



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년05월28일  
(11) 등록번호 10-0833136  
(24) 등록일자 2008년05월22일

(51) Int. Cl.

C12N 15/85 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2003-7005885

(22) 출원일자 2003년04월28일

심사청구일자 2006년10월31일

번역문제출일자 2003년04월28일

(65) 공개번호 10-2003-0074614

(43) 공개일자 2003년09월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2001/045375

국제출원일자 2001년10월31일

(87) 국제공개번호 WO 2002/36789

국제공개일자 2002년05월09일

(30) 우선권주장

60/244,665 2000년10월31일 미국(US)

09/732,234 2000년12월07일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Nature Biotech., vol.15(9):859-865

Nucleic Acids Research, vol.27(17):e16

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 신원혜

(54) 진핵세포의 변형 방법

(57) 요약

진핵 세포에 있는 내인성 유전자 및 염색체 유전자좌를 상동성 재조합을 통해 표적화하고, 어떤 바람직한 방식으로 변형시키기 위해 거대 DNA 벡터를 엔지니어링 및 사용하는 방법이다. 다른 접근법에 의해 사용된 것들보다 더 큰 클로닝된 게놈 DNA의 단편으로부터 유래되어 LTVECs로 명명된, 진핵 세포에 대한 이들 거대 DNA 표적화 벡터는 진핵 세포에서 상동성 표적화를 수행하도록 의도된다. 또한 LTVEC가 원하는 내인성 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌(들)을 올바르게 표적화하고 변형시킨 진핵 세포의 검출을 위한 신속하고 편리한 방법은 물론이고 유전적 변형을 갖는 생물을 생성하기 위한 이들 세포의 사용이 제공된다.

(72) 발명자

**발렌주엘라데이빗앤.**

미국뉴욕주10598

요크타운하이츠오다노드라이브529

**프렌듀이데이빗**

미국뉴욕주10016뉴욕아파트먼트22

씨퍼스트애비뉴564

**얀코폴로스조지디.**

미국뉴욕주10598

요크타운하이츠밥티스트처치로드1519

(81) 지정국

국내특허 : 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아 헤르체고비나, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 벨라루스, 캐나다, 스위스, 중국, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 에스토니아, 스페인, 핀란드, 영국, 그루지야, 헝가리, 이스라엘, 아이슬랜드, 일본, 케냐, 키르키즈스탄, 북한, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 리베이라, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아공화국, 몽고, 말라위, 멕시코, 노르웨이, 뉴질랜드, 슬로베니아, 슬로바키아, 타지키스탄, 투르크멘, 터어키, 트리니아드토바고, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 폴란드, 포르투갈, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 아랍에미리트, 안티구와바부다, 코스타리카, 도미니카, 알제리, 모로코, 탄자니아, 남아프리카, 벨리즈, 모잠비크, 에쿠아도르, 콜롬비아, 그라나다, 가나, 감비아, 크로아티아, 인도네시아, 인도, 시에라리온, 세르비아 앤 몬테네그로, 짐바브웨

AP ARIPO특허 : 케냐, 레소토, 말라위, 수단, 스와질랜드, 우간다, 시에라리온, 가나, 감비아, 짐바브웨, 모잠비크, 탄자니아

EA 유라시아특허 : 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르키즈스탄, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크멘

EP 유럽특허 : 오스트리아, 벨기에, 스위스, 독일, 덴마크, 스페인, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투갈, 스웨덴, 핀란드, 사이프러스, 터어키

OA OAPI특허 : 부르키나파소, 베닌, 중앙아프리카, 콩고, 코트디부아르, 카메룬, 가봉, 기니, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고, 기니 비사우, 적도 기니

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- a) 관심있는 DNA 서열을 함유한 20 kb 이상의 거대 클로닝 계놈 단편을 획득하는 단계;
- b) 박테리아 상동성 재조합을 이용하여 (a)의 거대 클로닝 계놈 단편을 유전적으로 변형하여, 진핵 세포에서 사용하기 위한 거대 표적화 벡터(LTVEC)를 제작하는 단계로, 이 LTVEC는 총 20 kb 이상의 상동성 팔을 가지고;
- c) (b)의 LTVEC를 진핵 세포 내로 도입하여 상동성 재조합에 의해 세포에서 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 변형시키는 단계; 및
- d) 정량 분석을 이용하여 (c)의 진핵 세포에서 대립유전자의 변형(MOA)을 검출하여, 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌가 유전적으로 변형된 진핵 세포를 확인하는 단계를 포함하며,
- 상기 진핵 세포는 비인간 세포이거나 또는 인체에서 분리된 세포인, 진핵 세포에서 관심있는 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 유전적으로 변형시키는 방법.

### 청구항 2

- 제 1 항에 있어서, DNA 서열을 함유한 거대 클로닝 계놈 단편은 관심있는 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌에 상동성인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 3

- 제 1 항에 있어서, 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌의 유전적 변형은 코딩 서열, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 결실; 코딩 서열, 유전자 세그먼트 또는 조절 요소의 변경; 새로운 코딩 서열, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 삽입; 조건 대립유전자의 제작; 또는 한 종으로부터 유래된 코딩 서열 또는 유전자 세그먼트의 동일하거나 상이한 종으로부터 유래된 상동성 또는 오르토로그스(orthologous) 코딩 서열로의 대체를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

- 제 3 항에 있어서, 코딩 서열, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 변경은 치환, 부가, 또는 융합을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

- 제 4 항에 있어서, 융합은 에피토프 태그 또는 2작용 단백질(bifunctional protein)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

- 제 1 항에 있어서, 정량 분석은 정량 PCR, FISH(Fluorescence In Situ Hybridization), 비교 계놈 혼성화, 또는 DNA 증폭 또는 고정된 프로브로의 정량 혼성화를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

- 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 진핵 세포는 비-인간 포유 동물 배아 줄기 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8

- 제 7 항에 있어서, 배아 줄기 세포는 마우스, 래트, 또는 다른 설치류의 배아 줄기 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 9

- 제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌는 포유 동물의 유전자 또는 염색체 유전자좌인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 10

제 9 항에 있어서, 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌는 인간의 유전자 또는 염색체 유전자좌인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 11

제 9 항에 있어서, 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌는 마우스, 래트, 또는 다른 설치류의 유전자 또는 염색체 유전자좌인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 12

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, LTVEC는 100 kb 이상의 거대 DNA 단편을 수용할 수 있는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 13

a) 관심있는 DNA 서열을 함유한 20 kb 이상의 거대 클로닝 게놈 단편을 획득하는 단계로, 여기에서 거대 클로닝 DNA 단편은 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌에 상동성이고;

b) 박테리아 상동성 재조합을 이용하여 (a)의 거대 클로닝 게놈 단편을 유전적으로 변형시켜, 마우스 배아 줄기 세포에서 사용하기 위한 거대 표적화 벡터를 제작하는 단계로, 이 거대 표적화 벡터는 총 20 kb 이상의 상동성 팔을 가지며, 여기에서 유전적 변형은 코딩 서열, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 결실이고;

c) (b)의 거대 표적화 벡터를 마우스 배아 줄기 세포 내로 도입하여 상동성 재조합에 의해 세포에서 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 변형시키는 단계; 및

d) 정량 PCR인 정량 분석을 이용하여 (c)의 마우스 배아 줄기 세포에서 대립유전자의 변형(MOA)를 검출하여, 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌가 유전적으로 변형된 마우스 배아 줄기 세포를 확인하는 단계를 포함하는, 마우스 배아 줄기 세포에서 관심있는 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 유전적으로 변형시키는 방법.

#### 청구항 14

제 1 항 내지 제 6 항 및 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 약 1 내지 5  $\mu\text{g}$ 의 (c)의 거대 표적화 벡터가 약  $1 \times 10^7$  세포로 도입되는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 15

삭제

#### 청구항 16

삭제

#### 청구항 17

삭제

#### 청구항 18

삭제

#### 청구항 19

삭제

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

## 청구항 54

삭제

## 명세서

### 기술분야

- <1> 본 출원은 2000년 12월 7일에 제출된 미국 특허 출원 제 09/732,234호 및 2000년 10월 31일에 제출된 미국 가출원 제 60/244,665 호에 대한 우선권을 청구한다. 본 출원의 전반에 걸쳐 다양한 출판물이 참조된다. 이들 출판물 전문의 개시는 참고문헌으로서 본 출원에 수록된다.
- <2> 본 발명의 분야는 진핵 세포에 있는 내인성 유전자 및 염색체 유전자좌를 상동성 재조합을 통해 표적화하고, 어떤 바람직한 방식으로 변형시키도록 거대 DNA 벡터를 엔지니어링하고 사용하는 방법이다. LTVEC로 불리우는 이들 거대 DNA 표적화 벡터는, 진핵 세포에서 상동성 표적화를 수행하도록 의도된 다른 접근법에 의해 전형적으로 사용되는 것들보다 더 거대한 클로닝된 게놈 DNA의 단편으로부터 유래된다. 본 발명의 분야는 LTVEC가 원하는 내인성 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌(들)를 올바르게 표적화하고 변형시킨 진핵 세포의 신속하고 용이한 검출 방법을 더욱 제공한다. 분야는 또한 유전적 변형을 갖는 생물을 생성하는데에 이들 세포의 사용, 생물 그 자체, 및 그것의 사용 방법을 포함한다.

### 배경기술

- <3> 서론
- LTVEC의 사용은 현재 방법에 비하여 실질적인 장점을 제공한다. 예를 들어, 이것은 표적화 벡터를 생성하는데에 현재 사용되는 것보다 더 큰 DNA 단편으로부터 유래되기 때문에, LTVEC는 현재 기술을 이용하여 만들어진 표적화 벡터보다 더욱 신속하고 편리하게 거대 게놈 DNA 단편의 이용가능한 라이브러리 (예를 들어 BAC 및 PAC 라이브러리)로부터 생성될 수 있다. 게다가, 현재의 기술을 이용하는 것보다, 더 거대한 변형은 물론이고 더 거대한 게놈 영역에 걸친 변형이 더욱 편리하게 생성될 수 있다.
- <4> 더욱이, 본 발명은 "표적화하기 힘든" 유전자좌의 표적화 빈도를 증가시키도록 상동성의 긴 영역을 이용하고, 또한 이들 표적화 벡터에서, 만약 있다면, 동질유전자형 DNA 사용의 이익을 줄인다.
- <5> 따라서 본 발명은 주어진 생물의 거의 모든 내인성 유전자 및 염색체 유전자좌를 전체적으로 변형시키는 신속하고, 편리하고, 능률화된 방법을 제공한다.
- <6> 발명의 배경기술
- <7> 상동성인 외인성 DNA와 내인성 염색체 서열간의 상동성 재조합에 의한 유전자 표적화는 마우스에서 결실, 삽입을 창출하거나, 돌연변이를 디자인하거나, 유전자 돌연변이를 교정하거나, 형질전환유전자를 도입하거나, 또는 다른 유전적 변형을 만드는 매우 유용한 방법인 것으로 증명되었다. 현재 방법은 내인성 DNA에 대하여 전형적으로 10 내지 20 kb 미만인 상동성의 영역을 갖는 표준 표적화 벡터를 이용하여 마우스 배아 줄기 (ES)세포 내로 원하는 유전적 변형을 도입한 후, 마우스 배 계열 내로 이들 엔지니어링된 유전적 변형을 전달하도록 마우스 배아 내로 변경된 ES 세포를 주사하는 것을 포함한다 (Smithies et al., Nature, 317:230-234, 1985; Thomas et al., Cell, 51:503-512, 1987; Koller et al., Proc Natl Acad Sci USA, 86:8927-8931, 1989; Kuhn et al., Science, 254:707-710, 1991; Thomas et al., Nature, 346:847-850, 1990; Schwartzberg et al., Science, 246:799-803, 1989; Doetschman et al., Nature, 330:576-578, 1987; Thomson et al., Cell, 5:313-321, 1989; DeChiara et al., Nature, 345:78-80, 1990; GenPharm International의 이름으로 1998년 8월 4일에 특허받은 미국 특허 제 5,789,215). 이들 현재 방법에서, 표준 표적화 벡터가 원하는 내인성 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌(들)를 올바르게 표적화하고 변형시킨 소수의 ES 세포를 검출하는 것은 표적화 벡터 내에 함유된 상동성 표적화 서열 외부의 서열 정보를 필요로 한다. 성공적인 표적화를 위한 분석은 표적화 벡터의 외부에 있고 전체 상동성 팔 (정의 참조)에 걸쳐있는 서열로부터의 표준 서던 블로팅 또는 long PCR을 포함한다 (Cheng, et al., Nature, 369:684-5, 1994; Foord and Rose, PCR Methods Appl, 3:S149-61, 1994; Ponce and Micol, Nucleic Acids Res, 20:623, 1992; Takara Shuzo Co., Ltd.로 특허받은 미국 특허 제 5,436,149호); 따라서, 이들 방법을 제한하는 크기 고려 사항 때문에, 상동성 팔의 크기는 전체로 10 내지 20 kb 미만으로 제한

된다 (Joyner, The Practical Approach Series, 293, 1999).

<8> 현재 방법에서 사용되는 것보다 더 거대한 상동성 팔을 갖는 표적화 벡터를 활용하는 능력은 극단적으로 다양할 수 있다. 예를 들어, 이러한 표적화 벡터는 거대 게놈 삽입체를 함유한 구입가능한 라이브러리 (예를 들어, BAC 또는 PAC 라이브러리)로부터, 현재 기술을 이용하여 제작된 표적화 벡터보다 더 신속하고 편리하게 생성될 수 있는데, 이러한 게놈 삽입체는 사용에 앞서 광범위하게 특성결정되고 다듬어져야 한다. 게다가, 더 큰 변형은 물론이고 더 큰 게놈 영역에 걸쳐있는 변형이 현재 기술을 이용한 것 보다 더 적은 단계로 더욱 편리하게 생성될 수 있다. 더욱이, 긴 상동성 영역의 사용은 진핵 세포에서 "표적화하기 힘든" 유전자좌의 표적화 빈도를 증가시킬 수 있는데, 이는 진핵 세포에서 상동성 재조합의 표적화가 표적화 벡터 내에 함유된 전체 상동성에 관련된 것으로 나타나기 때문이다 (Deng and Capecchi, Mol Cell Biol, 12:3365-71, 1992). 게다가, 긴 상동성 팔을 사용하여 획득된 증가된 표적화 빈도는 이들 표적화 벡터에서 동질유전자형 DNA를 사용하는 것으로부터 어떠한 잠재적 이익을 줄일 수 있다.

<9> 매우 거대한 게놈 단편 (예를 들어, BAC 라이브러리로 클로닝된 것)내로 이전의 변형을 엔지니어링하는 문제점은 박테리아에서 상동성 재조합의 이용을 통해 대부분 해결되었고 (Zhang, et al., Nat Genet, 20:123-8, 1998; Yang, et al., Nat Biotechnol, 15:859-65, 1997; Angrand, et al., Nucleic Acids Res, 27:e16, 1999; Muyrers, et al., Nucleic Acids Res, 27:1555-7, 1999; Narayanan, et al., Gene Ther, 6:442-7, 1999), 이는 진핵 세포의 외인성 유전자 또는 염색체 유전자좌에 대하여 상동성인 거대한 영역을 함유하는 벡터의 구성을 허용한다. 그러나, 일단 제작되면, 이들 벡터는 상동성 팔이 10 내지 20 kb 보다 더 클 때에는 소수의 올바른 표적화 사건을 검출하는 것이 어렵기 때문에, 상동성 재조합을 통해 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 변형시키는데에 있어서 일반적으로 유용하지 않다 (Joyner, The Practical Approach Series, 293, 1999). 따라서, BAC 게놈 단편으로부터 박테리아의 상동성 재조합을 이용하여 생성된 벡터는 표적화 벡터로서 사용되기에 앞서 광범위하게 다듬어져야 한다 (Hill et al., Genomics, 64:111-3, 2000). 그러므로, 거대한 상동성 영역을 함유하는 표적화 벡터의 사용을 가능하게 하여 진핵 세포에서 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 변형시킬 수 있는 신속하고 편리한 방법론이 여전히 필요하다.

<10> 본 발명에 따라서, 본 출원은 상동성 재조합을 통해 진핵 세포에서 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 변형시키도록 거대한 상동성 영역을 함유한 표적화 벡터의 사용을 가능하게 하는 신규 방법을 제공한다. 이러한 방법은 현재 기술에 있어서 상기-설명된 제한을 극복한다. 게다가, 당업자는 본 발명의 방법이 마우스, 래트, 다른 설치류, 또는 인간과 같은 동물은 물론이고 콩, 옥수수 및 밀과 같은 식물을 포함하되 이에 제한되지 않는 어떠한 진핵 생물의 어떠한 게놈 DNA로의 사용에 용이하게 적용될 수 있다는 것이 손쉽게 인정할 것이다.

#### <11> 발명의 개요

<12> 본 발명에 따라서, 본 출원은 변형된 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 함유한 진핵 세포를 창출하고 스크리닝하기 위한 신규의, 빠르고, 능률적이며 효과적인 방법을 개발하였다. 본 신규 방법은 처음으로:

<13> 1. 거대한 클로닝된 게놈 단편 내에서 원하는 유전적 변형을 정확하게 엔지니어링함으로써, 진핵 세포에서의 사용을 위한 거대 표적화 벡터 (LTVECs)를 창출하기 위한 박테리아 상동성 재조합;

<14> 2. 관심있는 내인성 염색체 유전자좌를 변형시키기 위하여 진핵 세포 내로 이들 LTVECs의 직접 도입; 및

<15> 3. 표적화된 대립유전자가 원하는 대로 변형된 소수의 진핵 세포를 측정하기 위한 분석 (예를 들어, 정량 PCR과 같이, 표적 서열 외부의 서열 정보를 필요로 하지 않는 친계 대립유전자의 대립유전자 변형 (MOA)에 대한 분석)을 결합시킨다.

<16> 본 발명의 바람직한 구체예는 진핵 세포에서 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 유전적으로 변형하는 방법으로서, 이는 a) 관심있는 DNA 서열을 함유한 거대 클로닝된 게놈 단편을 획득하는 단계; b) (a)의 거대 클로닝된 게놈 단편을 변형하여 진핵 세포에서의 사용을 위한 거대 표적화 벡터 (LTVEC)를 제작하는 단계; c) (b)의 LTVEC을 진핵 세포 내로 도입하여 세포 내에 있는 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 변형시키는 단계; 및 d) 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌가 유전적으로 변형된 진핵 세포를 식별하기 위하여 정량 분석을 이용하여 (c)의 진핵 세포 내에서 대립유전자의 변형 (MOA)를 검출하는 단계를 포함한다.

<17> 본 발명의 또다른 구체예는 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌에 대한 유전적 변형이 코딩 서열, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 결실; 코딩 서열, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 변경; 새로운 코딩 서열, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 삽입; 조건 대립유전자의 제작; 또는 상이한 종으로부터 유래된 상동성 또는 오르



토로고스 코딩 서열로 한 종으로부터 유래된 코딩 서열 또는 유전자 세그먼트의 대치를 포함하는 방법이다.

- <18> 본 발명의 대안적 구체예는 코딩 서열, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 변경이 치환, 첨가, 또는 융합을 포함하는데, 여기에서 융합은 에피토프 태그 (epitope tag) 또는 이기능 단백질을 포함하는 방법이다.
- <19> 본 발명의 또다른 구체예는 정량 분석이 정량 PCR, 비교 게놈 혼성화, 등은 DNA 증폭, 고정된 프로브로의 정량 혼성화, Invader Probes®, 또는 MMP assays®를 포함하고, 여기에서 정량 PCR은 TaqMan® Molecular Beacon, 또는 Eclipse™ 프로브 기술을 포함하는 방법이다.
- <20> 본 발명의 또다른 바람직한 구체예는 진핵 세포가 포유동물의 배아 줄기 세포이고 특히 배아 줄기 세포는 마우스, 래트, 또는 다른 설치류 배아 줄기 세포인 방법이다.
- <21> 본 발명의 또다른 바람직한 구체예는 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌가 포유동물의 유전자 또는 염색체 유전자좌이고, 바람직하게는 인간의 유전자 또는 염색체 유전자좌이거나 마우스, 래트, 또는 다른 설치류의 유전자 또는 염색체 유전자좌인 방법이다.
- <22> 추가적인 바람직한 구체예는 LTVEC가 20 kb 보다 더 큰 거대 DNA 단편, 특히 100 kb 보다 더 큰 거대 DNA 단편을 수용할 수 있는 것이다.
- <23> 또다른 바람직한 구체예는 본 발명의 방법에 의해 생산되는 유전적으로 변형된 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌이다.
- <24> 또다른 바람직한 구체예는 본 발명의 방법에 의해 생산되는 유전적으로 변형된 진핵 세포이다.
- <25> 본 발명의 바람직한 구체예는 본 발명의 방법에 의해 생산된 유전적으로 변형된 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 함유하는 비-인간 생물이다.
- <26> 또한 본 발명의 방법에 의해 생산되는 유전적으로 변형된 진핵 세포 또는 배아 줄기 세포로부터 생산되는 비-인간 생물이 바람직하다.
- <27> 바람직한 구체예는 유전적으로 변형된 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 함유한 비-인간 생물인데, 이는 a) 관심있는 DNA 서열을 함유한 거대 클로닝 게놈 단편을 획득하는 단계; b) 박테리아 상동성 재조합을 이용하여 (a)의 거대 클로닝 게놈 단편을 유전적으로 변형하여 배아 줄기 세포에서의 사용을 위한 거대 표적화 벡터 (LTVEC)를 제작하는 단계; c) (b)의 LTVEC를 배아 줄기 세포 내로 도입하여 세포에서 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 변형시키는 단계; d) 정량 분석을 이용하여 (c)의 배아 줄기 세포에서 대립유전자의 변형 (MOA)을 검출하여 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌가 유전적으로 변형된 배아 줄기 세포를 확인하는 단계; e) (d)의 배아 줄기 세포를 배반포 내로 도입하는 단계; 및 f) (e)의 배반포를 임신을 위해 대리모 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다.
- <28> 본 발명의 추가적인 바람직한 구체예는 유전적으로 변형된 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 함유하는 비-인간 생물인데, 이는 a) 관심있는 DNA 서열을 함유한 거대 클로닝 게놈 단편을 획득하는 단계; b) 박테리아 상동성 재조합을 이용하여 (a)의 거대 클로닝 게놈 단편을 유전적으로 변형하여 진핵 세포에서의 사용을 위한 거대 표적화 벡터 (LTVEC)를 제작하는 단계; c) (b)의 LTVEC를 진핵 세포 내로 도입하여 세포에서 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 유전적으로 변형시키는 단계; d) 정량 분석을 이용하여 (c)의 진핵 세포에서 대립유전자의 변형(MOA)을 검출하여 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌가 유전적으로 변형된 진핵 세포를 확인하는 단계; e) (d)의 진핵 세포로부터 핵을 제거하는 단계; f) (e)의 핵을 난세포 내로 도입하는 단계; 및 g) (f)의 난세포를 임신을 위한 대리모 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다.
- <29> 또다른 바람직한 구체예는 유전적으로 변형된 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 함유한 비-인간 생물인데, 이는 a) 관심있는 DNA 서열을 함유한 거대 클로닝 게놈 단편을 획득하는 단계; b) 박테리아 상동성 재조합을 이용하여 (a)의 거대 클로닝 게놈 단편을 유전적으로 변형하여 진핵 세포에서의 사용을 위한 거대 표적화 벡터 (LTVEC)를 제작하는 단계; c) (b)의 LTVEC를 진핵 세포 내로 도입하여 세포에서 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 유전적으로 변형시키는 단계; d) 정량 분석을 이용하여 (c)의 진핵 세포에서 대립유전자의 변형 (MOA)을 검출하여 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌가 유전적으로 변형된 진핵 세포를 확인하는 단계; e) (d)의 진핵 세포를 또다른 진핵 세포에 융합시키는 단계; f) (e)의 융합된 진핵 세포를 임신을 위하여 대리모 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법에 의해서 생산된다.
- <30> 바람직한 구체예에서, 비-인간 생물은 마우스, 래트, 또는 다른 설치류이고; 배반포는 마우스, 래트, 또는 다른

설치류 배반포이고; 난세포는 마우스, 래트, 또는 다른 설치류 난세포이고; 대리모는 마우스, 래트, 또는 다른 설치류이다.

<31> 또다른 바람직한 구체예에서는 배아 줄기 세포가 포유동물 배아 줄기 세포, 바람직하게는 마우스, 래트, 또는 다른 설치류의 배아 줄기 세포인 것이다.

<32> 추가적인 바람직한 구체예는 비-인간 생물의 생산을 위한 본 발명의 유전적으로 변형된 진핵 세포의 사용이고, 특히 비-인간 생물의 생산을 위한 본 발명의 유전적으로 변형된 배아 줄기 세포의 사용이다.

<33> 본 발명의 바람직한 구체예는 마우스 배아 줄기 세포에서 관심있는 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 유전적으로 변형시키는 방법인데, 이는 a) 관심있는 DNA 서열을 함유한 20 kb 이상의 거대 클로닝 계놈 단편을 획득하는 단계; b) 박테리아 상동성 재조합을 이용하여 (a)의 거대 클로닝 계놈 단편을 유전적으로 변형하여 마우스 배아 줄기 세포에서의 사용을 위한 거대 표적화 벡터 (LTVEC)를 제작하는 단계로, 여기에서 유전적 변형은 코딩 서열, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 결실인 단계; c) (b)의 거대 표적화 벡터를 마우스 배아 줄기 세포 내로 도입하여 세포에서 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 변형시키는 단계; 및 d) 정량 분석을 이용하여 (c)의 진핵 세포에서 대립유전자의 변형 (MOA)을 검출하여 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌가 유전적으로 변형된 진핵 세포를 확인하는 단계로, 여기에서 정량 분석은 정량 PCR인 단계를 포함한다. 또한 바람직한 것은 본 발명에 의해 생산되는 유전적으로 변형된 마우스 배아 줄기 세포; 본 발명에 의해 생산되는 유전적으로 변형된 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 함유한 마우스; 및 유전적으로 변형된 마우스 배아 줄기 세포로부터 생산되는 마우스이다.

<34> 또다른 바람직한 구체예는 유전적으로 변형된 관심있는 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 함유한 마우스인데, 이는 a) 관심있는 DNA 서열을 함유한 20 kb 이상의 거대 클로닝 계놈 단편을 획득하는 단계로, 여기에서 거대 클로닝 DNA 단편은 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌에 상동성인 단계; b) 박테리아 상동성 재조합을 이용하여 (a)의 거대 클로닝 계놈 단편을 유전적으로 변형하여 마우스 배아 줄기 세포에서의 사용을 위한 거대 표적화 벡터를 제작하는 단계로, 여기에서 유전적 변형은 코딩 서열, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 결실인 단계; c) (b)의 거대 표적화 벡터를 마우스 배아 줄기 세포 내로 도입하여 세포에서 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 변형시키는 단계; 및 d) 정량 분석을 이용하여 (c)의 진핵 세포에서 대립유전자의 변형 (MOA)을 검출하여 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌가 유전적으로 변형된 진핵 세포를 확인하는 단계로, 여기에서 정량 분석은 정량 PCR인 단계; e) (d)의 마우스 배아 줄기 세포를 배반포 내로 도입하는 단계; 및 f) (e)의 배반포를 임신에 위해 대리모 내로 도입하는 단계를 포함하는 방법에 의해 생산된다.

<35> 또한 바람직한 것은 마우스의 생산을 위한 상기 설명된 유전적으로 변형된 마우스 배아 줄기 세포의 사용이다.

<36> 또한 바람직한 것은 약 1 내지 5  $\mu\text{g}$ 의 거대 표적화 벡터 DNA가 약  $1 \times 10^7$  개의 진핵 세포 내로 도입되는 방법이다.

## 발명의 상세한 설명

<52> 정의

<53> "표적화 벡터"는 원하는 유전적 변형(들)의 측면 내인성 염색체 핵산 서열에 "상동성"인 서열을 함유하는 DNA 구성체이다. "상동성 팔"으로서 지칭되는 측면 상동성 서열은, 상동성 팔 및 상응하는 내인성 서열간에 존재하는 상동성에 의하여 계놈 내에 있는 특정 염색체 위치로 표적화 벡터를 이끌고 "상동성 재조합"으로서 지칭되는 과정에 의해 원하는 유전적 변형을 도입한다.

<54> "상동성"은 서로 혼성화하거나 또는 분자간 교환을 겪을 수 있을 만큼 충분히 동일하거나 유사한 두 개 이상의 핵산 서열을 의미한다.

<55> "유전자 표적화"는 표적화 벡터를 이용하여 상동성 재조합을 통해 내인성 서열 내로의 삽입, 서열의 결실, 또는 대체에 의한 내인성 염색체 유전자좌의 변형이다.

<56> "유전자 낙아웃"은 염색체 유전자좌에 암호화된 유전 정보의 붕괴로부터 발생하는 유전적 변형이다.

<57> "유전자 낙인"은 염색체 유전자좌에 암호화된 유전 정보를 상이한 DNA 서열로 대체하는 것으로부터 발생하는 유전적 변형이다.

<58> "낙아웃 생물"은 생물 세포의 유의한 비율이 유전자 낙아웃을 내포하는 생물이다.

- <59> "낙인 생물"는 생물 세포의 유의한 비율이 유전자 낙인을 내포하는 생물이다.
- <60> "마커" 또는 "선별가능한 마커"는 집단에서 대다수의 처리된 세포로부터 마커를 발현하는 소수의 트랜스펙션된 세포의 분리를 허용하는 선택 마커이다. 이러한 마커 유전자는 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 및 히그로마이신 B 포스포트랜스퍼라제, 또는 GFP와 같은 형광 단백질을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- <61> "ES 세포"는 배아 줄기 세포이다. 이 세포는 보통 배반포-단계 배아의 내세포괴로부터 유래된다.
- <62> "ES 세포 클론"은 DNA의 도입 및 순차적인 선택 후 ES 세포 집단의 단일 세포로부터 유래된 세포의 하부집단이다.
- <63> "측면 DNA"는 기준의 특정 지점과 동일 선상에 있고 이와 인접한 DNA의 세그먼트이다.
- <64> "LTVECs"는 진핵 세포에서 상동성 표적화를 수행하도록 의도되는 다른 접근법에 의해 사용되는 것들 보다 더 큰, 클로닝된 게놈 DNA의 단편으로부터 유래되는 진핵 세포를 위한 거대 표적화 벡터이다.
- <65> "비-인간 생물"는 공중에 의해 인간으로서 통상적으로 수용되지 않는 생물이다.
- <66> "대립유전자의 변형"(MOA)은 게놈에서 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌(들) 중 한 대립유전자의 정확한 DNA 서열의 변형을 지칭한다. 대립유전자의 변형 (MOA)은 단일 뉴클레오타이드 만큼의 결실, 치환 또는 삽입 또는 관심 있는 유전자 또는 염색체 유전자좌에 걸쳐있는 수천 염기의 결실은 물론이고, 이들 양 극단간의 어떤 및 모든 가능한 변형을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- <67> "오르토로그스" 서열은 또다른 종에 있는 서열과 기능적으로 동등한, 한 종으로부터의 서열을 지칭한다.
- <68> 하기의 설명 및 실시예는 본 발명을 예시하도록 제공된다. 당업자는 이러한 실시예가 단지 예시로서 제공되며 본 발명을 제한하는 목적으로 의도되는 것이 아니라는 것을 인정할 것이다.
- <69> **발명의 상세한 설명**
- <70> 본 발명자들은 변형된 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 함유한 진핵 세포를 제작 및 스크리닝하는 신규의, 신속하고, 능률화되고 효율적인 방법을 개발하였다. 이들 세포에서, 변형은 유전자(들) 낙아웃, 낙인, 점 돌연변이, 또는 거대한 게놈 삽입 또는 결실 또는 다른 변형이 될 수 있다. 제한되지 않는 예로서, 이들 세포는, 변경, 결실 및/또는 삽입된 유전자(들)의 기능을 결정하기 위한 목적으로 낙아웃 또는 낙인 생물 및 특히, 낙아웃 또는 낙인 마우스를 제작하는데에 유용한 배아 줄기 세포가 될 수 있다.
- <71> 여기 설명된 신규 방법은, 처음으로
- <72> 1. 거대한 클로닝된 게놈 단편 내에서 원하는 유전적 변형을 정확하게 엔지니어링함으로써, 진핵 세포에서의 사용을 위한 거대 표적화 벡터 (LTVECs)를 창출하기 위한 박테리아 상동성 재조합;
- <73> 2. 상응하는 관심의 내인성 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌(들)를 변형시키기 위하여 진핵 세포 내로 이들 LTVECs의 직접 도입; 및
- <74> 3. 친계 대립유전자의 대립유전자의 변형(MOA)에 대한 정량 분석을 포함하는, 표적화된 대립유전자가 원하는 대로 변형된 소수의 진핵 세포를 측정하기 위한 분석을 결합시킨다.
- <75> 진핵 세포에서 성공적인 상동성 재조합을 검출하는 이전의 방법은 LTVECs에 존재하는 긴 상동성 팔 때문에 본 발명자들의 발명의 LTVECs와 함께 사용될 수 없다는 것이 강조되어야 한다. 상동성 재조합을 통하여 진핵 세포에서 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌를 계획적으로 변형시키는데에 LTVECs를 사용하는 것은 표적화된 대립유전자가 원하는 것과 같이 변형된 소수의 진핵 세포를 측정하는 분석의 신규 출원에 의해 가능하게 되는데, 이러한 분석은 예를 들어 정량 PCR 또는 MOA를 위한 다른 적합한 정량 분석의 채택에 의한, 친계 대립유전자의 대립유전자의 변형 (MOA)에 대한 정량 분석을 포함한다.
- <76> 현재 방법에서 사용되는 것들보다 더 거대한 상동성 팔을 갖는 표적화 벡터를 사용하는 능력은 다음의 이유로 매우 유용하다.
- <77> 1. 사용에 앞서 광범위하게 특성결정되고 "다듬어"져야만 하는 이전 기술을 이용하여 제작된 표적화 벡터에 비하여, 표적화 벡터는 거대한 게놈 삽입체를 함유한 이용가능한 라이브러리 (예를 들어 BAC 또는 PAC 라이브러리)로부터 보다 신속하고 편리하게 생성된다 (아래에 상세히 설명됨). 게다가, 관심있는 유전자좌에 대하여 최소 서열 정보만 알려질 필요가 있는데, 다시 말해, 상동성 박스 (아래에 상세히 설명됨)를 생성하고

MOA에 대한 정량 분석에 사용될 수 있는 프로브를 생성하는데에 요구되는 대략 80 내지 100 뉴클레오티드만을 알면 된다 (아래에 상세히 설명됨).

- <78> 2. 더 거대한 변형은 물론이고 더 거대한 게놈 영역에 걸쳐있는 변형은 이전의 기술을 이용하는 것보다 더욱 손쉽고 더 적은 단계로 생성된다. 예를 들어, 본 발명의 방법은 전통적인 플라스미드-기초 표적화 벡터로는 그것의 크기 제한으로 인해 적용될 수 없는 거대한 유전자좌의 정확한 변형을 가능하게 한다. 이것은 또한 한 단계에서 다수의 지점에 위치한 어떤 주어진 유전자좌의 변형 (예를 들어, 다중-엑손 유전자의 상이한 엑손에 특정 돌연변이의 도입)을 가능하게 하고, 다수의 표적화 벡터를 엔지니어링하는 필요 및 ES 세포에서 상동성 재조합에 대하여 표적화 및 스크리닝의 다수 라운드를 수행하는 필요를 완화한다.
- <79> 3. 긴 상동성 영역 (긴 상동성 팔)의 사용은 진핵 세포에서 "표적화하기 어려운" 유전자좌의 표적화 빈도를 증가시키는데, 이는 진핵 세포에서 상동성 재조합의 표적화가 표적화 벡터 내에 함유된 전체 상동성에 관련된 것으로 나타나는 이전의 발견과 일치한다.
- <80> 4. 긴 상동성 팔을 사용하여 얻어진 증가된 표적화 빈도는, 만약 있다면, 이들 표적화 벡터에서 동질유전자형 DNA를 사용하는 것으로부터 이익을 명백히 감소시킨다.
- <81> 5. 상동성 재조합에 대하여 진핵 세포를 스크리닝하기 위한 정량 MOA 분석의 적용은 표적화 벡터로서 LTVECs의 사용(상기 개�된 장점)에 권한을 부여할 뿐 아니라 올바르게 변형된 진핵 세포를 확인하는 시간을 전형적인 며칠로부터 수시간으로 감소시킨다. 게다가, 정량 MOA의 적용은 변형되는 내인성 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌(들)의 외부에 위치한 프로브의 사용을 필요로 하지 않으므로, 변형된 유전자(들) 또는 유전자좌(들)의 측면에 위치하는 서열을 알 필요가 없다. 이것은 과거에 수행되었던 스크리닝에 대하여 유의한 개선이며, 진핵 세포에서 상동성 재조합에 있어서의 스크리닝을 위한 훨씬 덜 노동-집약적이고 훨씬 더 비용-고효율적인 접근법으로 만든다.
- <82> **방법**
- <83> 여기 설명된 DNA 벡터를 구성하기 위하여 이용된 많은 과학 기술은 당업자에게 주지된 표준 분자 생물학 기술이다 (Sambrook, J., E. F. Fritsch And T. Maniatis. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Vols 1, 2, and 3, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel et al., Greene Publ. Assoc., Wiley Interscience, NY 참조). 모든 DNA 서열분석은 ABI 373A DNA 서열분석기 및 Taq Dideoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)를 사용한 표준 기술에 의해 수행된다.
- <84> 단계 1. 관심있는 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌를 함유한 거대 게놈 DNA 클론을 획득한다.
- <85> 관심있는 유전자(들) 또는 유전자좌(들)은 상세한 구조적 또는 기능적 데이터와 같은, 특정 기준에 기초하여 선택될 수 있거나, 또는 잠재적 유전자 또는 유전자 단편은 다양한 게놈 서열분석 프로젝트의 노력을 통해 예측되기 때문에 이러한 상세한 정보의 부재에서도 선택될 수 있다.
- <86> 중요하게도, LTVECs를 생산하는데에 본 발명의 방법을 적용하기 위하여 관심있는 유전자(들)의 완전한 서열 및 유전자 구조를 알 필요가 없다는 것이 주목되어야 한다. 사실, 관심있는 게놈 클론을 얻기 위해서는 물론이고 LTVEC를 제작하는데에 사용되는 상동성 박스를 생성하고 정량 MOA 분석에서의 사용을 위한 프로브를 제작하기 위해서, 요구되는 서열 정보는 단지 대략 80 내지 100 뉴클레오티드이다.
- <87> 일단 관심있는 유전자(들) 또는 유전자좌(들)가 선택되면, 이 유전자(들) 또는 유전자좌(들)을 함유한 거대 게놈 클론(들)이 획득된다. 이 클론(들)은 몇몇 방법 중 어떤 하나로 획득될 수 있는데, 이는 표준 혼성화 또는 PCR 기술에 의해, 또는 당업자에게 익숙한 어떤 다른 방법에 의해 적합한 DNA 라이브러리 (예를 들어 BAC, PAC, YAC 또는 코스미드)를 스크리닝하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- <88> 단계 2. 상동성 박스 1 및 2를 변형 카세트에 첨가하고 LTVEC를 생성한다.
- <89> 상동성 박스는 거대 클론 게놈 단편으로부터 LTVECs를 생성하는데에 이용되는 박테리아 상동성 재조합의 부위를 표시한다 (도 1). 상동성 박스는 DNA의 짧은 세그먼트로서, 일반적으로 이중-가닥이고 길이로 적어도 40 뉴클레오티드인데, 이는 "변형되는 영역"의 측면에 위치한 거대 클론 게놈 단편 내에 있는 영역과 상동성이다. 박테리아에서 상동성 재조합 후 변형 카세트가 변형되는 영역을 대신하도록, 상동성 박스는 변형 카세트에 첨가된다 (도 1). 박테리아 상동성 재조합을 이용한 표적화 벡터의 제작 방법은 다양한 시스템에서 수행될 수 있다 (Yang et al., Nat Biotechnol, 15:859-65, 1997; Muyrers et al., Nucleic Acids Res, 27:1555-7, 1999;



Angrand et al., Nucleic Acids Res, 27:e16, 1999; Narayanan et al., Gene Ther, 6:442-7, 1999; Yu, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 97:5978-83, 2000). 현재 사용되는 바람직한 기술의 한 예는 ET 클로닝 (Zhang et al., Nat Genet, 20:123-8, 1998; Narayanan et al., Gene Ther, 6:442-7, 1999) 및 이 기술의 변형이다 (Yu, et al., Proc Natl Acad Sci USA, 97:5978-83, 2000). ET는 상동성 재조합 반응을 수행하는 recE (Hall and Kolodner, Proc Natl Acad Sci USA, 91:3205-9, 1994) 및 recT 단백질 (Kusano et al., Gene, 138:17-25, 1994)을 지칭한다. RecE는 직선 이중-가닥 DNA (본질적으로 상기 설명된 공여체 DNA 단편)의 한 가닥을 5'에서 3'으로 잘라내어, 3' 단일-가닥 돌출부를 갖는 직선 이중-가닥 단편을 생성하는 엑소뉴클레아제이다. 이 단일-가닥 돌출부는 recT 단백질로 코팅되는데, 이는 단일-가닥 DNA (ssDNA) 결합 활성을 갖는다 (Kovall and Matthews, Science, 277:1824-7, 1997). ET 클로닝은 recE 및 recT의 *E. coli* 유전자 생성물 (Hall and Kolodner, Proc Natl Acad Sci USA, 91:3205-9, 1994; Clark et al., Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 49:453-62, 1984; Noirot and Kolodner, J Biol Chem, 273:12274-80, 1998; Thresher et al., J Mol Biol, 254:364-71, 1995; Kolodner et al., Mol Microbiol, 11:23-30, 1994; Hall et al., J Bacteriol, 175:277-87, 1993) 및 박테리오파지 람다 ( $\lambda$ ) 단백질  $\lambda$ gam (Murphy, J Bacteriol, 173:5808-21, 1991; Poteete et al., J Bacteriol, 170:2012-21, 1988)을 일시적으로 발현하는 *E. coli*를 이용하여 수행된다.  $\lambda$ gam 단백질은 recBC 엑소뉴클레아제 시스템에 의한 분해로부터 공여 DNA 단편을 보호하는데 필요하고 (Myers and Stahl, Annu Rev Genet, 28:49-70, 1994) 빈번하게 사용되는 *E. coli* 균주 DH10b와 같은 recBC<sup>+</sup> 숙주에서 효과적인 ET-클로닝에 필요하다.

- <90> 박테리아 상동성 재조합을 이용하여 변형되고 대체되는 영역은 길이로 0개의 뉴클레오티드부터 (원래 유전자좌 내로의 삽입을 생성) 수만 염기 (원래 유전자좌의 결실 및/또는 대치를 생성)까지의 범위일 수 있다. 변형 카세트에 의존하여, 변형은 하기의 결과를 가져온다.
- <91> (a) 코딩 서열, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 결실;
- <92> (b) 치환, 첨가, 및 융합을 포함하는, 코딩 서열, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 변경 (예를 들어 에피토프 태그 또는 GFP를 갖는 단백질과 같은 2작용 단백질의 생성);
- <93> (c) 선별가능한 마커 유전자 또는 리포터 유전자를 위한 것과 같은, 새로운 코딩 영역, 유전자 세그먼트, 또는 조절 요소의 삽입, 또는 내인성 전사 제어 하에서 새로운 유전자의 도입;
- <94> (d) Cre 리코비나제에 의해 절단되는 영역의 측면에 위치한 loxP 부위 (Abremski and Hoess, J Biol Chem, 259:1509-14, 1984), 또는 Flp 리코비나제에 의해 절단되는 영역의 측면에 위치한 FRT 부위 (Andrews et al., Cell, 40:795-803, 1985; Meyer-Leon et al., Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 49:797-804, 1984; Cox, Proc Natl Acad Sci USA, 80:4223-7, 1983)의 도입에 의한 조건 대립유전자의 생성; 또는
- <95> (e) 한 종으로부터 유래된 코딩 서열을 상이한 종으로부터 유래된 유사 코딩 서열로 대체하는 것 (예를 들어, 마우스를 엔지니어링하기 위해 쥐의 유전자좌를 오르토로고스 인간 유전자좌로 대체하면 그 특정 유전자좌는 '인간화'된다).
- <96> 어떤 또는 모든 이들 변형은 LTVEC 내로 통합될 수 있다. 내인성 코딩 서열이 결실됨과 동시에 선별가능한 마커는 물론 리포터 유전자로 대체되는, 제한되지 않는 특정 예는 아래에 실시예 1에서 제공되고, 이는 이전의 기술에 비교되었을 때 본 발명의 방법의 장점이다.
- <97> 단계 3 (임의적). 각 LTVEC가 올바르게 엔지니어링된 것을 확인한다.
- <98> a. 관심있는 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌(들) 내로 공여체 단편의 도입에 의해 생성된 신규 접합부의 증명을 위한 진단 PCR (따라서 획득된 PCR 단편은 서열분석되어 관심있는 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌(들) 내로 공여체 단편의 도입에 의해 생성된 신규 접합부를 더욱 확인할 수 있다);
- <99> b. 박테리아 상동성 재조합 과정 도중 오직 원하는 변형만이 LTVEC 내로 도입되었다는 것을 확실히 하는 진단 제한효소 절단;
- <100> c. LTVEC, 특히 변형의 부위에 걸쳐있는 영역을 직접 서열분석하여 관심있는 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌(들) 내로 공여체 단편의 도입에 의해 생성된 신규 접합부를 확인하는 것에 의해 LTVEC가 올바르게 엔지니어링되었는가를 확인한다.
- <101> 단계 4. 진행 세포 내로의 도입을 위한 LTVEC DNA의 정제, 제제, 및 직쇄화

- <102> a. LTVEC DNA의 제제
- <103> 선택된 LTVEC의 미니프렙 (miniprep) DNA를 제제하고 (Sambrook, J., E. F. Fritsch And T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Vols 1, 2, and 3, 1989; Tillett and Neilan, *Biotechniques*, 24:568-70, 572, 1998; <http://www.qiagen.com/literature/handbooks/plkmini/plm-399.pdf>) 전기천공법을 이용하여 E. coli 내로 미니프렙 LTVEC DNA를 재-트랜스포메이션한다 (Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Vols 1, 2, and 3, 1989). 이 단계는 박테리아 상동성 재조합 단계에 사용되는 재조합생성 단백질을 암호화하는 플라스미드를 제거하는데 필요하다 (Zhang et al., *Nat Genet*, 20:123-8, 1998; Narayanan et al., *Gene Ther*, 6:442-7, 1999). 이 플라스미드는 (a) 많은 카피 수의 플라스미드이고 거대 스케일의 LTVEC 프렙에서 획득되는 수율을 감소시킬 수 있기 때문에; (b) 재조합생성 단백질의 발현을 유도하는 가능성을 제거하기 위하여; 그리고 (c) LTVEC의 물리적 지도작성을 불분명하게 할 수 있기 때문에, 제거하는 것이 유용하다. 진핵 세포 내로 LTVEC를 도입하기 전에, 더 많은 양의 LTVEC DNA는 표준 방법에 의해 제제된다 (<http://www.qiagen.com/literature/handbooks/plk/plklow.pdf>; Sambrook, J., E. F. Fritsch And T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Vols 1, 2, 및 3, 1989; Tillett and Neilan, *Biotechniques*, 24:568-70, 572, 1998). 그러나, 이 단계는 만약 재조합생성 프로파지를 사용한 박테리아 상동성 재조합 방법이 이용되면, 즉, 재조합생성 단백질을 암호화하는 유전자가 박테리아 염색체 내로 통합되는 것이 이용되면, 무시될 수 있다 (Yu, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:5978-83, 2000).
- <104> b. LTVEC DNA의 직쇄화
- <105> 진핵 세포 내로의 도입을 위한 LTVEC를 제조하기 위하여, LTVEC는 변형된 내인성 유전자(들) 또는 염색체 유전자(들) DNA를 긴 상동성 팔의 측면에 위치되도록 방치하는 방식으로 바람직하게 직쇄화된다. 이것은 아주 드물게 절단하는 어떤 적합한 제한효소로, 바람직하게는 벡터 백본에서 LTVEC를 직쇄화함으로써 성취될 수 있다. 적합한 제한 효소의 예는 NotI, PacI, SfiI, SrfI, SwaI, FseI, 등을 포함한다. 제한 효소의 선택은 실험적으로 (즉, 몇몇 상이한 후보 커터를 시험함으로써) 또는, 서열의 분석 및 서열에 기초한 적합한 제한 효소의 선택에 의해 LTVEC의 서열을 알면, 결정될 수 있다. LTVEC가 CosN 부위와 같이 드문 부위를 함유한 벡터 백본을 가지는 상황이라면, 이러한 부위를 인식하는 효소 (예를 들어  $\lambda$  터미나아제)로 절단될 수 있다 (Shizuya et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, 89:8794-7, 1992; Becker and Gold, *Proc Natl Acad Sci USA*, 75:4199-203, 1978; Rackwitz et al., *Gene*, 40:259-66, 1985).
- <106> 단계 5. 진핵 세포 내로 LTVEC의 도입 및 LTVEC의 성공적인 도입이 일어난 세포의 선택
- <107> LTVEC DNA는 인산 칼슘, 지질, 또는 전기천공법에 의해 중재되는 트랜스펙션과 같은, 표준 방법을 이용하여 진핵 세포 내로 도입될 수 있다 (Sambrook, J., E. F. Fritsch And T. Maniatis. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Vols 1, 2, 및 3, 1989). LTVEC가 성공적으로 도입된 세포는 선택제에 노출시킴으로써 선택될 수 있는데, 이는 LTVEC내로 엔지니어링된 선별가능한 마커에 의존한다. 제한되지 않는 예로서, 선별가능한 마커가 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 (neo) 유전자 (Beck, et al., *Gene*, 19:327-36, 1982)라면, LTVEC을 흡수한 세포는 G418-함유 배지에서 선택될 수 있고; LTVEC을 갖지 않는 세포는 사멸하는 반면 LTVEC를 흡수한 세포는 생존할 것이다 (Santerre, et al., *Gene*, 30:147-56, 1984). 다른 적합한 선별가능한 마커는, 히그로마이신 B (Santerre, et al., *Gene*, 30:147-56, 1984; Bernard, et al., *Exp Cell Res*, 158:237-43, 1985; Giordano and McAllister, *Gene*, 88:285-8, 1990), 블라스티시딘 S (Izumi, et al., *Exp Cell Res*, 197:229-33, 1991), 및 당업자에게 익숙한 다른 것과 같은, 진핵 세포에서 활성을 갖는 어떠한 약물을 포함한다.
- <108> 단계 6. 대립유전자의 변형 (MOA)에 대한 정량 분석을 이용하여 진핵 세포에서 상동성 재조합 사건에 대하여 스크리닝한다.
- <109> 관심있는 유전자와 내로 LTVEC를 표적화함으로써 성공적으로 변형된 진핵 세포는 관심있는 유전자와 내에서 대립유전자의 변형을 검출할 수 있고 전체 상동성 팔 또는 팔들에 걸친 분석에 의존하지 않는 다양한 접근법을 이용하여 확인될 수 있다. 이러한 접근법은,
- <110> (a) TaqMan®을 이용한 정량 PCR (Lie and Petropoulos, *Curr Opin Biotechnol*, 9:43-8, 1998);
- <111> (b) 분자 표지를 이용한 정량 MOA 분석 (Tan, et al., *Chemistry*, 6:1107-11, 2000);

- <112> (c) 형광 제자리 혼성화 FISH (Laan, et al., Hum Genet, 96:275-80, 1995) 또는 비교 게놈 혼성화 (CGH) (Forozan, et al., Trends Genet, 13:405-9, 1997; Thompson and Gray, J Cell Biochem Suppl, 139-43, 1993; Houldsworth and Chaganti, Am J Pathol, 145:1253-60, 1994);
- <113> (d) 등은 DNA 증폭 (Lizardi, et al., Nat Genet, 19:225-32, 1998; Mitra and Church, Nucleic Acids Res, 27:e34, 1999);
- <114> (e) 고정된 프로브(들)로의 정량 혼성화 (Southern, J. Mol. Biol. 98: 503, 1975; Kafatos FC; Jones CW; Efstratiadis A, Nucleic Acids Res 7(6):1541-52, 1979);
- <115> (f) Invader Probes® (Third Wave Technologies);
- <116> (g) Eclipse™ 및 Molecular Beacon 프로브 (Synthetic Genetics); 및
- <117> (h) MMP 분석 (High Throughput Genomics)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- <118> 본 발명자들은 여기에서 TaqMan® 정량 PCR이 성공적으로 표적화된 진행 세포를 스크리닝하는데에 이용된 예를 제공한다. 이 제한되지 않는 예에서, TaqMan®은 디플로이드 게놈에서 두 상동성 대립유전자 중 하나의 부분이 또다른 서열로 대체된 상동성 재조합을 겪은 진행 세포를 확인하는데에 사용된다. 전체 상동성 팔 또는 팔들에 걸쳐있는 제한 단편 길이에서의 차이점이 두 대립유전자 중 하나의 변형을 가리키는 전통적인 방법과는 반대로, 정량 TaqMan® 방법은 변형되지 않은 대립유전자의 카피 수에서의 감소 (절반)를 측정함으로써 한 대립유전자의 변형을 검출할 것이다. 특히, 프로브는 변형되지 않은 대립유전자를 검출하고 변형된 대립유전자는 검출하지 않는다. 그러므로, 방법은 변형의 정확한 성질에 대하여 독립적이고 이 예에서 설명된 서열 대체에 제한되지 않는다. TaqMan은 특히 기준 유전자와의 비교에 의해서, 게놈 DNA 샘플에 있는 DNA 주형의 카피 수를 정량하는데에 사용된다 (Lie and Petropoulos, Curr Opin Biotechnol, 9:43-8, 1998). 기준 유전자는 표적 유전자(들) 또는 유전자좌(들)로서 동일한 게놈 DNA에서 정량된다. 그러므로, 두 개의 TaqMan® 증폭 (각각 그 개개의 프로브를 가짐)이 수행된다. 하나의 TaqMan® 프로브는 기준 유전자의 "Ct" (Threshold Cycle)를 측정하고, 반면 다른 프로브는 성공적인 표적화에 의해 대체된 표적화된 유전자(들) 또는 유전자좌(들)의 Ct를 측정한다. Ct는 각각의 TaqMan® 프로브에 대한 출발 DNA의 양을 반영하는 양이다 (즉, 덜 풍부한 서열은 임계 주기수에 도달하는데에 더 많은 PCR 주기수를 필요로 한다). TaqMan® 반응을 위한 주형 서열의 카피 수를 반으로 줄이는 것은 약 하나의 Ct 단위의 증가를 일으킨다. 상동성 재조합에 의해서 대체된 표적 유전자(들) 또는 유전자좌(들)의 한 대립유전자가 있는 세포에서의 TaqMan® 반응은, 비-표적화된 세포 유래 DNA에 비교될 때 기준 유전자에 대한 Ct의 증가 없이 표적 TaqMan® 반응에 대하여 하나의 Ct의 증가를 일으킨다. 이것은 LTVECs를 이용한 진행 세포에서 관심있는 유전자(들) 중 한 대립유전자의 변형을 손쉽게 검출하도록 허용한다.
- <119> 위에 설명된 것과 같이, 대립유전자의 변형 (MOA) 스크리닝은 한 대립유전자의 변형을 검출하여 상동성 재조합을 겪은 세포를 확인하는 어떤 방법의 사용이다. 표적화된 대립유전자는 서로 동일 (상동성)할 필요가 없고, 사실, 그들은 다형성을 함유할 수 있는데, 이는 마우스에서 두 개의 상이한 계통을 교차시키는 것으로부터 발생하는 자손에서의 경우이다. 게다가, MOA 스크리닝에 의해 또한 포함되는 한 특정 상황은 성염색체, 특히 Y 염색체 상에 위치된 몇몇 유전자와 같은, 세포에서 통상적으로 단일 카피로서 존재하는 유전자이다. 이 경우에서, 정량 PCR, 서던 블로팅, 등과 같은, 단일 표적화 대립유전자의 변형을 검출할 방법은 표적화 사건을 검출하는데에 이용될 수 있다. 대립유전자가 다형성일 때 또는 표적화된 세포에서 단일 카피로 존재할 때조차 변형된 진행 세포를 생성하는데에 본 발명의 방법을 사용할 수 있다는 것이 분명하다.
- <120> 단계 8. 유전적으로 변형된 진행 세포의 사용
- <121> (a) 단계 1 부터 7에 설명된 방법에 의해 생성된 유전적으로 변형된 진행 세포는 어떠한 시험관내 또는 생체내 분석에 채택될 수 있는데, 세포의 표현형을 변화시키는 것이 바람직하다.
- <122> (b) 단계 1 부터 7에 설명된 방법에 의해 생성된 유전적으로 변형된 진행 세포는 또한 유전적 변형을 수반하는 생물을 생성하는데에 사용될 수 있다. 유전적으로 변형된 생물은 다음을 포함하는 몇몇 상이한 기술에 의해 생성될 수 있지만 이에 제한되지 않는다.
- <123> 1. 주로 사용되는 래트 및 마우스 ES 세포와 같은 변형된 배아 줄기 (ES) 세포. ES 세포는 표준 배반포 주입 기술 또는 응집 기술 (Robertson, Practical Approach Series, 254, 1987; Wood, et al., Nature, 365:87-9, 1993; Joyner, The Practical Approach Series, 293, 1999), 테트라플로이드 배반포 주입 (Wang, et al., Mech Dev, 62:137-45, 1997), 또는 핵이식 및 복제 (Wakayama, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 96:14984-9,

1999)에 의해 유전적으로 변형된 래트 또는 마우스를 제작하는데에 사용될 수 있다. 토끼 (Wang, et al., Mech Dev, 62:137-45, 1997; Schoonjans, et al., Mol Reprod Dev, 45:439-43, 1996) 또는 닭 (Pain, et al., Development, 122:2339-48, 1996) 또는 다른 종으로부터 유래된 ES 세포는 본 발명의 방법을 이용하여 유전적 변형을 받을 수 있어야 한다.

- <124> 2. 변형된 원생동물은 유전적으로 변형된 식물을 생성하는데에 사용될 수 있다 (예를 들어 미국 특허 제 5,350,689 호 "Zea mays plants and transgenic Zea mays plants regenerated from protoplasts or protoplast-derived cells", 및 미국 특허 제 5,508,189 호 "Regeneration of plants from cultured guard cell protoplasts" 및 그것의 참고문헌 참조).
- <125> 3. 변형된 대립유전자를 갖는 복제된 생물을 생성하기 위해 변형된 진핵 세포로부터 난세포로의 핵이식 (Wakayama, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 96:14984-9, 1999; Baguisi, et al., Nat Biotechnol, 17:456-61, 1999; Wilmut, et al., Reprod Fertil Dev, 10:639-43, 1998; Wilmut, et al., Nature, 385:810-3, 1997; Wakayama, et al., Nat Genet, 24:108-9, 2000; Wakayama, et al., Nature, 394:369-74, 1998; Rideout, et al., Nat Genet, 24:109-10, 2000; Campbell, et al., Nature, 380:64-6, 1996).
- <126> 4. 또다른 세포로 변형된 대립유전자를 이동시키기 위한, 엔지니어링된 염색체(들)의 이동, 및 변형된 대립유전자 또는 엔지니어링된 염색체(들)을 수반하는 생물을 생성하는데에 이러한 세포(들)의 사용을 포함하는 세포-융합 (Kuroiwa, et al., Nat Biotechnol, 18:1086-1090, 2000).
- <127> 5. 본 발명의 방법은 또한 이용되었거나 또는 아직 발견되지 않은 어떠한 다른 접근법도 받을 수 있다.
- <128> 본 발명의 방법의 각 단계를 실행하는데에 사용된 많은 기술이 당업자에게 익숙하다 하더라도, 본 발명자들은 본 발명의 방법의 신규성이 진핵 세포 내로 LTVEC를 도입하여 염색체 유전자좌를 변형시키는 미증유의 방법 및 적합하게 변형된 진핵 세포를 확인하는데에 정량 MOA 분석의 사용과 연결된 이들 단계 및 기술의 유일한 조합에 있다는 것을 주장한다. 이 신규 조합은 내인성 유전자 또는 염색체 유전자좌의 변형을 갖는 생물을 제작하기 위한 이전의 기술을 상회하는 유의한 개선을 나타낸다.

## 실시예

- <129> **실시예 1: OCR10 유전자의 결실을 갖는 마우스 ES 세포의 엔지니어링**
- <130> a. mOCR10를 함유한 거대 게놈 DNA 클론의 선택
- <131> 마우스 OCR10 (mOCR10) 유전자의 코딩 서열을 함유한 거대 게놈 DNA 단편을 갖는 박테리아 인공 염색체 (BAC) 클론은 PCR을 이용한 정렬된 마우스 게놈 DNA BAC 라이브러리 (Incyte Genomics)를 스크리닝함으로써 얻었다. 이 라이브러리를 스크리닝하는데에 채택된 프라이머는 mOCR10 유전자 cDNA 서열로부터 유래하였다.
- <132> 사용된 두 개의 프라이머 쌍:
- <133> (a) 102 bp DNA를 증폭한 OCR10.RAA (5'-AGCTACCAGCTGCAGATGCGGGCAG-3') 및
- <134> OCR10.PVIrc (5'-CTCCCCAGCCTGGGTCTGAAAGATGACG-3'); 및
- <135> (b) 1500 bp DNA를 증폭한 OCR10.TDY (5'-GACCTCACTTGCTACTGACTACTAC-3') 및
- <136> OCR10.QETrc (5'-ACTTGTGTAGGTGCAGAAGGTCTCTTG-3')
- <137> 이 mOCR10 BAC은 완전한 mOCR10 코딩 서열을 포함하는 대략 180 kb의 게놈 DNA를 함유한다. 이 BAC 클론은 LTVEC의 생성에 사용하는데 이 LTVEC는 그 후에 mOCR10의 코딩 영역 일부를 삭제하고 이와 동시에 (개시 코돈을 정확하게 OCR10의 개시 코돈으로 대치한) 리포터 유전자의 도입은 물론이고 이 리포터 유전자 뒤에 *E.coli* 및 포유동물 세포 모두에서의 선택에 유용한 선별가능한 마커 유전자의 삽입에 사용된다 (도 2). 리포터 유전자 (제한되지 않는 예에서, 그 서열이 당업자에게 손쉽게 이용가능한 LacZ)는 *E.coli* β-갈락토시다제 효소를 암호화한다. LacZ의 삽입 위치로 인하여 (이것의 개시 코돈은 mOCR10의 개시 코돈과 동일한 위치에 있음) lacZ의 발현은 mOCR10의 발현을 모방하는데, 이는 이전의 기술을 이용하여 LacZ로의 유사한 대치를 수행한 다른 예에서 관찰된 것과 마찬가지로이다 ("Gene trap strategies in ES cells", W Wurst and A. Gossler, in Joyner, The Practical Approach Series, 293, 1999 참조). LacZ 유전자는 수행되는 단순하고 표준인 효소 분석이 그것의 제자리 발현 패턴을 드러낼 수 있도록 허용하여, 대치된 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌(들)의 정상 발현 패턴을 반영하는 대리 분석을 제공한다.



- <138> b. 공여체 단편의 구성 및 LTVEC의 생성
- <139> mOCR10 LTVEC의 구성에 사용된 변형 카세트는 lacZ-SV40 폴리A-PGKp-EM7-neo-PGK 폴리A 카세트인데 여기에서 lacZ는 위에 설명된 것과 같이 마커 유전자이고, SV40 폴리A는 Simian Virus 40으로부터 유래된 단편으로서 (Subramanian, et al., Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 19:157-64, 1976; Thimmappaya, et al., J Biol Chem, 253:1613-8, 1978; Dhar, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 71:371-5, 1974; Reddy, et al., Science, 200:494-502, 1978) 폴리아데닐화 부위 및 신호를 함유하고 (Subramanian, et al., Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 19:157-64, 1976; Thimmappaya, et al., J Biol Chem, 253:1613-8, 1978; Dhar, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 71:371-5, 1974; Reddy, et al., Science, 200:494-502, 1978), PGKp는 마우스 포스포글리세레이트 키나아제 (PGK) 프로모터이고 (Adra, et al., Gene, 60:65-74, 1987) (포유동물 세포에서 약물 내성 유전자의 발현을 유도하는데에 널리 사용됨), EM7은 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 (neo) 유전자의 발현을 유도함으로써 완료된 LTVEC 구성체의 박테리아에서 포지티브 선택을 허용하는 장점을 가진 강력한 박테리아 프로모터이고, neo는 원핵 세포에서의 가나마이신 내성 및 진핵 세포에서의 G418 내성을 부여하는 선별가능한 마커이고 (Beck, et al., Gene, 19:327-36, 1982), PGK 폴리A는 PGK 유전자로부터 유래된 3' 비번역 영역으로서 폴리아데닐화 부위 및 신호를 함유한다 (Boer, et al., Biochem Genet, 28:299-308, 1990).
- <140> mOCR10 LTVEC를 구성하는데에 있어서, 우선 표준 재조합 유전적 엔지니어링 기술을 이용하여, 변형 카세트에서 LacZ 유전자로부터 상류에 부착된 mOCR10 상동성 박스 1 (hb1) 및 변형 카세트에서 neo-PGK 폴리A 서열의 하류에 부착된 mOCR10 상동성 박스 2 (hb2)로 구성되도록 공여체 단편을 생성하였다 (F계. 2). 상동성 박스 1 (hb1)은 mOCR10 오픈 리딩 프레임 (open reading frame; mOCR10 ORF)의 개시 메티오닌 바로 상류에 있는 211 bp의 비번역 서열로 구성된다 (FIG. 3A-3D). 상동성 박스 2 (hb2)는 마지막 216 bp의 mOCR10 ORF로 구성되며, 정지 코돈에서 끝난다 (FIG. 3A-3D).
- <141> 그 다음으로, 박테리아 상동성 재조합을 이용하여 (Zhang, et al., Nat Genet, 20:123-8, 1998; Angrand, et al., Nucleic Acids Res, 27:e16, 1999; Muylers, et al., Nucleic Acids Res, 27:1555-7, 1999; Narayanan, et al., Gene Ther, 6:442-7, 1999; Yu, et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 97:5978-83, 2000), mOCR10 코딩 영역을 (개시 메티오닌부터 정지 코돈까지) 삽입 카세트에 정확하게 대치하는데에 이 공여체 단편을 사용하여, mOCR10 LTVEC의 구성체를 제작하였다. (FIG. 2). 따라서, 이 mOCR10 LTVEC에서, mOCR10 코딩 서열은 mOCR10 유전자좌에서 대략 20 kb 결실을 생성하는 반면 대략 130 kb의 상류 상동성 (상류 상동성 팔) 및 32 kb의 하류 상동성 (하류 상동성 팔)은 남겨두는 삽입 카세트에 대치하였다.
- <142> 단지 단일 박테리아 재조합 단계가 필요하고 요구되는 서열 정보는 상동성 박스를 생성하는데에 필요한 것 뿐이므로, 이전의 기술을 이용한 표적화 벡터보다 LTVECs가 이용가능한 BAC 라이브러리로부터 더 신속하고 편리하게 생성될 수 있다는 것을 주목하는 것이 중요하다. 반대로, 박테리아 상동성 재조합을 이용하여 표적화 벡터를 생성하는 이전의 접근법은 거대 표적화 벡터를 ES 세포로 도입하기에 앞서 이를 "다듬어"야 할 필요가 있다 (Hill et al., Genomics, 64:111-3, 2000). 이 다듬기가 필요한 이유는 이전의 접근법에 의해 이용되는 스크리닝 방법을 적용하기에 충분할 만큼 상동성 팔을 짧게 생성할 필요가 있기 때문이다. Hill et al.의 방법에서 하나의 주된 단점은 단순히 다듬기 위한 두 개의 추가적인 상동성 재조합 단계 (하나는 변형된 유전자좌의 상류에 있는 영역을 다듬는 것이고 하나는 변형된 유전자좌의 하류에 있는 영역을 다듬는 것)가 필요하다는 것이다. 이를 위해, 실질적으로 더 많은 서열 정보가 필요한데, 이는 다듬는 부위에 걸쳐있는 서열 정보를 포함한다.
- <143> 게다가, 위의 예에 의해 예시된 또다른 분명한 장점은, 단일 단계에서도 손쉽게 mOCR10 유전자 (대략 20 kb)에 걸쳐있는 매우 거대한 결실을 생성할 수 있다는 것이다. 반대로, 이전의 기술을 이용하면, 동일한 업무를 수행하는 것은 몇몇 단계를 필요로 하고 진핵 세포에 변형된 유전자좌를 도입한 후 loxP 부위의 측면에 위치한 서열을 제거하는데에 Cre 리코비나제를 사용하기 위하여 코딩 서열의 상류 및 하류에 loxP 부위를 갖는 영역의 제작을 포함한다. 이것은 한 단계에서 성취되기 어려운 것일 수 있으므로, 상이한 선택 마커를 사용한 두 개의 표적화 벡터 및 ES 세포에서 두 개의 순차적인 표적화 사건을 필요로 하는데, 이 중 하나는 코딩 서열의 상류에 있는 영역에 loxP 부위를 도입하는 것이고 또다른 하나는 코딩 서열의 하류에 있는 영역에 loxP 부위를 도입하는 것이다. 진핵 세포에서 이전의 표적화 기술을 이용하면 거대한 결실의 제작은 종종 낮은 효율로 일어나는데, 이는 상대적으로 짧은 상동성 팔의 측면에 위치한 거대 결실을 함유하는 표적화 벡터를 사용하였을 때 상동성 재조합을 성취하는 빈도가 낮아질 수 있기 때문이라는 것을 더욱 주목해야 한다. 본 발명의 방법을 이용하여 얻어진 높은 효율 (아래 참조)은 진핵 세포에서 상동성 재조합의 비율을 증가시키는 LTVEC에 있는 매우 긴 상동성 팔으로 인한 것이다.

- <144> c. mOCR10 LTVEC DNA의 확인, 제제 및 ES 세포 내로의 도입
- <145> 삽입 카세트 및 상동성 서열의 접합부 주위에 있는 서열은 DNA 서열 분석으로써 확인하였다. mOCR10 LTVEC의 크기는 제한효소 분석 후 펄스 필드 겔 전기영동 (PFGE)으로써 확인하였다 (Cantor, et al., Annu Rev Biophys Biophys Chem, 17:287-304, 1988; Schwartz and Cantor, Cell, 37:67-75, 1984). mOCR10 LTVEC의 표준 거대-스케일 플라스미드 제제를 수행하고, 플라스미드 DNA는 제한 효소 NotI으로 효소절단하여 직쇄 DNA를 생성하였는데, 이 효소는 mOCR10 LTVEC의 벡터 백본을 절단한다. 그 다음 직쇄화된 DNA를 전기천공법으로써 마우스 ES 세포 내로 도입하였다 (Robertson, Practical Approach Series, 254, 1987; Joyner, The Practical Approach Series, 293, 1999; Sambrook, et al., Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Vols 1, 2, 및 3, 1989). mOCR10 LTVEC로 성공적으로 트랜스펙션된 ES 세포는 표준 선택 방법을 이용하여 G418-함유 배지에 대하여 선택하였다 (Robertson, Practical Approach Series, 254, 1987; Joyner, The Practical Approach Series, 293, 1999).
- <146> d. 정량 대립유전자의 변형 (MOA) 분석을 이용한 표적화된 ES 세포의 확인
- <147> 두 개의 내인성 mOCR10 유전자 중 하나가 변형 카세트 서열에 의해 대체된 ES 세포를 확인하기 위해, 설명된 것과 같이 표준 TaqMan® 방법을 이용한 정량 PCR로써 개개의 ES 세포 클론으로부터 유래된 DNA를 분석하였다 (Applied Biosystems, TaqMan® Universal PCR Master Mix, catalog number P/N 4304437; 또한 <http://www.pebiiodocs.com/pebiiodocs/04304449.pdf> 참조). 사용한 프라이머 및 TaqMan® 프로브는 도 3a-3b에서 설명한다. 총 69개의 독립적인 ES 세포 클론을 스크리닝 하였고 그 중 3개를 포지티브로서, 즉 하나의 내인성 mOCR10 코딩 서열을 상기 설명된 변형 카세트로서 대체한 클론으로서 확인하였다.
- <148> MOA 접근법의 몇몇 장점은 명백하다:
- <149> (i) 변형되는 유전자좌 외부에 프로브를 사용할 필요가 없으므로, 변형된 유전자좌의 측면에 위치하는 서열을 알 필요가 없다.
- <150> (ii) 이전 방법의 선택이었던 전통적인 서던 블로팅 방법론에 비하여 이것을 수행하는데 매우 적은 시간이 필요하므로 (Robertson, Practical Approach Series, 254, 1987, Joyner, The Practical Approach Series, 293, 1999), 올바르게 변형된 세포를 확인하기 위한 시간을 전형적인 며칠부터 단 몇 시간으로 줄인다.
- <151> 이것은 과거에 수행되었던 스크리닝에 대하여 유의한 개선이며, 진행 세포에서 상동성 재조합에 있어서의 스크리닝을 위한 훨씬 덜 노동-집약적이고 훨씬 더 비용-고효율적인 접근법으로 만든다.
- <152> 본 발명의 방법의 또다른 장점은 난해한 유전자좌를 표적화하는 그 능력 때문에 또한 이전의 기술 보다 우위에 있다는 것이다. 이전의 기술을 이용하면, 어떤 유전자좌에 있어서 성공적인 표적화의 빈도는 통합 사건 2000회 당 1회만큼 낮을 수 있고, 이보다 더 낮을 수 있다. 본 발명의 방법을 이용하면, 본 발명자들은 긴 (즉, 이전의 기술에 의한 것보다 훨씬 더 큰) 상동성 팔을 함유한 LTVECs를 이용하여 훨씬 더 효과적으로 이러한 난해한 유전자좌를 표적화할 수 있다는 것을 예증하였다. 상기 설명된 제한되지 않는 예가 예증한 것과 같이, 본 발명자들은 OCR10 유전자좌를 표적화하였는데, 이 유전자좌는 전통적인 기술을 이용하여 표적화에 대해 저항성인 것으로 증명되었다. 본 발명의 방법을 이용하면, 본 발명자들은 mOCR10 LTVEC가 통합된 69 개의 ES 세포 클론 중 3 개 (160 kb 이상의 상동성 팔을 함유하고, 20 kb 결실을 도입)에서 성공적인 표적화를 얻었다는 것을 나타내었고, 반면 15 kb 미만의 결실을 도입하고 10 내지 20 kb 보다 더 짧은 상동성 팔을 갖는 플라스미드-기초 벡터를 사용한 ES 세포 표적화를 위한 이전의 기술 (Joyner, The Practical Approach Series, 293, 1999)을 사용하면, 600 개의 벡터 통합체 사이에서 어떠한 표적화된 사건도 발견되지 않았음을 나타내었다. 이들 데이터는 이전의 기술을 넘어서 본 발명의 방법의 우월성을 명백하게 예증한다.
- <153> **실시예 2 : LTVECs를 표적화 벡터로서 사용할 때 증가된 표적화 빈도 및 동질유전자형 DNA 사용의 폐기**
- <154> 상기 설명된 것과 같이, 긴 상동성 팔을 사용하여 얻은 증가된 표적화 빈도는 표적화되는 진행 세포의 DNA에 동질유전자형인 (즉, 서열에서 동일한) 게놈 DNA의 사용으로부터 유래되는 이익을 줄일 수 있다. 이 가설을 시험하기 위해, 본 발명자들은 표적화되는 진행 세포와 동일한 마우스 아주로부터 유래된 게놈 DNA를 사용한 다수의 LTVECs (동질유전자형으로 생각됨), 및 표적화되는 진행 세포의 그것과는 상이한 마우스 아주로부터 유래된 게놈 DNA를 사용한 다수의 다른 LTVECs (비-동질유전자형으로 생각됨)를 제작하였다. 두 셋트의 LTVECs는 1 내지 13%의 범위를 갖는 유사한 표적화 빈도를 나타내었고 (표 1), 이것은 LTVECs를 사용한 성공적인 표적화가 동질 유전자형에 의존하지 않는다는 것을 가리킨다.

표 1

표적 유전자	설명	DNA 기원	ES 세포	대략적 크기 (kb)						결실	포지티브 클론		표적화 %
				BAC 크기	Arm 1	Arm 2					포지티브	클론	
OGH	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	148	50	90	5	4	4				4
OCRI0(A)	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	165	135	8	20	1	1.4				
OCRI0(B)	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	160	130	32	20	3	4.3				
MA61	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	95	N/D	N/D	30	3	4.6				
MA16	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	120	N/D	N/D	8	8	13				
AGRP	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	189	147	32	8	1	1.1				
SHIP-2	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	136	30	90	11	7	15				
Sm22	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	70	35	35	0.9	18	20				
LGR7L	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	200	N/D	N/D	1	3	3.2				
C5aR	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	160	80	25	1	4	4.2				
IL18	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	120	50	65	10	7	7.3				
PLGF	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	130	40	20	8	1	1				
NaDC-1	LacZ-ATG 융합	Svj	C17	180	30	45	25	4	2.1				
ROR1	세 포 내 LacZ 융합	C17	C17	55	14	14	20	5	5				
ROR1	세 포 내 3xmyc 융합	C17	C17	55	14	14	20	2	2				
ROR2	브라키 닥 텔리 돌연변이 및 Myc 태그	C17	C17	45	11	24	0.5	2	2				

### 실시예 3: 표적화된 ES 클론의 확인을 위한 TaqMan<sup>®</sup>-기초 MOA의 상세한 설명

LTVEC을 흡수하고 그것을 상동성 재조합에 의하여 표적 유전자좌에서 게놈 내로 통합시킨 ES 클론은, 실시간 정량 PCR을 사용하여, 두 개의 표적화된 대립유전자 중 하나가 변형된 표적화된 ES 세포 클론과 두 개의 대립유전자 모두가 변형되지 않고 유지된 비-표적화 ES 세포 클론 사이의 차이점을 구별해내는 대립유전자 변형 (MOA) 분석에 의하여 확인한다. MOA 분석은 1차 및 2차 스크린으로 구성된다. 1차 스크린은 다음: (1) LTVEC-트랜스펙션된 ES 세포 클론을 젤라틴-피복 96웰 플레이트 상에서 성장시키는 단계; (2) 각 ES 세포로부터 게놈 DNA의 분리 단계; (3) 게놈 DNA 샘플을 384-웰 플레이트 상에서 8 가지의 별개의 정량적 PCR의 주형으로 사용하는 단계로서, PCR 2 개 반응에서는 결실에 표적화하는 게놈 단편의 한쪽 말단에 있는 DNA 서열에 혼성화되는 표적-유전자좌-특이적 프라이머 세트를 채용하고 ('상류 PCR'), PCR 2 개 반응에서는 결실에 표적화하는 게놈 단편의 다른 한쪽 말단에 있는 DNA 서열에 혼성화되는 표적-유전자좌-특이적 프라이머 세트를 채용하고 ('하류 PCR'), PCR 4 개 반응에서는 네 가지의 비-표적화된 대조표준 유전자좌를 인지하는 프라이머 세트를 채용하며 ('대조표준 PCR'), 각 PCR은 증폭된 서열을 인지하고 그것의 형과 신호는 PCR 산물의 양에 직접 비례하는 형광 프로브 (예를 들어, TaqMan<sup>®</sup> [ABI], Eclipse<sup>™</sup>, 또는 Molecular Beacon 프로브 [Synthetic Genetics])를 포함하는 것을 특징으로 하는 단계; (4) PCR 동안 증폭의 축적을 정량하고, 임계 순환 (CT), 형광 신호가 바탕값 교란 이상

으로 검출가능한 PCR 상의 점을 측정하는 형광 검출기가, 열순환기와 조합된 장치(예를 들어 ABI7900HT)에서 PCR 산물을 전개하는 단계; (5) 각 ES 세포 클론 DNA 샘플에 대하여, 상류 PCR과 각각의 네가지 대조표준 PCR 사이 및 하류 PCR과 각각의 네가지 대조표준 PCR 사이의  $C_T$  값의 차이( $\Delta C_T$ )를 계산하여  $\Delta C_T$ 값의 8개 표를 제작하는 단계; (6) 양의 값이 되도록  $\Delta C_T$  값을 정상화시키는 단계; (7) 각 표적-대조표준 비교 표에 대하여  $\Delta C_T$  중간값을 계산하는 단계; (8) 8 가지  $\Delta C_T$  표를 시험하고, 주어진 ES 세포 클론 DNA 샘플이  $\Delta C_T$  중간값보다 0.5 내지 1.5, 0.25 내지 1.5, 0.5 내지 2.0, 0.25 내지 2.0, 0.5 내지 3.0 및 0.25 내지 3.0 순환 더 큰 허용한도 내에 속하는  $\Delta C_T$  값을 나타내는 회수를 계산하는 프로그램을 사용하여 (이 같은 프로그램을 제작하거나 작성하는데 적당한 컴퓨터 프로그램 언어의 예는 시각적 베이직, Java, 또는 당업자에게 친숙한 다른 컴퓨터 프로그램 언어를 포함함) 신뢰도 스코어를 결정하는 단계; (9) 8 개의  $\Delta C_T$  표 각각에 대한 값과 그것의 중간값을 히스토그램으로 도표화하는 단계; 및 (10) 신뢰도 스코어 및  $\Delta C_T$  히스토그램의 조사로부터 올바르게 표적화된 ES 세포 후보를 확인하는 단계를 포함한다. 바람직한 실시예에서, 후보 표적화 클론  $\Delta C_T$ 값은 8 개의 대조표준 비교로부터의 8 개의 중간값보다 0.5 내지 1.5 순환 더 큰 범위내에 해당한다.

<158> MOA 분석 1차 스크린에 의하여 확인된 후보 클론은 2차 스크린에서 확인되거나 거부되는데, 그것은 (1) 각 양성 후보 ES 세포 클론으로부터의 게놈 DNA, 다수의 음성 클론으로부터의 게놈 DNA, 및 LTVEC LacZ-Neo 카세트의 하나 또는 두 복제본을 함유하는 마우스로부터의 게놈 DNA 복제수 대조표준으로부터의 게놈 DNA를, 384-웰 플레이트 상에서의 8 가지의 별개의 정량적 PCR에서 주형으로 사용하는 단계로서, 1 개 반응은 (1차 스크린에서와 같은) 상류 PCR, 1 개 반응은 (1차 스크린에서와 같은) 하류 PCR, 4 개의 반응은 1차 스크린에서 사용된 것과는 다른 두개의 대조표준 유전자좌를 갖는 대조표준 PCR, 1 개의 반응은 LTVEC의 LacZ 유전자에 대하여 특이적인 프라이머와 프로브를 사용한 PCR, 그리고, 한 개의 반응은 LTVEC의 Neo 유전자에 대하여 특이적인 프라이머와 프로브를 사용한 PCR인 것을 특징으로 하는 단계; (2) 1차 스크린에서와 같은 정량적 PCR 장치에서의 PCR 전개; (3) 1차 스크린에서와 같은, 상류 PCR과 각각의 두가지 대조표준 PCR 사이, 하류 PCR과 각각의 두가지 대조표준 PCR 사이, LacZ PCR과 각각의 두가지 대조표준 PCR 사이, Neo PCR과 각각의 두가지 대조표준 PCR 사이의  $\Delta C_T$ 를 계산하여  $\Delta C_T$ 값의 8개 표를 제작하는 단계; (4) 양의 값이 되도록  $\Delta C_T$  값을 정상화시키는 단계; (5) 각 표적-대조표준 비교 표에 대하여  $\Delta C_T$  중간값을 계산하는 단계; (6) 1차 스크린에서와 같이 신뢰도 스코어를 계산하는 단계; 및 (7) 8 가지의  $\Delta C_T$  표 각각의 값과 중간값을 도표화하는 단계를 포함한다.

<159> 1차 스크린과 2차 스크린에 대한 신뢰도 스코어와  $\Delta C_T$  히스토그램의 조사로부터, 올바르게 표적화된 ES 클론 후보를 확인하거나 거부한다. 바람직한 실시예에서, 후보 표적화 클론에 대한  $\Delta C_T$  값은 1차 및 2차 스크린을 한 것으로부터의 12 대조표준 비교로부터 12 가지의 중간값보다 0.5 내지 1.5 순환 더 큰 범위 내에 해당한다.

<160> 확인된 올바르게 표적화된 ES 클론에서의 디플로이드 게놈 당 LTVEC 복제수를 계수하기 위하여, LacZ 및 Neo PCR와 두가지 대조표준 PCR을 비교한 것으로부터의  $\Delta C_T$  값을 LacZ-Neo 복제수 표준에 대한  $\Delta C_T$  값을 비교한다. 각 ES 세포 클론은 1, 2, 또는 2 보다 많은 복제수의 LTVEC를 갖는 것으로 계수된다. 각 변형된 대립유전자 프로젝트에 대하여, ES 세포 클론을 96 개의 클론의 군들(보통 288개 미만의 전체 클론수)에서 스크리닝하였는데 MOA에서 양성으로 측정되고 LacZ-Neo 카세트의 단일 복제수를 갖는 3 개의 클론이 확인된다.

<161> **실시예 4: ES 세포에서 바르게 표적화된 LTVECs를 확인하기 위한 FISH의 사용**

<162> 여기에 기재된 LTVEC 기술을 사용하여, 본 발명자들은 ES 세포에서 SM22  $\alpha$  유전자를 낙아웃시켰다. SM22  $\alpha$ 는, 수축성 SMC의 골격근 액틴 필라멘트 다발과 물리적으로 연결된, 22-kD의 민무늬근 세포 (SMC) 계-제한 단백질이다. 그 후, 표적화된 ES 세포를 중기 염색체 배열물 상에서 표준 형광 원위치 혼성화 (FISH)를 받게하여 유전자가 적절하게 표적화되었음을 확인하였다. 실험은 두 가지 프로브: 1) LTVEC을 생성하기 위하여 사용된 비변형 SM22  $\alpha$ BAC 클론으로 구성된 SM22  $\alpha$  유전자 프로브와 2) 표적화 사건에 의하여 제조된 유전자 변형만을 검출하는 LacZ와 네오마이신 DNA (LacZ와 Neo 유전자 카세트의 삽입물) 프로브를 가지고 수행하였다. 중기 염색체 배열물을 세포로부터 제조하고 혼성화는 동일한 배열물 내에서 각 프로브의 혼성화의 검출을 허용하도록 상이한 색상의 형광단으로 표지된 두 가지 프로브로 동시에 수행하였다. 동시에 대조표준으로서 비-표적화된 ES 세포주를 분석하였다. 예상되는 바와 같이, 대조표준 배열물에서는, SM22  $\alpha$ 의 두가지 대립 유전자가 상동성 염색체 팔에서 검출되었으나, LacZ-Neo 프로브의 혼성화는 일어나지 않았다. 대조표준에서와 같이, 표적화된 ES 세포 배열물에서는 두 대립유전자가 또한 동일한 염색체상 위치에서 및 상동성 염색체 상에서 검출되었으나, LacZ-



Neo와 함께 이중표지된 것은 두 염색체 중 하나에서만 나타났는데, 이는 SM22 a의 그 대립유전자에서 SM22 a와 LacZ-Neo DNA의 공-편재를 나타내었다. 중요하게도, 배열물 중의 대응하지 않는 위치에서는 SM22 a 또는 LacZ-Neo 유전자 서열이 검출되지 않았다. SM22 a 유전자 서열의 여분의 통합의 부존재와 상동성염색체 짝 중 한 염색체 상의 SM22 a와 LacZ-Neo의 공-편재는 SM22 a 대립유전자 중 하나에 상동성 재조합을 통한 LacZ-Neo의 올바른 표적화가 일어났음을 강력하게 시사한다.

<163> **실시예 5: ES 세포를 전기천공법하는데 사용하는 DNA 양을 줄이는 것이 표적화 효율을 개선시킴.**

<164> 마우스 배아 줄기 (ES) 세포에서 유전자의 표적화 변형을 위한 표준화된 방법은 전기천공법 방법에서 20 내지 40  $\mu\text{g}$ 의 표적화 벡터를 전형적으로 채용한다. 본 발명자들은 LTVEC와 함께, 훨씬 소량의 DNA -  $1 \times 10^7$  세포당 약 1 내지 5  $\mu\text{g}$  - 로의 전기천공법이, 올바르게 표적화된 상동성 재조합 사건의 빈도를 배가시키는 반면, 부수적, 비상동성 삽입 사건은 상당히 감소시킨다는 것을 발견하였다. 표적화 효율의 이 명백한 개선은 매우 중요한데, 그 이유는 올바르게 표적화된 단일복제수 변형을 갖는 몇몇의 양성 클론을 찾기 위하여 스크리닝하는데 필요한 ES 세포 수를 유의하게 감소시키기 때문이다. 그외의 잇점은 비용을 감소시키고 트로풋을 증가시키는 것이다.

<165> **실시예 6: 근육위축을 연구하기 위하여 본 발명의 방법을 사용하여 MA61 낙아웃 마우스를 제조함**

<166> MAFbx라고도 불리우는 M61는, 근육위축의 다양한 상태에서 상향조절되는 최근 발견된 유비퀴틴 리가제이다. (여기에 각각 그 전체가 참고문헌으로서 첨부된, 모두 Regeneron Pharmaceuticals, Inc.의 2001년 1월 31일 출원된 미국 가출원 제60/264,926호, 2001년 8월10일 출원된 미국 가출원 제60/311,697호, 및 2001년 10월 22일 출원된 (일련번호가 아직 알려지지 않은) 미국 가출원 참조.) 이 유전자의 근육위축에서의 생물학적 의의를 더 연구하기 위하여, 다음과 같이 본 발명의 방법을 사용하여 낙아웃 마우스를 제조하였다.

<167> 우선, MA61 유전자를 함유하는 클론된 큰 게놈 단편을 얻기 위하여, 박테리아 인공 유전자 (BAC) 라이브러리를 MA61 cDNA 서열로부터 유래한 프라이머로 스크리닝하였다. 그 후, 이와 같이 얻어진 BAC 클론을 진핵세포를 위한 거대 표적화 벡터 (LTVEC)를 제작하기 위하여 다음과 같이 사용하였다. 5' 상동성 박스/LacZ 유전자/polyA/PGV 프로모터/neo/polyA/3' 상동성 박스를 함유하는 변형 카세트를 제작하였다. 상동성 박스는 LTVEC의 제작 동안에 박테리아 상동성 재조합의 부위를 표시하기 위하여 부착하였다. LacZ 유전자는 그것의 개시 코돈이 MA61 유전자의 코돈과 동일한 위치가 되도록 위치된 리포터 유전자이다. 박테리아에서의 상동성 재조합 후에, 변형 카세트는 MA61 유전자와 교체된다. 이와 같이, BAC 클론에서의 MA61 코딩 서열이 상기 기재된 바와 같이 조작된 변형 카세트로 교체된 MA61 LTVEC을 제조한다. 그 후, LTVEC DNA를 제조하고 정제하고, 하기된 바와 같이 진핵 세포 내로 도입하기 위하여 선형화한다.

<168> MA61 LTVEC DNA 소량제조물을 제조하고 (Sambrook, J., E. F. Fritsch 및 T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판 1, 2, 및 3권, 1989; Tillett 및 Neilan, Biotechniques, 24:568-70, 572, 1998; [http://www.qiagen.com/literature/handbooks/plkmini/plm\\_399.pdf](http://www.qiagen.com/literature/handbooks/plkmini/plm_399.pdf)), 박테리아 상동성 재조합 단계를 위하여 이용되는 재조합형성 단백질질을 코딩하는 플라스미드를 제거하기 위하여(Zhang et al., Genet, 20:123-8, 1998; Marayanan et al., Gene Ther, 6:442-7, 1999) 전기천공법을 사용하여 E.coli 내로 재-형질전환시킨다 (Sambrook, J., E. F. Fritsch 및 T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판 1, 2, 및 3권, 1989). MA61 LTVEC를 진핵세포에 도입하기 전에, 다량의 MA61 LTVEC를 표준 방법학에 의하여 제조한다 (<http://www.qiagen.com/literature/handbooks/plk/plklow.pdf>; Sambrook, J., E. F. Fritsch 및 T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판 1, 2, 및 3권, 1989; Tillett 및 Neilan, Biotechniques, 24:568-70, 572, 1998).

<169> 그 다음, 진핵생물 내로 도입하기 위하여 MA61 LTVEC를 제조하기 위하여, MA61 LTVEC를 선형화하였다. 이것은 변형된 내재성 유전자나 긴 상동성 팔과 인접하는 염색체 위치 DNA를 보존시키는 제한효소 NotI로 절단함에 의하여 얻어졌다.

<170> 그 후, MA61 LTVEC를 표준 전기천공법 방법학에 의하여 진핵세포 내로 도입시켰다 (Sambrook, J., E. F. Fritsch 및 T. Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 제2판 1, 2, 및 3권, 1989). 선택제에 노출시킴으로써 MA61 LTVEC가 성공적으로 도입된 세포를 선택하였다. 이 변형 카세트에서 사용된 선택 마커가 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 (neo) 유전자 (Beck, et al., Gene, 19:327-36, 1982)이기 때문에, MA61 LTVEC를 흡수한 세포는 살아남는다(Santerre, et al., Gene, 30:147-56, 1984).

<171> MA61 LTVEC를 MA61 위치내로 표적화함으로써 성공적으로 변형된 진핵세포는 정량적 PCR 방법 TaqMan<sup>®</sup>(Lie 및 Petropoulos, Curr Opin Biotechnol, 9:43-8, 1998)로 확인하였다.

<172> 마지막으로, 유전적으로 변형된, 이 경우에는 낙아아웃, 마우스를 제조하기 위하여 표준 주머니배 주사 기술에 의하여 유전적으로 변형된 ES 세포를 사용하였다. 이와 같이 제조된 것이, MA61 유전자가 결실된 MA61 낙아아웃 마우스이다.

<173> 이들 낙아아웃 마우스와 야생형(WT) 마우스 둘 모두를, 마우스를 탈신경시킴으로써 만들어지는 위축-유도 조건 하에 노출시켰고 위축의 수준을 비교하였다. 먼저, 좌골신경을 마우스의 우측 뒷다리 대퇴 부분에서 분리하고 가로절단하였다. 좌골신경의 가로절단은 탈신경을 유발하고, 14일 이상 동안, 하지의 근육에서, 구체적으로 14일 이상 동안 전방 경골과 장딴지근에서 위축을 일으킨다. 탈신경 후 7일과 14일에, 동물을 이산화탄소 흡입에 의하여 희생시켰다. 그 후, 전방 경골 (TA)과 장딴지근 (GA)을 (탈신경된) 우측 및 (정상) 좌측 하지로부터 분리하여, 칭량하고, 고정된 길이에서 액체질소 냉각 이소펜탄에서 동결시켰다. 탈신경된 다리로부터의 근육 중량과 탈신경되지 않은 다리로부터의 근육 중량을 비교함으로써 위축량을 평가하였다.

<174> 좌골신경의 가로절단 후 7일과 14일에 근육 위축을 평가하였다. 우측, 탈신경된 근육의 흡습 중량을 좌측, 탈신경되지 않은 근육의 흡습 중량과 비교하였다. 우측: 좌측의 비교를 표 2에 나타낸다.

<175> 제7일                      장딴지근                      전방 경골

유전자형	샘플 크기	평균	SE	샘플크기	평균	SE
WT	7	0.76	0.016	11	0.68	0.033
KO	6	0.84	0.022	11	0.80	0.015

<177> 제14일                      장딴지근                      전방 경골

유전자형	샘플 크기	평균	SE	샘플크기	평균	SE
WT	5	0.55	0.024	5	0.62	0.023
KO	5	0.80	0.019	5	0.80	0.012

<179> 제7일과 제 14일에, 낙아아웃 마우스로부터의 근육은 야생형 마우스로부터의 근육에 비하여 유의하게 ( $p < .001$ ) 낮은 위축을 나타냈다. 낙아아웃 및 야생형 마우스 사이의 차이는 제14일에서가 제7일에서보다 컸다. 야생형 마우스는 제7일과 제14일 사이에서 위축을 계속한 반면, 낙아아웃 마우스는 더이상의 위축을 나타내지 않았다.

<180> 요약하면, LTVEC를 제조하는 방법과 그것을 ES 세포에서 상동성 재조합 사건을 위한 MOA 스크리닝과 조합하여 표적화 벡터로서 직접 사용하는 것은, 유전적으로 변형된 유전자좌를 조작하기 위한, 신속하고 저렴한 신규의 방법을 제공하고, 지루하고, 시간낭비인 종전에 사용되던 방법에 비하여 유의한 개선을 제공한다. 그러므로, 그것은 종래 방법학에 의하면 반드시 필요한 시간과 비용의 일부만으로, 본질적으로 생체의 게놈 내의 임의의 모든 유전자의, 신속한 대규모 생체내 기능 유전학 분석할 수 있는 가능성을 열고 있다.

<181> 상기 발명은 설명과 실시예에 의하여 다소 상세하게 기술되었지만, 첨부된 청구항의 요지와 범위로부터 벗어나지 않고 본 발명의 교시로부터 어떤 변화와 변형이 이루어질 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다.

## 도면의 간단한 설명

<37> 도 1은 박테리아 상동성 재조합을 이용한 전형적인 LTVEC 생성의 개요도이다.

<38> (hb1 = 상동성 박스 1; hb2 = 상동성 박스 2; RE = 제한효소 부위).

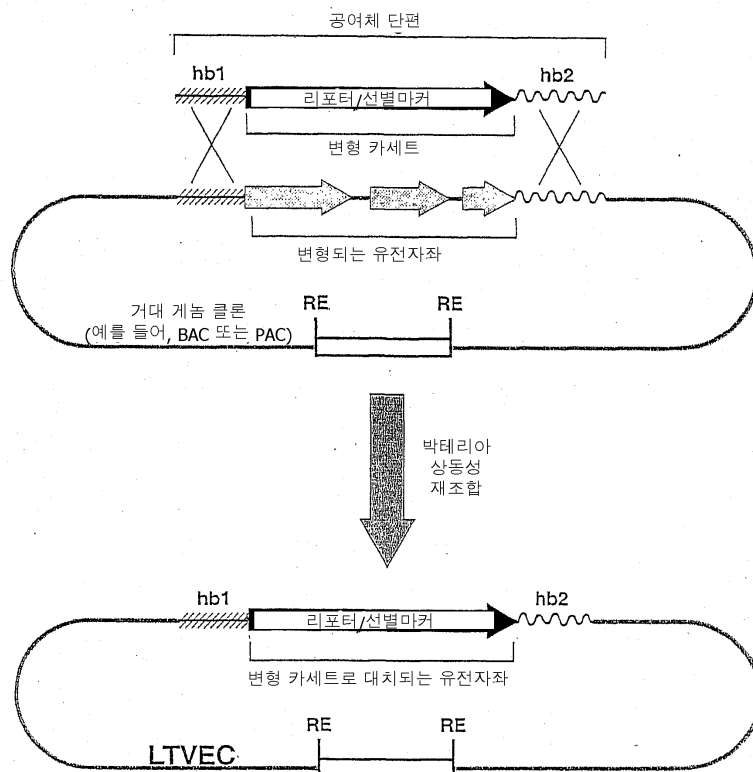
<39> 도 2는 마우스 OCR10에 대한 공여 단편 및 LTVEC의 개요도이다.

<40> (hb1 = 상동성 박스 1; lacZ =  $\beta$ -갈락토시다제 ORF; SV40 polyA = 시미안 바이러스40 유래 DNA 단편으로서 폴리아데닐화 부위 및 신호를 함유; PGKp = 마우스 포스포글리세레이트 키나아제 (PGK) 프로모터; EM7 = 박테리아 프로모터; neo = 네오마이신 포스포트랜스퍼라제; PGK polyA = PGK 유전자 유래의 3' 비번역 영역으로서 폴리아데닐화 부위 및 신호를 함유; hb2 = 상동성 박스 2).

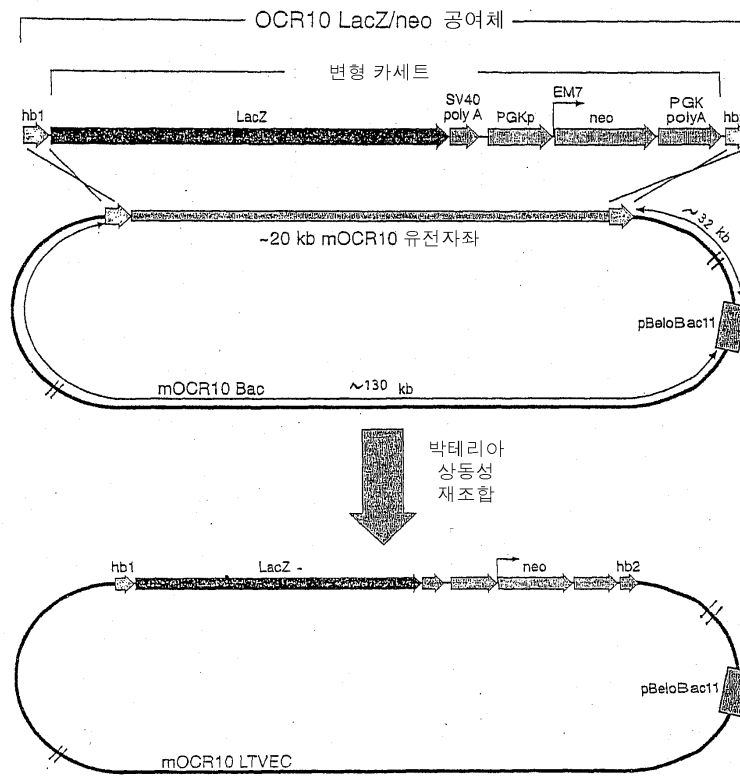
- <41> 도 3a-3d는 마우스 OCR10 cDNA, 상동성 박스 1 (hb1), 상동성 박스 2 (hb2), 및 TaqMan® 프로브의 서열 및 mOCR10 LTVEC을 사용하여 표적화된 ES 세포에서 대립유전자의 변형 (MOA)을 검출하기 위해 정량 PCR 분석에 사용된 프라이머이다.
- <42> hb1: 1 내지 211 염기쌍
- <43> hb2: 1586 내지 1801 염기쌍
- <44> mOCR10 엑손 3으로부터 유래된 TaqMan® 프로브 및 상응하는 PCR 프라이머 세트 :
- <45> TaqMan® 프로브: 413번 부터 439번 뉴클레이티드-상위 가닥
- <46> 프라이머 ex3-5': 390번 부터 410번 뉴클레오티드-상위 가닥
- <47> 프라이머 ex3-3': 445번 부터 461번 뉴클레오티드-하위 가닥
- <48> mOCR10 엑손 4로부터 유래된 TaqMan® 프로브 및 상응하는 PCR 프라이머 세트 :
- <49> TaqMan® 프로브: 608번 부터 639번 뉴클레오티드-상위 가닥
- <50> 프라이머 ex4-5': 586번 부터 605번 뉴클레오티드-상위 가닥
- <51> 프라이머 ex4-3': 642번 부터 662번 뉴클레오티드-하위 가닥

## 도면

도면1



도면2





도면3a

```

10      20      30      40      50      60
CCCCGGGCTT CCTGTTCTAA TAAGAATACC TCCTAGGTCC CCCATGGGCT AACCTCATCT
GGGGCCCGAA GGACAAGATT ATTCTTATGG AGGATCCAGG GGGTACCCGA TTGGAGTAGA

70      80      90      100     110     120
TTGGTACTCA ACAGGGGTCT TCTTTATGAG CTTCGGACCA GCTCTTTTGA TGTGGCAGGG
AACCATGAGT TGTCCCCAGA AGAAATACTC GAAGCCTGGT CGAGAAACT ACACCGTCCC

130     140     150     160     170     180
ACTGACCCTG GGTGGGGAAG CCACTCAGTG CATGACCCCA GCTGGTTCAC CACATATACC
TGACTGGGAC CCACCCCTTC GGTGAGTCAC GTACTGGGGT CGACCAAGTG GTGTATATGG

190     200     210     220     230
ACATACTTTT CTGTCAGGTC TGGGACACAG C ATG CCC CGG GGC CCA GTG GCT GCC
TGTATGAAAA GAACGTCCAG ACCCTGTGTC G TAC GGG GCC CCG GGT CAC CGA CGG
Met Pro Arg Gly Pro Val Ala Ala>

240     250     260     270     280
TTA CTC CTG CTG ATT CTC CAT GGA GCT TGG AGC TGC CTG GAC CTC ACT
AAT GAG GAC GAC TAA GAG GTA CCT CGA ACC TCG ACG GAC CTG GAG TGA
Leu Leu Leu Leu Ile Leu His Gly Ala Trp Ser Cys Leu Asp Leu Thr>

290     300     310     320     330
TGC TAC ACT GAC TAC CTC TGG ACC ATC ACC TGT GTC CTG GAG ACA CGG
ACG ATG TGA CTG ATG GAG ACC TGG TAG TGG ACA CAG GAC CTC TGT GCC
Cys Tyr Thr Asp Tyr Leu Trp Thr Ile Thr Cys Val Leu Glu Thr Arg>

340     350     360     370
AGC CCC AAC CCC AGC ATA CTC AGT CTC ACC TGG CAA GAT GAA TAT GAG
TCG GGG TTG GGG TCG TAT GAG TCA GAG TGG ACC GTT CTA CTT ATA CTC
Ser Pro Asn Pro Ser Ile Leu Ser Leu Thr Trp Gln Asp Glu Tyr Glu>

380     390     400     410     420
GAA CTT CAG GAC CAA GAG ACC TTC TGC AGC CTA CAC AAG TCT GGC CAC
CTT GAA GTC CTG GTT CTC TGG AAG ACG TCG GAT GTG TTC AGA CCG GTG
Glu Leu Gln Asp Gln Glu Thr Phe Cys Ser Leu His Lys Ser Gly His>

430     440     450     460     470
AAC ACC ACA CAT ATA TGG TAC ACG TGC CAT ATG CGC TTG TCT CAA TTC
TTG TGG TGT GTA TAT ACC ATG TGC ACG GTA TAC GCG AAC AGA GTT AAG
Asn Thr Thr His Ile Trp Tyr Thr Cys His Met Arg Leu Ser Gln Phe>

480     490     500     510     520
CTG TCC GAT GAA GTT TTC ATT GTC AAC GTG ACG GAC CAG TCT GGC AAC
GAC AGG CTA CTT CAA AAG TAA CAG TTG CAC TGC CTG GTC AGA CCG TTG
Leu Ser Asp Glu Val Phe Ile Val Asn Val Thr Asp Gln Ser Gly Asn>

530     540     550     560     570
AAC TCC CAA GAG TGT GGC AGC TTT GTC CTG GCT GAG AGC ATC AAG CCA
TTG AGG GTT CTC ACA CCG TCG AAA CAG GAC CGA CTC TCG TAG TTC GGT
Asn Ser Gln Glu Cys Gly Ser Phe Val Leu Ala Glu Ser Ile Lys Pro>

```

도면3b

```

580      590      600      610
GCT CCC CCC TTG AAC GTG ACT GTG GCC TTC TCA GGA CGC TAT GAT ATC
CGA GGG GGG AAC TTG CAC TGA CAC CGG AAG AGT CCT GCG ATA CTA TAG
Ala Pro Pro Leu Asn Val Thr Val Ala Phe Ser Gly Arg Tyr Asp Ile>

620      630      640      650      660
TCC TGG GAC TCA GCT TAT GAC GAA CCC TCC AAC TAC GTG CTG AGA GGC
AGG ACC CTG AGT CGA ATA CTG CTT GGG AGG TTG ATG CAC GAC TCT CCG
Ser Trp Asp Ser Ala Tyr Asp Glu Pro Ser Asn Tyr Val Leu Arg Gly>

670      680      690      700      710
AAG CTA CAA TAT GAG CTG CAG TAT CGG AAC CTC AGA GAC CCC TAT GCT
TTC GAT GTT ATA CTC GAC GTC ATA GCC TTG GAG TCT CTG GGG ATA CGA
Lys Leu Gln Tyr Glu Leu Gln Tyr Arg Asn Leu Arg Asp Pro Tyr Ala>

720      730      740      750      760
GTG AGG CCG GTG ACC AAG CTG ATC TCA GTG GAC TCA AGA AAC GTC TCT
CAC TCC GGC CAC TGG TTC GAC TAG AGT CAC CTG AGT TCT TTG CAG AGA
Val Arg Pro Val Thr Lys Leu Ile Ser Val Asp Ser Arg Asn Val Ser>

770      780      790      800      810
CTT CTC CCT GAA GAG CTC CAC AAA GAT TCT AGC TAC CAG CTG CAG ATG
GAA GAG GGA CTT CTC AAG GTG TTT CTA AGA TCG ATG GTC GAC GTC TAC
Leu Leu Pro Glu Glu Phe His Lys Asp Ser Ser Tyr Gln Leu Gln Met>

820      830      840      850
CGG GCA GCG CCT CAG CCA GGC ACT TCA TTC AGG GGG ACC TGG AGT GAG
GCC CGT CGC GGA GTC GGT CCG TGA AGT AAG TCC CCC TGG ACC TCA CTC
Arg Ala Ala Pro Gln Pro Gly Thr Ser Phe Arg Gly Thr Trp Ser Glu>

860      870      880      890      900
TGG AGT GAC CCC GTC ATC TTT CAG ACC CAG GCT GGG GAG CCC GAG GCA
ACC TCA CTG GGG CAG TAG AAA GTC TGG GTC CGA CCC CTC GGG CTC CGT
Trp Ser Asp Pro Val Ile Phe Gln Thr Gln Ala Gly Glu Pro Glu Ala>

910      920      930      940      950
GGC TGG GAC CCT CAC ATG CTG CTG CTC CTG GCT GTC TTG ATC ATT GTC
CCG ACC CTG GGA GTG TAC GAC GAC GAG GAC CGA CAG AAC TAG TAA CAG
Gly Trp Asp Pro His Met Leu Leu Leu Leu Ala Val Leu Ile Ile Val>

960      970      980      990      1000
CTG GTT TTC ATG GGT CTG AAG ATC CAC CTG CCT TGG AGG CTA TGG AAA
GAC CAA AAG TAC CCA GAC TTC TAG GTG GAC GGA ACC TCC GAT ACC TTT
Leu Val Phe Met Gly Leu Lys Ile His Leu Pro Trp Arg Leu Trp Lys>

1010      1020      1030      1040      1050
AAG ATA TGG GCA CCA GTG CCC ACC CCT GAG AGT TTC TTC CAG CCC CTG
TTC TAT ACC CGT GGT CAC GGG TGG GGA CTC TCA AAG AAG GTC GGG GAC
Lys Ile Trp Ala Pro Val Pro Thr Pro Glu Ser Phe Phe Gln Pro Leu>

```

도면3c

```

1060      1070      1080      1090
TAC AGG GAG CAC AGC GGG AAC TTC AAG AAA TGG GTT AAT ACC CCT TTC
ATG TCC CTC GTG TCG CCC TTG AAG TTC TTT ACC CAA TTA TGG GGA AAG
Tyr Arg Glu His Ser Gly Asn Phe Lys Lys Trp Val Asn Thr Pro Phe>

1100      1110      1120      1130      1140
ACG GCC TCC AGC ATA GAG TTG GTG CCA CAG AGT TCC ACA ACA ACA TCA
TGC CGG AGG TCG TAT CTC AAC CAC GGT GTC TCA AGG TGT TGT TGT AGT
Thr Ala Ser Ser Ile Glu Leu Val Pro Gln Ser Ser Thr Thr Thr Ser>

1150      1160      1170      1180      1190
GCC TTA CAT CTG TCA TTG TAT CCA GCC AAG GAG AAG AAG TTC CCG GGG
CGS AAT GTA GAC AGT AAC ATA GGT CGG TTC CTC TTC TTC AAG GGC CCC
Ala Leu His Leu Ser Leu Tyr Pro Ala Lys Glu Lys Lys Phe Pro Gly>

1200      1210      1220      1230      1240
CTG CCG GGT CTG GAA GAG CAA CTG GAG TGT GAT GGA ATG TCT GAG CCT
GAC GGC CCA GAC CTT CTC GTT GAC CTC ACA CTA CCT TAC AGA CTC GGA
Leu Pro Gly Leu Glu Glu Gln Leu Glu Cys Asp Gly Met Ser Glu Pro>

1250      1260      1270      1280      1290
GGT CAC TGG TGC ATA ATC CCC TTG GCA GCT GGC CAA GCG GTC TCA GCC
CCA GTG ACC ACG TAT TAG GGG AAC CGT CGA CCG GTT GCG CAG AGT CGG
Gly His Trp Cys Ile Ile Pro Leu Ala Ala Gly Gln Ala Val Ser Ala>

1300      1310      1320      1330
TAC AGT GAG GAG AGA GAC CGG CCA TAT GGT CTG GTG TCC ATT GAC ACA
ATG TCA CTC CTC TCT CTG GCC GGT ATA CCA GAC CAC AGG TAA CTG TGT
Tyr Ser Glu Glu Arg Asp Arg Pro Tyr Gly Leu Val Ser Ile Asp Thr>

1340      1350      1360      1370      1380
GTG ACT GTG GGA GAT GCA GAG GGC CTG TGT GTC TGG CCC TGT AGC TGT
CAC TGA CAC CCT CTA CGT CTC CCG GAC ACA CAG ACC GGG ACA TCG ACA
Val Thr Val Gly Asp Ala Glu Gly Leu Cys Val Trp Pro Cys Ser Cys>

1390      1400      1410      1420      1430
GAG GAT GAT GGC TAT CCA GCC ATG AAC CTG GAT GCT GGC AGA GAG TCT
CTC CTA CTA CCG ATA GGT CGG TAC TTG GAC CTA CGA CCG TCT CTC AGA
Glu Asp Asp Gly Tyr Pro Ala Met Asn Leu Asp Ala Gly Arg Glu Ser>

1440      1450      1460      1470      1480
GGT CCT AAT TCA GAG GAT CTG CTC TTG GTC ACA GAC CCT GCT TTT CTG
CCA GGA TTA AGT CTC CTA GAC GAG AAC CAG TGT CTG GGA CGA AAA GAC
Gly Pro Asn Ser Glu Asp Leu Leu Leu Val Thr Asp Pro Ala Phe Leu>

1490      1500      1510      1520      1530
TCT TGT GGC TGT GTC TCA GGT AGT GGT CTC AGG CTT GGG GGC TCC CCA
AGA ACA CCG ACA CAG AGT CCA TCA CCA GAG TCC GAA CCC CCG AGG GGT
Ser Cys Gly Cys Val Ser Gly Ser Gly Leu Arg Leu Gly Gly Ser Pro>

```

도면3d

```

1540      1550      1560      1570
GGC AGC CTA CTG GAC AGG TTG AGG CTG TCA TTT GCA AAG GAA GGG GAC
CCG TCG GAT GAC CTG TCC AAC TCC GAC AGT AAA CGT TTC CTT CCC CTG
Gly Ser Leu Leu Asp Arg Leu Arg Leu Ser Phe Ala Lys Glu Gly Asp>

1580      1590      1600      1610      1620
TGG ACA GCA GAC CCA ACC TGG AGA ACT GGG TCC CCA GGA GGG GGC TCT
ACC TGT CGT CTG GGT TGG ACC TCT TGA CCC AGG GGT CCT CCC CCG AGA
Trp Thr Ala Asp Pro Thr Trp Arg Thr Gly Ser Pro Gly Gly Gly Ser>

1630      1640      1650      1660      1670
GAG AGT GAA GCA GGT TCC CCC CCT GGT CTG GAC ATG GAC ACA TTT GAC
CTC TCA CTT CGT CCA AGG GGG GGA CCA GAC CTG TAC CTG TGT AAA CTG
Glu Ser Glu Ala Gly Ser Pro Pro Gly Leu Asp Met Asp Thr Phe Asp>

1680      1690      1700      1710      1720
AGT GGC TTT GCA GGT TCA GAC TGT GGC AGC CCC GTG GAG ACT GAT GAA
TCA CCG AAA CGT CCA AGT CTG ACA CCG TCG GGG CAC CTC TGA CTA CTT
Ser Gly Phe Ala Gly Ser Asp Cys Gly Ser Pro Val Glu Thr Asp Glu>

1730      1740      1750      1760      1770
GGA CCC CCT CGA AGC TAT CTC CGC CAG TGG GTG GTC ACG ACC CCT CCA
CCT GGG GGA GCT TCG ATA GAG GCG GTC ACC CAC CAG TCC TGG GGA GGT
Gly Pro Pro Arg Ser Tyr Leu Arg Gln Trp Val Val Arg Thr Pro Pro>

1780      1790      1800
CCT GTG GAC AGT GGA GCC CAG AGC AGC TAG
GGA CAC CTG TCA CCT CGG GTC TCG TCG ATC
Pro Val Asp Ser Gly Ala Gln Ser Ser ***>

```