	ATGCAT	
BsaJ I	CCNNGG		Nsp I	RCATGY	
BsaW I	WCCGGW		Pac I	TTAATTAA	
BseR I	GAGGAG		Paer7 I	CTCGAG	
Bsg I	GTGCAG		Pci I	ACATGT	
BsiE I	CGRYCG		Phf I	GACNNNGTC	
BsiHKA I	GWGCWC		PhM I	CCANNNNNNTGG	21
BsiW I	CGTACG		PleI	GAGTC	
Bsl I	CCNNNNNNNNGG	13	Pme I	GTTTAAAC	
BsmA I	GTCTC		Pml I	CACGTG	
BsmB I	CGTCTC		PpuM I	RGGWCCY	
BsmF I	GGGAC		PshA I	GACNNNGTC	22
Bsm I	GAATGC		Psi I	TTATAA	
BsoB I	CYCGRG		PspG I	CCWGG	
Bsp1286 I	GDGCHC		PspOM I	GGGCCC	
BspD I	ATCGAT		Pst I	CTGCAG	
BspE I	TCCGGA		Pvu I	CGATCG	
BspH I	TCATGA		Pvu II	CAGCTG	
BspM I	ACCTGC		Rsa I	GTAC	
BsrB I	CCGCTC		Rsr II	CGGWCCG	
BsrD I	GCAATG		Sac I	GAGCTC	
BsrF I	RCCGGY		Sac II	CCGCGG	
BsrG I	TGTACA		Sal I	GTCGAC	
Bsr I	ACTGG		Sap I	GCTCTTC	
BssH II	GCGCGC		Sau3A I	GATC	
BssK I	CCNNGG		Sau96 I	GGNCC	
Bst4C I	ACNGT		Sbf I	CCTGCAGG	

[0079]

효소	인식 서열	SEQ ID NO:	효소	인식 서열	SEQ ID NO:
BssS I	CACGAG		Sca I	AGTACT	
BstAP I	GCANNNNNNTGC	14	ScrF I	CCNGG	
BstB I	TTCGAA		SexA I	ACCWGGT	
BstE II	GGTNACC		SfaN I	GCATC	
BstF5 I	GGATGNN		Sfc I	CTRYAG	
BstN I	CCWGG		Sfi I	GGCCNNNNNGGCC	23
BstU I	CGCG		Sfo I	GGCGCC	
BstX I	CCANNNNNNTGG	15	SgrA I	CRCCGGYG	
BstY I	RGATCY		Sma I	CCCGGG	
BstZ17 I	GTATAC		Sml I	CTYRAG	
Bsu36 I	CCTNAGG		SnaB I	TACGTA	
Btg I	CCPuPyGG		Spe I	ACTAGT	
Btr I	CACGTG		Sph I	GCATGC	
Cac8 I	GCNNGC		Ssp I	AATATT	
Cla I	ATCGAT		Stu I	AGGCCT	
Dde I	CTNAG		Sty I	CCWWGG	
Dpn I	GATC		Swa I	ATTAAAT	
Dpn II	GATC		Taq I	TCGA	
Dra I	TTTAAA		Th I	GAWTC	
Dra III	CACNNNGTG		Th I	CTCGAG	
Drd I	GACNNNNNNNTGC	16	Tse I	GCWGC	
Eae I	YGGCCR		Tsp45 I	GTSAC	
Eag I	CGGCCG		Tsp509 I	AATT	
Ear I	CTCTTC		TspR I	CAGTG	
Eci I	GGCGGA		Tth111 I	GACNNNGTC	
EcoN I	CCTNNNNNNNAGG	17	Xba I	TCTAGA	
EcoO109 I	RGGNCCY		Xcm I	CCANNNNNNNNNNTGG	24
EcoR I	GAATTC		Xho I	CTCGAG	
EcoR V	GATATC		Xma I	CCCGGG	
Fau I	CCCGCNNNN		Xmn I	GAANNNNTTC	25

[0080]

[0081]

여기에서, R = A 또는 G, K = G 또는 T, S = G 또는 C, Y = C 또는 T, M = A 또는 C, W = A 또는 T, B = A가 아님 (C, G 또는 T), H = G가 아님 (A, C 또는 T), D = C가 아님 (A, G 또는 T), V = T가 아님 (A, C 또는 G), 및 N = 임의의 뉴클레오티드.

[0082]

당업자는 표적 게놈 서열 및 DNA 올리고의 특징에 따라 적절한 뉴클레아제를 선택할 수 있을 것이다. 한 구체예에서, 뉴클레아제는 부위-특이적 뉴클레아제이다. 관련된 구체예에서, 뉴클레아제는 적어도 8, 적어도 10, 적어도 12, 적어도 14, 적어도 16, 적어도 18, 적어도 20, 또는 적어도 25개의 염기 쌍의 인식 서열을 갖는다. 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 또는 25개 염기 쌍 초과인 인식 서열을 갖는 뉴클레아제를 인코딩하는 RNA를 형질 감염시키는 것이 세포에 덜 독성일 것으로 여겨진다. 게다가, 뉴클레아제를 RNA로서 제공하는 것 또한 세포에 대한 독성을 감소시킬 수 있다.

[0083]

한 구체예에서, 부위-특이적 뉴클레아제를 인코딩하는 RNA는 Cas 뉴클레아제를 인코딩한다. 관련된 구체예에서, Cas 뉴클레아제는 Cas9이다. 추가의 구체예에서, 뉴클레아제는 cas9이며, 표적화 RNA는 가이드 RNA이다. 본원에 기술된 방법 및 조성물과 이용될 수 있는 서열-특이적 뉴클레아제 시스템의 또 다른 예는 Cas9/CRISPR 시스템을 포함한다 (Wiedenheft, B. et al. Nature 482, 331-338 (2012); Jinek, M. et al. Science 337, 816-821 (2012); Mali, P. et al. Science 339, 823-826 (2013); Cong, L. et al. Science 339, 819-823 (2013)). Cas9/CRISPR(Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeat: 클러스터링되고 주기적으로 간격을 두고 분포된 짧은 회문구조 반복부) 시스템은 표적 DNA의 RNA-안내된 DNA-결합 및 서열-특이

적 절단을 이용한다. 가이드 RNA/Cas9 조합은 뉴클레아제에 부위 특이성을 부여한다. 가이드 RNA(gRNA)는 게놈 PAM(프로토스페이서 인접 모티프) 부위(NNG)의 표적 게놈 DNA 서열 업스트림에 상보적인 약 20개 뉴클레오타이드 및 RNA 스캐폴드 불변 영역을 함유한다. Cas(CRISPR-관련된) 9 단백질은 gRNA 및 gRNA가 결합하는 표적 DNA에 결합하며, PAM 부위의 업스트림의 규정된 위치에서 이중-가닥 파괴를 도입한다. Cas9에는 HNH 및 RuvC 엔도뉴클레아제에 상동성인 2개의 독립적인 뉴클레아제 도메인이 내재되어 있으며, 두 도메인중 어느 하나를 돌연변이시키므로써, Cas9 단백질이 단일-가닥 파괴를 도입하는 니카제로 전환될 수 있다 (Cong, L. et al. Science 339, 819-823 (2013)). Cas9의 단일- 또는 이중-가닥-유도 버전은 물론 기타 RNA-가이드된 DNA 뉴클레아제 예컨대, 기타 박테리아 Cas9-유사 시스템을 사용한 본 발명의 방법 및 조성물이 이용될 수 있음이 특히 고려된다. 본원에 기재된 방법 및 조성물의 서열-특이적 뉴클레아제는 조작될 수 있거나, 키메라일 수 있거나 유기체로부터 분리될 수 있다. 서열-특이적 뉴클레아제는 서열-특이적 뉴클레아제를 인코딩하는 RNA 예컨대, mRNA 형태로 세포 내로 도입될 수 있다.

[0084] 일부 구체예에서, 부위=특이적 뉴클레아제는 *cpf1*, *casX* 또는 *casY*를 포함한다. 예시적인 CRISPR 효소 및 시스템은 본원에 참조로 통합된 US 20160208243에 기술되어 있다. 이러한 시스템은 본원에 기술된 바와 같은 게놈 DNA를 변형시키기 위해 현재 공개된 방법에 이용될 수 있음이 고려된다.

[0085] 한 구체예에서, 부위-특이적 뉴클레아제를 인코딩하는 RNA는 아연 핑거 뉴클레아제를 인코딩한다. 아연 핑거 뉴클레아제는 일반적으로, DNA 결합 도메인(즉, 아연 핑거) 및 절단 도메인(즉, 뉴클레아제)를 포함한다. 아연 핑거 결합 도메인은 선택된 임의의 핵산 서열을 인식하고 결합하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 하기 문헌 [Beerli et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nat. Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; Zhang et al. (2000) J. Biol. Chem. 275(43):33850-33860; Doyon et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26:702-708; and Santiago et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:5809-5814] 참조. 조작된 아연 핑거 결합 도메인은 자연-발생 아연 핑거 단백질과 비교하여 신규한 결합 특이성을 가질 수 있다. 조작 방법은 비제한적으로, 합리적인 설계 및 다양한 선택 유형을 포함한다. 합리적인 설계는 예를 들어, 이중, 삼중 및/또는 사중 뉴클레오타이드 서열 및 개별적인 아연 핑거 아미노산 서열을 포함하는 데이터베이스를 사용하는 것을 포함하며, 여기에서 각 이중, 삼중 또는 사중 뉴클레오타이드 서열은 특정 삼중 또는 사중 서열에 결합하는 아연 핑거의 하나 이상의 아미노산 서열과 관련된다. 예를 들어, 그 전체 기재내용이 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,453,242 및 6,534,261 참조. 예로서, 미국 특허 6,453,242에 기술된 알고리즘이 사전 선택된 서열을 표적으로 하기 위해 아연 핑거 결합 도메인을 설계하는데 이용될 수 있다.

[0086] 대안적 방법 예컨대, 정상적인 인식 코드표를 사용한 합리적인 설계가 또한 특이적 서열을 표적으로 하기 위해 아연 핑거 결합 도메인을 설계하는데 이용될 수 있다(Sera et al. (2002) Biochemistry 41 :7074-7081). DNA 서열에서 가능한 표적 부위를 확인하고 아연 핑거 결합 도메인을 설계하기 위한 공개적으로 입수가능한 웹-기반 도구는 각각 <http://www.zincfingertools.org> 및 <http://bindr.gdcb.iastate.edu/ZiFiT/>에서 찾아볼 수 있다 (Mandell et al. (2006) Nuc. Acid Res. 34:W516-W523; Sander et al. (2007) Nuc. Acid Res. 35:W599-W605).

[0087] 아연 핑거 결합 도메인은 약 3개 뉴클레오타이드 내지 약 21개 뉴클레오타이드 길이, 또는 바람직하게는, 약 9개 내지 약 18개 뉴클레오타이드 길이 범위의 DNA 서열을 인식하고 결합하도록 설계될 수 있다. 일반적으로, 아연 핑거 결합 도메인은 적어도 3개의 아연 핑거 인식 영역(즉, 아연 핑거)을 포함한다. 한 구체예에서, 아연 핑거 결합 도메인은 4개의 아연 핑거 인식 영역을 포함할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 아연 핑거 결합 도메인은 5개의 아연 핑거 인식 영역을 포함할 수 있다. 여전히 또 다른 구체예에서, 아연 핑거 결합 도메인은 6개의 아연 핑거 인식 영역을 포함할 수 있다. 아연 핑거 결합 도메인은 임의의 적당한 표적 DNA 서열에 결합하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 그 기재내용 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,607,882; 6,534,261 및 6,453,242 참조.

[0088] 아연 핑거 인식 영역을 선택하는 예시적인 방법은 파지 디스플레이 및 2-하이브리드 시스템을 포함할 수 있으며, 각각 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759; 및 6,242,568; 뿐만 아니라 WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 및 GB 2,338,237에 기재되어 있다. 또한, 아연 핑거 도메인 결합에 대한 결합 특이성의 향상은 예를 들어, WO 02/077227에 기술되어 있다.

- [0089] 아연 핑거 결합 도메인 및 융합 단백질 (및 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드)의 설계 및 작제를 위한 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 그 전체가 본원에 참조로 각각 통합된 미국 특허 출원 공개 번호 20050064474 및 20060188987에 기술된다. 아연 핑거 인식 영역 및/또는 다중-핑거화된 아연 핑거 단백질이 예를 들어, 5개 이상의 아미노산 길이의 링커를 포함하는 적합한 링커 서열을 사용하여 함께 연결될 수 있다. 6개 이상의 아미노산 길이의 링커 서열의 비제한적 예에 있어서는 본원에 그 기재내용 전체가 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,479,626; 6,903,185; 및 7,153,949를 참조하시오. 본원에 기술된 아연 핑거 결합 도메인은 단백질의 개별 아연 핑거 사이의 적합한 링커들의 조합을 포함할 수 있다.
- [0090] 일부 구체예에서, 아연 핑거 뉴클레아제는 핵 위치 신호 또는 서열 (NLS)을 추가로 포함할 수 있다. NLS는 핵으로의 아연 핑거 뉴클레아제 단백질을 표적화시키는 것을 촉진하여 크로모솜의 표적 서열에 이중 가닥 파괴를 도입하는 아미노산 서열이다. 핵 위치 신호는 당해 기술에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Makkerh et al. (1996) *Current Biology* 6:1025-1027] 참조.
- [0091] 아연 핑거 뉴클레아제는 또한 절단 도메인을 포함한다. 아연 핑거 뉴클레아제의 절단 도메인 부분은 임의의 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로부터 수득될 수 있다. 절단 도메인이 유래될 수 있는 엔도뉴클레아제의 비제한적 예는 제한 엔도뉴클레아제 및 호밍 엔도뉴클레아제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌 [2002-2003 Catalog, New England Biolabs, Beverly, Mass.; and Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388 or www.neb.com] 참조. DNA를 절단하는 추가적인 효소가 공지되어 있다(예를 들어, S1 뉴클레아제; 녹두 뉴클레아제; 췌장 DN아제 I; 마이크로코컬 뉴클레아제; 효모 HO 엔도뉴클레아제). 또한, 문헌 [Linn et al. (eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993] 참조. 이들 효소 (또는 이의 작용성 단편) 중 하나 이상이 절단 도메인의 공급원으로서 사용될 수 있다.
- [0092] 절단 도메인은 또한, 절단 활성을 위한 다이머화를 필요로 하는 상기 기술된 바와 같은 효소 또는 이의 일부로부터 유도될 수 있다. 2개의 아연 핑거 뉴클레아제가 절단에 필요할 수 있는데, 각 뉴클레아제는 활성 효소 다이머의 모노머를 포함하기 때문이다. 대안적으로, 단일 아연 핑거 뉴클레아제가 두 모노머 모두를 포함하여 활성 효소 다이머를 생성할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이 "활성 효소 다이머"는 핵산 분자를 절단할 수 있는 효소 다이머이다. 2개의 절단 모노머는 동일한 엔도뉴클레아제 (또는 이의 작용성 단편)으로부터 유래될 수 있거나, 각 모노머는 상이한 엔도뉴클레아제 (또는 이의 작용성 단편)으로부터 유래될 수 있다.
- [0093] 2개의 절단 모노머가 활성 효소 다이머를 형성하는데 사용되는 경우, 2개의 아연 핑거 뉴클레아제에 대한 인식 부위는, 바람직하게는, 2개의 아연 핑거 뉴클레아제의 이들의 각 인식 부위로의 결합이 절단 모노머를 서로에 대한 공간 배향으로 위치시키도록 배치되어 절단 모노머가 예를 들어, 다이머화에 의해 활성 효소 다이머를 형성하게 한다. 그 결과, 인식 부위의 근처 가장자리는 약 5 내지 약 18개 뉴클레오티드로 분리될 수 있다. 예를 들어, 근처의 가장자리는 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개 뉴클레오티드에 의해 분리될 수 있다. 그러나, 임의의 정수개의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 쌍이 두 인식 부위(예를 들어, 약 2 내지 약 50개 또는 그 초과 뉴클레오티드 쌍) 사이에 개입될 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 본원에 상세히 기술된 것과 같은 아연 핑거 뉴클레아제의 인식 부위의 근처 가장자리는 6개 뉴클레오티드에 의해 분리될 수 있다. 일반적으로, 절단 부위는 인식 부위 사이에 위치한다.
- [0094] 제한 엔도뉴클레아제(제한 효소)는 많은 중에 존재하며, (인식 부위에서) DNA에 서열-특이적 결합하여 결합 부위에서 또는 결합 부위 근처에서 DNA를 절단할 수 있다. 특정 제한 효소(예를 들어, 타입 IIS)는 인식 부위로부터 제거된 부위에서 DNA를 절단하며 분리가능한 결합 및 절단 도메인을 갖는다. 예를 들어, 타입 IIS 효소 FokI는 한 가닥의 이의 인식 부위로부터 9개 뉴클레오티드 및 또 다른 가닥의 이의 인식 부위로부터 13개 뉴클레오티드에서 DNA의 이중-가닥 절단을 촉매한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5356802; 5,436,150 및 5,487,994; 뿐만 아니라 문헌 [Li et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim et al. (1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31, 978-31, 982] 참조. 따라서, 아연 핑거 뉴클레아제는 적어도 하나의 타입 IIS 제한 효소로부터의 절단 도메인 및 하나 이상의 아연 핑거 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 이는 조작될 수 있거나 없다. 예시적인 타입 IIS 제한 효소는 예를 들어, 그 기재내용 전체가 본원에 참조로서 통합된 국제 공개 WO 07/014,275에 기술되어 있다. 추가적인 제한 효소는 또한 분리가능한 결합 및 절단 도메인을 함유하며, 또한 본 기재내용에 의해 고려된다. 예를 들어, 문헌 [Roberts et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31 :418-420] 참조.
- [0095] 또 다른 구체예에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 메가뉴클레아제일 수 있다. 메가뉴클레아제는 큰 인식 부위를

특징으로 하는 엔도데옥시리보뉴클레아제이며 즉, 인식 부위는 일반적으로 약 12개 염기쌍 내지 약 40개 염기쌍의 범위이다. 이러한 요구의 결과로서, 인식 부위는 일반적으로 임의의 주어진 게놈에서 단지 1회 발생한다. 자연-발생 메가뉴클레아제는 15-40개 염기-쌍 절단 부위를 인식하며, 보통 4개의 패밀리로 그룹화된다: LAGLIDADG 패밀리, GIY-YIG 패밀리, His-Cyst 박스 패밀리 및 HNH 패밀리. 메가뉴클레아제는 당업자에게 널리 공지된 기법을 사용하여 이들의 인식 서열을 변형시킴으로써 특이적 크로모솜 서열에 표적화될 수 있다.

[0096] 추가의 구체예에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 전사 활성인자-유사 이펙터(TALE) 뉴클레아제일 수 있다. TALE는 신규한 DNA 표적에 결합하도록 용이하게 조작될 수 있는 식물 병원체 크산토모나스로부터의 전사 인자이다. TALE 또는 이의 절두된 버전은 FokI과 같은 엔도뉴클레아제의 촉매 도메인에 연결되어 TALE 뉴클레아제 또는 TALEN으로 불리는 표적화 엔도뉴클레아제를 발생시킬 수 있다.

[0097] 여전히 또 다른 구체예에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 부위-특이적 뉴클레아제일 수 있다. 특히, 부위-특이적 뉴클레아제는 "회귀-커터" 엔도뉴클레아제일 수 있으며, 이의 인식 서열은 게놈에서 거의 발생하지 않는다. 바람직하게는, 부위-특이적 뉴클레아제의 인식 서열은 게놈에서 단지 한번 발생한다.

[0098] 여전히 또 다른 구체예에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 인공 표적 DNA 이중 가닥 파괴 유도제(또한 소위 인공 제한 DNA 커터로 불림)일 수 있다. 예를 들어, 인공 표적화된 DNA 이중 가닥 파괴 유도제는 표적화된 절단 부위에 상보적인 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드 및 DNA를 절단하는 금속/킬레이트 착물을 포함할 수 있다. 따라서, 인공 표적 DNA 이중 가닥 파괴 유도제는 어떠한 단백질도 함유하지 않는다. 금속/킬레이트 착물의 금속은 세륨, 카드뮴, 코발트, 크롬, 구리, 철, 마그네슘, 망간, 아연 및 기타 등등일 수 있다. 금속/킬레이트 착물의 킬레이트는 EDTA, EGTA, BAPTA, 및 기타 등등일 수 있다. 바람직한 구체예에서, 금속/킬레이트 착물은 Ce(IV)/EDTA일 수 있다. 다른 바람직한 구체예에서, 인공 표적 DNA 이중 가닥 파괴 유도제는 Ce(IV)/EGTA의 착물 및 슈도-상보적 펩티드 핵산(PNA)의 2 가닥을 포함할 수 있다(Katada et al., Current Gene Therapy, 2011, 11 (1):38-45).

[0099] 추가의 구체예에서, 뉴클레아제는 호밍 뉴클레아제일 수 있다. 호밍 엔도뉴클레아제는 1-5'cel, 1-CeuI, 1-PspI, VI-Sce, 1-SceIV, I-CsmI, 1-PanI, 1-SceII, 1-PpoI, 1-SceIII, 1-CreI, 1-TevI, 1-Tev 및 I-7evIII를 포함한다. 이들의 인식 서열은 공지되어 있다. 또한, 미국 특허 번호 5,420,032; 미국 특허 번호 6,833,252; 문헌 [Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Ouyon et al. (1989) Gene 82: 115-118; Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125- 1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263: 163-180; Argast et al. (1998) J Mol. Biol. 280:345-353 and the New England Biolabs catalogue] 참조.

[0100] 특정 구체예에서, 뉴클레아제는 조작된 (비-천연 발생) 호밍 엔도뉴클레아제(메가뉴클레아제)를 포함한다. 호밍 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제 예컨대, 1-SceI, 1-CeuI, VI- PspI, VI-Sce, 1-SceIN, 1-CsmI, 1-PanI, 1-SceII, 1-PpoI, 1-SceIII, 1-CreI, 1-TevI, 1-TevII 및 I-7evIII의 인식 서열은 공지되어 있다. 또한, 미국 특허 번호 5,420,032; 미국 특허 번호 6,833,252; 문헌 [Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Dujon et al. (1989) Gene 82: 115-118; Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263: 163-180; Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353 and the New England Biolabs catalogue] 참조. 또한, 호밍 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 DNA-결합 특이성은 비-천연 표적 부위에 결합하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905; Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962; Ashworth et al. (2006) Nature 441:656-659; Paques et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66]; 미국 특허 공개 번호 20070117128 참조. 호밍 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 DNA-결합 도메인은 뉴클레아제에 있어서 (즉, 뉴클레아제가 동족 절단 도메인을 포함하도록) 전체 변경될 수 있거나 이종성 절단 도메인에 융합될 수 있다.

[0101] 한 구체예에서, DNA 분해제는 오메가, 아연 핑거, TALE 및 CRISPR/Cas9로 구성된 군으로부터 선택되거나 이들 군의 부위-특이적 뉴클레아제이다.

[0102] D. 마커

[0103] 본 발명의 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물로 형질감염된 세포 또는 게놈 DNA 서열 변형을 함유하는 세포는 조성물에 마커를 포함시킴으로써 시험관내 또는 생체내에서 확인될 수 있다. 이러한 마커는 세포에 식별가능한 변형을 부여하여 조성물로 형질감염된 세포의 용이한 식별을 허용할 것이다. 일반적으로, 선택가능한 마커는

선택을 허용하는 특성을 부여하는 것이다. 양성 선택가능 마커는 마커의 존재가 이의 선택을 허용하는 것인 반면, 음성 선택가능 마커는 이의 존재가 이의 선택을 방지하는 것이다. 양성 선택가능 마커의 예는 약물 내성 마커 또는 항생제 내성 유전자/마커이다.

[0104] 일반적으로, 형질전환주 예를 들어, 네오마이신, 퓨로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신, G418, 플레오마이신, 블라스티시딘 및 히스티디놀이 대한 내성을 부여하는 유전자의 클로닝 및 식별에서 약물 선택 마커 보조제의 포함은 유용한 선택가능 마커이다. 조건의 구현을 기반으로 하는 형질전환주의 구별을 허용하는 표현형을 부여하는 마커 이외에, 기본이 비색 분석인 GFP와 같은 스크리닝가능한 마커를 포함하는 다른 유형의 마커가 또한 고려된다. 대안적으로, 스크리닝가능한 효소 예컨대, 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(*tk*) 또는 클로르암페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT)가 사용될 수 있다. 당업자는 또한 가능하게는 FACS 분석과 함께 면역학적 마커를 어떻게 사용하는지 알고 있을 것이다. 선택가능하고 스크리닝 가능한 마커의 추가의 예는 당업자에게 널리 공지되어 있다. 특정 구체예에서, 마커는 형광 마커, 효소 마커, 발광 마커, 광활성 마커, 광변환 마커, 또는 비색 마커이다. 형광 마커는 예를 들어, GFP 및 변이체 예컨대, YFP, RFP 등등, 및 기타 형광 단백질 예컨대, DsRed, mPlum, mCherry, YPet, Emerald, CyPet, T-Sapphire, 및 Venus를 포함한다. 광활성 마커는 예를 들어, KFP, PA-mRFP, 및 Dronpa를 포함한다. 광변환 마커는 예를 들어, mEosFP, KikGR, 및 PS-CFP2를 포함한다. 발광 단백질은 예를 들어, Neptune, FP595, 및 피알리딘을 포함한다.

[0105] 본 발명에 사용된 마커는 RNA 또는 DNA로 인코딩될 수 있다. 특정 구체예에서, 마커는 RNA로 인코딩된다.

[0106] 특정 양태에서, 전기천공 후, 전기천공된 조성물이 내부화된 세포는 음성 선택에 의해 선택된다. 또 다른 양태에서, 전기천공 후, 전기천공된 작제물이 내부화된 세포는 양성 선택에 의해 선택된다. 일부 양태에서, 선택은 전기천공 동안 선택 내성 유전자를 흡수하거나 선택 내성 유전자를 발현하지 않는 세포의 생존력을 절충시키는 농도의 선택 제제에 세포를 노출시키는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 선택은 조건부로 치사시키는 농도의 선택 제제에 세포를 노출시키는 것을 포함한다. 특정 양태에서, 선택 제제 또는 선택 화합물은 항생제이다. 기타 양태에서, 선택 제제는 단독의 또는 조합된 G418 (또한, 제네티신 및 G418 설페이트로서 공지됨), 퓨로마이신, 제오신, 하이그로마이신, 플레오마이신 또는 블라스티시딘이다. 특정 양태에서, 선택 제제의 농도는 0.1 μ g/L 내지 0.5 μ g/L, 0.5 μ g/L 내지 1 μ g/L, 1 μ g/L 내지 2 μ g/L, 2 μ g/L 내지 5 μ g/L, 5 μ g/L 내지 10 μ g/L, 10 μ g/L 내지 100 μ g/L, 100 μ g/L 내지 500 μ g/L, 0.1mg/L 내지 0.5mg/L, 0.5mg/L 내지 1mg/L, 1mg/L 내지 2mg/L, 2mg/L 내지 5mg/L, 5mg/L 내지 10mg/L, 10mg/L 내지 100mg/L, 100mg/L 내지 500mg/L, 0.1g/L 내지 0.5g/L, 0.5g/L 내지 1g/L, 1g/L 내지 2g/L, 2g/L 내지 5g/L, 5g/L 내지 10g/L, 10g/L 내지 100g/L, 또는 100g/L 내지 500g/L의 범위 또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위이다. 특정 양태에서, 선택 제제의 농도는 (y)g/L이며, 여기에서 'y'는 비제한적으로, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위를 포함하는 임의의 값일 수 있다. 일부 구체예에서, 선택 제제는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 또는 10 g/L 또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위의 조건부 치사 농도로 배양 배지에 존재한다.

[0107] 특정 구체예에서, 코딩 서열 자체의 길이에 상관없이 핵산 세그먼트는 다른 핵산 서열 예컨대, 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 추가적인 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 기타 코딩 세그먼트, 및 기타 등등과 조합될 수 있어, 이들의 전체 길이는 상당히 변화될 수 있다.

[0108] E. 벡터

[0109] 폴리펩티드는 조성물 중의 핵산 분자에 의해 인코딩될 수 있다. 특정 구체예에서, 핵산 분자는 핵산 벡터 형태일 수 있다. 용어 "벡터"는 담체 핵산 분자를 지칭하는데 사용되는데, 이중성 핵산 서열이 복제되고 발현될 수 있는 세포로의 도입을 위해 이중성 핵산 서열이 이러한 담체 핵산 분자 내로 삽입될 수 있다. 핵산 서열은 "이중성"일 수 있으며, 이는 벡터가 도입될 세포에 또는 혼입될 핵산에 이중인 상보성을 의미하며, 이는 세포 또는 핵산의 서열에 상동성인 서열을 포함하나 정상적으로는 발견되지 않는 핵산 또는 숙주 세포 내부의 위치에서 포함한다. 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 코스미드, 바이러스(박테리오파지, 동물 바이러스 및 식물 바이러스), 및 인공 크로모좀(예를 들어, YAC)을 포함한다. 당업자는 표준 재조합 기법을 통해 벡터를 작제할 실력이 갖춰

져 있을 것이다(예를 들어, 둘 모두 참조로서 본원에 통합된 문헌 [Sambrook et al., 2001; Ausubel et al., 1996]). 벡터는 항체를 생성하기 위해 숙주 세포에 이용될 수 있다.

- [0110] 용어 "발현 벡터"는 숙주 세포 계능으로 전사되거나 안정하게 통합되고 후속하여 전사될 수 있는 유전자 생성물의 적어도 일부를 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 벡터를 지칭한다. 일부 경우에, RNA 분자는 이어서 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드로 번역된다. 발현 벡터는 다양한 "조정 서열"을 함유할 수 있으며, 이는 특정 숙주 유기체에서 작동적으로 연결된 코딩 서열의 전사 및 가능하게는 번역에 필요한 핵산 서열을 지칭한다. 전사 및 번역을 지배하는 조정 서열 이외에, 벡터 및 발현 벡터는 또한 다른 기능을 제공하는 핵산 서열을 함유할 수 있으며, 본원에 기술되어 있다. 마커를 발현하는 발현 벡터가 본 발명에 유용할 수 있음이 고려된다. 기타 구체예에서, 마커는 mRNA로 인코딩되며 발현 벡터에는 존재하지 않는다.
- [0111] "프로모터"는 조정 서열이다. 프로모터는 전형적으로, 전사의 개시 및 비율이 조정되는 핵산 서열의 영역이다. 이는 RNA 폴리머라제 및 기타 전사 인자와 같은 조절 단백질 및 분자가 결합할 수 있는 유전자 요소를 함유할 수 있다. 문구 "작동적으로 위치한", "작동적으로 연결된", "조정 하의" 및 "전사 조정 하의"는 프로모터가 핵산 서열과 관련하여 올바른 작용 위치 및/또는 방향으로 존재하여 그러한 서열의 전사 개시 및 발현을 조정함을 의미한다. 프로모터는 핵산 서열의 전사 활성화와 관련된 시스-작용 조절 서열을 지칭하는 "인핸서"와 함께 이용될 수 있거나 없다.
- [0112] 펩티드 또는 단백질 인코딩 폴리펩티드의 발현을 조정하는데 사용되는 특정 프로모터는 표적화된 세포 바람직하게는, 박테리아 세포에서 폴리뉴클레오티드를 발현할 수 있는 한 중요한 것으로서 간주되지 않는다. 인간 세포를 표적으로 하는 경우, 인간 세포에서 발현될 수 있는 프로모터의 조정 하에 그리고 이러한 프로모터에 인접하게 폴리뉴클레오티드 코딩 영역을 위치시키는 것이 바람직하다. 일반적으로 말해서, 이러한 프로모터는 박테리아, 인간 또는 바이러스 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0113] 특이적 개시 신호는 또한, 코딩 서열의 효과적인 번역에 필요할 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 또는 인접한 서열을 포함한다. ATG 개시 코돈을 포함하는 외인성 번역 조정 신호가 제공되어야 할 수 있다. 당업자는 용이하게 필요한 신호를 결정하고 제공할 수 있을 것이다.
- [0114] 벡터는 다중의 제한 효소 부위를 함유하는 핵산 영역인 다중 클로닝 부위 (MCS)를 포함할 수 있으며, 다중 제한 효소 부위 중 일부는 벡터를 분해하기 위해 표준 재조합 기법과 함께 이용될 수 있다 (참조로서 본원에 통합된 문헌 [Carbonelli et al., 1999, Levenson et al., 1998, and Cocea, 1997] 참조).
- [0115] 대부분의 전사된 진핵생물 RNA 분자는 RNA 스플라이싱되어 일차 전사체로부터 인트론을 제거할 것이다. 계능 진핵생물 서열을 함유하는 벡터는 단백질 발현의 전사의 적절한 프로세싱을 보장하기 위해 도너 및/또는 어셉터 스플라이싱 부위를 필요로 할 수 있다(본원에 참조로서 통합된 문헌 [Chandler et al., 1997] 참조).
- [0116] 벡터 또는 작제물은 적어도 하나의 말단 신호를 일반적으로 포함할 것이다. "종료 신호" 또는 "종결화제"는 RNA 중합효소에 의한 RNA 전사체의 특정 종결화에 관련된 DNA 서열로 구성된다. 따라서, 특정 구체예에서, RNA 전사체의 생성을 종료하는 종료 신호가 고려된다. 종결화제는 바람직한 메시지 수준을 달성하기 위해 생체내에서 필요할 수 있다. 진핵생물 시스템에서, 종결화제 영역은 또한, 폴리아데닐화 부위를 노출하도록 새로운 전사체의 부위-특이적 절단을 허용하는 특이적 DNA 서열을 포함할 수 있다. 이는 특정화된 내인성 중합효소에 신호를 보내 전사체의 3' 말단에 약 200개 A 잔기(폴리아)의 스트레치를 첨가한다. 이러한 폴리A 테일로 변형된 RNA 분자는 더욱 안정적인 것으로 보이며 더욱 효율적으로 번역된다. 따라서, 진핵 생물을 포함하는 기타 구체예에서, 종결화제가 RNA의 절단을 위한 신호를 포함하는 것이 바람직하며, 종결화제 신호가 폴리아데닐화 메시지를 촉진하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0117] 발현 특히, 진핵생물 발현에서, 전형적으로 폴리아데닐화 신호를 포함시켜 전사체의 적절한 폴리아데닐화를 수행할 것이다.
- [0118] 숙주 세포에서 벡터를 증식시키기 위해, 이는 복제 부위의 하나 이상의 오리진(종종 "ori"로 불림)을 함유할 수 있으며, 이는 복제가 개시되는 특정 핵산 서열이다. 대안적으로, 숙주 세포가 효모인 경우, 자가 복제 서열(ARS)이 사용될 수 있다.
- [0119] 일부 벡터는 벡터가 진핵생물 및 원핵생물 세포 둘 모두에서 복제되고/거나 발현되게 하는 조정 서열을 사용할 수 있다. 당업자는 상기 기술된 숙주 세포 모두를 인큐베이션하여 이들을 유지하고 벡터의 복제를 허용하는 조건을 추가로 이해할 것이다. 또한, 벡터의 대규모 생성을 허용하며, 뿐만 아니라 벡터 및 이들의 동족 폴리펩티드, 단백질 또는 펩티드에 의해 인코딩된 핵산의 생성을 허용하는 조건 및 기법이 또한 이해되고 공지되어 있

다.

[0120] 특정 구체예에서, 전기천공에 의해 세포 내로 형질감염된 조성물은 비-바이러스성이다(즉, 어떠한 바이러스 성분도 함유하지 않음). 비-바이러스 방법은 독성을 감소시키고/거나 방법의 안전성을 향상시킬 것으로 여겨진다. RNA로서 제공된 DNA 분해제 및 작은 DNA 올리고의 사용의 조합이 감소된 세포독성 및 게놈 DNA 서열 변형의 증가된 효율의 이점을 제공하는 것으로 여겨진다.

F. 핵산 변형

[0122] 본 기재내용의 문맥에서, 용어 "비변형된 올리고뉴클레오타이드"는 일반적으로 리보핵산(RNA) 또는 데옥시리보핵산(DNA)의 올리고머 또는 폴리머를 지칭한다. 일부 구체예에서, 핵산 분자는 비변형된 올리고뉴클레오타이드이다. 이러한 용어는 자연 발생 뉴클레오베이스, 당 및 뉴클레오시드간 공유 결합으로 구성된 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 용어 "올리고뉴클레오타이드 유사체"는 올리고뉴클레오타이드와 유사한 방식으로 작용하는 하나 이상의 비-자연 발생 부분을 갖는 올리고뉴클레오타이드를 지칭한다. 이러한 비-자연 발생 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, 향상된 세포 흡수, 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산 표적에 대한 향상된 친화성 및 뉴클레아제의 존재하에서의 증가된 안정성과 같은 바람직한 특성으로 인해 자연 발생 형태 대비 종종 선택된다. 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 비변형된 올리고뉴클레오타이드 또는 올리고뉴클레오타이드 유사체를 지칭하는데 사용될 수 있다.

[0123] 핵산 분자의 특정 예는 변형된 즉, 비-자연 발생 뉴클레오시드간 결합을 함유하는 핵산 분자를 포함한다. 이러한 비-자연적 뉴클레오시드간 결합은 예를 들어, 향상된 세포 흡수, 다른 올리고뉴클레오타이드 또는 핵산 표적에 대한 향상된 친화성 및 뉴클레아제의 존재하에서의 증가된 안정성과 같은 바람직한 특성으로 인해 자연 발생 형태에 비해 종종 선택된다. 특정 구체예에서, 변형은 메틸 기를 포함한다.

[0124] 핵산 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드간 결합을 가질 수 있다. 본 명세서에 규정된 바와 같이, 변형된 뉴클레오시드간 결합을 갖는 올리고뉴클레오타이드는 인 원자를 갖지 않는 뉴클레오시드간 결합 및 인 원자를 보유하는 뉴클레오시드간 결합을 포함한다. 본 명세서의 목적에 있어서, 그리고 당해 기술에 때때로 언급된 바와 같이, 이들의 뉴클레오시드간 백본에 인 원자를 갖지 않는 변형된 올리고뉴클레오타이드는 또한 올리고뉴클레오타이드인 것으로 간주될 수 있다.

[0125] 핵산 분자에 대한 변형은 하나 또는 둘 모두의 말단 뉴클레오타이드가 변형된 변형을 포함할 수 있다.

[0126] 하나의 적합한 인-함유 변형된 뉴클레오시드간 결합은 포스포로티오에이트 뉴클레오시드간 결합이다. 많은 다른 변형된 올리고뉴클레오타이드 백본(뉴클레오시드간 결합)은 당해분야에 공지되어 있으며 본 구체예의 내용상 유용할 수 있다.

[0127] 인-함유 뉴클레오시드간 결합의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 비제한적으로, 미국 특허 번호 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243, 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 5,625,050, 5,489,677, 및 5,602,240을 포함하며, 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다.

[0128] 백본에 인 원자를 포함하지 않는 변형된 올리고뉴클레오타이드 백본(뉴클레오시드간 결합)은 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오시드간 결합, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오시드간 결합, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 뉴클레오시드간 결합에 의해 형성되는 뉴클레오시드간 결합을 갖는다. 이들에는 아마이드 백본을 갖는 것들; 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 요소 부분을 갖는 것을 포함하는 기타의 것을 포함한다.

[0129] 상기 인-비함유 올리고뉴클레오타이드의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 비제한적으로, 미국 특허 번호 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 및 5,677,439를 포함하며, 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다.

[0130] 올리고머 화합물은 또한 올리고뉴클레오타이드 모방체를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드에 적용될 때 용어 모방체는 단지 푸라노스 고리만 또는 푸라노스 고리와 뉴클레오타이드간 결합 둘 모두가 신규한 그룹으로 대체되

는 올리고머 화합물을 포함하는 것으로 의도되며, 단지 푸라노스 고리의 예를 들어, 모르폴리노 고리로의 대체는 또한 당 대용물인 것으로 또한 당해 기술에 언급된다. 헤테로사이클릭 베이스 모이어티 또는 변형된 헤테로 사이클릭 베이스 모이어티는 적절한 표적 핵산과의 하이브리드화를 위해 유지된다.

- [0131] 올리고뉴클레오타이드 모방체는 올리고머 화합물 예컨대, 펩티드 핵산(PNA) 및 사이클로헥세닐 핵산(CeNA로서 공지됨, 문헌 [Wang *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 8595-8602] 참조)을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 모방체의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 비제한적으로, 미국 특허 번호 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262를 포함하며, 이의 각각은 참조로서 본원에 통합된다. 또 다른 부류의 올리고뉴클레오타이드 모방체는 포스포노모노에스테르 핵산으로서 언급되며, 백본에 인 기를 통합시킨다. 이러한 부류의 올리고뉴클레오타이드 모방체는 분자 생물학에 사용하기 위한 보조제로서 및 핵산 검출을 위한 프로브로서 유전자 발현 억제 영역 (안티센스 올리고뉴클레오타이드, 리보자임, 센스 올리고뉴클레오타이드 및 트리플렉스-형성 올리고뉴클레오타이드)에서 유용한 물리적 및 생물학적 및 약물학적 특성을 갖는 것으로 보고된다. 푸라노실 고리가 사이클로부틸 모이어티에 의해 대체된 또 다른 올리고뉴클레오타이드 모방체가 보고되었다.
- [0132] 핵산 분자는 또한 하나 이상의 변형되거나 치환된 당 모이어티를 함유할 수 있다. 염기 모이어티는 적절한 핵산 표적 화합물과의 하이브리드화를 위해 유지된다. 당 변형은 올리고머 화합물에 뉴클레아제 안정성, 결합 친화성 또는 일부 기타 유리한 생물학적 특성을 부여할 수 있다.
- [0133] 대표적인 변형된 당은 카르보시클릭 또는 비고리형(acyclic) 당, 2', 3' 또는 4' 위치 중 하나 이상에서 치환기를 갖는 당, 당의 하나 이상의 수소 원자 대신에 치환기를 갖는 당, 및 당에서 임의의 2개의 다른 원자 사이에 결합을 갖는 당을 포함한다. 많은 당 변형은 당해분야에 공지되어 있으며, 2' 위치에서 변형된 당 및 당의 임의의 2개 원자 사이의 브릿지를 갖는 당(당이 바이사이클릭이 됨)이 특히 본 구체예에 유용하다. 본 구체예에 유용한 당 변형의 예는 비제한적으로, 하기로부터 선택된 당 치환기를 포함하는 화합물을 포함한다: OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; 또는 O-알킬-O-알킬 (여기에서, 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환되거나 비치환된 C1 내지 C10 알킬 또는 C2 내지 C10 알케닐 및 알키닐일 수 있다). 특히 적합한 것은 다음과 같다: 2'-메톡시에톡시 (또한, 2'-O-메톡시에틸, 2'-MOE, 또는 2'-OCH₂CH₂OCH₃로서 공지됨), 2'-O-메틸 (2'-O--CH₃), 2'-플루오로 (2'-F), 또는 4' 탄소 원자를 2' 탄소 원자로 연결시키는 브릿지 기를 갖는 바이사이클릭 당 변형된 뉴클레오시드 (여기에서, 예시적인 브릿지 기는 -CH₂--O--, --(CH₂)₂--O-- 또는 --CH₂-N(R₃)--O를 포함하며, 여기서 R₃은 H 또는 C1-C12 알킬임).
- [0134] 뉴클레오타이드에 대한 매우 높은 결합 친화성 및 증가된 뉴클레아제 내성을 부여하는 한 변형은 2'-MOE 측쇄이다 (Baker *et al.*, J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). 2'-MOE 치환의 즉각적인 이점 중 하나는 결합 친화성의 향상이며, 이는 O-메틸, O-프로필, 및 O-아미노프로필과 같은 많은 유사한 2' 변형보다 더 크다. 2'-MOE 치환기를 갖는 올리고뉴클레오타이드는 또한 생체내 사용을 위한 유망한 특징을 갖는 유전자 발현의 안티센스 억제제인 것으로 입증되었다 (Martin, P., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 486-504; Altmann *et al.*, *Chimia*, 1996, 50, 168-176; Altmann *et al.*, *Biochem. Soc. Trans.*, 1996, 24, 630-637; and Altmann *et al.*, *Nucleosides Nucleotides*, 1997, 16, 917-926).
- [0135] 2'-당 치환기는 아라비노 (상) 위치 또는 리보 (하) 위치에 있을 수 있다. 한 2'-아라비노 변형은 2'-F이다. 유사한 변형이 또한 올리고머 화합물 상의 다른 위치 특히, 3' 말단 뉴클레오시드 상의 당의 3' 위치 또는 2'-5' 연결된 올리고뉴클레오타이드 및 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에서 이루어질 수 있다. 올리고머 화합물은 또한 펜토프라노실 당 대신에 사이클로부틸 모이어티와 같은 당 모방체를 가질 수 있다. 이러한 변형된 당 구조의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 비제한적으로, 미국 특허 번호 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; 및 5,700,920를 포함하며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로서 통합된다.
- [0136] 대표적인 당 치환기는 그 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,172,209 (제목 "Capped 2'-Oxyethoxy Oligonucleotides")에 기재되어 있다.
- [0137] 대표적인 사이클릭 당 치환기는 그 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,271,358 (제목 "RNA Targeted 2'-Oligomeric compounds that are Conformationally Preorganized")에 기재되어 있다.
- [0138] 대표적인 구아니디노 치환기는 그 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,593,466 (제목 "Functionalized Oligomers")에 기재되어 있다.

- [0139] 대표적인 아세트아미도 치환기는 그 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,147,200에 기재되어 있다.
- [0140] 핵산 분자는 또한 자연 발생 또는 합성의 비변형된 뉴클레오베이스와 구조적으로 구별가능한 그러나, 작용적으로 상호교환가능한 하나 이상의 뉴클레오베이스 (종종 당해기술에서 단순히 "염기"로 언급됨) 변형 또는 치환을 함유할 수 있다. 이러한 뉴클레오베이스 변형은 뉴클레아제 안정성, 결합 친화성 또는 일부 기타 유익한 생물학적 특성을 올리고며 화합물에 부여할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "비변형된" 또는 "천연" 뉴클레오베이스는 퓨린 염기 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘 염기 티민 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)을 포함한다. 헤테로사이클릭 염기 모이어티로서 본원에서 또한 언급된 변형된 뉴클레오베이스는 기타 합성 및 천연 뉴클레오베이스를 포함하며, 이의 많은 예 예컨대, 특히, 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 7-테아자구아닌 및 7-테아자아데닌을 포함한다.
- [0141] 헤테로사이클릭 염기 모이어티는 또한, 퓨린 또는 피리미딘 염기가 기타 헤테로사이클로 대체된 것들 예를 들어, 7-테아자-아데닌, 7-테아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈을 포함할 수 있다. 일부 뉴클레오베이스는 미국 특허 번호 3,687,808에 기재된 것들, 문헌 [The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990]에 기재된 것들, 문헌 [Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613]에 기재된 것들, 문헌 [Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993]에 기재된 것들을 포함한다. 이들 뉴클레오베이스 중 특정 뉴클레오베이스는 특히, 올리고머 화합물의 결합 친화성을 증가시키기에 유용하다. 이들은 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린을 포함하며, 2-아미노프로필아데닌, 5-피로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함한다.
- [0142] 핵산 분자에 대한 추가적인 변형은 참조로서 본원에 통합된 미국 특허 공개 2009/0221685에 기재되어 있다. 핵산 분자에 대한 추가적인 적합한 권주게이트가 또한 본원에 기술된다.
- [0143] **II. 세포 배양**
- [0144] **A. 숙주 세포**
- [0145] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호교환적으로 사용될 수 있다. 이들 용어 전부는 또한, 새로 분리된 세포 및 생체외의 배양되거나 활성화되거나 확장된 세포 둘 모두를 포함한다. 이들 용어 모두는 또한 임의의 및 모든 후속 세대인 이들의 후손을 포함한다. 모든 후손은 의도적인 또는 비의도적인 돌연변이로 인해 동일하지 않을 수 있음이 이해된다. 이중성 핵산 서열을 발현하는 상황에서, "숙주 세포"는 원핵생물 세포 또는 진핵생물 세포를 지칭하며, 이는 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 인코딩된 이중성 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질전환가능한 유기체를 포함한다. 숙주 세포는 벡터 또는 바이러스에 대한 수령체로서 사용될 수 있으며 사용되었다. 숙주 세포는 "형질감염" 또는 "형질전환"될 수 있으며, 이는 외인성 핵산 예컨대, 재조합 단백질-인코딩 서열이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. 형질전환된 세포는 일차 대상 세포 및 이의 후손을 포함한다.
- [0146] 특정 구체예에서, 전기천공은 임의의 원핵생물 또는 진핵생물 세포에서 수행될 수 있다. 일부 양태에서, 전기천공은 인간 세포의 전기천공을 포함한다. 기타 양태에서, 전기천공은 동물 세포의 전기천공을 포함한다. 특정 양태에서, 전기천공은 세포주 또는 하이브리드 세포 유형의 전기천공을 포함한다. 일부 양태에서, 전기천공되는 세포 또는 세포들은 암 세포, 종양 세포 또는 불멸화된 세포이다. 일부 경우에, 종양, 암, 불멸화된 세포 또는 세포주가 유도되며, 다른 경우에는 종양, 암, 불멸화된 세포 또는 세포주는 이들의 각 상태 또는 조건으로 자연적으로 유입된다. 특정 양태에서, 전기천공될 세포 또는 세포주는 A549, B-세포, B16, BHK-21, C2C12, C6, CaCo-2, CAP/, CAP-T, CHO, CHO2, CHO-DG44, CHO-K1, COS-1, Cos-7, CV-1, 수지상 세포, DLD-1, 배아 줄기 (ES) 세포 또는 유도체, H1299, HEK, 293, 293T, 293FT, Hep G2, 조혈 줄기 세포, HOS, Huh-7, 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포 또는 유도체, Jurkat, K562, L5278Y, LNCaP, MCF7, MDA-MB-231, MDCK, 중간엽 세포, Min-6, 난핵 세포, Neuro2a, NIH 3T3, NIH3T3L1, K562, NK-세포, NS0, Panc-1, PC12, PC-3, 말초혈 세포, 혈장 세포, 원발성 섬유모세포, RBL, Renca, RLE, SF21, SF9, SH-SY5Y, SK-MES-1, SK-N-SH, SL3, SW403, 자극 야기성 다능성 획득 (Stimulus-triggered Acquisition of Pluripotency (STAP)) 세포 또는 유도체성 SW403, T-세포, THP-1, 종양 세포, U2OS, U937, 말초혈 림프구, 확장된 T 세포, 조혈 줄기 세포, 또는 Vero 세포일 수 있다. 일부 구체예에서, 세포는 말초혈 림프구, 확장된 T 세포, 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 또는 일차 세포이다. 일부 구체

예에서, 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 말초혈 림프구이다.

[0147] 일부 구체예에서, 세포는 환자로부터 분리된 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 새롭게 분리된다. 일부 구체예에서, 세포는 정확히 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1일 또는 그 미만, 또는 정확히 24, 22, 20, 18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1시간 미만 또는 여기에 속하는 임의의 추론 가능한 범위 기간에서 형질감염된다. 일부 구체예에서, 분리된 세포는 전혀 냉동되지 않았다. 일부 구체예는, 분리된 세포는 시험관 내에서 전혀 계대되지 않았다. 일부 구체예에서, 분리된 세포는 정확히 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1회 미만 또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위의 횟수로 계대되었다. 용어 "계대된"은 이미 존재하는 세포로부터 많은 세포를 생성하기 위해 세포를 분열시키는 과정을 지칭하고자 한다. 계대는 세포를 분열시키고 소수를 각 새로운 용기로 옮기는 것을 포함한다. 부착 배양에 있어서, 세포는 먼저 분리되어야 하며, 일반적으로 트립신-EDTA의 혼합물로 수행된다. 이어서 소수의 분리된 세포는 새로운 배양물을 시딩하는데 사용될 수 있는 반면, 나머지는 버려진다. 또한, 배양된 세포의 양은 모든 세포를 새로운 플라스크에 분배함으로써 용이하게 확대될 수 있다.

[0148] 특정 구체예에서, 세포는 형질감염시키기 어려운 것으로 당업자에게 공지된 것이다. 이러한 세포는 당해기술에 공지되어 있으며, 예를 들어, 일차 세포, 곤충 세포, SF9 세포, Jurkat 세포, CHO 세포, 줄기 세포, 느리게 분열하는 세포, 및 비-분열 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 세포는 배세포 예컨대, 난세포 또는 정자세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 수정 배아이다. 일부 구체예에서, 세포는 인간 수정 배아이다.

[0149] 일부 구체예에서, 세포는 세포의 클론 집단의 확장을 가능하게 하는 제한 희석 방법으로 처리될 수 있다. 제한 희석 클로닝 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 이러한 방법은 예를 들어, 하이브리도마를 위해 기술되었으나 임의의 세포에 적용될 수 있다. 이러한 방법은 문헌 [Cloning hybridoma cells by limiting dilution, Journal of tissue culture methods, 1985, Volume 9, Issue 3, pp 175-177, by Joan C. Renner, Bruce L. Brown, and Roland M. Nardone]에 기술되어 있으며, 이는 본원에 참조로 통합된다.

[0150] 일부 구체예에서, 세포는 전기천공 전에 또는 전기천공 후에 배양된다. 기타 구체예에서, 세포는 전기천공 후 선택 단계 동안 배양된다. 여전히 기타 구체예에서, 세포는 유지 및 클론 선택 및 개시 확장 단계 동안 배양된다. 여전히 기타 구체예에서, 세포는 스크리닝 단계 동안 배양된다. 기타 구체예에서, 세포는 대규모 생산 단계 동안 배양된다. 현탁 및 점착 세포 배양 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 일부 구체예에서, 세포는 시중에서 입수가 가능한 세포-배양 용기 및 세포 배양 배지를 이용하여 현탁액에서 배양된다. 일부 구체예에서 사용될 수 있는 시중에서 입수가 가능한 배양 용기의 예는 ADME/TOX 플레이트(ADME/TOX Plate), 셀 챔버 슬라이드(Cell Chamber Slide) 및 커버슬립(Coverslip), 셀 카운팅 이큅먼트(Cell Counting Equipment), 셀 컬처 설페이스(Cell Culture Surfaces), 코닝 HYPERFlask 셀 컬처 베슬(Corning HYPERFlask Cell Culture Vessel), 코팅된 컬처웨어(Coated Cultureware), 날젠 크리오웨어(Nalgene Cryoware), 컬처 챔버(Culture Chamber), 컬처 디쉬(Culture Dish), 글래스 컬처 플라스크(Glass Culture Flask), 플라스틱 컬처 플라스크(Plastic Culture Flask), 3D 컬처 포맷(3D Culture Format), 컬처 멀티웰 플레이트(Culture Multiwell Plate), 컬처 플레이트 인서트(Culture Plate Insert), 글래스 컬처 튜브(Glass Culture Tube), 플라스틱 컬처 튜브(Plastic Culture Tube), 스택러블 셀 컬처 베슬(Stackable Cell Culture Vessel), 하이폭식 컬처 챔버(Hypoxic Culture Chamber), 페트리 디쉬(Petri dish) 및 플라스크 캐리어, 퀵핏 컬처 베슬(Quickfit culture vessel), 롤러 보틀(Roller Bottle)을 사용한 스케일-업 셀 컬처(Scale-Up Cell Culture), 스피너 플라스크(Spinner Flask), 3D 셀 컬처(3D Cell Culture), 또는 세포 배양 백을 포함한다.

[0151] 기타 구체예에서, 배지는 당업자에게 널리 공지된 구성요소를 사용하여 포물레이션될 수 있다. 세포를 배양하기 위한 포물레이션 및 방법은 하기 참고문헌에 상세히 기술되어 있다: Short Protocols in Cell Biology J. Bonifacino, et al., ed., John Wiley & Sons, 2003, 826 pp; Live Cell Imaging: A Laboratory Manual D. Spector & R. Goldman, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, 450 pp.; Stem Cells Handbook S. Sell, ed., Humana Press, 2003, 528 pp.; Animal Cell Culture: Essential Methods, John M. Davis, John Wiley & Sons, Mar 16, 2011; Basic Cell Culture Protocols, Cheryl D. Helgason, Cindy Miller, Humana Press, 2005; Human Cell Culture Protocols, Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 806, Mitry, Ragai R.; Hughes, Robin D. (Eds.), 3rd ed. 2012, XIV, 435 p. 89, Humana Press; Cancer Cell Culture: Method and Protocols, Cheryl D. Helgason, Cindy Miller, Humana Press, 2005; Human Cell Culture Protocols, Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 806, Mitry, Ragai R.; Hughes, Robin D. (Eds.), 3rd ed. 2012, XIV, 435 p. 89, Humana Press; Cancer Cell Culture: Method and Protocols, Simon P. Langdon, Springer, 2004; Molecular Cell Biology. 4th edition., Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al.,

New York: W. H. Freeman; 2000., Section 6.2Growth of Animal Cells in Culture (이들 모두는 참조로서 본원에 통합됨).

[0152] 일부 구체예에서, 스크리닝 및 확장 단계 동안 및/또는 대규모 생산 단계 (또한, 유가 배양 & 비교로서 언급됨) 동안, 선택 또는 스크리닝으로부터 발생하는 확장된 전기전공 세포는 변형된 게놈 DNA 서열을 포함할 수 있다.

[0153] III. 치료학적 및 약물 발견 적용

[0154] 특정 구체예에서, 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 세포 및 세포주는 게놈 DNA의 변형시, 치료학적 효과를 제공하는 것이다. 일차 세포는 분리되고, 본원에 기술된 방법에 의해 변형될 수 있으며 처리될 대상체로의 재도입을 위해 생체 외에서 사용될 수 있다. 적합한 일차 세포는 말초혈 단핵 세포(PBMC), 말초혈 림프구 (PBL) 및 기타 혈액 세포 서브셋 예컨대, 비제한적으로, CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포를 포함한다. 기타 적합한 일차 세포는 조상 세포 예컨대, 골수 또는 림프 조상 세포를 포함한다. 적합한 세포는 또한 줄기 세포 예컨대, 예로서 배아 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 신경 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 근육 줄기 세포 및 피부 줄기 세포를 포함한다. 예를 들어, iPSC는 관련된 공지된 유전자 돌연변이로 고통받는 환자로부터 생체외에서 유도될 수 있으며, 이러한 돌연변이는 본원에 기술된 방법을 이용하여 야생형 대립유전자로 변형될 수 있다. 변형된 iPSC는 이어서 도파민 뉴런으로 분화될 수 있으며 환자로 재이식될 수 있다. 또 다른 생체의 치료학적 적용에서, 조혈 줄기 세포는 공지된 유전자 돌연변이에 의해 고통받는 환자로부터 분리될 수 있으며, 이는 이어서 유전자 돌연변이를 보정하도록 변형될 수 있다. 이어서, HSC는 치료학적 효과를 위해 환자로 다시 투여될 수 있거나 환자로의 투여 전에 더욱 성숙한 조혈 세포로 배양물에서 분화될 수 있다.

[0155] 일부 구체예에서, 변형된 게놈 DNA 서열은 질환-관련 유전자를 포함한다. 질환-관련 유전자는 당해기술에 공지되어 있다. 질환 관련 유전자는 genecards.org/cgi-bin/listdiseasecards.pl?type=full&no_limit=1의 월드 와이드 웹에 기재된 것이 고려된다. 유전자의 완전한 목록은 물론 이들의 관련 질환은 그 전체가 본원에 참조로서 통합된다.

[0156] 일부 구체예에서, 본 방법은 조혈 줄기 세포(a.k.a. 혈구모세포) 또는 골수 조상 세포에서 게놈 DNA를 변형시키는 것을 포함한다.

[0157] 일부 구체예에서, 본 방법은 조혈 줄기 세포(a.k.a. 혈구모세포) 또는 골수 조상 세포에서 *HBB* 유전자 게놈 DNA 서열을 변형시키는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 서열은 게놈 서열에서 질환-관련 돌연변이를 보정하도록 변형된다. 예를 들어, 낫적혈구 빈혈을 갖는 대상체의 게놈 서열은 E6V 돌연변이를 보정하도록 변형될 수 있다. 따라서, 본원에 기술된 방법은 글루탐산 대신에 6번째 위치에서 발린을 갖는 β -글로빈 단백질을 생성하는 게놈 돌연변이를 내포하고 있는 대상체로부터 세포의 게놈 서열을 보정하는데 이용될 수 있다. 따라서, 일 구체예에서, 서열 변형은 *HBB* 유전자의 6번째 코돈을 글루탐산 코돈으로 변형시키는 게놈 DNA의 보정이다.

[0158] *HBB* 유전자에 대한 단백질 코딩 서열은 하기 서열로 예시된다: MVHLTPEEKSAVTALWGKVNVDEVGGEALGRLLVVYPWTQRFFESFGDLSTPDAVMGNPKVKAHGKKVLGAFSDGLAHLNLTGKTFATLSSELHCDKLHVDPE NFRLLGNVLVCVLAHHFGKEFTTPVQAAVQKVVAGVANALAHKYH (SEQ ID NO:26). 밀줄친 글루탐산은 단백질의 6번째 위치에서의 아미노산을 나타낸다. DNA 수준에서, 게놈 DNA는 GAG의 GTG로의 돌연변이를 포함하며, 이는 E6V 변이 단백질을 유도한다.

[0159] 일부 구체예에서, 본 방법은 세포에서 gp91phox 유전자를 변형시키는 것을 포함한다. 일부 구체예에서, 세포는 환자로부터의 자가 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 구체예에서, 본 방법은 만성 육아종병 (CGD)을 치료하기 위한 것이다.

[0160] gp91phox 유전자에 대한 단백질 코딩 서열은 하기 서열에 의해 예시된다: mgnwavnegl sifvilvwlg lnvflfvwyy rvydippkff ytrklglsal alarapaacI nfncllilp vcrnllsflr gssaccstrv rrqldrnltf hkmvawmial hsaihtiahI fnvewcvnar vnnsdpysva lselgdrqne sylnfarkri knpegglyla vtllagitgv vitlclilii tsstktirrs yfevfwythh lfviffigla ihgaerivrg qtaeslavhn itvceqkise wgkikecpip qfagnppmtw kwivgpmfly lcerlvrfwr sqqkvvitkv vthpfktiel qmkkkgfkme vgqyifvkcp kvsklewhpf tltsapeedf fsihirivgd wteglfnacg cdqeqfdaw klpkiavdgp fgtasedvfs yevvmlvgag igvtpfasil ksvwykycnn atnlklkkyi fywlcdrtha fewfadllql lesqmgermn agflsnyil tgwdesqanh favhhddekd vitglkqktl ygrpnwdnef ktiasqhpnt rigvflcgpe alaetlskqs isnsesgprg vhfifnkenf (SEQ ID NO:27).

[0161] 일부 구체예에서, 본 방법은 엑손 7의 위치 676C에서 T로 gp91phox 유전자의 뉴클레오티드 서열을 보정한다. gp91phox의 아미노산 부위 226번에서 뉴클레오티드 "T"에서 "C"로의 보정은 정지 코돈으로부터 올바른 Arg로 부

위를 복원한다. 따라서, 일 구체예에서, 서열 변형은 gp91phox 유전자의 226번째 코돈을 Arg 코돈으로 변형하는 게놈 DNA의 보정이다.

[0162] 특정 양태에서, 본원에 기술된 방법은 생체의 요법을 위한 개선된 방법에 관한 것이다. 세포의 집단은 대상체로부터 분리될 수 있으며, 세포의 게놈 DNA는 결함을 보정하는 방식으로 변형될 수 있다. 이어서 세포 집단은 치료학적 용도를 위해 대상체로 이식될 수 있다. 특정의 경우, 분리된 세포 집단은 예를 들어, 특정한 시험관 내 조작 예컨대, 전통적인 형질감염 및/또는 전기천공 방법에 민감한 세포의 서브셋을 포함할 수 있거나, 세포의 서브셋은 전통적인 형질감염 및/또는 전기천공 방법 또는 게놈 DNA 조작에 내성일 수 있다. 본원에 기술된 방법으로 게놈 DNA를 변형시키는 것은 이러한 집단에서 서열 변형의 더 큰 효율을 유도할 것으로 여겨진다.

[0163] 서열 변형의 효율은 또한 편집율로서 본원에서 언급될 수 있다. 이는 세포의 전체 수로 나눈 편집된 세포의 수에 의해 계산될 수 있다. 본원에 제공된 예에서, 편집율은 (분해 밴드의 밀도)/[(소화된 밴드의 밀도 + 어미 밴드의 밀도)로서 계산되었다.

[0164] 본 기재내용의 한 양태는 대상체로부터 세포를 분리하고; (a) DNA 올리고; (b) DNA 분해제; 및 (c) 캡핑되고/거나 폴리아데닐화되는 표적화 RNA를 포함하는 조성물로 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 것을 포함하는, 대상체로부터 분리된 세포에서 표적 게놈 DNA 영역의 부위-특이적 서열 변형 또는 보정을 위한 방법으로서, 도너 DNA는 (i) 표적 게놈 DNA 영역에 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동성 영역; 및 (ii) 서열 변형 영역을 포함하며; 게놈 DNA 서열은 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형되는 방법에 관한 것이다. 일 구체예에서, 분리된 세포는 2개 이상의 상이한 세포 유형을 포함한다.

[0165] 본 문맥에서 사용되는 경우, 용어 "상이한 세포 유형"은 상이한 세포 계통(lineage)으로부터 기원하는 세포 또는 동일한 계통으로부터 기원하나 다능성 또는 분화의 상이한 단계에 있는 세포를 의미할 수 있다. 한 구체예에서, 2개 이상의 상이한 세포 유형은 다능성 또는 분화의 상이한 단계에서의 2개 이상의 세포 유형을 포함한다. 추가의 구체예에서, 세포는 동일한 계통으로부터 비롯되나, 다능성 또는 분화의 상이한 단계에 있다.

[0166] 본원에 기술된 방법은 특정 세포 집단에 대해 부정적으로 선택적이지 않을 것으로 여겨진다. 따라서, 특정 구체예에서, 2개 이상의 상이한 세포 유형 간에 서열 변형의 효율은 1% 미만으로 차이난다. 추가의 구체예에서, 2개 이상의 세포 유형 간에 서열 변형의 효율은 2, 1.5, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 또는 0.01% 미만으로 차이난다. 기타 구체예에서, 세포 생존력은 2개 이상의 세포 유형 간에 5% 미만으로 차이난다. 추가의 구체예에서, 세포 생존력은 2개 세포 집단 간에 10, 7, 3, 2, 1, 0.5, 또는 0.1% 미만으로 차이난다.

[0167] 특정 구체예에서, 분리된 세포는 대상체의 골수로부터 분리된 세포이다. 추가의 구체예에서, 분리된 세포는 줄기 세포를 포함한다. 줄기 세포는 몸체로부터 분리가능한 임의의 줄기 세포일 수 있다. 비제한적 예는 조혈 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포 및 신경 줄기 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 세포는 조혈 줄기 세포이다. 추가의 구체예에서, 분리된 세포는 세포 표면 마커 CD34+를 포함한다.

[0168] 추가적으로, 본원에 사용된 방법에 의해 생성된 세포 및 세포주는 약물 개발 및/또는 역유전자 연구에 유용할 수 있다. 이러한 세포 및 동물은 특정 돌연변이 또는 이의 서열 변형과 관련된 표현형을 드러낼 수 있으며, 해당 돌연변이(들) 또는 변이 단백질과 특징하게 상호작용하거나 병에 걸린 동물에서 질환 치료에 유용한 약물을 스크리닝하는데 이용될 수 있다. 이들 세포주는 또한, 특이적 돌연변이의 효과를 조사하기 위한 도구를 제공할 수 있는데, 왜냐하면 세포주 및 이의 상응하는 "변형된" 세포주는 "유전적으로 동일한" 조정을 나타내며, 따라서 질환-특이적 돌연변이의 복구, 약물 스크리닝 및 발견, 및 질환 메카니즘 연구를 위한 강력을 도구를 제공하기 때문이다. 추가로, 이러한 기술은 예를 들어, RNAi 및 shRNA와 같은 현 유전자-녹다운 기법에 대한 과학적으로 탁월한 대안을 제공할 수 있는 것으로 여겨진다. 한 예에서, DNA 서열 변형은 치료학적 적용을 위한 또는 발달 또는 질환 메카니즘 연구를 위해 관심 유전자로 도입되는 정지 코돈이다.

[0169] IV. 전기천공

[0170] 특정 구체예는 숙주 세포로의 하나 이상의 핵산 분자의 유입을 촉진하기 위해 전기천공의 사용을 포함한다.

[0171] 본원에 사용된 바와 같이, "전기천공" 또는 "전기로딩"은 세포 내로의 핵산 분자의 유입을 촉진하기 위해 세포로의 전류 또는 전기장의 적용을 지칭한다. 당업자는 전기천공의 임의의 방법 및 기법이 본 발명에 의해 고려됨을 이해할 것이다.

[0172] 본 발명의 특정 구체예에서, 전기로딩은 미국 특허 번호 5,612,207(특히 참조로서 본원에 통합됨), 미국 특허

번호 5,720,921(특히 참조로서 본원에 통합됨), 미국 특허 번호 6,074,605(특히 참조로서 본원에 통합됨); 미국 특허 번호 6,090,617(특히 참조로서 본원에 통합됨); 미국 특허 번호 6,485,961(특히 참조로서 본원에 통합됨); 미국 특허 번호 7,029,916(특히 참조로서 본원에 통합됨), 미국 특허 번호 7,141,425(특히 참조로서 본원에 통합됨), 미국 특허 번호 7,186,559(특히 참조로서 본원에 통합됨), 미국 특허 번호 7,771,984(특히 참조로서 본원에 통합됨), 및 미국 공개 번호 2011/0065171(특히 참조로서 본원에 통합됨)에 기술된 바와 같이 수행될 수 있다.

[0173] 본 발명의 상황에서 이용될 수 있는 전기로딩을 위한 기타 방법 및 장치는 또한 예를 들어, 공개 PCT 출원 번호 WO 03/018751 및 WO 2004/031353; 미국 특허 출원 번호 10/781,440, 10/080,272, 및 10/675,592; 및 미국 특허 번호 6,773,669, 6,090,617, 6,617,154에 기술되어 있으며, 이들 모두는 참조로서 통합된다.

[0174] 본 발명의 특정 구체예에서, 전기천공은 2002년 8월 21일 출원된 미국 특허 출원 일련 번호 10/225,446에 기술된 바와 같이 수행될 수 있으며, 이의 전체 기재내용은 특허 참조로서 본원에 통합된다.

[0175] 본 발명의 추가의 구체예에서, 유동 전기천공은 MaxCyte STX®, MaxCyte VLX® 또는 MaxCyte GT® 유동 전기천공 장치를 사용하여 수행된다. 특정 구체예에서, 정적 또는 유동 전기천공이 기재내용 전반에 걸쳐 기술된 파라미터로 사용된다.

[0176] 전기천공 바람직하게는, 유동 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 청구된 방법은 40% 초과, 50% 초과 및 60%, 70%, 80% 또는 90% (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위) 초과와 형질감염 효율을 달성할 수 있다. 형질감염 효율은 유전자에 의해 발현된 생성물의 분비 수준 또는 유전자의 생성물을 발현하는 세포의 백분율에 의해 측정될 수 있다. 세포는 전기천공 과정 동안 및 전기천공 과정 후 높은 생존력을 유지한다. 생존력은 일정하게 50% 초과 보다 높다. 전기천공된 세포의 생존력은 출발의 비전기천공된 집단 또는 대조군 작제물로 형질감염된 전기천공된 집단의 생존력의 최대 또는 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다.

[0177] 일부 구체예에서, 현재 방법은 입자 현탁액의 전기적 자극을 위한 유동 전기천공 장치를 사용하며, 이러한 장치는 하나 이상의 유입구 흐름 포트, 하나 이상의 배출구 흐름 포트 및 하나 이상의 흐름 채널을 갖는 유동 전기천공 셀 어셈블리로서, 흐름 채널은 두 개 이상의 벽을 포함하고, 이러한 흐름 채널은 추가로 유입구 흐름 포트로부터 현탁액 중의 입자의 연속적인 입자 흐름을 수용하고 일시적으로 함유하도록 형성되는, 유동 전기천공 셀 어셈블리; 및 각각의 전극이 흐름 채널의 적어도 하나의 벽을 형성하도록 흐름 채널과 관련하여 배치된 쌍을 이룬 전극으로서, 전극이 전기 에너지원과 전기적으로 소통하도록 전극을 배치하는 것을 추가로 포함하며, 이에 의해 채널을 통과하여 흐르는 입자 현탁액이 전극 사이에 형성된 전기장으로 처리될 수 있는, 쌍을 이룬 전극을 포함한다.

[0178] 일부 구체예에서, 현 방법은 유동 전기천공을 사용하여 샘플 크기의 제한을 극복한다. 이러한 방법을 이용하여, 세포 현탁액은 바람직하게는 배치가능한 유동 셀에 함유된 평행한 전극 바를 가로질러 지나가게 된다.

[0179] 추가의 구체예에서, 본원에 기술된 유동 또는 정적 전기천공 방법은 샘플의 열 분해를 극복하기 위해 이용된다. 다양한 구성의 세포가 현 방법에 사용될 수 있음이 이해되어야 한다. 전기천공 동안, 세포는 소정의 특징을 갖는 전기 펄스로 처리된다. 예를 들어, 샘플 세포 제조를 위한 특정 설정은 다음과 같다: 전압, 750V; 펄스 폭, 650 μ sec; 펄스간 시간, 100 μ sec; 파열시 2 이상성 펄스; 파열간 시간, 12 sec; 유속, 0.05 mL/sec. 관심 분자 또는 분자들이 이어서 농도 및/또는 전기 구배 후 세포 내로 분산될 수 있다. 본 발명은 전기장 강도 범위로 세포를 선택적으로 처리할 수 있다.

[0180] 현 유동 전기천공 방법의 또 다른 이점은 많은 집단의 세포가 형질감염될 수 있는 속도이다. 예를 들어, 림프구 집단은 5시간 미만, 바람직하게는, 4시간 미만 및 가장 바람직하게는, 3시간 미만 및 가장 바람직하게는, 2시간 미만으로 샘플을 전기천공시킴으로써 전기천공에 의해 형질감염될 수 있다. 전기천공 시간은 샘플이 유동 전기천공 공정에 의해 처리되는 시간이다. 특정 구체예에서, 1E10 세포는 유동 전기천공을 이용하여 30분 또는 그 미만으로 형질감염된다. 추가의 구체예에서, 2E11 세포는 유동 전기천공을 이용하여 30분 또는 60분 또는 그 미만으로 형질감염된다.

[0181] 유동 전기천공에 있어서, 공정은 필요한 유체 및 샘플을 갖는 용기에서 용액 및 세포 현탁액을 유동 세포와 접촉시킴으로써 개시된다. 프라이밍 용액(염수) 및 세포 현탁액은 전기천공 시스템에 요구되는 명령을 제공함으

로써 도입되며, 이는 펌프 및 핀치 밸브의 작동을 제어한다. 세포가 전극 사이의 유동 경로를 통과하기 때문에, 선택된 전압의 전기 펄스, 기간 및 진동수가 적용된다. 생성물 및 폐 유체가 설계된 용기에서 수집된다.

[0182] 사용자는 요망되는 전압 및 기타 파라미터를 본 발명의 유동 전기천공 시스템으로 입력한다. 상기 주지된 바와 같이, 세팅 범위가 선택적으로 이용가능하다. 컴퓨터는 타워에서 전자 장치와 소통하여 요망되는 전압으로 컴팩터 뱅크를 하전시킨다. 이어서, 유동 경로로 전달되어 전기장을 발생시키기 전에 적절한 스위치는 전압을 조작한다 (스위치는 교대의 펄스 또는 파열을 제공하여 전기장으로서의 연장된 노출에 의해 초래된 전극 마모를 최소화시킨다). 전압은 작업자에 의해 본 발명의 유동 전기천공 시스템으로 설정된 기간 및 진동수 파라미터에 따라 전달된다. 본 발명의 유동 전기천공 시스템이 이제 더욱 상세히 기술된다.

[0183] 유동 전기천공 공정은 예를 들어, 용기 내의 세포 현탁액 및 용액과 (예를 들어, 튜브를 통해) 유체 소통하게 전기천공 챔버를 위치시킴으로써 개시될 수 있으며, 이는 멸균 또는 무균 환경에서 수행될 수 있다. 세포 현탁액 및/또는 기타 시약은 하나 이상의 펌프, 진공, 밸브, 전기천공 챔버 내부의 공기압 또는 부피를 변경시키는 기타 기계적 장치, 및 이들의 조합을 이용하여 전기천공 챔버로 도입될 수 있으며, 이는 세포 현탁액 및/또는 기타 시약이 요망되는 시간 및 요망되는 속도로 전기천공 챔버 내로 흐르게 할 수 있다. 세포 현탁액 및/또는 기타 시약의 일부가 전기천공 챔버에 위치하는 경우, 요망되는 전압의 전기 펄스, 기간 및/또는 간격이 세포 현탁액 및/또는 기타 시약에 적용된다. 전기천공 후, 처리된 세포 현탁액 및/또는 기타 시약은 전기천공 챔버 내부의 배수량, 압력 또는 부피를 변경시키는 하나 이상의 펌프, 진공, 밸브, 기타 전기적, 물리적, 공압 또는 미세유체 장치, 또는 이들의 조합을 이용하여 전기천공 챔버로부터 제거될 수 있다. 특정 구체예에서, 중력 또는 수동 전달이 전기천공 챔버 안으로 또는 밖으로 샘플을 이동시키거나 샘플을 처리하는데 이용될 수 있다. 요망에 따라, 새로운 세포 현탁액 및/또는 기타 시약이 전기천공 챔버 내로 도입될 수 있다. 전기천공된 샘플은 아직 전기천공되지 않은 샘플과는 별도로 수집될 수 있다. 진행되는 일련의 사건은 예를 들어, 전자 회로(예를 들어, 전기 펄스를 제공함), 펌프, 진공, 밸브, 이들의 조합, 및 전기천공 챔버의 내부로 및 외부로의 샘플의 흐름에 영향을 끼치며 이를 제어하는 기타 요소에 결합된 컴퓨터에 의해 일시적으로 편성될 수 있다. 예로서, 전기천공 공정은 컴퓨터에 의해 실행될 수 있으며, 모니터 및/또는 키보드에 대해 그래픽 사용자 인터페이스를 통해 작업자에 의한 것을 포함한다. 적합한 밸브의 예는 핀치 밸브, 버터플라이 밸브, 및/또는 볼 밸브를 포함한다. 적합한 펌프의 예는 원심분리 또는 양성 대체 펌프를 포함한다.

[0184] 예로서, 유동 전기천공 장치는 스페이서에 의해 분리된 적어도 2개의 전극을 포함할 수 있으며, 여기에서 스페이서 및 적어도 2개의 전극은 챔버를 규정한다. 일부 구체예에서, 전기천공 챔버는 스페이서를 가로지르는 적어도 3개의 포트를 추가로 포함할 수 있으며, 여기에서 제1 포트는 챔버로의 샘플 흐름을 위한 것이며, 제2 포트는 챔버 밖으로의 처리된 샘플 흐름을 위한 것이며, 제3 포트는 챔버 내로 또는 챔버 밖으로의 비-샘플 유체 흐름을 위한 것이다. 일부 구체예에서, 비-샘플 유체는 샘플이 챔버로 흐름 때 챔버 밖으로 흘러 나오며, 처리된 샘플이 챔버 밖으로 흘러나올 때 비-샘플 유체는 챔버 내로 흐른다. 또 다른 예로서, 유동 전기천공 장치는 적어도 2개의 평행한 전극을 포함하는 상단 및 바닥 부분을 갖는 전기천공 챔버를 포함할 수 있으며, 챔버는 2개의 전극 사이에 형성되며, 전기천공 챔버의 바닥 부분에서 2개의 챔버 포트 및 전기천공 챔버의 상단 부분에서 2개의 챔버 포트를 갖는다. 이러한 장치는 챔버의 바닥 부분에서 제1 챔버 포트를 통하여 전기천공 챔버와 유체 소통하는 적어도 하나의 샘플 용기를 추가로 포함할 수 있으며, 전기천공 챔버는 챔버의 상단 부분에서 제2 챔버 포트를 통해 샘플 용기와 유체 소통될 수 있으며, 이는 제1 유체 경로를 형성한다. 추가로, 적어도 하나의 생성물 용기는 챔버의 바닥 부분에서 제3 챔버 포트를 통해 전기천공 챔버와 유체 소통될 수 있으며, 전기천공 챔버는 챔버의 상단 부분에서 제4 챔버 포트를 통해 생성물 용기와 유체 소통될 수 있으며, 이는 제2 유체 경로를 형성한다. 일부 구체예에서, 단일 포트 전기천공 챔버가 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 전극, 스페이서, 포트 및 용기의 다양한 다른 적합한 조합물이 사용될 수 있다. 전기천공 챔버는 약 1-10 mL의 내부 부피를 포함할 수 있다; 그러나, 기타 구체예에서, 전기천공 챔버는 더 작은 내부 부피(예를 들어, 0.75 mL, 0.5 mL, 0.25 mL, 또는 그 미만) 또는 더 큰 내부 부피(예를 들어, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 또는 그 초과)를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 전기천공 챔버 및 관련된 요소 예컨대, PVC 백, PVC 튜브, 커넥터, 실리콘 펌프 튜브 및 기타 등등은 일회용일 수 있다 (예를 들어, 의료용 등급 클래스 VI 물질).

[0185] 임의의 수의 용기(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 초과)가 전기천공 챔버와 유체 소통할 수 있다. 용기는 접을 수 있거나, 확장가능하거나 고정된 부피의 용기일 수 있다. 예를 들어, 제1 용기(예를 들어, 샘플 공급원 또는 샘플 용기)는 세포 현탁액을 포함할 수 있으며, 전기천공 동안 세포 현탁액 중의 세포 내로 통과할 물질을 포함할 수 있거나 없다. 그러한 물질이 포함되지 않는 경우, 이러한 물질을 포함하는 제2 용기는 물질

이 전기천공 챔버 내로 유입되기 전에 또는 전기천공 챔버에서 인라인으로 혼합될 수 있도록 포함된다. 추가적인 구성에서, 배출될 유체를 유지할 수 있는 또 다른 용기가 부착될 수 있다. 하나 이상의 추가적인 용기는 처리된 샘플 또는 생성물 용기로서 사용될 수 있다. 처리된 샘플 또는 생성물 용기는 전기천공 공정으로부터 생성된 세포 또는 기타 생성물을 유지할 것이다. 게다가, 하나 이상의 추가적인 용기는, 별개의 부피 또는 유닛 부피로 샘플을 분리하는데 사용될 수 있는 다양한 비-샘플 유체 또는 가스를 포함할 수 있다. 비-샘플 유체 또는 가스 용기는 제3 및/또는 제4 포트를 통해 전기천공 챔버와 유체 소통될 수 있다. 비-샘플 유체 또는 가스 용기는 처리된 샘플 용기 또는 샘플 용기로 통합될 수 있으며(예를 들어, 비-샘플 유체 용기는 처리된 샘플 용기 또는 샘플 용기의 일부를 포함할 수 있다); 따라서, 비-샘플 유체 또는 가스는 샘플의 처리 동안 처리된 샘플 용기로부터 또 다른 용기 (이는 샘플 용기를 포함할 수 있음)로 이송될 수 있다. 비-샘플 유체 또는 가스 용기는 비-샘플 유체 또는 가스의 압축이 전기천공에 영향을 끼치지 않는 한 챔버내로 통합될 수 있다. 본 발명의 추가의 양태는 샘플 용기에 커플링되는 기타 용기를 포함할 수 있으며 시약 또는 다른 샘플을 챔버에 공급할 수 있다.

[0186] 추가의 구체예에서, 전기천공 장치는 정적 전기천공이며, 세포 흐름을 포함하지 않으며, 대신 단일 챔버에서 세포 현탁액을 포함한다. 이러한 장치가 사용되는 경우, 유동 전기천공에 대해 기술된 파라미터가 열 분해를 제한하고, 세포 생존력을 향상시키고, 서열 변형 혼입을 향상시키고, 형질감염 효율을 증가시키고 기타 등등을 위해 사용될 수 있다. 이러한 파라미터는 예를 들어, 본 출원 전반에 걸쳐 기술된 유동 전기천공 파라미터 및 챔버의 내열성, 전극 간격, 완충제와 접촉되는 합친 전극 표면 대 전극 간의 간격의 비율, 및 전기장을 포함한다.

[0187] 본원에 기술된 구체예가 배제될 수 있음이 특히 고려된다. 범위가 기술된 경우, 특정 범위가 배제될 수 있음이 추가로 고려된다.

[0188] 특정 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 제어된 변수이다. 전기천공 동안 세포의 세포 밀도는 비제한적으로, 세포 유형, 요망되는 전기천공 효율 또는 생성된 전기천공 세포의 요망되는 생존력에 따라 다양할 수 있거나 변화될 수 있다. 특정 양태에서, 세포 밀도는 전기천공에 걸쳐 일정하다. 기타 양태에서, 세포 밀도는 전기천공 공정 동안 변화된다. 특정 양태에서, 전기천공 전 세포 밀도는 1×10^4 세포/mL 내지 $(y) \times 10^4$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 수 있다. 또 다른 양태에서, 전기천공 전의 세포 밀도는 1×10^5 세포/mL 내지 $(y) \times 10^5$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)이다. 여전히 기타 양태에서, 전기천공 전 세포 밀도는 1×10^6 세포/mL 내지 $(y) \times 10^6$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 전 세포 밀도는 1×10^7 세포/mL 내지 $(y) \times 10^7$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위일 수 있다. 여전히 기타 양태에서, 전기천공 전 세포 밀도는 1×10^7 세포/mL 내지 1×10^8 세포/mL, 1×10^8 세포/mL 내지 1×10^9 세포/mL, 1×10^9 세포/mL 내지 1×10^{10} 세포/mL, 1×10^{10} 세포/mL 내지 1×10^{11} 세포/mL, 또는 1×10^{11} 세포/mL 내지 1×10^{12} 세포/mL의 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 전 세포 밀도는 $(y) \times 10^6$ 일 수 있으며, 여기에서 y는 임의의 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 전 세포 밀도는 $(y) \times 10^{10}$ 일 수 있으며, 여기에서 y는 임의의 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다.

[0189] 특정 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 제어된 가변값이다. 전기천공 동안 세포의 세포 밀도는 비제한적으로, 세포 유형, 요망되는 전기천공 효율 또는 생성된 전기천공 세포의 요망되는 생존력에 따라 다양할 수 있거나 변화될 수 있다. 특정 양태에서, 세포 밀도는 전기천공에 걸쳐 일정하다. 기타 양태에서, 세포 밀도는 전기천공 공정 동안 변화된다. 특정 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 1×10^4 세포/mL 내지 $(y) \times 10^4$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다. 기타 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 1×10^5 세포/mL 내지 $(y) \times 10^5$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다. 여전히 기타

양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 1×10^6 세포/mL 내지 $(y) \times 10^6$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 1×10^7 세포/mL 내지 $(y) \times 10^7$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다. 여전히 기타 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 1×10^7 세포/mL 내지 1×10^8 세포/mL, 1×10^8 세포/mL 내지 1×10^9 세포/mL, 1×10^9 세포/mL 내지 1×10^{10} 세포/mL, 1×10^{10} 세포/mL 내지 1×10^{11} 세포/mL, 또는 1×10^{11} 세포/mL 내지 1×10^{12} 세포/mL의 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 $(y) \times 10^6$ 일 수 있으며, 여기에서 y 는 임의의 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 $(y) \times 10^{10}$ 일 수 있으며, 여기에서 y 는 임의의 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다.

[0190] 특정 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 1×10^4 세포/mL 내지 $(y) \times 10^4$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다. 기타 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 1×10^5 세포/mL 내지 $(y) \times 10^5$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다. 여전히 기타 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 1×10^6 세포/mL 내지 $(y) \times 10^6$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 1×10^7 세포/mL 내지 $(y) \times 10^7$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다. 여전히 기타 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 1×10^7 세포/mL 내지 1×10^8 세포/mL, 1×10^8 세포/mL 내지 1×10^9 세포/mL, 1×10^9 세포/mL 내지 1×10^{10} 세포/mL, 1×10^{10} 세포/mL 내지 1×10^{11} 세포/mL, 또는 1×10^{11} 세포/mL 내지 1×10^{12} 세포/mL (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)의 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 $(y) \times 10^6$ 일 수 있으며, 여기에서 y 는 임의의 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 $(y) \times 10^{10}$ 일 수 있으며, 여기에서 y 는 임의의 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다.

[0191] 특정 구체예에서, 전기천공은 임의의 원핵생물 또는 진핵생물 세포에 대해 수행될 수 있다. 일부 양태에서, 전기천공은 인간 세포의 전기천공을 포함한다. 기타 양태에서, 전기천공은 동물 세포의 전기천공을 포함한다. 특정 양태에서, 전기천공은 세포주 또는 하이브리드 세포 유형의 전기천공을 포함한다. 일부 양태에서, 전기천공될 세포 또는 세포들은 암 세포, 종양 세포 또는 불멸 세포이다. 일부 예에서, 종양, 암, 불멸화된 세포 또는 세포주가 유도되며, 다른 예에서, 종양, 암, 불멸화된 세포 또는 세포주는 이들의 각 상태 또는 조건으로 자연적으로 유입된다. 특정 양태에서, 전기천공된 세포 또는 세포주는 A549, B-세포, B16, BHK-21, C2C12, C6, CaCo-2, CAP/, CAP-T, CHO, CHO2, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-DUXB11 COS-1, Cos-7, CV-1, 수지상 세포, DLD-1, 배아 줄기(ES) 세포 또는 유도체, H1299, HEK, 293, 293T, 293FT, Hep G2, 조혈 줄기 세포, HOS, Huh-7, 유도된 다능성 줄기(iPS) 세포 또는 유도체, Jurkat, K562, L5278Y, LNCaP, MCF7, MDA-MB-231, MDCK, 중간엽 세포, Min-6, 단핵 세포, Neuro2a, NIH 3T3, NIH3T3L1, NK-세포, NS0, Panc-1, PC12, PC-3, 말초혈 세포, 혈장 세포, 원발성 섬유모세포, RBL, Renca, RLE, SF21, SF9, SH-SY5Y, SK-MES-1, SK-N-SH, SL3, SW403, 자극 야기성 다능성 획득(STAP) 세포 또는 유도체성 SW403, T-세포, THP-1, 종양 세포, U2OS, U937, 또는 Vero 세포일 수 있다.

[0192] 특정 구체예에서, 세포는 형질감염이 어려운 것으로 당업자에게 공지된 것이다. 이러한 세포는 당해 기술에 공지되어 있으며, 예를 들어, 일차 세포, 곤충 세포, SF9 세포, Jurkat 세포, CHO 세포, 줄기 세포, 느리게 분열

되는 세포, 및 비-분열 세포를 포함한다.

[0193] 일부 경우에, 특정 수의 세포는 특정 양의 시간에 전기천공될 수 있다. 기술된 플랫폼의 가요성, 일관성 및 재현성을 고려하여, 약 $(y) \times 10^4$, $(y) \times 10^5$, $(y) \times 10^6$, $(y) \times 10^7$, $(y) \times 10^8$, $(y) \times 10^9$, $(y) \times 10^{10}$, $(y) \times 10^{11}$, $(y) \times 10^{12}$, $(y) \times 10^{13}$, $(y) \times 10^{14}$, 또는 $(y) \times 10^{15}$ (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위) 이하 또는 초과인 세포가 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100초 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위) 미만으로 전기천공될 수 있으며, 여기에서 y는 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다. 기타의 경우에서, 약 $(y) \times 10^4$, $(y) \times 10^5$, $(y) \times 10^6$, $(y) \times 10^7$, $(y) \times 10^8$, $(y) \times 10^9$, $(y) \times 10^{10}$, $(y) \times 10^{11}$, $(y) \times 10^{12}$, $(y) \times 10^{13}$, $(y) \times 10^{14}$, 또는 $(y) \times 10^{15}$ (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위) 이하 또는 초과인 세포가 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 또는 120분 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위) 미만으로 전기천공될 수 있으며, 여기에서 y는 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다. 여전히 기타 양태에서, 약 $(y) \times 10^4$, $(y) \times 10^5$, $(y) \times 10^6$, $(y) \times 10^7$, $(y) \times 10^8$, $(y) \times 10^9$, $(y) \times 10^{10}$, $(y) \times 10^{11}$, $(y) \times 10^{12}$, $(y) \times 10^{13}$, $(y) \times 10^{14}$, 또는 $(y) \times 10^{15}$ (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위) 이하 또는 초과인 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24 시간 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위) 미만으로 전기천공될 수 있으며, 여기에서 y는 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위)일 수 있다.

[0194] 표현 $(y) \times 10^e$ 는 임의의 수치 값을 취할 수 있는 가변적인 'y'에 지수 값 e까지 증가되는 10을 곱한 것을 의미하는 것으로 이해된다. 예를 들어, $(y) \times 10^4$ 는 y가 2인 경우, 2×10^4 를 의미하는 것으로 이해되며, 이는 $2 \times 10,000$ 에 상응하며, 20,000과 동일하다. $(y) \times 10^4$ 는 또한 $(y)^*10^4$ 또는 $(y) \times 10^4$ 또는 $(y)^*10^4$ 로서 쓰일 수 있다.

[0195] 세포 또는 배지의 부피는 전기천공될 세포의 양, 스크리닝될 세포의 수, 스크리닝될 세포의 유형, 생성될 단백질의 유형, 요망되는 단백질의 양, 세포 생존력, 및 바람직한 세포 농도와 관련된 특정 세포 특징에 따라 변화될 수 있다. 방법 및 조성물에 이용될 수 있는 부피의 예는 비제한적으로, 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 ml 또는 L (또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위), 및 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위를 포함한다. 이러한 부피를 유지할 수 있는 용기는 본원에 기술된 구체예에 사용 고려된다. 이러한 용기는 비제한적으로, 세포 배양 디쉬, 펠트리 디쉬, 플라스크, 바이오백, 바이오용기, 바이오반응기 또는 통을 포함한다. 10L 이상으로 유지할 수 있는 것과 같은 대규모 부피를 위한 용기가 특히 고려된다. 특정 구체예에서, 100L 이상의 부피가 이용된다.

[0196] 본원에 기술된 방법에 의한 세포의 전기천공은 증가된 효율 및/또는 감소된 독성의 이점을 제공하는 것으로 특히 고려된다. 이러한 측정은 게놈 DNA 서열 변형을 혼입시킨 세포의 양을 측정하고/거나 마커를 발현하는 세포의 양을 측정하고/거나 전기천공 후 세포의 생존력을 측정함으로써 이루어질 수 있다.

[0197] 일부 구체예에서, 서열 변형의 효율은 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 또는 80% 초과이다. 서열 변형의 효율은 서열 변형을 갖는 세포의 수를 측정하고 전체 수의 세포로 나눔으로써 측정될 수 있다. 게놈 DNA 서열 변형의 혼입은 당해기술에 공지된 방법 예컨대, 직접 게놈 DNA 시퀀싱, 다양한 제

한 분해(서열 변형이 제한 효소 부위를 첨가하거나, 제거하거나 변경하는 경우), 겔 전기영동, 모세관 어레이 전기영동, MALDI-TOF MS, 동적 대립형질-특이적 하이브리디제이션, 분자 비콘(molecular beacon), 제한 단편 길이 다형체, 프라이머 연장, 온도 구배 겔 전기영동, 및 기타 등등에 의해 측정될 수 있다.

[0198] 기타 구체예에서, 전기영동 후 세포 생존력은 적어도 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 또는 95%이다. 세포 생존력은 당해기술에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 세포는 세포 계수 장치에 의해 전기천공 전 및 후에 계수될 수 있다. 기타 구체예에서, 아포토시스가 측정된다. 다량의 핵산 도입은 아포토시스를 유도할 수 있는 것으로 간주된다. 본원에 기술된 방법은 당해기술의 다른 방법보다 아포토시스를 덜 유도할 것으로 여겨진다. 특정 구체예에서, 전기천공 후 아포토시스를 나타내는 세포의 양은 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 또는 5% 미만이다. 아포토시스는 프로그래밍된 세포 치사의 특정 과정을 지칭하며, 당해 기술에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 아포토시스는 Annexin V 검정, 활성화된 카스파제 3/7 검출 검정, 및 Vybrant® Apoptosis Assay (Life Technologies)에 의해 측정될 수 있다.

[0199] 추가의 구체예에서, 마커를 인코딩하는 핵산을 발현하는 세포의 백분율은 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 또는 90% 초과, 또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위이다. 추가의 구체예에서, 외인성 핵산의 도입 이전의 세포의 수 대비 마커를 인코딩하는 핵산을 발현하는 생존 세포의 백분율은 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 또는 90% 초과, 또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위이다.

[0200] 본 기재내용의 특정 구체예가 본원에 기술된 바와 같은 범위 또는 특정 값을 포함하는 경우, 특히 범위 및 특정 값(즉, 핵산의 농도, 길이 및 백분율)은 본 발명의 구체예에서 제외될 수 있는 것으로 여겨진다. 본 기재내용이 요소(예를 들어, 세포 유형)의 목록을 포함하는 경우, 또한, 본 발명의 구체예는 목록의 하나 이상의 요소를 구체적으로 제외시킬 수 있는 것으로 여겨진다.

[0201] VI. 실시예

[0202] 본 발명의 바람직한 구체예를 입증하기 위해 하기 실시예가 포함된다. 하기의 실시예에 기재된 기술은 본 발명의 실시에서 잘 작용하고, 이에 따라 본 발명의 실시를 위한 바람직한 방식을 구성하는 것으로 간주될 수 있는, 본 발명자에 의해 발견된 기술임을 당업자는 이해해야 한다. 그러나, 본 명세서에 비추어 당업자는 기술된 특정 구체예에서 다수의 변형이 이루어질 수 있고, 본 발명의 사상 및 범위에서 벗어남이 없이 동일하거나 유사한 결과가 수득됨을 이해해야 한다.

[0203] 실시예 1

[0204] 세포 배양: 저온보존된 PBMC를 해동하고 RPMI-1640+10% FBS+100u/ml rhIL-2+항생제에서 밤새 배양하였다. 조직 배양 플라스크에 부착된 세포를 제거하였다. K562를 RPMI-1640 + 10% FBS + 2mM L-글루타민 + 항생제에서 배양하였다. 섬유모세포는 DMEM + 10% FBS + 항생제에서 배양하였다. 확장된 T 세포를 활성화 키트 프로토콜에 따라 Dynalbeads 인간 T-활성화인자 CD3/CD28 (Invitrogen, Carlsbad CA)에 의해 활성화시켰다. 세포를 활성화 3-6d 후 형질감염시켰다.

[0205] 전기천공: 세포를 PBL, 확장된 T 세포 또는 K562에 있어서는 직접적으로 또는 섬유모세포에 있어서는 트립신화를 이용하여 수집하였다. MXCT EP 완충액으로 세척 후, 세포를 mRNA(200ug/ml Cas9 및 100ug/ml gRNA, 또는 100ug/ml GFP) 및/또는 단일 가닥 DNA 올리고(달리 명시되지 않는 한 100ug/ml)와 혼합하고 전기천공하였다. EP 인큐베이션 20분 후, 세포를 2-5d 동안 배양한 후 유전자 변형 검정을 위해 세포 펠렛을 수집하였다.

[0206] 게놈 DNA 추출: 게놈 DNA를 Purelink 게놈 DNA Mini 키트(Invitrogen, Carlsbad CA)를 사용하여 추출하였다. 추출된 게놈 DNA를 사용 전에 -4C 냉장고에 보관하였다.

[0207] 유전자 변형 분석: Cel-1 분석을 수행하여 SURVEYOR Mutation 검출 키트(Trangenomic, Omaha NE)를 사용함으로써 유전자 게놈 DNA 편집을 검정하였다. 회사에 의해 제공된 키트 프로토콜을 따랐다. 6개 뉴클레오타이드를 인식하는 HindIII의 통합은 HindIII 분해에 의해 검정하였다. 샘플을 10% TBE 겔(Invitrogen, Carlsbad CA)을 사용하여 분석하였다.

[0208] CRISPR(Cas9 및 gRNA): SSAV1 안전 하버 부위에서 특이적 5' GGGGCCACTAGGGACAGGAT TGG 3' (SEQ ID NO:28) 부위를 표적으로 하는 gRNA 및 Cas9에 대한 전체 키트는 워싱턴 대학의 세인트 루이스 게놈 엔지니어링 센터로부터 구입하였다. gRNA 표적 부위를 함유하는 게놈 DNA 세그먼트를 증폭하기 위한 프라이머(F - 5' TTCGGGTCACCTCTCACTCC 3' (SEQ ID NO:29); R - 5' GGCTCCATCGTAAGCAAACC 3' (SEQ ID NO:30))를 키트에 포함시

켰다. 약 468bp 앰플리콘을 추가의 Cel-1 검정 및 HindIII 분해 검정을 위해 사용하였으며, 이의 분해는 게놈 DNA 변형이 발생하는 경우, 각각 약 170 및 298 bp의 2개 밴드를 제공할 것이다.

[0209] CRISPR mRNA: mRNA는 세인트 루이스의 워싱턴 대학으로부터 구입한 주형 플라스미드 DNA로부터 mMACHINE® T7 Ultra Kit (Invitrogen, Carlsbad CA)를 사용하여 제조하였다.

[0210] 단일-가닥 올리고머: 올리고의 서열은 하기와 같다:

[0211] 실시예 2

[0212] 본원에 기술된 방법은 유전자 질환을 치유하기 위해 환자 조혈 줄기 세포 (HSC)에서 질환-조래 돌연변이(들)를 보정하는데 이용될 수 있다. 이러한 실시예는 만성 육아종병(CGD)을 치유하기 위해 CGD에서 돌연변이를 보정하는 방법을 기술한다. 이러한 질환은 본원에 기술된 유전자 치료 요법의 개념 증명을 입증할 뿐만 아니라, 이러한 질환에 대한 치료학적 방법을 발전시킬 것이며, 이는 지금까지 여전히 충족되지 않은 도전이다. CGD에서 유전자 돌연변이는 널리 공지되어 있기 때문에, 질환을 갖는 세포의 시험관내 작용성 검정 기법은 충분히 발달되었으며, CGD의 동물 모델이 확립되었으며, 낮은 백분율의 보정은 또한 현저한 임상 효율로 이어질 수 있다. 비-바이러스 접근법은 'T'(질환 표현형을 발생시킴)의 'C'(정상 세포에서 우세함)로의 점 돌연변이를 전환시키기 위해 676번 위치에서 엑손 7에 위치한 gp91phox 유전자에서 가장 우세한 돌연변이('핫스팟')를 표적으로 하는 DNA 올리고머 및 CRISPR (Cas9 및 gRNA 쌍)을 인코딩하는 메신저 RNA (mRNA)를 전달하는데 이용될 것이다. CRISPR의 전달은 규제 준수 폐쇄 시스템 (regulatory compliant close system) 유동 전기천공 플랫폼 및 MaxCyte의 cGMP의 사용에 의해 촉진될 것이다.

[0213] 모델 질환으로서 CGD에서의 돌연변이가 임상-관련 효능에서 보정된 것으로 입증될 수 있는 경우, 본원에 기술된 방법의 이러한 개념 증명은 실제로, 많은 다른 질환을 치유하기 위한 동일한 방법의 확장에 있어서 잠재적인 치료 요법으로서의 기술적 플랫폼을 입증할 것이며, 여기에서 공지의 돌연변이는 질환과 관련된다. 게다가, MaxCyte 유동 형질감염 시스템(MaxCyte Flow Transfection System)은 GMP-준수의 FDA-Master-File 지지된 대규모 형질감염 기술 플랫폼이며, 현 임상 시험 및 상업화에 의해 입증되었기 때문에, 이러한 제안 연구의 성공은 CGD 뿐만 아니라 많은 다른 유전자 질환에 대한 임상 연구 및 상업화로 용이하게 바뀔 수 있다.

[0214] **HSC는 CGD를 치유하는데 있어서 가장 우수한 선택이며 본 제안에 이용될 것이다.** 자가 HSC에서 변이된 유전자를 보정하는 유전자 요법은 유전자 질환을 치유할 가능성이 가장 높다. CGD에 있어서, HSC는 이러한 질환에 대해 대항하는 올바른 후보인자인 것으로 임상적으로 밝혀졌다. 지금까지, 항시적 프로모터에 의해 추진된 질환 유전자/cDNA를 인코딩하는 바이러스 벡터에 의해 형질도입된 자가 HSC를 사용한 CGD에 대한 유전자 요법을 임상적으로 평가하였다. 이러한 방법은, 보정된 유전자를 발현하는 세포를 심지어 <1-5%로 갖는 환자에서 현저한 임상적 이점을 유도하는, 게놈 내에서의 무작위로 통합된 부위로부터의 발현 및 유전자 통합의 가능성을 입증하였다. 그러나, 통상적인 유전자 요법에 대한 주요 염려는, 게놈 내의 유전자 통합 위치를 제어할 수 없는 무능력으로 인한 삽입 돌연변이, 및 모든 하위 계통(sub lineage)에 대하여, 심지어 정상적인 건강한 상황인 경우 유전자를 발현할 수 없는 이들 세포에 대하여 cDNA 발현을 유도할 줄기 세포에서 cDNA의 항시적 발현의 위험이다.

[0215] 비-바이러스 방법은 이의 이점을 갖는다. 그러나, 비-바이러스 형질감염 방법에 의한 대부분의 조혈 세포에서 DNA 플라스미드 형질감염의 높은 세포독성 및 낮은 형질감염 효율로 인해 비-바이러스 형질감염 방법은 HSC 형질감염에 이용되기 어렵다. 10년이 넘는 연구를 통해, 형질감염을 위해 전기천공을 이용한 높은 세포독성 및 낮은 형질감염 효율이 DNA-흡수 매개된 아포토시스/프롭토시스로 인한 것이며, 전기천공-매개된 세포 치사로 인한 것은 아님이 밝혀졌다. 유전자 요법을 위한 비-바이러스 형질감염 방법을 적용하기 위해, 전이유전자를 효율적으로 형질감염시키고 세포 생존을 향상시키기 위한 방법을 발견해야 한다.

[0216] mRNA 형질감염은 낮은 세포독성을 갖는 전이유전자를 발현시키는 효율적인 방법인 것으로 밝혀졌다. mRNA 형질감염의 일시적 발현 특징은 CRISPR, TALEN 또는 ZEN의 뉴클레아제의 강요된 발현과 같은 많은 적용에 유리하다. mRNA 포플레이션에서 뉴클레아제의 전기천공을 통한 게놈 DNA에서의 효율적인 특이적 유전자 편집은 이러한 방법의 추가 적용을 재할성화시킨다. mRNA 포플레이션에서 뉴클레아제 전기천공을 사용하는 IND 신청의 몇몇개의 성공적인 승인은 우수한 예이다. 임상 시험을 위한 mRNA 형질감염의 이들 현재 적용에 있어서, DNA 물질이 의도적으로 회피되어 세포독성을 저하시킨다. 따라서, 적용은 유전자 삽입-결실을 통한 유전자 녹 아웃의 적용 영역에서 영리하게 설계된다. 현재 비-바이러스 형질감염은 게놈 DNA로의 유전자 또는 뉴클레오타이드 첨가에 여전히 적용될 수 없다.

- [0217] 본원에 기술된 현 발견은 플라스미드 DNA 흡수가 높은 세포독성을 매개하지만, 단일 가닥 DNA 올리고머의 형질 감염은 세포독성을 유발시키지 않음을 보여준다. 이러한 발견은 유전자 요법에서 cDNA의 항시적 발현 대신에 대안적 방법으로서 모노- 또는 소수개의 뉴클레오타이드 돌연변이의 유전자 보정에 비-바이러스 방법이 사용될 수 있게 하며, 이는 현 유전자 치료 요법에서 걱정되는 특정 하위-계통에서 돌연변이유발 및 원치않는 발현에 대한 염려를 중요하게 다룰 것이다. 대부분의 유전자 질환이 모노- 또는 소수개의 뉴클레오타이드 돌연변이를 포함하기 때문에, 이러한 유전자 보정법은 유전자 질환에 대항하는데 있어서 매우 중요하며 실질적일 수 있다. CGD HSC에서의 유전자 보정에 있어서 도너 DNA로서 DNA 단일 가닥 올리고머 및 mRNA 포물레이션에서 뉴클레아제 형질감염(본 제안에서 예로서 CRISPR)에 대한 스위칭은 CGD에 대해서 뿐만 아니라 기타 유전자 질환의 유전자 요법에 있어서 최소 위험 및 높은 유망한 결과를 제공한다.
- [0218] **설계 연구**
- [0219] 유전자 질환은 우리 사회에서 충족되지 않은 도전이다. 대부분의 유전자 질환 예컨대, CGD 또는 낮적혈구병은 단지 증상을 제어하는 능력으로 예컨대, 항박테리아/항진균 예방, CGD에 있어서 IFN-r 및 낮적혈구병에 있어서 혈액 투입으로 치료되었다. CGD 환자에 대한 항생제/항진균 요법에서 이루어진 현저한 발전에도 불구하고, 질환, CGD를 갖는 환자를 치료하는 효과적인 방법의 결여는 불행히도 심각하고, 심지어 치명적인 재발 감염을 발생시킨다. 줄기 세포 이식은 질환을 치유할 수 있으나, 이는 찾기 어려운 엄격하게 매칭되는 도너를 필요로 하여 적용 가능성이 제한된다.
- [0220] 생체외에서 돌연변이-보정된 자가 HSC를 사용한 유전자 요법은 환자에 이로운 효능을 입증하였으며, 이는 유전자 질환 치료에 대한 희망을 증가시킨다. 지금까지, 유전자 전달 방법으로서 바이러스를 사용한 이러한 방법은, 임상 시험에 대한 치료학적 단백질을 항시적으로 발현시키기 위해 프로모터와 돌연변이된 서브유닛을 인코딩하는 전체 cDNA를 대부분 사용하였다. 일부가 단백질을 자연적으로 발현시키지 않는 하위-계통 모두에 대한 일정한 발현 및 전체 계통에서 무작위된 통합을 이용한 이러한 접근법의 안전성은 크게 염려되고 있으며, 이는 가능한 삽입 돌연변이유발로 이어지며 일부 비공지의 추후 결과일 수 있다.
- [0221] 자가 HSC의 계통의 특이적 돌연변이된 부위에서 돌연변이된 뉴클레오타이드를 보정하기 위한 비-바이러스 접근법은 삽입 돌연변이유발, 유전자 발현 침묵, 바이러스-감염 세포의 고갈, 및 유전자 발현 조절에서 염려가 덜할 것이다. 그러나, 유전자 요법에서 비-바이러스 접근법은 지금까지 인기가 없었는데, 비-바이러스 접근법의 효율이 생존력 및 형질감염 효율 둘 모두에 있어서 너무 낮았기 때문이다. 그러나, 뉴클레아제(TALEN 또는 CRISPR)를 사용함으로써, 최근에 출원인은 현저한 세포독성 없이, 전기천공이 표적화된 계통 부위의 유효한 뉴클레오타이드 통합, 특이적 돌연변이된 뉴클레오타이드의 효율적인 보정, 및 HSC를 포함한 많은 다양한 세포 유형에서 돌연변이된 세포로부터 작용성 단백질 발현 세포로의 효율적인 표현형 반전을 매개할 수 있음을 발견하였으며, 이는 최근 보고된 것보다 효율이 더 높으며 따라서 비-바이러스 유전자 치료 요법에 대한 사용 희망을 다시 불러일으킨다. 추가적으로, MaxCyte에 의한 개발된 전기천공-기반 cGMP-준수 확장형 유전자 전달 기법은 이러한 발견을 임상 시험 및 가능하게는 상업화로 용이하게 바꿀 수 있다.
- [0222] 만성 육아종증(CGD)은 유전 질환의 군이며, 여기에서 포식세포는 특정 병원체를 치사시키는데 사용된 반응성 산소 화합물(가장 중요하게는, 초과산화물 라디칼)을 생성시키지 않는다. CGD는 미국에서 200,000명 중 약 1명에 영향을 미치며, 매년 약 20건의 새로운 경우가 진단되었다. CGD의 관리는 초기 진단, 환자 교육 및 감염 예방 및 치료를 위한 항생제를 포함한다. 재발 감염 및 염증의 사망률이 주요 논쟁점이며, 연간 약 0.3의 감염률을 갖는다. 매칭된 도너로부터의 조혈 줄기 세포(HSC) 이식은 치유적이거나, 현저한 관련 위험성 (이식 거부, 이식편대 숙주병, 화학요법-관련 독성 및 매칭된 도너의 입수가능성)을 갖는다. 항시적 프로모터에 의해 추진된 질환 유전자/cDNA를 인코딩하는 바이러스 벡터에 의해 형질도입된 자가 줄기 세포를 사용한 유전자 요법이 임상적으로 평가되었다. 이러한 접근법은 환자에 현저한 이점을 발생시키는, 계통 내에서 무작위로 통합된 부위로부터의 유전자 통합 및 발현의 실행가능성을 입증하였다. 그러나, 통상적인 유전자 요법에 대한 주요 염려는 계통으로의 유전자 통합 위치를 제어할 수 없는 무능력으로 인해 삽입성 돌연변이유발 위험이다.
- [0223] 본원에 기술된 조성물 및 방법은 CGD 환자에서 돌연변이의 표적화된 보정에 이용될 수 있다. CGD 환자 HSC에서 각 돌연변이를 특이적으로 표적으로 하기 위해 보정 서열을 갖는 메신저 RNA 기반의 비-바이러스 부위-특이적 유전자 편집 도구(CRISPR/Cas9 효소)가 이용될 수 있다. 본원에 기술된 방법을 이용하여, 비바이러스의 부위-특이적 생체의 유전자-변형된 세포 요법이 CGD에 대한 치료법으로서 개발될 수 있다.
- [0224] **CGD 돌연변이의 부위-특이적 보정을 위한 프로토콜 개발:** 제1 표적 보정은 먼저 환자로부터 유래된 EBV-형질전환된 B 세포를 사용함으로써 위치 676C에서 T로의 엑손 7의 gp91phox에서의 가장 우세한 돌연변이('핫스팟')일

것이다. 이러한 특정 CGD에서, 아미노산 부위 226에서 뉴클레오티드 "T"의 "C"로의 보정은 부위가 정지 코돈으로부터 올바른 Arg이 되도록 복원시키며, 보정된 세포로부터의 발현은 gp91 발현에 의해 정량화될 수 있으며 시퀀싱에 의해 확인될 수 있다.

[0225] **CGD 환자 HSC에서 작용성 유전자 보정 확인:** 특이적 C676T 돌연변이를 갖는 CGD 환자로부터의 자가 HSC가 수득될 수 있다. 형질감염 절차는 최적화될 수 있으며, 변이된 유전자는 본원에 기술된 방법을 이용하여 보정될 수 있다. 보정 효율은 gp91 발현 및 시험관 내에서 과산화물 생성의 작용 복원의 검출에 의해 이어져, 이중이식 모델에서 마우스 이식 연구에 의해 확인되어 이러한 보정된 환자 HSC의 이식 및 마우스로부터 회수된 인간 세포의 기능 복원을 평가할 수 있다.

[0226] **임상적 해석을 위한 대규모화 제작 공정:** 적합한 CGD 환자로부터 자가 HSC가 수득될 수 있다. 이어서 돌연변이된 유전자는 대규모 cGMP-준수 제작 공정에서 보정될 수 있다. 이어서 시험관 내에서 보정 효율 및 작용 복원이 검사될 수 있다.

[0227] 수십년의 연구로, 출원인들 및 기타 사람들은, DNA 형질감염이 대부분의 조혈 세포에 세포독성이며, 이는 비-바이러스 방법이 유전자 요법에 효과적으로 사용되게 하는 것을 방지하는 가장 큰 중요한 장애임을 발견하였다. 출원인들은 일반적으로 직관적으로 간주되는 바와 같이, 전기천공이 아니라 DNA가 세포독성에 대한 원인임을 확인하였다. 낮은 세포독성 및 높은 형질감염 효율성을 지니는 효율적인 형질감염에 대한 적절한 대안의 발견이 오랜 기간 동안 본 발명자들의 목적이었다. 출원인은 mRNA 형질감염을 개척하고, mRNA 형질감염이 이러한 요건을 충족시킴을 발견한 첫 번째 그룹중 하나이다. 도 17에 도시된 바와 같이, 형태학적으로, HSC의 유동 전기천공 형질감염은 mRNA에 의한 높은 형질감염 효율 및 낮은 세포독성을 매개할 수 있다.

[0228] 도 10A-D에 도시된 바와 같이, 플라스미드 DNA에 의한 것보다 매우 더 높은 형질감염 효율을 유도하는 다양한 mRNA 농도는 모두 DNA 플라스미드 형질감염으로 인한 것보다 더 높은 세포 생존력을 유도하였다. GFP-mRNA 형질감염은 높은 생존력(도 10A), 높은 형질감염 효율성(도 10C-D), 대조군 세포 대비 동일한 세포 증식율(도 10B)을 제공하나, DNA 플라스미드는 높은 세포독성(도 10A), 지연된 세포 증식(도 10B) 및 더 낮은 형질감염 효율(도 10C-D)을 초래하였다.

[0229] 출원인은 mRNA가 형질감염에 우수할 뿐만 아니라, 단일-가닥 DNA 올리고머도 세포독성을 초래하지 않음을 추가로 입증하였으며, 이는 비-바이러스 접근법에 의한 유전자 보정에 대한 가능성을 연다. 도 11에 도시된 바와 같은, mRNA 및 단일-가닥 올리고머에 의해 높은 형질감염 효율 및 낮은 세포 독성을 갖는 HSC의 유동 전기천공 형질감염. HSC를 MAXCYT 유동 전기천공 기법으로 형질감염시켰다. 대조군 및 GFP-mRNA 형질감염은 유사한 생존력(도 11B), 증식(도 11C)을 발생시켰다. CRISPR(cas 9 (c) 및 gRNA (g)) 및 단일-가닥 올리고머(25mer, 50mer, 70mer 및 100mer)의 형질감염 모두는 유사한 생존력 및 증식을 제공하나, 대조군 세포보다 약간 낮았다. 그러나, 세포는 높은 생존력 및 증식을 유지하였으며(대조군 세포 대비 $\geq 80\%$), 이는 HSC에서 c+g+올리고 형질감염의 높은 생존력을 입증하였다.

[0230] mRNA 형질감염은 세포독성이 낮을 뿐만 아니라, 이는 또한 형질감염 후의 효율적인 기능을 매개한다. 도 18에 도시된 바와 같이, 유동 전기천공은 HSC의 AAVS1 부위에서 효율적인 유전자 편집을 매개하였다. 대략 50% 유전자 편집이 달성되었다. 게다가, 형질감염에서 CRISPR과 단일-가닥 DNA 올리고의 조합된 사용은 또한 유전자 보정에 필요한 상동성 재조합의 과정인 효율적인 뉴클레오티드 통합을 매개할 수 있다. 도 13A-B에 도시된 바와 같이, 유동 전기천공은 HSC의 AAVS1 부위로의 효율적인 뉴클레오티드 통합을 매개하였다. HSC의 특이적 게놈 부위에서 효율적인 뉴클레오티드 통합이 달성되었다. 6-뉴클레오티드 Hind III 인식 서열의 통합은 올리고머 크기 및 농도 의존적이다. HSC에서 대략 40% 통합 만큼 높게 도달할 수 있다.

[0231] CRISPR과 단일-가닥 DNA 올리고머의 형질감염에 의한 뉴클레오티드 통합은 뉴클레오티드 길이를 증가시키지 않는, 뉴클레오티드 보정과 상이한 것으로 직관적으로 간주될 수 있다. 유전자 보정은 추가로 올바른 기능적 단백질의 유전자 발현의 보정과 상이할 것이다. 개념 증명에 의해 추가로 입증되는 바와 같이, 출원인은 CRISPR의 mRNA 형질감염 및 단일-가닥 올리고머가 유전자 통합, 유전자 보정을 매개할 수 있을 뿐만 아니라, 작용성 유전자 발현을 갖는 표현형 반전을 매개할 수 있음을 입증하였다. 도 19에 도시된 바와 같이, 유동 전기천공은 CGD 환자 EBV-형질전환된 B 세포에서 gp91 발현의 효율적인 복원을 매개하였다. 동일한 EBV-형질전환된 B 세포에서 HindIII-인식 6-뉴클레오티드 통합의 실질적인 비율은 gp91 발현 세포의 비율보다 훨씬 높았다(데이터 미도시됨). 이는 또한 환자 HSC에서 높은 효율로 성공적으로 수행되었다(>5%; 데이터 미도시됨).

[0232] 하기 방법은 환자에서 CGD를 보정하는데 사용될 수 있다: 위치 676C에서 T로의 엑손 7의 gp91phox에서의 가장

우세한 돌연변이("핫스팟")가 먼저 환자로부터 유래된 EBV-형질전환된 B 세포를 사용하여 표적화될 수 있다. 이러한 특정한 CGD에서, 아미노산 부위 226번에서 뉴클레오티드 "T"를 "C"로 보정하는 것은 이 부위를 정지 코돈으로부터 올바른 Arg으로 복원하며, 보정된 세포로부터의 발현은 gp91 발현에 의해 정량화되고 시퀀싱에 의해 확인될 수 있다.

[0233] 4개의 gRNA (g1, g2, g3, 및 g4)가 먼저 평가될 수 있으며, 효율에 있어서 입증될 수 있다. 이들 gRNA는 하기 표에서 기록된다:

	gp91로 표적화되는 gRNA	SEQ ID NO:
g1	TTTCCTATTACTAAATGATCNGG	31
g2	CACCCAGATGAATTGTACGTNGG	32
g3	TGCCCACGTACAATTCATCTNGG	33
g4	AGTCCAGATCATTTAGTAATNGG	34

[0234]

[0235] 유전자 보정 효율에 대한 50mer 내지 200mer(하기 표에 도시된 바와 같이, 01-04)의 올리고머 크기의 효과가 평가될 수 있다. 올리고머 크기가 세포 내부의 DNA 센서를 환기시켜 아포토시스 또는 피로토시스를 개시시키지 않는 경우, 더 긴 올리고머 크기는 더욱 우수한 보정 결과를 발생시킬 수 있는 것으로 예측된다.

	유전자 보정을 위한 단일-가닥 올리고머	SEQ ID NO:
01	5'ACATTTTTCACCCAGATGAATTGTACGTGGGCAGACCGCAGAGAGTTTGGC-3'	35
02	5'CTATTACTAAATGATCTGGACTTACATTTTTCACCCAGACGAATTGTACGTGG GCAGACCGCAGAGAGTTTGGCTGTGCATAATATAACAGTTTGTGAA-3'	36
03	5'TCTTTTAATAAAACAATTTAATTTCTTACTAAATGATCTGGACTTACATTT TTCACCCAGATGAATTGTACGTGGGCAGACCGCAGAGAGTTTGGCTGTGCATAA TATAACAGTTTGTGAACAAAAAATCTCAGAATGGGGAA-3	37
04	5'CAGAGCACTTAAATATATGCAGAATCTTTTAATAAAACAATTTAATTTCTTA TTACTAAATGATCTGGACTTACATTTTTCACCCAGATGAATTGTACGTGGGCAG ACCGCAGAGAGTTTGGCTGTGCATAATATAACAGTTTGTGAACAAAAAATCTCA GAATGGGGAAAAATAAAGGAATGCCCAATCCCTCA-3	38

[0236]

[0237] 연구의 제1 단계에 있어서, 올리고머는 HindIII-인식 부위(AAGCTT)를 통합시키는데 사용될 수 있으며, 4개 gRNA의 표적화 효율은, PCR 증폭된 앰플리콘의 HindIII 분해 검정에 의한 HindIII-인식 부위의 통합 효율 및 Cel-1 검정에 의한 Indel 효율을 이용하여 평가될 수 있다. 이어서 제거된 HindIII-인식 서열을 갖는 올리고머가 사용될 수 있으며, 돌연변이 부위에서 T를 C로 변경하여 연장된 긴 기간 동안 gp91 발현의 복원을 평가하여 유전자 보정의 지속성을 이해할 수 있다.

[0238] 진정한 보정을 확인하기 위해, 하기 기록된 3개 검정법이 이용될 수 있다: 1) gp91에 대한 항체를 사용하여 gp91 발현 복원의 평가 검정; 2) gp91 양성 세포를 분류하고 PCR 앰플리콘을 시퀀싱하여 보정을 입증함; 및 3) 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA)의 자극을 이용하여 향상된 화학발광의 측정에 의한 O_2^- 생성의 시험관내 작용성 연구.

[0239] 출원인은 이미 Cas9를 생성시키고 평가하였기 때문에, 출원인은 돌연변이 부위에 가까운 부위에서 효율적인 유전자 편집을 달성하는 것과 관련된 어떠한 문제도 예측하지 않는다. cel-1 검정은 유전자 편집의 효율을 평가하는데 사용될 수 있다. Hind III 인식 부위는 또한 돌연변이 부위로 통합되어 올리고머 통합을 평가할 수 있다. 이전에 기술된 방법 및 데이터를 이용하여, 100mer 크기 올리고머를 갖는 2개의 평가된 gRNA-2로 매우 유망한 결과가 밝혀졌다. gp91 유전자 발현은 3% 초과 수준으로 복원되었다. 상이한 구조화된 올리고머가 필요에 따라 설계될 수 있다. 이들은 세포 내부의 올리고머 안정성에 대한 결합 변형을 갖는 올리고머, 또는 심지어 이중 가닥 올리고머를 포함한다. 추가의 최적화를 이용하여, 5-10%의 보정 효율이 달성될 수 있는 것으로 간주되며, 이의 수준은 CGD 환자에 있어서 유의한 임상적 이득을 관찰하는데 충분히 높을 수 있다.

- [0240] CGD 환자 HSC에서 작용성 유전자 보정 확인: 특이적 C676T 돌연변이를 갖는 CGD 환자로부터의 자가 HSC가 수득될 수 있다. 형질감염이 최적화될 수 있으며, 변이된 유전자가 상기 기술된 4개 gRNA 및 올리고머를 사용하여 보정될 수 있다. 이어서 시험관내에서 과산화물 생성의 작용 복원 및 gp91 발현의 검출에 의한 보정 효율이 평가될 수 있다.
- [0241] 약 5-10%의 gp91 발현 복원을 달성했다면, SCID 마우스 생착 연구가 약 1-4개월 생착 기간 동안 이러한 보정된 환자 HSC의 생착을 평가하기 위해 이종이식 모델에서 수행될 수 있다. 게다가, 마우스로부터 회수된 인간 세포에서 작용 복원 또한 평가될 수 있다. 1-3개월의 기간으로 $1e6-5e6$ /마우스의 정맥내 꼬리 정맥 주입으로 보정된 복원 HSC의 생착 효율이 또한 평가될 수 있다.
- [0242] 유전자 보정을 확인하기 위해, 하기 연구가 이용될 수 있다: 1) gp91 발현의 복원을 검정하기 위해 gp91에 대한 항체 이용; 2) gp91 양성 세포를 분류하고 PCR 앰플리콘을 시퀀싱하여 보정을 입증함; 3) 14-17d 분화된 골수 세포로의 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA)의 자극을 이용하여 향상된 화학발광의 측정에 의한 $O2^-$ 생성의 시험관내 작용성 연구; 4) 14-17d 분화된 골수 세포로의 PMA 자극 후 디하이드로호드아민 123(DHR) 형광 프로브를 사용한 $O2^-$ 생성의 작용성 연구의 시험관내 FACS 분석; 5) 반고체 아가로스에서 분화된 골수 콜로니의 PMA 자극 후 니트로블루 테트라졸륨(NBT)으로부터의 환원된 포르마잔 형성에서 과산화물 $O2^-$ 생성의 시험관내 작용성 연구; 및 6) PMA 자극 후 (DHR) 형광 프로브를 사용하여, SCID 마우스에서 생착된 HSC로부터 회수된 분화된 골수의 과산화물 $O2^-$ 생성의 시험관내 작용성 FACS 연구.
- [0243] 출원인은 HSC 배양물 중 CD34 HSC에서 형질감염 및 유전자 편집에 매우 능숙하였다. 형질감염 조건, 및 해동 및 사이토카인과의 배양 후 형질감염 시점은 추가로 최적화될 수 있다. 유전자 편집이 검사될 수 있으며, 올리고머는 돌연변이 부위에서 뉴클레오티드 통합 효율을 검사하기 위해 Hind III 인식 뉴클레오티드를 통합하도록 변형될 수 있다. 올리고머 크기 및 농도 및 CRISPR 비율 및 농도는 효율적인 유전자 편집 및 Hind III 통합을 수득하기 위해 최적화될 수 있다. Hind III-인식 부위 통합은 돌연변이된 유전자 보정으로 보정될 수 있다. 해동 후 1 내지 5d 동안 HSC를 배양하여 효율적인 보정 효율을 갖게 하기 위해 완전한 증식 단계에 속하는 것이 필요하거나 유리할 수 있다. 출원인은 보정된 CGD-환자 HSC로부터 분화된 호중구에서 gp91 발현의 > 6% 복원을 이미 관찰하였기 때문에, 문제가 예측되지 않는다.
- [0244] 임상 해석을 위한 규모 확대 제조 과정: 적합한 CGD 환자로부터 자가 HSC가 수득될 수 있다. $4e8-4e9$ HSC가 각 개체에 대한 임상 시험에 필요할 것으로 예측된다. 규모 확대 절차 및 향후 임상 시험의 준비를 위한 세포 조작이 이어서 연구될 수 있다. 규모 확대는 $2e6$ HSC 내지 $1e8$ HSC로, 이어서 $1e8$ 내지 $1e9$ 또는 $4e9$ 로 시작될 수 있다. 형질감염된 세포는 시험관내에서 검정될 것이다. 돌연변이된 유전자는 이어서 규모 확대 cGMP-준수 제작 공정에서 보정될 수 있다. 보정 효율 및 시험관내에서의 작용성 복원이 이어서 평가될 수 있다. 이러한 보정된 환자 HSC의 생착을 평가하기 위해 이종이식 모델에서 SCID 마우스 이식 연구가 또한, 수행될 수 있다.
- [0245] 하기 실험이 유전자 보정을 확인하기 위해 이용될 수 있다: 1) gp91 발현의 복원을 검정하기 위해 gp91에 대한 항체 이용; 2) gp91 양성 세포를 분류하고 PCR 앰플리콘을 시퀀싱하여 보정을 입증함; 3) 14-17d 분화된 골수 세포로의 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA)의 자극을 이용하여 향상된 화학발광의 측정에 의한 $O2^-$ 생성의 시험관내 작용성 연구; 4) 14-17d 분화된 골수 세포로의 PMA 자극 후 디하이드로호드아민 123(DHR) 형광 프로브를 사용한 $O2^-$ 생성의 작용성 연구의 시험관내 FACS 분석; 5) 반고체 아가로스에서 분화된 골수 콜로니의 PMA 자극 후 니트로블루 테트라졸륨(NBT)으로부터의 환원된 포르마잔 형성에서 과산화물 $O2^-$ 생성의 시험관내 작용성 연구; 및 6) PMA 자극 후 (DHR) 형광 프로브를 사용하여, SCID 마우스에서 생착된 HSC로부터 회수된 분화된 골수의 과산화물 $O2^-$ 생성의 시험관내 작용성 FACS 연구.
- [0246] 본원에 기술된 방법은 유전자 질환에 대한 예시적인 플랫폼으로서 CGD를 치료하기 위해 돌연변이가 효율적으로 보정된 다수의 자가 HSC를 제조하기 위한 번역적 플랫폼 기법을 개발하는데 사용될 수 있다. 제안된 연구로부터의 결과는 제조 공정 개발, 분석적 방법론 및 생성물 특성규명을 포함하는 기술적 전이 패키지를 개발하고, 인간 임상 시험의 수행을 위한 IND 신청을 지지하기 위해 NIH cGMP 설비에서 IND-가능 연구로의 변경에 대한 요건을 평가하는 것을 알아내는데 이용될 것이다. 본 실시예에 기술된 방법은 또한, CGD 치료를 위한 임상적으로 관련된 수의 유전자-보정된 자가 HSC의 제조를 위한 확대가능한 공정을 개발하는데 이용될 수 있다. 이러한 프로젝트는 높은 생존력, 낮은 독성 및 유전자-보정에 대한 임상적 관련 수준을 갖는 돌연변이-보정된 자가 HSC를

생성할 것이다. 게다가, 이들 결과는 기타 유전자 질환 치료를 위해 개발된 접근법의 적용을 추가로 입증할 수 있으며, 별도의 추가 연구에 대한 근거가 된다.

[0247] **실시예 3**

[0248] 유전자 복구는 특이적 뉴클레아제 및 도너 DNA를 필요로 한다. 유전자 복구의 효율은 뉴클레아제의 표적화 부분(CRISPR에 있어서 gRNA) 및 도너 DNA의 서열 부분을 최적화시킴으로써 달성될 수 있다. gRNA를 제조하는 현 실시 방법은 전체(약 100mer) 또는 2개 세그먼트(듀플렉스)에서 gRNA를 합성하거나 gRNA를 시험관내 전사(캐핑 없음 및 테일링 없음)하는 것이다. gRNA를 제조하기 위한 시험관내 전사에 있어서, 현 실시 방법에는 캐핑이나 테일링이 존재하지 않는다(기술 지원으로부터 이전의 3개 슬라이드 참조).

[0249] 이러한 현 실시예는, gRNA가 캐핑되고 테일링되는 경우 시험관내 전사된 gRNA가 단일유전자 돌연변이 복구에서 더 높은 효율을 지닐 수 있으며(세포 생존력 및 증식 향상으로 인해), 도너 단일-가닥 DNA 올리고머는 올리고 및 gRNA가 게놈 DNA 서열의 동일한 측면에 상보적인 경우 더 높은 복구 효율을 발생시킬 수 있음을 입증한다.

[0250] 복구를 위해 첫 번째로 선택된 단일유전자 돌연변이는 gp91phox 결핍된 Exon 7 c.676C>T으로서, gp91phox 결핍된 CGD의 특정한 X-연결된 형태에서 발생하여, 돌연변이로 인한 정지 코돈을 유도한다. 복구를 위해 두 번째로 선택된 단일유전자 돌연변이는 IL2 수용체 γ 사슬에서 인트론 7 스플라이스 부위로서, G에서 A로의 돌연변이 (c.924+1G>A)에서 발생한다.

[0251] 상이한 돌연변이를 갖는 두 명의 환자로부터의 EBV-형질전환된 환자 B 세포(B-LCL)를 사용하였다. 각 질병에 있어서, B 세포는 x-연결된 gp91^{phox} 유전자에서 단일유전자 돌연변이를 가지며, 이는 gp91 발현을 유도하지 않는다. IL2 수용체 감마쇄 돌연변이와 함께 x-연결된 심한 복합 면역결핍은 IL2 수용체 감마쇄 발현을 일으키지 않는다. 성공적인 유전자 복구는 gp91 및 IL2Rgc 발현의 복원으로 이어질 것이다.

[0252] 달리 명시되지 않는 한 mMESSAGE mMACHINE® T7 ULTRA 전사 키트(T7 Ultra)를 사용하였다. 달리 명시되지 않는 한, 키트에 의해 제공된 프로토콜에 따른다. 테일 캐핑의 효과 연구에 있어서, TranscriptAid T7 고수율 전사 키트(TranscriptAid)를 사용하였다. 캐핑이 없으며, 폴리 A가 첨가되는 경우, 키트로부터의 프로토콜에 따른다. 캐핑에 있어서, 4:1 ARCA:GTP를 사용하였다. 폴리 A에 있어서, mMESSAGE mMACHINE® T7 ULTRA 전사 키트로부터의 폴리 A 첨가를 위한 시약을 사용하였다.

[0253] Cas9 mRNA를 선형화된 cas 9 플라스미드를 사용하여 제조하였다. gRNA RNA는 gRNA 플라스미드로부터의 PCR 앰플리콘을 사용하여 제조하였다. 표적 부위에 상보적인 100mer 크기의 단일 가닥 DNA 올리고는 IDT로부터 구입하였다.

[0254] Gp91-gRNA 표적화 서열: CACCCAGATGAATTGTACGTNGG (SEQ ID NO:39) (적색은 돌연변이된 뉴클레오티드이다).

[0255] 하기 프라이머, 올리고 및 서열을 본 실시예의 실험에 사용하였다:

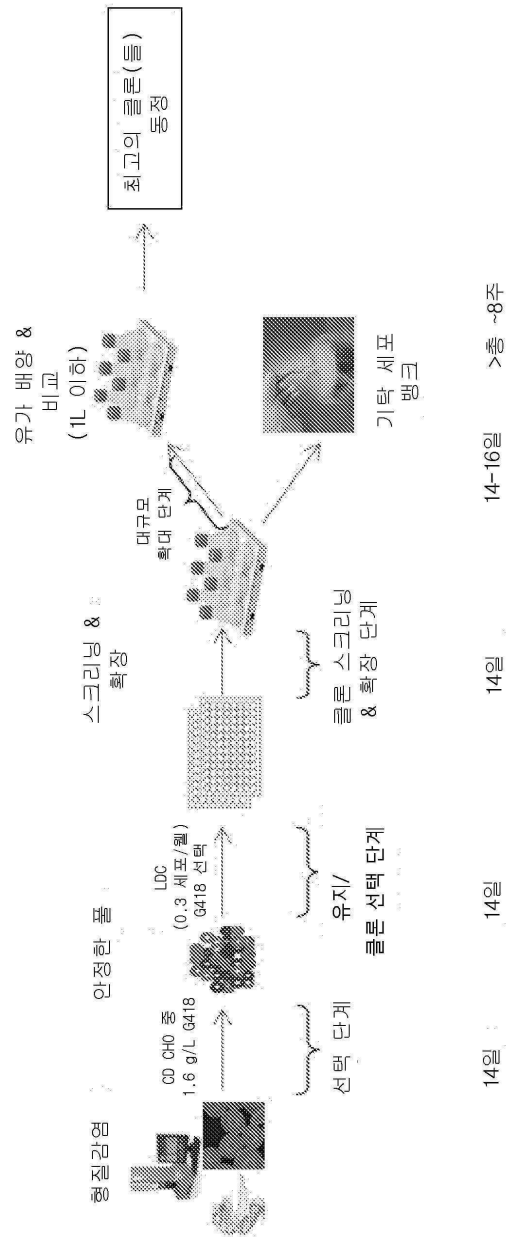
gp91-gRNA 주형을 위한 전방향 프라이머	5-TTAATACGACTCACTATAGGCACCCAGATGAATT GTACGT-3'	SEQ ID NO.40
gp91-gRNA 주형을 위한 역방향 프라이머	5'-aaaagcaccgactcggtgcc-3'	SEQ ID NO.41
gp91-gRNA 표적과 동일한 듀플렉스에 상보적인 올리고 서열	5-CTATTACTAAATGATCTGGACTTACATTTTTCACC CAGACGAATTGTACGTGGGCAGACCCGAGAGAGTT TGGCTGTGCATAATATAACAGTTTGTGAAC-3	SEQ ID NO.42
gp91-gRNA 표적에 반대되는 듀플렉스에 상보적인 올리고 서열	5-TGTTATATTATGCACAGCCAACTCTCTGCGGTCT GCCCACGTACAATTCGTCTGGGTGAAAAATGTAAG TCCAGATCATTTAGTAATAGGAAATTAAAT-3	SEQ ID NO.43
X-SCID-gRNA 표적화 서열	5' TTCTCATCGAAAAAGTTCCCG 3' (밑줄은 돌연변이된 뉴클레오타이드임)	SEQ ID NO.44
X-SCID-gRNA 주형을 위한 전방향 프라이머	5-TTAATACGACTCACTATAGGTTCTCATCGAAAAAG TTCCCG-3	SEQ ID NO.45
X-SCID-gRNA 주형을 위한 역방향 프라이머	5'-aaaagcaccgactcggtgcc-3'	SEQ ID NO.46
X-SCID-gRNA 표적과 동일한 듀플렉스에 상보적인 올리고 서열	5'-GTTGGCAGTTGATAGACTGCAGCATGCTTATGAC AGCGTTCTCACCGAAAAGTTCCCGTGGTATTTCAGTA ACAAGATCCTCTAGGTTCTTCAGGGTGGGA-3'	SEQ ID NO.47
X-SCID-gRNA 표적에 반대되는 듀플렉스에 상보적인 올리고 서열	5-TCCCACCCTGAAGAACCTAGAGGATCTTGTTACT GAATACCGGGAAGTTTTCGGTGAGAACGCTGTC ATAAGCATGCTGCAGTCTATCAACTGCCAAC-3	SEQ ID NO.48

[0256]

[0257] 본원에 기술되고 청구된 모든 조성물 및 방법은 본 명세서에 비추어 과도한 실험 없이 이루어지고 실시될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 구체예로 기술되었으나, 본 발명의 개념, 사상 및 범위에서 벗어남이 없이 변형이 본 방법 및 본원에 기술된 방법의 단계 또는 단계의 순서에 적용될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 더욱 특히, 화학적 및 생리학적 둘 모두에 관련된 특정 작용제가 본원에 기술된 작용제를 대체하면서 동일하거나 유사한 결과가 달성될 수 있음이 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 모든 이러한 유사한 치환 및 변형은 첨부된 청구의 범위에 규정된 바와 같이 본 발명의 사상, 범위 및 개념에 해당되는 것으로 간주된다.

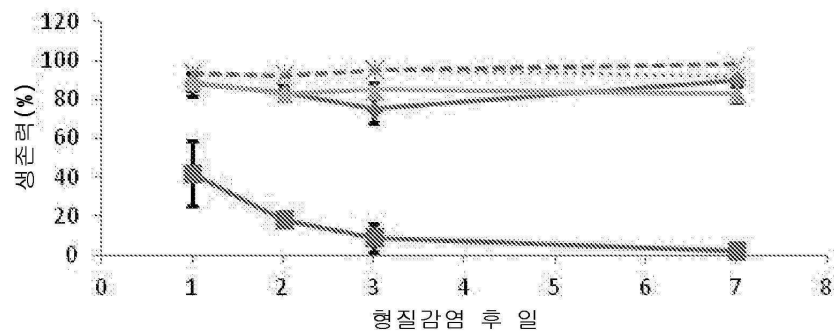
도면

도면1

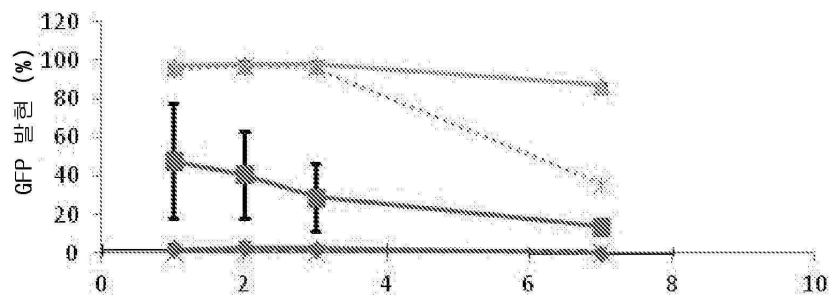


도면2

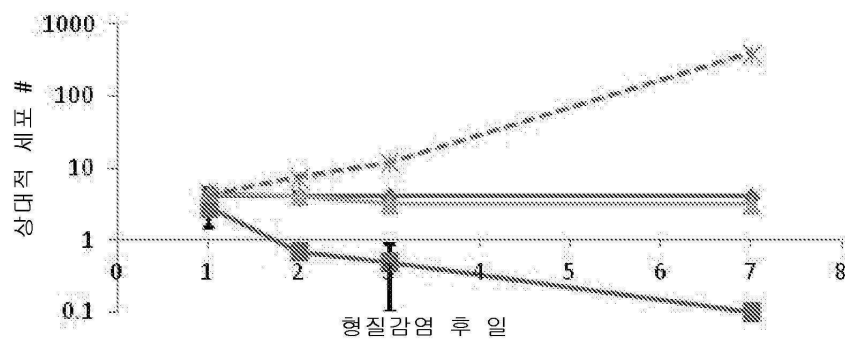
도 2a



도 2b

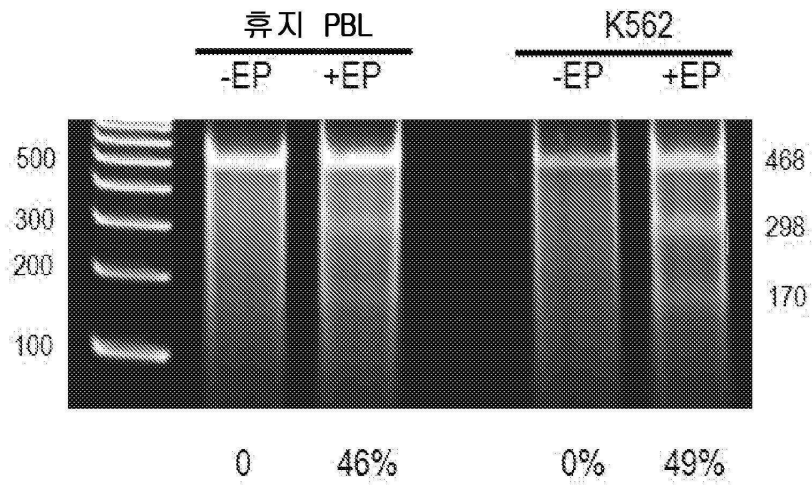


도 2c

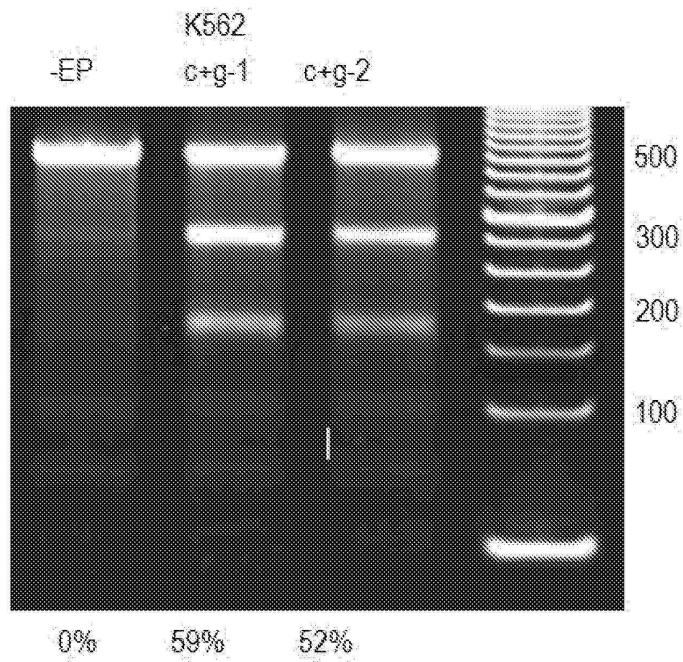


PBL-대조군 PBL-플라스미드-GFP PBLmRNA-GFP
 K562-대조군 K562플라스미드-GFP

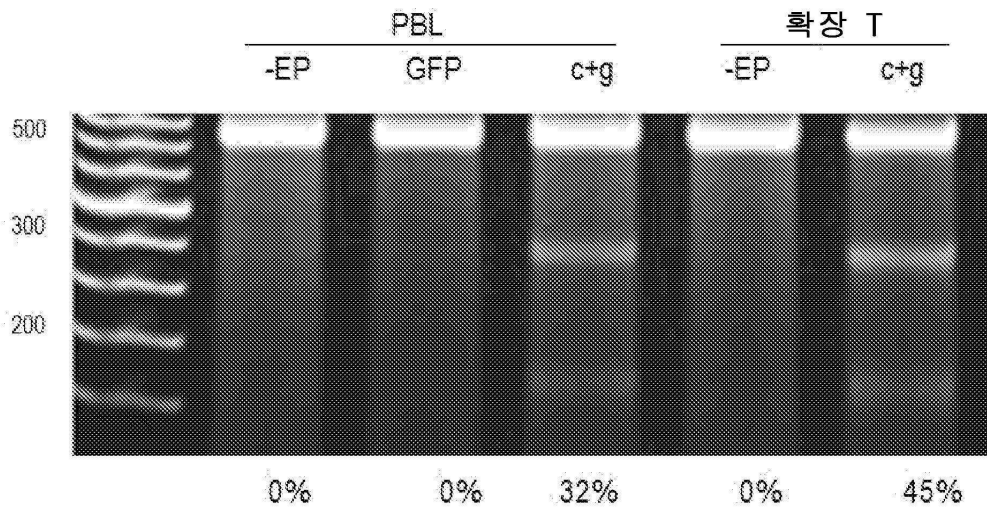
도면3



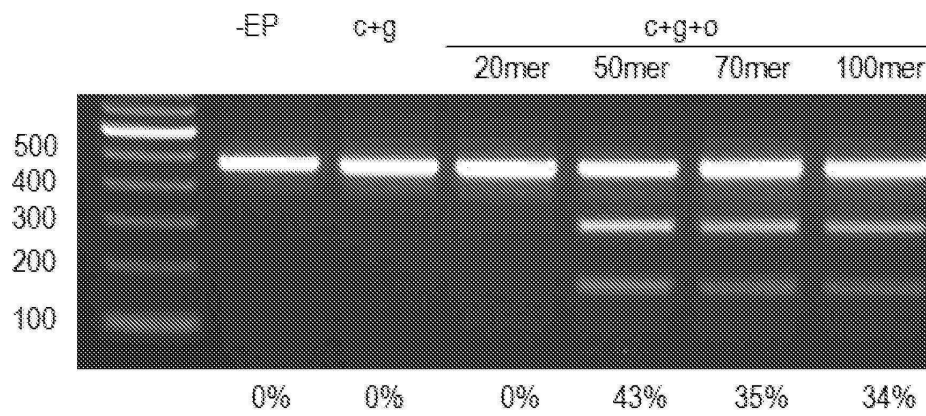
도면4



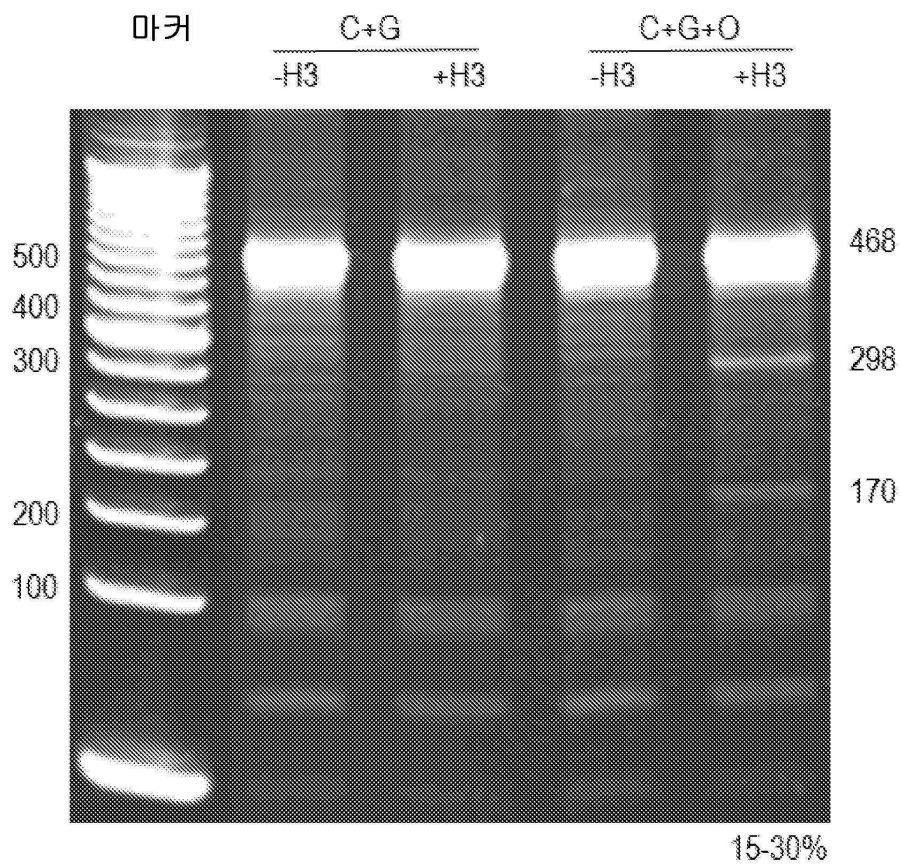
도면5



도면6

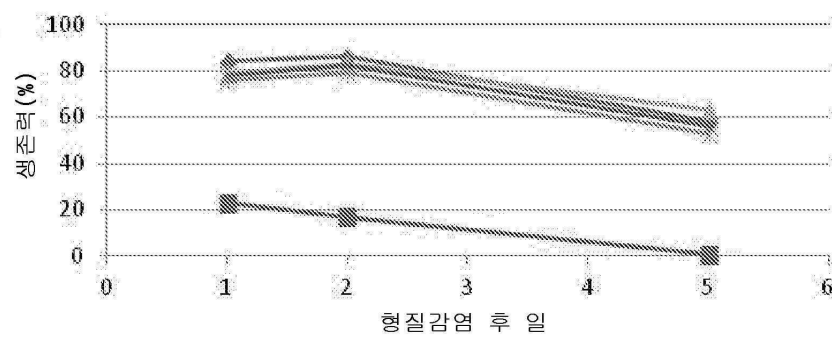


도면7

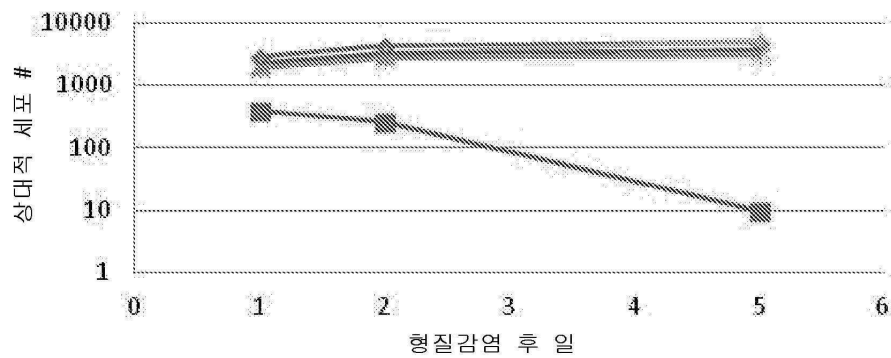


도면8

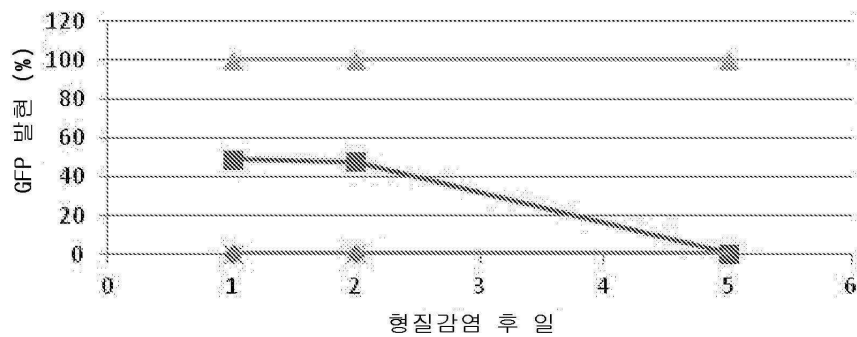
도 8a



도 8b

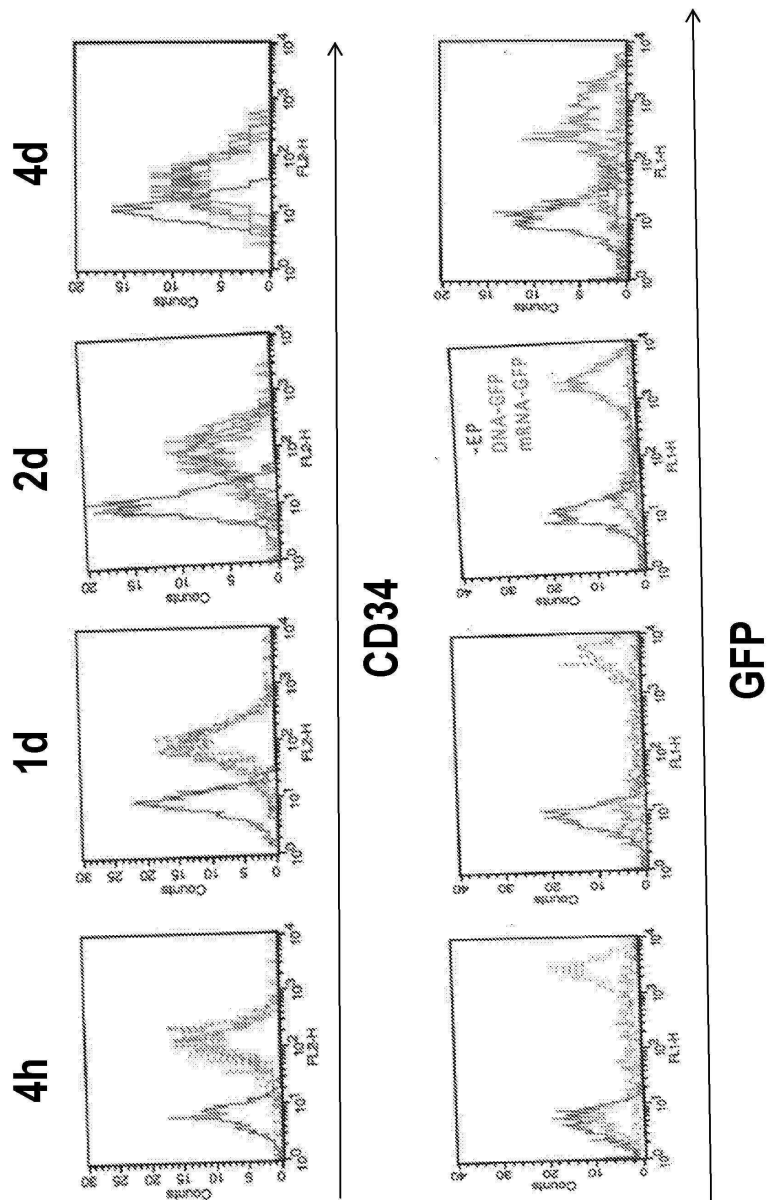


도 8c

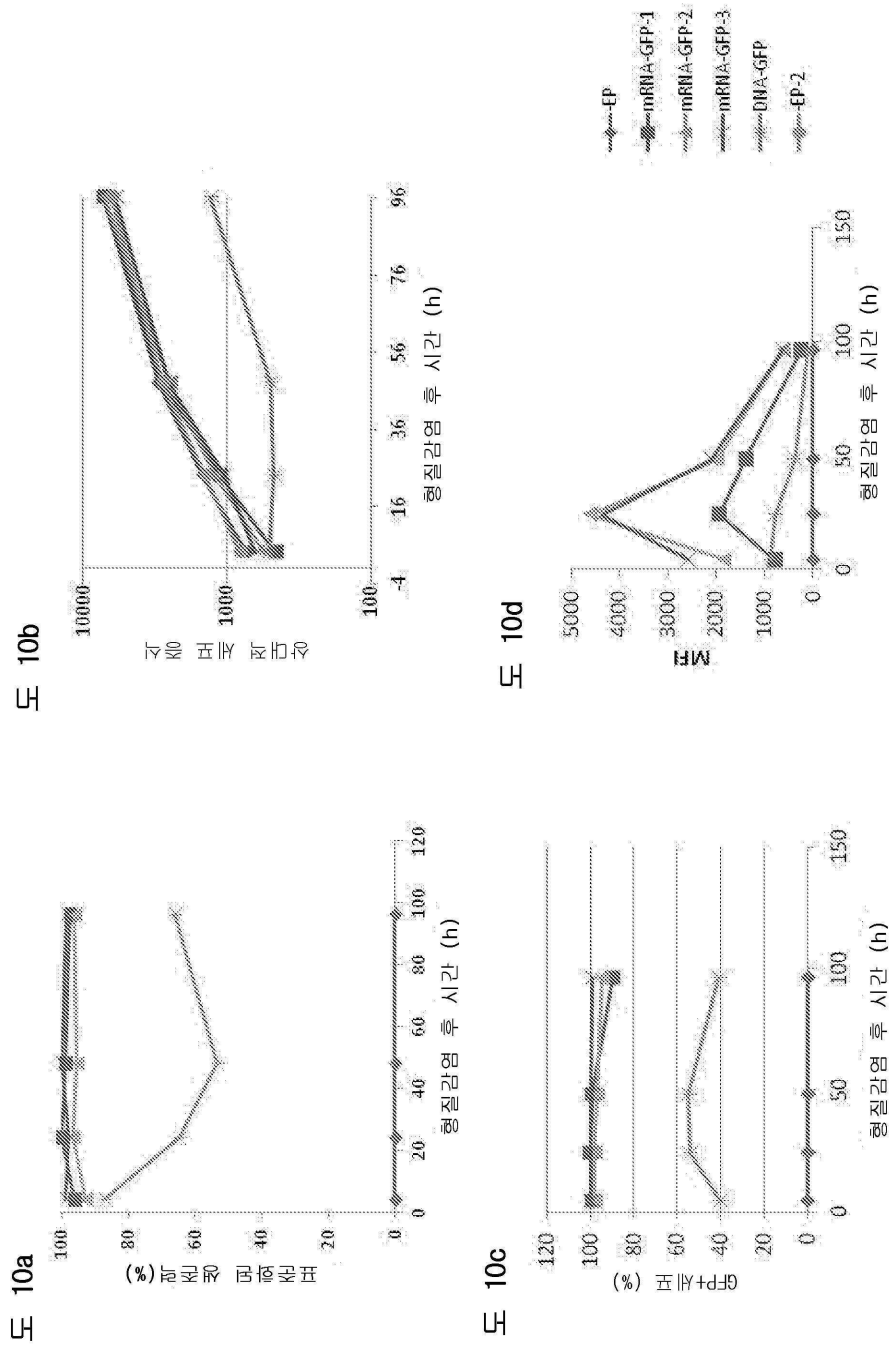


◆-EP ■-플라스미드 GFP ▲-mRNA-GFP
 — Cas9+gRNA — cas9+gRNA+Olig

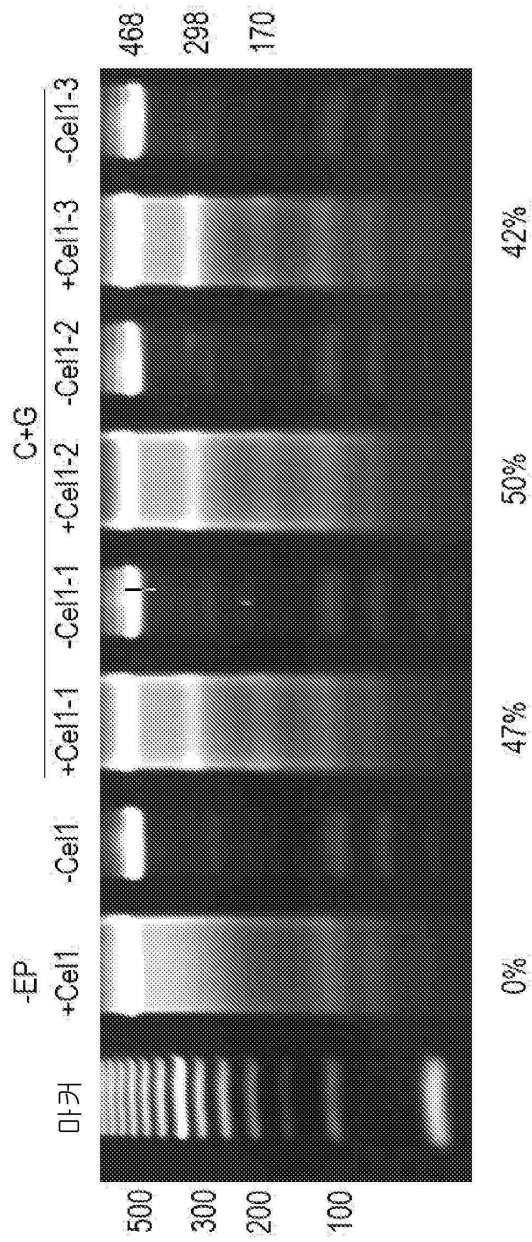
도면9



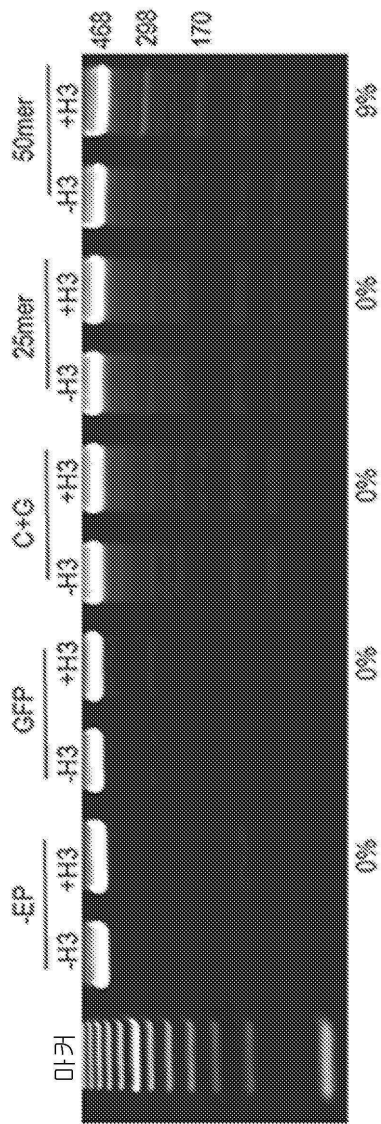
도면10



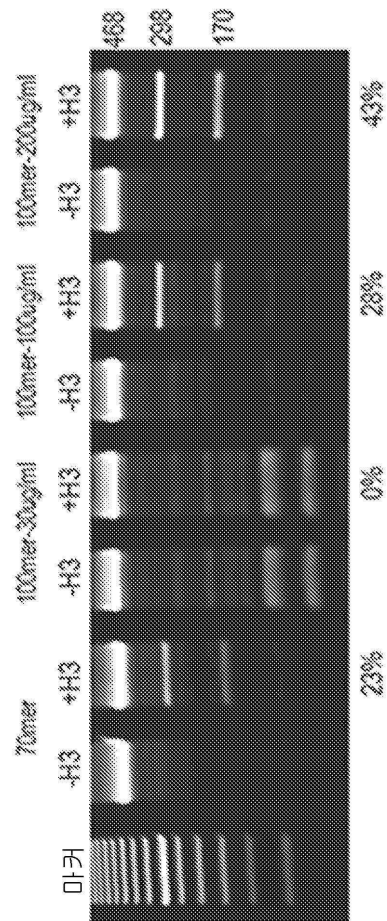
도면12



도면13

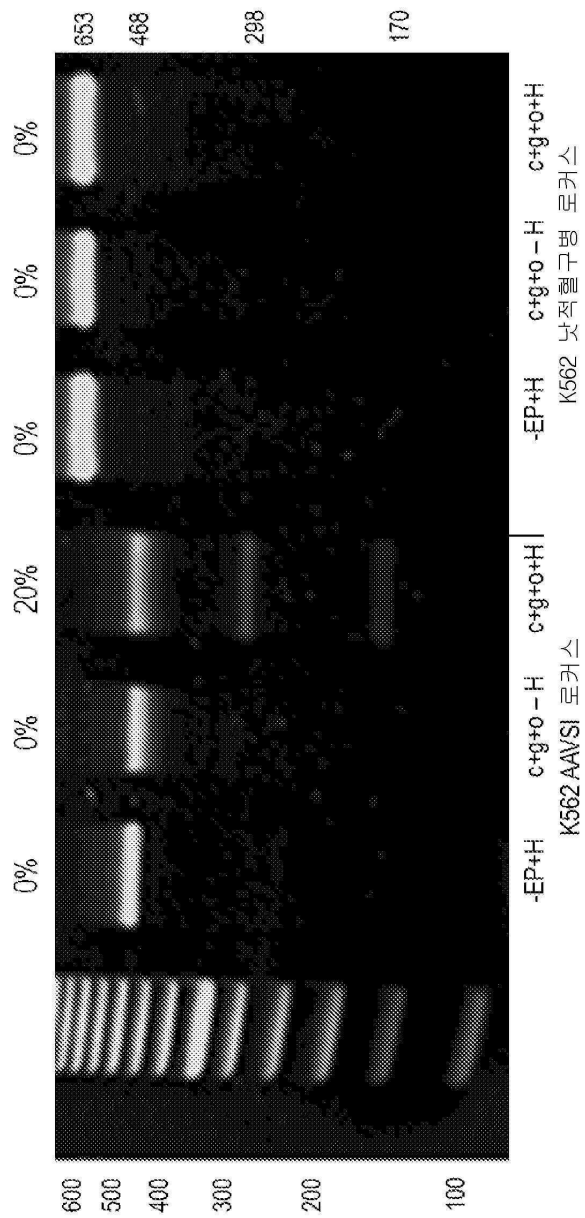


도 13a

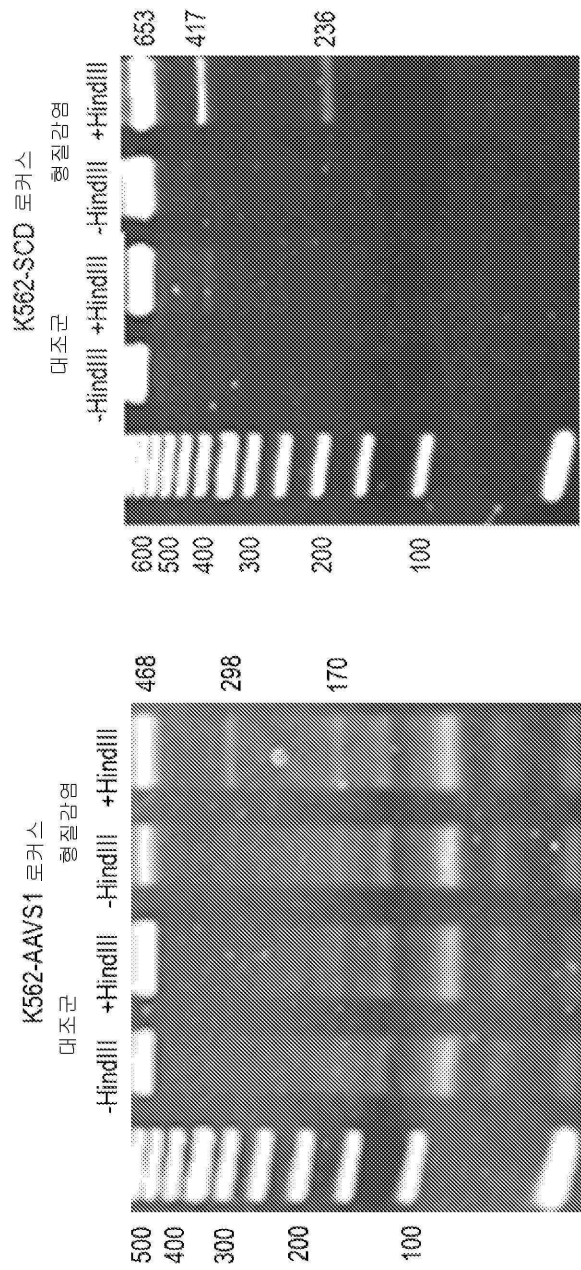


도 13b

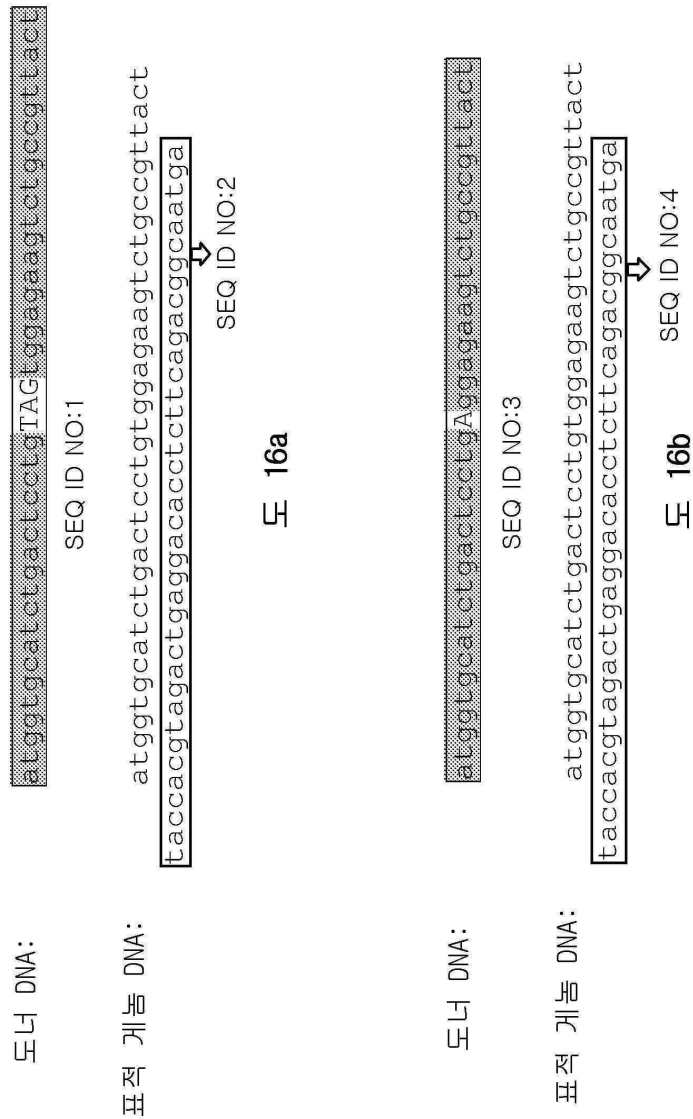
도면14



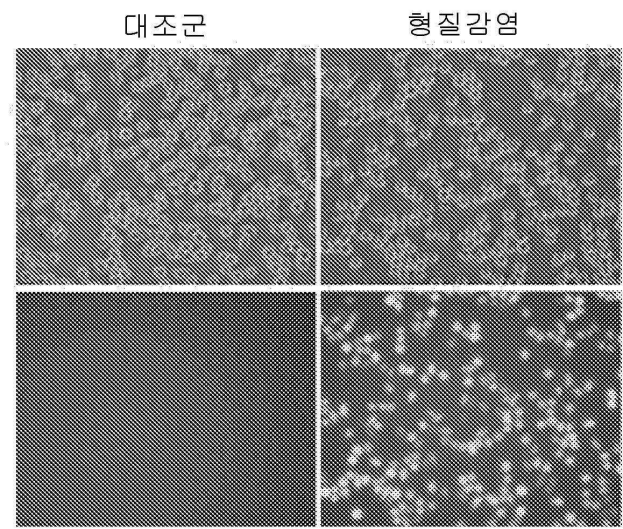
도면15



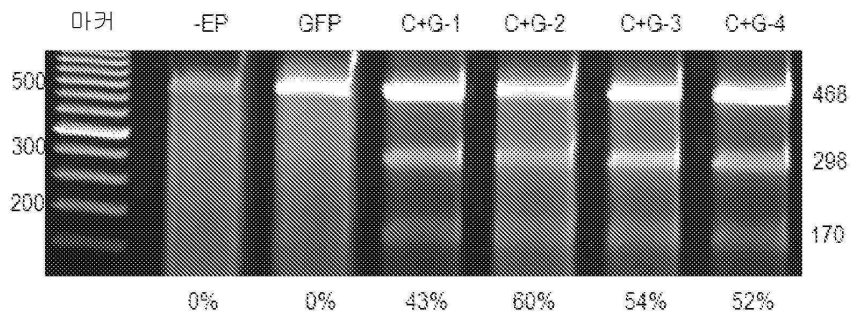
도면16



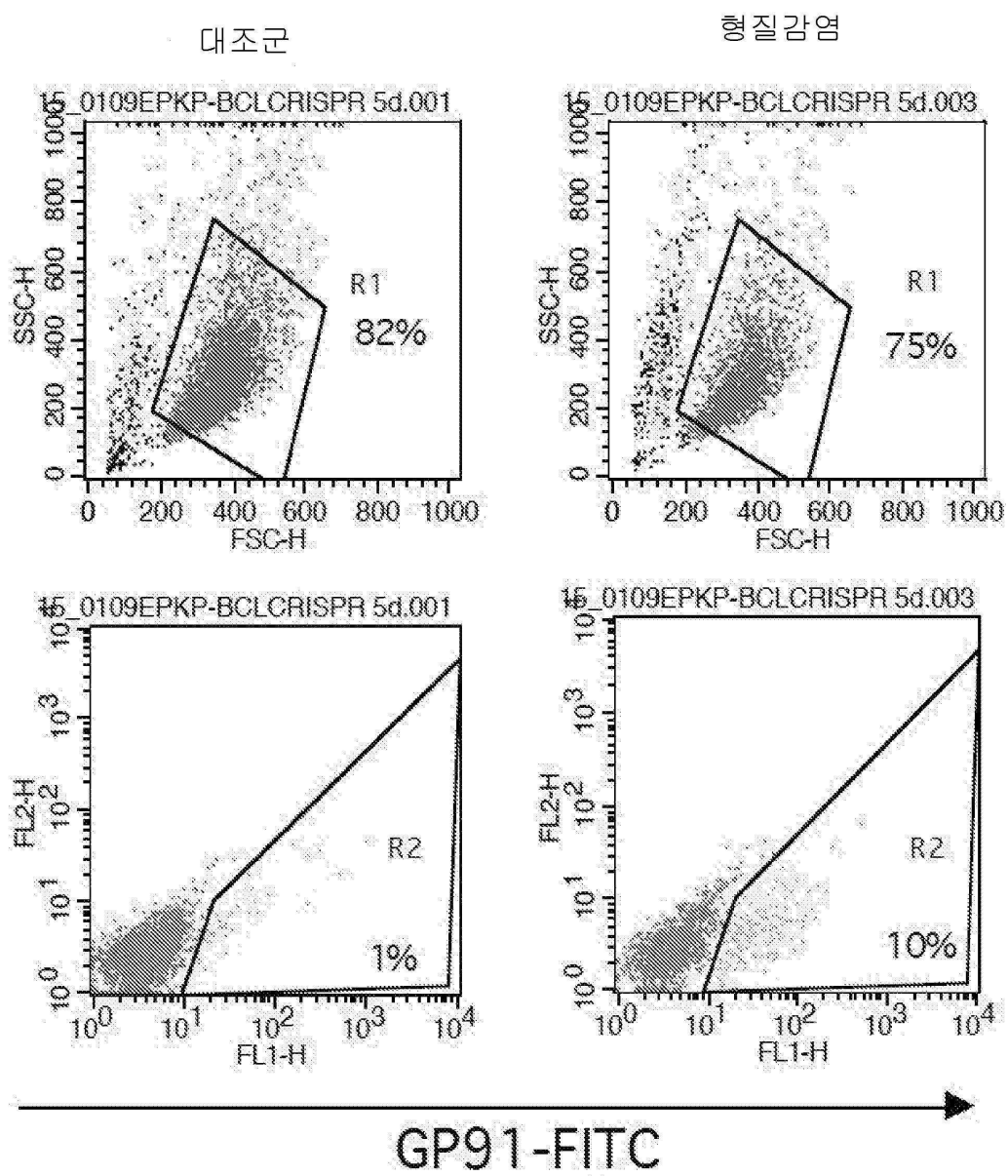
도면17



도면18

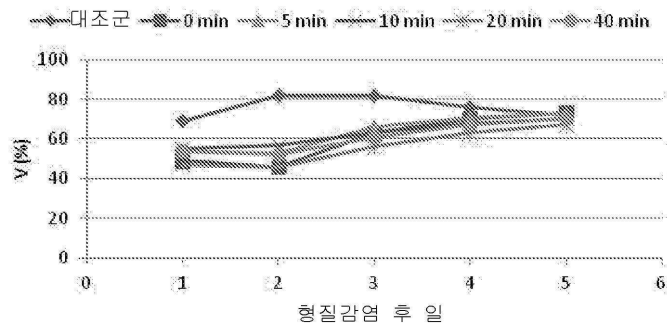


도면19

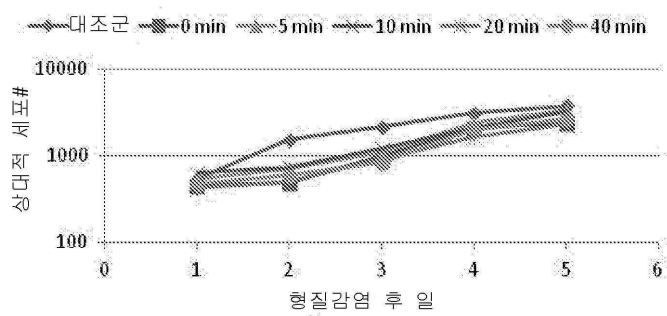


도면20

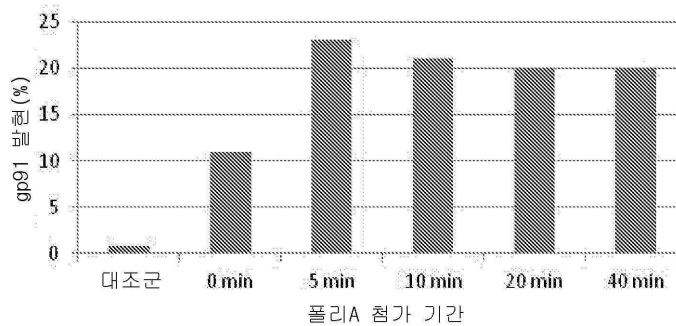
도 20a



도 20b

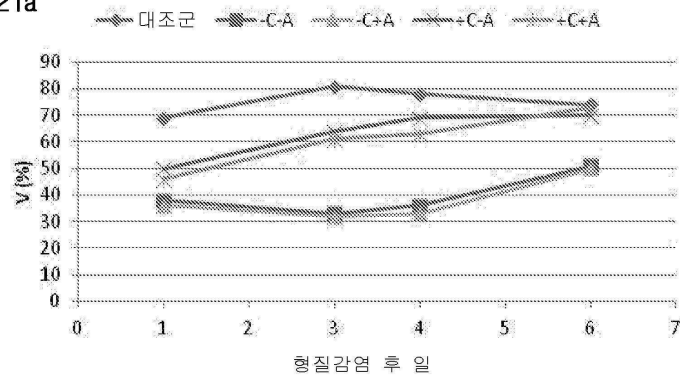


도 20c

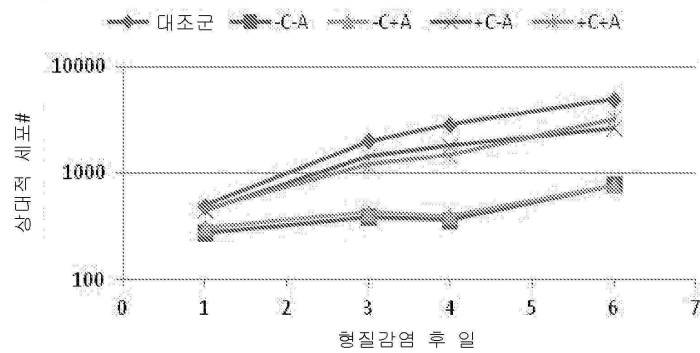


도면21

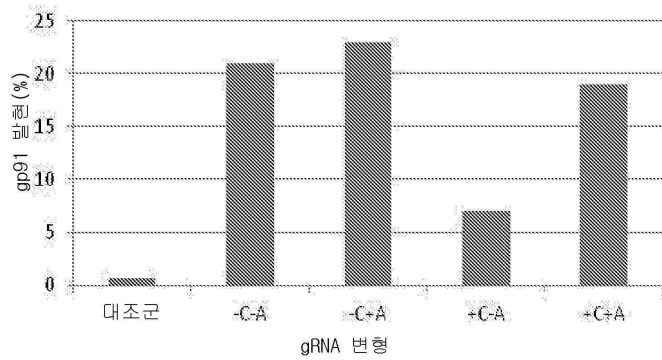
도 21a



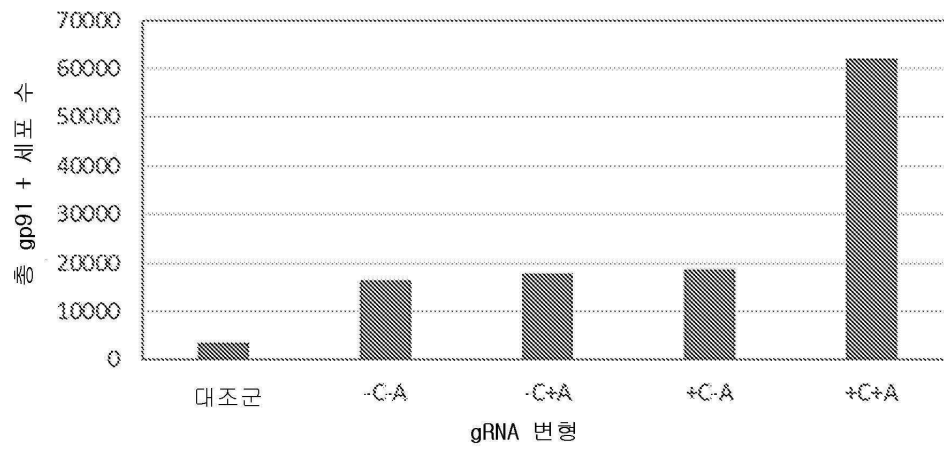
도 21b



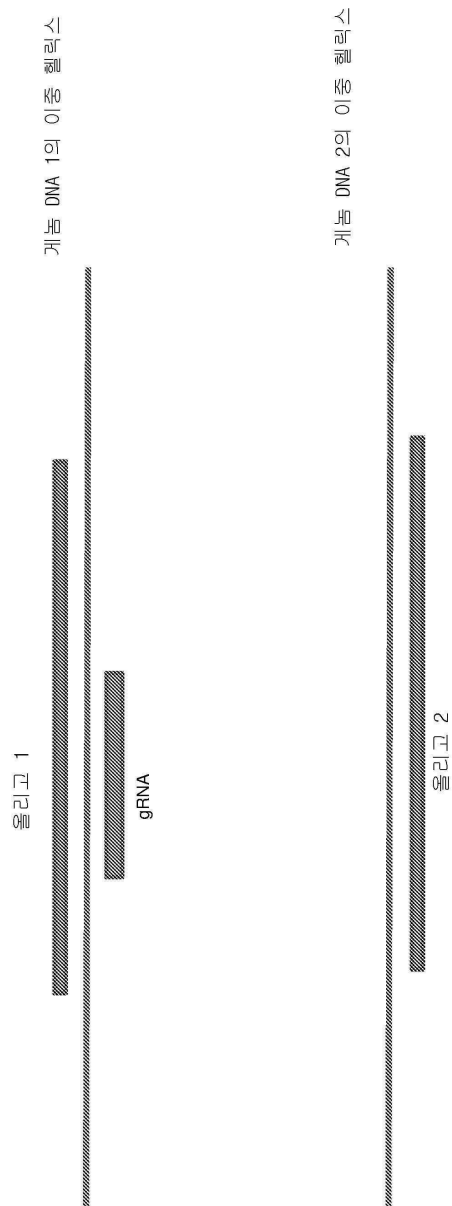
도 21c



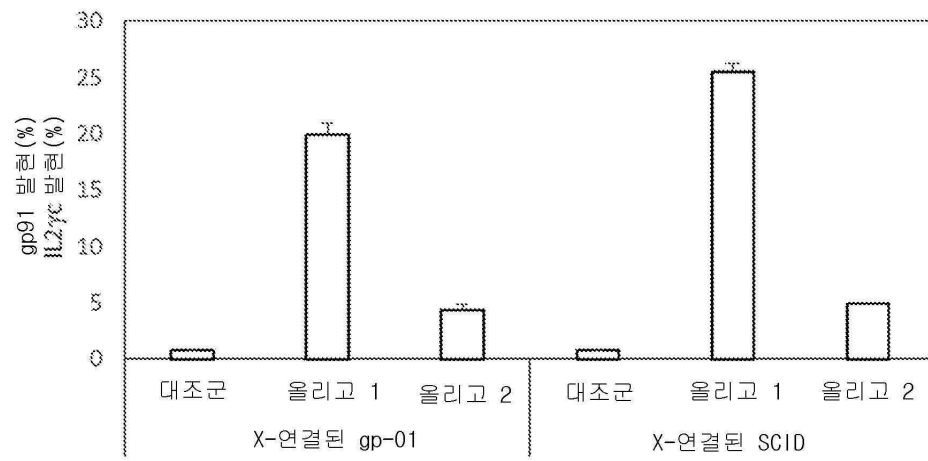
도면22



도면23

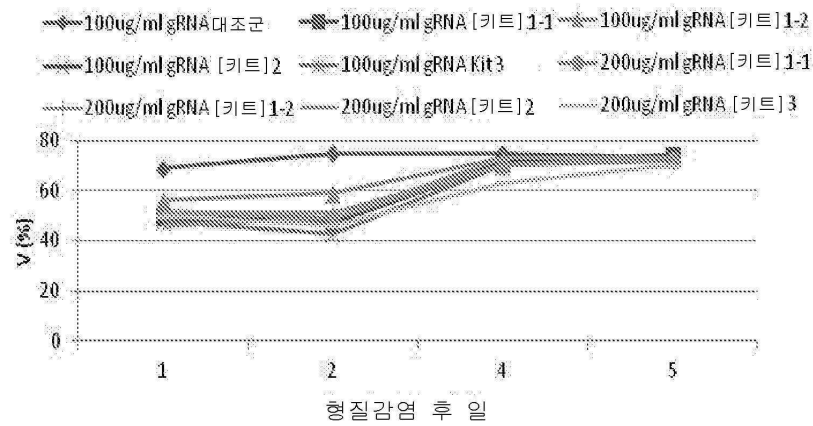


도면24

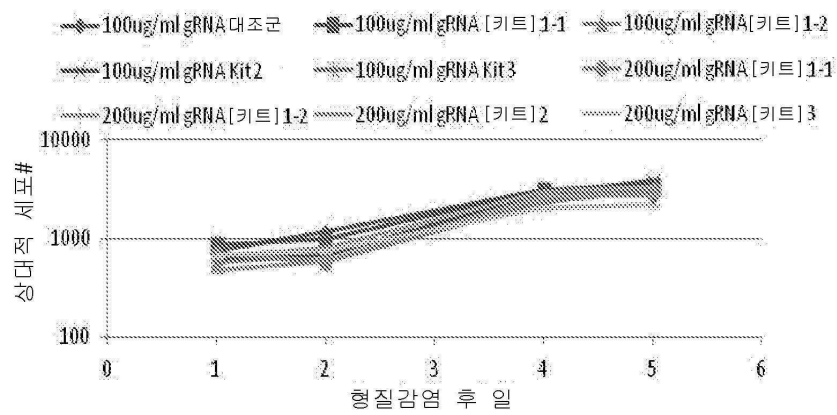


도면25

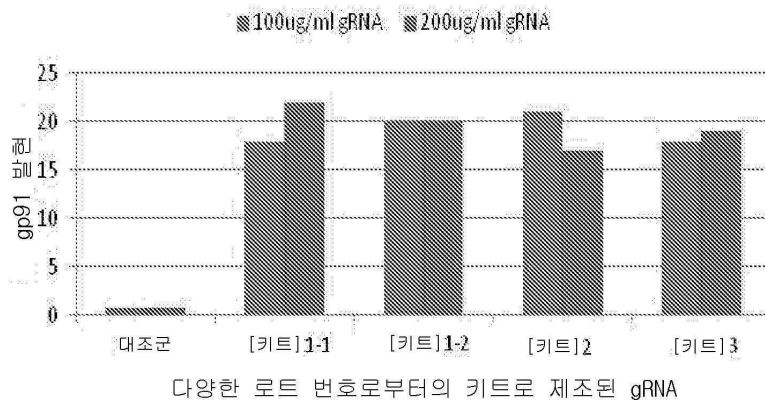
도 25a



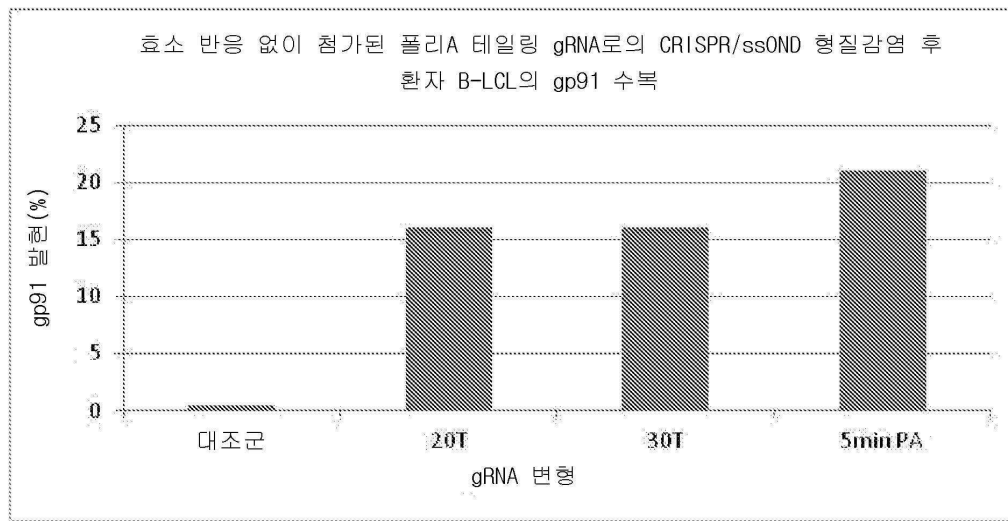
도 25b



도 25c



도면26



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> MAXCYTE, INC.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR MODIFYING GENOMIC DNA

<130> MAXC.P0041WO

<140> PCT/IB2017/054446

<141> 2017-07-21

<150> 62/365,126

<151> 2016-07-21

<160> 48

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 1

atggtgcatc tgactcctgt agtggagaag tctgccgta ct

42

<210> 2

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 2

atggtgcatc tgactcctgt ggagaagtct gccgttactt accacgtaga ctgaggacac 60

ctcttcagac ggcaatga 78

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 3

atggtgcatc tgactcctga ggagaagtct gccgttact 39

<210> 4

<211> 78

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 4

atggtgcatc tgactcctgt ggagaagtct gccgttactt accacgtaga ctgaggacac 60

ctcttcagac ggcaatga 78

<210> 5

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 5

ttaatacgac tcactatagg caccagatg aattgtacgt 40

<210> 6

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 6

tttttttttt tttttttttt aaaagcaccg actcggtgcc 40
 <210> 7
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 7
 tttttttttt tttttttttt tttttttttt aaaagcaccg actcggtgcc 50
 <210> 8
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(8)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 8
 gacnnnnngt c 11
 <210> 9
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <220><221> misc_feature

 <222> (1)..(1)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(7)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 9

nacnnnngta ycn	13
<210> 10	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<220><221> misc_feature	
<222> (4)..(9)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 10	
cgannnnnnt gc	12
<210> 11	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<220><221> misc_feature	
<222> (4)..(8)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 11	
gccnnnnngg c	11
<210> 12	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<220><221> misc_feature	
<222> (4)..(7)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 12	
gatnnnnatc	10
<210> 13	
<211> 11	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(9)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 13
 ccnnnnnnng g 11
 <210> 14
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(8)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 14
 gcannnnntg c 11

 <210> 15
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(9)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 15
 ccannnnnnt gg 12
 <210> 16
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <220><221> misc_feature

<222> (4)..(9)

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

<400> 16

gacnnnnnng tc

12

<210> 17

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(8)

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

<400> 17

cctnnnnnag g

11

<210> 18

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<220><221> misc_feature

<222> (6)..(10)

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

<400> 18

gagtcnnnnn

10

<210> 19

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(7)

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

<400> 19

caynnnnrntg	10
<210> 20	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<220><221> misc_feature	
<222> (3)..(9)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 20	
gcnnnnnnng c	11
<210> 21	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<220><221> misc_feature	
<222> (4)..(8)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 21	
ccannnnntg g	11
<210> 22	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Nucleic Acid	
<220><221> misc_feature	
<222> (4)..(7)	
<223> n is a, c, g, or t	
<400> 22	
gacnnnnngtc	10
<210> 23	
<211> 13	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 23
 ggccnnnnng gcc 13
 <210> 24
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(12)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 24
 ccannnnnnn nntgg 15
 <210> 25
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(7)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 25
 gaannnnnttc 10
 <210> 26
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polypeptide
 <400> 26

Met Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp

1 5 10 15

Gly Lys Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu

20 25 30

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp

35 40 45

Leu Ser Thr Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His

50 55 60

Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp

65 70 75 80

Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala Thr Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys

85 90 95

Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val

100 105 110

Cys Val Leu Ala His His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Pro Val Gln

115 120 125

Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His

130 135 140

Lys Tyr His

145

<210> 27

<211> 570

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polypeptide

<400> 27

Met Gly Asn Trp Ala Val Asn Glu Gly Leu Ser Ile Phe Val Ile Leu

1 5 10 15

Val Trp Leu Gly Leu Asn Val Phe Leu Phe Val Trp Tyr Tyr Arg Val

20 25 30

Tyr Asp Ile Pro Pro Lys Phe Phe Tyr Thr Arg Lys Leu Leu Gly Ser

35 40 45
 Ala Leu Ala Leu Ala Arg Ala Pro Ala Ala Cys Leu Asn Phe Asn Cys
 50 55 60
 Met Leu Ile Leu Leu Pro Val Cys Arg Asn Leu Leu Ser Phe Leu Arg
 65 70 75 80
 Gly Ser Ser Ala Cys Cys Ser Thr Arg Val Arg Arg Gln Leu Asp Arg
 85 90 95
 Asn Leu Thr Phe His Lys Met Val Ala Trp Met Ile Ala Leu His Ser
 100 105 110

 Ala Ile His Thr Ile Ala His Leu Phe Asn Val Glu Trp Cys Val Asn
 115 120 125
 Ala Arg Val Asn Asn Ser Asp Pro Tyr Ser Val Ala Leu Ser Glu Leu
 130 135 140
 Gly Asp Arg Gln Asn Glu Ser Tyr Leu Asn Phe Ala Arg Lys Arg Ile
 145 150 155 160
 Lys Asn Pro Glu Gly Gly Leu Tyr Leu Ala Val Thr Leu Leu Ala Gly
 165 170 175

 Ile Thr Gly Val Val Ile Thr Leu Cys Leu Ile Leu Ile Ile Thr Ser
 180 185 190
 Ser Thr Lys Thr Ile Arg Arg Ser Tyr Phe Glu Val Phe Trp Tyr Thr
 195 200 205
 His His Leu Phe Val Ile Phe Phe Ile Gly Leu Ala Ile His Gly Ala
 210 215 220
 Glu Arg Ile Val Arg Gly Gln Thr Ala Glu Ser Leu Ala Val His Asn
 225 230 235 240

 Ile Thr Val Cys Glu Gln Lys Ile Ser Glu Trp Gly Lys Ile Lys Glu
 245 250 255
 Cys Pro Ile Pro Gln Phe Ala Gly Asn Pro Pro Met Thr Trp Lys Trp
 260 265 270
 Ile Val Gly Pro Met Phe Leu Tyr Leu Cys Glu Arg Leu Val Arg Phe
 275 280 285

Trp Arg Ser Gln Gln Lys Val Val Ile Thr Lys Val Val Thr His Pro
290 295 300

Phe Lys Thr Ile Glu Leu Gln Met Lys Lys Lys Gly Phe Lys Met Glu
305 310 315 320

Val Gly Gln Tyr Ile Phe Val Lys Cys Pro Lys Val Ser Lys Leu Glu
325 330 335

Trp His Pro Phe Thr Leu Thr Ser Ala Pro Glu Glu Asp Phe Phe Ser
340 345 350

Ile His Ile Arg Ile Val Gly Asp Trp Thr Glu Gly Leu Phe Asn Ala
355 360 365

Cys Gly Cys Asp Lys Gln Glu Phe Gln Asp Ala Trp Lys Leu Pro Lys
370 375 380

Ile Ala Val Asp Gly Pro Phe Gly Thr Ala Ser Glu Asp Val Phe Ser
385 390 395 400

Tyr Glu Val Val Met Leu Val Gly Ala Gly Ile Gly Val Thr Pro Phe
405 410 415

Ala Ser Ile Leu Lys Ser Val Trp Tyr Lys Tyr Cys Asn Asn Ala Thr
420 425 430

Asn Leu Lys Leu Lys Lys Ile Tyr Phe Tyr Trp Leu Cys Arg Asp Thr
435 440 445

His Ala Phe Glu Trp Phe Ala Asp Leu Leu Gln Leu Leu Glu Ser Gln
450 455 460

Met Gln Glu Arg Asn Asn Ala Gly Phe Leu Ser Tyr Asn Ile Tyr Leu
465 470 475 480

Thr Gly Trp Asp Glu Ser Gln Ala Asn His Phe Ala Val His His Asp
485 490 495

Glu Glu Lys Asp Val Ile Thr Gly Leu Lys Gln Lys Thr Leu Tyr Gly
500 505 510

Arg Pro Asn Trp Asp Asn Glu Phe Lys Thr Ile Ala Ser Gln His Pro
515 520 525

Asn Thr Arg Ile Gly Val Phe Leu Cys Gly Pro Glu Ala Leu Ala Glu

530 535 540
 Thr Leu Ser Lys Gln Ser Ile Ser Asn Ser Glu Ser Gly Pro Arg Gly
 545 550 555 560

Val His Phe Ile Phe Asn Lys Glu Asn Phe
 565 570

<210> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 28

ggggccacta gggacaggat tgg 23

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 29

ttcgggtcac ctctcactcc 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 30

ggctccatcg taagcaaacc 20

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> n is a, c, g, or t
 <400> 31
 ttctctatta ctaaagatc ngg 23
 <210> 32
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <220><221> misc_feature

 <222> (21)..(21)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 32
 caccagatg aattgtacgt ngg 23
 <210> 33
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <220><221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 33
 tgcccacgta caattcatct ngg 23
 <210> 34
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <220><
 221> misc_feature
 <222> (21)..(21)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 34
 agtcagatc atttagtaat ngg 23

<210> 35
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 35
 acatttttca cccagatgaa ttgtacgtgg gcagaccgca gagagtttgg c 51
 <210> 36
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 36
 ctattactaa atgatctgga cttacatttt tcaccagac gaattgtacg tgggcagacc 60
 gcagagagtt tggctgtgca taatataaca gtttgtgaa 99
 <210> 37
 <211> 146
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 37
 tcttttaata aaacaattta atttcctatt actaaatgat ctggacttac atttttcacc 60
 cagatgaatt gtacgtgggc agaccgcaga gagtttggct gtgcataata taacagtttg 120
 tgaacaaaaa atctcagaat ggggaa 146
 <210> 38
 <211> 196
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 38
 cagagcactt aaaatatatg cagaatcttt taataaaaca atttaatttc ctattactaa 60
 atgatctgga cttacatttt tcaccagat gaattgtacg tgggcagacc gcagagagtt 120
 tggctgtgca taatataaca gtttgtgaac aaaaaatctc agaatgggga aaaataaagg 180

aatgcccaat ccctca 196

<210> 39

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<220><221> misc_feature

<222> (21)..(21)

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

<400> 39

caccagatg aattgtacgt ngg 23

<210> 40

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 40

ttaatacgac tcactatagg caccagatg aattgtacgt 40

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 41

aaaagcaccg actcgggtgcc 20

<210> 42

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 42

ctattactaa atgatctgga cttacatfff tcaccagac gaattgtacg tgggcagacc 60

gcagagagtt tggctgtgca taatataaca gtttgtgaac 100

<210> 43
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 43
 tgttatatta tgcacagcca aactctctgc ggtctgcca cgtacaattc gtctgggtga 60
 aaaatgtaag tccagatcat ttagtaatag gaaattaaat 100
 <210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 44
 ttctcatcga aaagttcccg 20
 <210> 45
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 45
 ttaatacgac tcactatagg ttctcatcga aaagttcccg 40
 <210> 46
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid
 <400> 46
 aaaagcaccg actcggtgcc 20
 <210> 47
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 47

gttggcagtt gatagactgc agcatgctta tgacagcgtt ctcaccgaaa agttcccgtg 60

gtattcagta acaagatcct ctaggttctt cagggtggga 100

<210> 48

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Nucleic Acid

<400> 48

tcccaccctg aagaacctag aggatcttgt tactgaatac cacgggaact tttcggtgag 60

aacgctgtca taagcatgct gcagtctatc aactgccaac 100