



등록특허 10-2386101



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년04월14일  
(11) 등록번호 10-2386101  
(24) 등록일자 2022년04월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/85* (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)  
*C12N 15/90* (2006.01) *C12N 5/0735* (2010.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 15/8509* (2013.01)  
*A01K 67/0275* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7001889
- (22) 출원일자(국제) 2015년06월26일  
심사청구일자 2020년06월19일
- (85) 번역문제출일자 2017년01월20일
- (65) 공개번호 10-2017-0023118
- (43) 공개일자 2017년03월02일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2015/038001
- (87) 국제공개번호 WO 2015/200805  
국제공개일자 2015년12월30일

(30) 우선권주장  
62/017,582 2014년06월26일 미국(US)  
62/017,627 2014년06월26일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

WO2013163394 A1\*

Nat Biotechnol., 31(6):530-532(2013.6.)\*

US 2011/307968 A1(2011.12.15.)

WO2014093661 A2

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

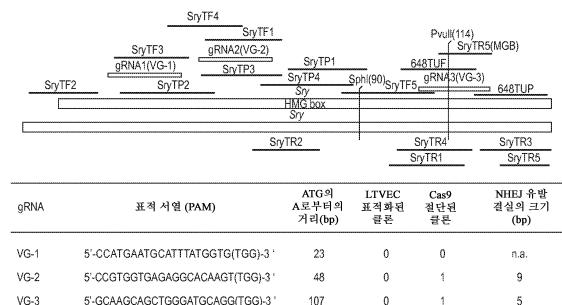
전체 청구항 수 : 총 28 항

심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 표적화된 유전자 변형을 위한 방법 및 그 조성물, 및 사용 방법

**(57) 요 약**

Y 염색체 또는 챠린징 표적 유전자와 상의 표적화된 유전자 변형을 발생시키는 방법 및 그 조성물이 제공된다. 상기 조성물은 Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 XY 만능성 및/또는 전능성 동물 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 포함하는 시험관내 배양물을 포함하며; 이들 세포를 XY F0 생식능력이 있는 암컷의 발생을 촉진시키는 배지에서 배양하는 것을 포함한다. 이러한 조성물은 F0 세대의 생식능력이 있는 암컷 XY 비인간 포유류를 생산하는 다양한 방법에서의 용도가 발견된다.

**대 표 도 - 도1**

(52) CPC특허분류

*A01K 67/0276* (2013.01)

*A01K 67/0278* (2013.01)

*C12N 15/907* (2013.01)

*C12N 5/0606* (2013.01)

*A01K 2227/105* (2013.01)

*A01K 2267/02* (2013.01)

*A01K 2267/0393* (2013.01)

*C12N 2500/60* (2013.01)

*C12N 2517/00* (2013.01)

(72) 발명자

**가글리아르디 앤써니**

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

**쿠노 준코**

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

---

**아우어바흐 보이테크**

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

**발렌주엘라 데이비드 엠.**

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드  
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

세포의 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 방법으로서,

(a) Y 염색체 상에서 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 세포를 제공하는 단계로서, 표적 게놈 유전자좌는 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위를 포함하고, 세포는 DMEM 기반 배지를 포함한 배양 하에 있는, 단계;

(b) (i) 인식 부위에서 낙 또는 이중 가닥 절단을 유도하는 뉴클레아제 제제 또는 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 및

(ii) 표적 게놈 유전자좌 내에 위치한 제1 및 제2 표적 부위에 대응하는 제1 및 제2 상동성 암이 플랭킹된 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 큰 표적화 벡터로서, 제1 상동성 암 및 제2 상동성 암의 합계는 적어도 10 kb이고, 표적화 벡터는 표적 게놈 유전자좌와 상동 재조합되는, 큰 표적화 벡터를 세포로 도입하는 단계; 및

(c) 표적 게놈 유전자좌에서 통합되는 삽입 폴리뉴클레오티드를 이의 게놈에 포함하는 적어도 하나의 세포를 동정하는 단계로서, 삽입 폴리뉴클레오티드의 통합은 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 핵산 서열의 결실 및 외인성 핵산 서열로의 치환을 포함하는 유전적 변형을 도입하는 단계

를 포함하는, 방법.

#### 청구항 2

제1 항에 있어서, 제1 상동성 암 및 제2 상동성 암의 합계는 150 kb 미만인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 3

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 세포는 포유류 세포이고, 임의로 포유류 세포는 설치류로부터 유래되고, 임의로 설치류는 래트 또는 마우스인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 4

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 세포는 만능성 세포이고, 임의로 만능성 세포는 유도 만능성 줄기 (iPS) 세포 또는 비-인간 배아 줄기 (ES) 세포이고, 임의로 비-인간 ES 세포는 설치류 ES 세포, 래트 ES 세포, 또는 마우스 ES 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 5

제4 항에 있어서, 세포는 마우스 ES 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 6

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 뉴클레아제 제제는

(a) 징크 평거 뉴클레아제 (ZFN);

(b) 전사 활성화 인자 유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN);

(c) 메가뉴클레아제;

(d) Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-associated) 단백질 및 가이드 RNA (gRNA); 또는

(e) 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA

인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 7

제6 항에 있어서, 뉴클레아제 제제는 Cas 단백질 및 gRNA이고, Cas 단백질은 Cas9 단백질이고, gRNA는  
 (a) PAM (Protospacer Adjacent Motif) 서열이 바로 플랭킹된 인식 부위를 표적화하는 CRISPR RNA (crRNA); 및  
 (b) 트랜스 활성화 CRISPR RNA (tracrRNA)  
 를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 8

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 길이가 5 kb 내지 400 kb인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 9

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 조건 대립유전자, 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 부위 특이적 재조합 표적 서열이 플랭킹된 핵산, 또는 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하고, 리포터 유전자는 LacZ, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, 비너스, YPet, 고감도 황색 형광 단백질 (EYFP), 애메랄드, 고감도 녹색 형광 단백질 (EGFP), CyPet, 시안 형광 단백질 (CFP), 세룰리언, T-사파이어, 루시페라아제, 알칼리 포스파타아제, 및 그 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 리포터 단백질을 암호화하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 10

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 유전자 변형은 도메인 교환, 엑손 교환, 인트론 교환, 조절 서열 교환, 유전자 교환, 또는 그 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 11

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 결실된 내인성 핵산 서열은 5 kb 내지 3 Mb의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 12

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 결실된 내인성 핵산 서열은 적어도 500 kb인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 13

제1 항 또는 제2 항에 있어서, 유전자 변형은 상동성 또는 이종상동성 핵산 서열로의 내인성 핵산 서열의 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 14

제1 항 또는 제2 항에 있어서, Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌는 *Sry* 유전자, *Uty* 유전자, *Eif2s3y* 유전자, *Ddx3y* 유전자, *Ubel* 유전자, *Tspy* 유전자, *Usp9y* 유전자, *Zfy1* 유전자, *Zfy2* 유전자, 또는 *Kdm5d* 유전자, *Eif2s3y* 유전자, *Tspy* 유전자, *Uty* 유전자, *Ddx3y* 유전자, 및 *Usp9y* 유전자를 포함하는 영역인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 15

제1 항 또는 제2 항에 있어서, Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌는 *Sry* 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 16

제1 항에 있어서, 단계 (a)에서 세포는 마우스 배아 줄기 (ES) 세포이고,

단계 (a)는 Y 염색체 상에서 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 마우스 ES 세포를 제공하는 단계를 포함하고, 여기서 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌는 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위를 포함하고, 마우스 ES 세포는 DMEM 기반 배지를 포함한 배양 하에 있고, DMEM 기반 배지는 KO-DMEM 기반 배지가 아니며,

뉴클레아제 제제는 징크 평거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화 인자 유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN), 또는 Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-associated 9) 단백질 및 (1) PAM

(Protospacer Adjacent Motif) 서열이 바로 플랭킹된 인식 부위를 표적화하는 CRISPR RNA (crRNA); 및 (2) 트랜스-활성화 CRISPR RNA (tracrRNA)를 포함하는 가이드 RNA (gRNA)인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 17

제16 항에 있어서, 제1 상동성 암 및 제2 상동성 암의 합계는 150 kb 미만인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 18

제16 항 또는 제17 항에 있어서, 단계 (b)는 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계를 포함하며, 폴리뉴클레오티드는 뉴클레아제 제제를 암호화하는 mRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 19

제16 항 또는 제17 항에 있어서, 뉴클레아제 제제는 Cas9 단백질 및 gRNA인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 20

제16 항 또는 제17 항에 있어서, 치환된 내인성 핵산 서열은 5 kb 내지 3 Mb의 범위인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 21

제16 항 또는 제17 항에 있어서, 치환된 내인성 핵산 서열은 적어도 500 kb인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 22

제16 항 또는 제17 항에 있어서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 길이가 5 kb 내지 400 kb인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 23

제16 항 또는 제17 항에 있어서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 조건 대립유전자, 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 리포터 유전자인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 24

제16 항 또는 제17 항에 있어서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 부위 특이적 재조합 표적 서열이 플랭킹된 핵산을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 25

제16 항 또는 제17 항에 있어서, 변형은 도메인 교환, 엑손 교환, 인트론 교환, 조절 서열 교환, 유전자 교환, 또는 그 조합을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 26

제16 항 또는 제17 항에 있어서, 변형은 상동성 또는 이종상동성 핵산 서열로의 내인성 핵산 서열의 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 27

제16 항 또는 제17 항에 있어서, Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌는 *Sry* 유전자, *Uty* 유전자, *Eif2s3y* 유전자, *Ddx3y* 유전자, *Ube1y* 유전자, *Tspy* 유전자, *Usp9y* 유전자, *Zfy1* 유전자, *Zfy2* 유전자, 또는 *Kdm5d* 유전자, *Eif2s3y* 유전자, *Tspy* 유전자, *Uty* 유전자, *Ddx3y* 유전자, 및 *Usp9y* 유전자를 포함하는 영역인 것을 특징으로 하는 방법.

#### 청구항 28

제16 항 또는 제17 항에 있어서, Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌는 *Sry* 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

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

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001]

관련 출원의 상호 참조

[0002]

본원은 2014년 6월 26일자로 출원된 미국 가출원 제62/017,582호 및 2014년 6월 26일자로 출원된 미국 가출원 제62/017,627호를 우선권 주장하며, 각각 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

EFS 웹을 통해 텍스트 파일로서 제출된 서열 목록의 참조

[0004]

서열 목록의 공인된 사본은 2015년 6월 25일자로 작성된 14 킬로바이트 크기를 갖는 463545SEQLIST.TXT의 파일명의 ASCII 포맷된 서열 목록으로서 EFS-Web을 통해 전자적으로 제출된 것이다. 이러한 ASCII 포맷된 문서에 포함된 서열 목록은 본 명세서의 일부이며, 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0005]

기술분야

- [0006] 본 발명은 만능성(pluripotent) 및/또는 전능성(totipotent) 세포를 유지하거나 배양하기 위한 방법 및 그 조성물, 및 세포 집단 및 트랜스제닉 동물을 생산하기 위한 방법 및 그 조성물에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0007] 아마도 Y 염색체의 독특한 구조적 특징으로 인해, Y 연쇄 유전자 상의 돌연변이를 발생시키는 마우스 배아 줄기 세포의 통상적인 유전자 표적법(gene targeting strategy)은 제한된 성공을 거두었다. 따라서, 종종 마우스의 Y 연쇄 유전자의 기능에 대한 이해는 자연 발생(spontaneous) 결실, 랜덤 유전자 트랩 삽입 또는 상염색체 도입 유전자를 갖는 마우스의 연구 조사로부터 얻은 견해로 제한된다. Y 염색체 상의 계놈 유전자좌를 표적으로 하는 능력을 향상시키는 방법이 필요하다.

- [0008] Sry 단백질(성결정영역 Y)은 유태반 포유류의 웅성 성결정의 주요 조절인자이다. 정소결정인자(TDF)로도 알려진 Sry 유전자가 Y 염색체에 존재한다. Sry는 이의 고이동도군(High Mobility Group; HMG) 도메인을 통해 DNA에 결합하는 전사 인자로 여겨진다. 마우스 Sry 유전자의 발현은 배아 발생 11일경에 좁은 시간창(time window)의 생식 용기로 한정되며; Sry mRNA와 단백질이 모두 검출된다. 자성 난소 발달 프로그램을 억제하면서, 양능성(bipotential) 생식 용기를 웅성 정소 형성 프로그램으로 전환시키도록 충분한 Sry가 이러한 시간창 내에 형성되어야 한다. 성체 정소에서, 원형 Sry 전사물이 검출되지만, Sry 단백질은 검출되지 않는다. 불활성 Sry 단백질의 생성을 유도하거나, 유전자 발현의 시기와 강도를 변화시키는 Sry 유전자 돌연변이는 수컷에서 암컷으로의 성전환을 일으켜서, X 및 Y 염색체를 가진 해부학적으로 암컷인 동물을 얻을 수 있다. 소위 XY 암컷은 종종 불임이거나 생식능력이 낮다. Sry 조절에 의해 성결정을 제어할 수 있다는 것은 유전자 변형 동물의 생산에 있어서 매우 가치가 있을 것이다.

## 발명의 내용

- [0009] F0 세대의 생식능력이 있는 XY 암컷 비인간 포유류를 생산할 수 있는 XY 배아 줄기(ES) 세포주의 제조 방법이 제공된다. 상기 방법은 (a) Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖도록 비인간 포유류 XY 배아 줄기(ES) 세포를 변형시키는 단계; 및 (b) F0 세대의 생식능력이 있는 XY 암컷 비인간 포유류를 생산할 수 있는 ES 세포주를 제조할 수 있는 조건 하에 변형된 ES 세포주를 배양하는 단계를 포함한다.

- [0010] F0 세대의 생식능력이 있는 XY 암컷 비인간 포유류의 생산 방법도 제공된다. 상기 방법은 (a) Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 상기 방법에 의해 제조된 비인간 포유류 XY ES 세포를 숙주 배아로 도입하는 단계; (b) 숙주 배아를 임신시키는 단계; 및 (c) 성숙기에 이를 때에 생식능력이 있는 F0 XY 암컷 비인간 포유류를 얻는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서, 암컷 XY F0 비인간 포유류는 야생형 마우스와 교배하는 경우에 생식능력을 나타낸다. 구체적인 실시 형태에서, 야생형 마우스는 C57BL/6이다.

- [0011] 일 실시 형태에서, 비인간 포유류 XY ES 세포는 설치류로부터 유래된다. 구체적인 실시 형태에서, 설치류는 마우스이다. 일 실시 형태에서, 마우스 XY ES 세포는 129 균주로부터 유래된다. 일 실시 형태에서, 마우스 XY ES 세포는 VGF1 마우스 ES 세포이다. 일 실시 형태에서, 마우스 XY ES 세포는 129 균주로부터 유래된 Y 염색체를 포함한다. 일 실시 형태에서, 마우스 XY ES 세포는 C57BL/6 균주이다. 또 하나의 실시 형태에서, 설치류는 래트 또는 햄스터이다.

- [0012] 일부 실시 형태에서, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성 저하는 Sry 유전자의 유전자 변형에 기인한다. 몇몇 이러한 방법에서, Sry 유전자의 유전자 변형은 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실, 하나 이상의 뉴클레오티드의 치환, 녹아웃(knockout), 녹인(knockin), 내인성 핵산 서열의 상동, 이종 또는 이종상동성(orthologous) 핵산 서열로의 치환, 또는 그 조합을 포함한다.

- [0013] 본 명세서에 제공된 방법에서, 표적화된 유전자 변형은 삽입, 결실, 녹아웃, 녹인, 점돌연변이 또는 그 조합을 포함할 수 있다. 또 하나의 실시 형태에서, 표적화된 유전자 변형은 상염색체 상에 일어난다.

- [0014] 일부 실시 형태에서, Sry 유전자의 변형은 비인간 포유류 ES 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자 및/또는 선택가능한 마커의 삽입을 포함한다. 일부 실시 형태에서, Sry 유전자의 변형은 내인성 Sry 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자의 삽입을 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 리포터 유전자는 리포터 단백질 LacZ를 암호화한다.

- [0015] 일 실시 형태에서, 배양 단계는 배양 하의 비인간 포유류 ES 세포를 유지하기에 적합한 기본 배지 및 보충물을 포함하는 저삼투압 배지에서 비인간 포유류 XY ES 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일 실시 형태에서, 저삼투

암 배지는 삼투압이 약 200 mOsm/kg 내지 약 329 mOsm/kg 미만을 나타낸다. 다른 실시 형태에서, 저삼투압 배지는 하나 이상의 하기 특성을 나타낸다: 전도도 약 11 mS/cm 내지 약 13 mS/cm; 알칼리 금속과 할로겐화물의 염의 농도 약 50 mM 내지 약 110 mM; 탄산염의 농도 약 17 mM 내지 약 30 mM; 알칼리 금속 할로겐화물 염과 탄산염의 총 농도 약 85 mM 내지 약 130 mM; 및/또는 이들 중 임의의 2개 이상의 조합.

[0016] 일부 실시 형태에서, 비인간 포유류 XY ES 세포를 숙주 배아에 도입하여, 숙주 배아의 임신 후에, F0 비인간 포유류 중 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상 또는 95% 이상은 XY 암컷으로, 성숙기에 이를 때에 F0 XY 암컷 비인간 포유류가 생식능력을 나타낸다.

[0017] 일 실시 형태에서, 비인간 포유류 XY ES 세포는 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위를 포함하는 Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌를 포함하며, 뉴클레아제 제제는 인식 부위에서 낙(nick) 또는 이중 가닥 절단을 유도한다. 이러한 방법은 ES 세포를 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 표적화 백터의 존재 하에 뉴클레아제 제제에 노출시키는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 뉴클레아제 제제 및 표적화 백터에 노출된 후에, ES 세포는 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하도록 변형된다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA이다. 구체적인 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 (a) 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN); (b) 전사 활성화 인자 유사 이펙터 뉴클레아제(Transcription Activator-Like Effector Nuclease; TALEN); 또는 (c) 메가뉴클레아제이다. 다른 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 Cas(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats(CRISPR)-associated) 단백질 및 가이드(guide) RNA(gRNA)를 포함한다. 이러한 방법에서, 가이드 RNA(gRNA)는 (a) 제1 인식 부위를 표적으로 하는 CRISPR RNA(crRNA); 및 (b) 트랜스 활성화 CRISPR RNA(tracrRNA)를 포함한다. 경우에 따라서는, 인식 부위는 바로 PAM(Protospacer Adjacent Motif) 서열이 플랭킹(flanking)된다. 일 실시 형태에서, Cas 단백질은 Cas9이다.

[0018] 또한 본 명세서에 제공된 어느 하나의 방법에 따른 비인간 포유류 XY ES 세포주를 포함하는 시험관내 배양물이 제공된다.

[0019] 시험관내 배양물이 제공되며, 이는 (a) Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 비인간 포유류 XY 배아 줄기(ES) 세포; 및 (b) 배양 하의 비인간 포유류 ES 세포를 유지하기에 적합한 기본 배지 및 보충물을 포함하는 배지를 포함한다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 삼투압이 약 200 mOsm/kg 내지 약 329 mOsm/kg 미만을 나타낸다. 다른 실시 형태에서, 기본 배지는 하나 이상의 하기 특성을 나타낸다: 전도도 약 11 mS/cm 내지 약 13 mS/cm; 알칼리 금속과 할로겐화물의 염의 농도 약 50 mM 내지 약 110 mM; 탄산염의 농도 약 17 mM 내지 약 30 mM; 알칼리 금속 할로겐화물 염과 탄산염의 총 농도 약 85 mM 내지 약 130 mM; 및/또는 이들 중 임의의 2개 이상의 조합. 일 실시 형태에서, 비인간 포유류 XY ES 세포는 설치류로부터 유래된다. 일 실시 형태에서, 설치류는 마우스 또는 래트이다. 일 실시 형태에서, 마우스 XY ES 세포는 VGF1 마우스 ES 세포이다. 일 실시 형태에서, 설치류는 래트 또는 햄스터이다. 일 실시 형태에서, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성 저하는 Sry 유전자의 유전자 변형에 기인한다. 일 실시 형태에서, Sry 유전자의 유전자 변형은 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실, 하나 이상의 뉴클레오티드의 치환, 녹아웃, 녹인, 내인성 핵산 서열의 이중 핵산 서열로의 치환, 또는 그 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 비인간 포유류 ES 세포는 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 표적화된 유전자 변형을 포함한다. 일 실시 형태에서, 표적화된 유전자 변형은 삽입, 결실, 녹아웃, 녹인, 점돌연변이 또는 그 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 표적화된 유전자 변형은 이중 폴리뉴클레오티드의 XY ES 세포 계놈으로의 적어도 하나의 삽입을 포함한다. 일 실시 형태에서, 표적화된 유전자 변형은 상염색체 상에 일어난다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 50 ± 5 mM NaCl, 26 ± 5 mM 탄산염, 및 218 ± 22 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 약 3 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중탄산나트륨, 및 218 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 87 ± 5 mM NaCl, 18 ± 5 mM 탄산염, 및 261 ± 26 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 약 5.1 mg/mL NaCl, 1.5 mg/mL 중탄산나트륨, 및 261 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 110 ± 5 mM NaCl, 18 ± 5 mM 탄산염, 및 294 ± 29 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 약 6.4 mg/mL NaCl, 1.5 mg/mL 중탄산나트륨, 및 294 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 87 ± 5 mM NaCl, 26 ± 5 mM 탄산염, 및 270 ± 27 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 약 5.1 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중탄산나트륨, 및 270 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 87 ± 5 mM NaCl, 26 ± 5 mM 탄산염, 86 ± 5 mM 글루코스, 및 322 ± 32 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 약 5.1 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중탄산나트륨, 15.5 mg/mL 글루코스, 및 322 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 비인간 포유류 XY ES 세포를 숙주 배아에 도입하여, 숙주 배아의 임신 후에, F0 비인간 포유류 중 80% 이상은 XY 암컷으로, 성숙기에 이를 때에 F0 XY 암컷 비인간 포유류가 생식능력을 나타낸다.

[0020]

또한, (a) *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 도너 비인간 포유류 XY 배아 줄기(ES) 세포를 배양 하의 비인간 포유류 ES 세포를 유지하기에 적합한 기본 배지 및 보충물을 포함하는 배지에서 배양하는 단계, (b) 도너 XY 비인간 포유류 ES 세포를 숙주 배아로 도입하는 단계; (c) 숙주 배아를 임신시키는 단계; 및 (d) 성숙기에 이를 때에 생식능력이 있는 F0 XY 암컷 비인간 포유류를 얻는 단계를 포함하는, F0 세대의 생식능력이 있는 XY 암컷 비인간 포유류의 생산 방법이 제공된다. 일 실시 형태에서, 배지는 삼투압이 약 200 mOsm/kg 내지 약 329 mOsm/kg 미만을 나타낸다. 다른 실시 형태에서, 배지는 하나 이상의 하기 특성을 나타낸다: 전도도 약 11 mS/cm 내지 약 13 mS/cm; 알칼리 금속과 할로겐화물의 염의 농도 약 50 mM 내지 약 110 mM; 탄산염의 농도 약 17 mM 내지 약 30 mM; 알칼리 금속 할로겐화물 염과 탄산염의 총 농도 약 85 mM 내지 약 130 mM; 및/또는 이들 중 임의의 2개 이상의 조합. 일 실시 형태에서, 비인간 포유류 XY ES 세포는 설치류로부터 유래된다. 일 실시 형태에서, 설치류는 마우스 또는 래트이다. 일 실시 형태에서, 마우스 XY ES 세포는 VGF1 마우스 ES 세포이다. 일 실시 형태에서, 설치류는 래트 또는 햄스터이다. 일 실시 형태에서, *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성 저하는 *Sry* 유전자의 유전자 변형에 기인한다. 일 실시 형태에서, *Sry* 유전자의 유전자 변형은 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실, 하나 이상의 뉴클레오티드의 치환, 녹아웃, 녹인, 내인성 핵산 서열의 이중 핵산 서열로의 치환, 또는 그 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 비인간 포유류 ES 세포는 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 표적화된 유전자 변형을 포함한다. 일 실시 형태에서, 표적화된 유전자 변형은 삽입, 결실, 녹아웃, 녹인, 점돌연변이 또는 그 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 표적화된 유전자 변형은 이중 폴리뉴클레오티드의 XY ES 세포 계놈으로의 적어도 하나의 삽입을 포함한다. 일 실시 형태에서, 표적화된 유전자 변형은 상염색체 상에 일어난다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 50 ± 5 mM NaCl, 26 ± 5 mM 탄산염, 및 218 ± 22 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 약 3 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중탄산나트륨, 및 218 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 87 ± 5 mM NaCl, 18 ± 5 mM 탄산염, 및 261 ± 26 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 약 5.1 mg/mL NaCl, 1.5 mg/mL 중탄산나트륨, 및 261 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 110 ± 5 mM NaCl, 18 ± 5 mM 탄산염, 및 294 ± 29 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 약 6.4 mg/mL NaCl, 1.5 mg/mL 중탄산나트륨, 및 294 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 87 ± 5 mM NaCl, 26 ± 5 mM 탄산염, 및 270 ± 27 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 약 5.1 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중탄산나트륨, 및 270 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 87 ± 5 mM NaCl, 26 ± 5 mM 탄산염, 86 ± 5 mM 글루코스, 및 322 ± 32 mOsm/kg을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 약 5.1 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중탄산나트륨, 15.5 mg/mL 글루코스, 및 322 mOsm/kg을 나타낸다.

[0021]

또한 (a) *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성이 저하된 F0 XY 생식능력이 있는 암컷을 동일한 ES 세포 클론으로부터 유래되는 코호트 클론 동포종(cohort clonal sibling), F0 XY 수컷 비인간 포유류와 교배시키는 단계 - 여기서, F0 XY 생식능력이 있는 암컷 비인간 포유류 및 F0 XY 수컷 비인간 포유류는 각각 유전자 돌연변이에 대하여 이형접합성임 -; 및 (b) 유전자 변형에 대하여 동형접합성인 F1 자손 마우스를 얻는 단계를 포함하는, F1 세대의 표적화된 유전자 돌연변이에 대하여 동형접합성인 트랜스제닉 비인간 포유류를 생산하는 방법이 제공된다.

[0022]

또한 세포의 Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌를 변형시키는 방법이 제공되며, (a) 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위를 포함하는 Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌를 포함하는 세포를 제공하는 단계, (b) (i) 뉴클레아제 제제 - 여기서, 뉴클레아제 제제는 제1 인식 부위에서 낙 또는 이중 가닥 절단을 유도함 -; 및 (ii) 제1 인식 부위에 충분히 근접하여 위치하고 있는 제1 및 제2 표적 부위에 대응하는 제1 및 제2 상동성 암이 플랭킹된 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 표적화 벡터를 세포로 도입하는 단계; 및 (c) 표적 계놈 유전자좌에서 통합되는 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 이의 계놈에 포함하는 적어도 하나의 세포를 동정하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서, 제1 상동성 암과 제2 상동성 암의 합계는 적어도 4kb 이상 150 kb 미만이다. 일 실시 형태에서, 제1 상동성 암 및/또는 제2 상동성 암의 길이는 적어도 400 bp 이상 1000 bp 미만이다. 또 하나의 실시 형태에서, 제1 상동성 암 및/또는 제2 상동성 암의 길이는 약 700 bp 내지 약 800 bp이다.

[0023]

또한 세포의 Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌를 변형시키는 방법이 제공되며, (a) 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위를 포함하는 Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌를 포함하는 세포를 제공하는 단계, (b) 제1 및 제2 표적 부위에 대응하는 제1 및 제2 상동성 암이 플랭킹된 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 표적화 벡터를 세포로 도입하는 단계; 및 (c) 표적 계놈 유전자좌에서 통합되는 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 이의 계놈에 포함하는 적어도 하나의 세포를 동정하는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서, 제1 상동성 암 및/또는 제2 상동성 암의 길이는 적어도 400 bp 이상 1000 bp 미만이다. 또 하나의 실시 형태에서, 제1 상동성 암 및/또는 제2 상동성 암의 길이는 약 700 bp 내지 약 800 bp이다. 일 실시 형태에서, 상기 세포는 포유류 세포이다. 일 실

시 형태에서, 포유류 세포는 비인간 세포이다. 일 실시 형태에서, 포유류 세포는 설치류로부터 유래된다. 일 실시 형태에서, 설치류는 래트, 마우스 또는 햄스터이다. 일 실시 형태에서, 상기 세포는 만능성 세포이다. 일 실시 형태에서, 포유류 세포는 유도 만능성 줄기(iPS) 세포이다. 일 실시 형태에서, 만능성 세포는 비인간 배아 줄기(ES) 세포이다. 일 실시 형태에서, 만능성 세포는 설치류 배아 줄기(ES) 세포, 마우스 배아 줄기(ES) 세포 또는 래트 배아 줄기(ES) 세포이다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA이다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 징크 평거 뉴클레아제(ZFN)이다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 전사 활성화 인자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)이다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 메가뉴클레아제이다. 다른 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 Cas(CRISPR-associated) 단백질 및 가이드 RNA(gRNA)를 포함한다. 이러한 방법에서, 가이드 RNA(gRNA)는 (a) 제1 인식 부위를 표적으로 하는 CRISPR RNA(crRNA); 및 (b) 트랜스 활성화 CRISPR RNA(tracrRNA)를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 제1 또는 제2 인식 부위는 바로 PAM 서열이 플랭킹된다. 일부 실시 형태에서, Cas 단백질은 Cas9이다.

[0024] 일부 실시 형태에서, 변형은 내인성 핵산 서열의 결실을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 결실은 약 5 kb 내지 약 10 kb, 약 10 kb 내지 약 20 kb, 약 20 kb 내지 약 40 kb, 약 40 kb 내지 약 60 kb, 약 60 kb 내지 약 80 kb, 약 80 kb 내지 약 100 kb, 약 100 kb 내지 약 150 kb, 약 150 kb 내지 약 200 kb, 약 200 kb 내지 약 300 kb, 약 300 kb 내지 약 400 kb, 약 400 kb 내지 약 500 kb, 약 500 kb 내지 약 1 Mb, 약 1 Mb 내지 약 1.5 Mb, 약 1.5 Mb 내지 약 2 Mb, 약 2 Mb 내지 약 2.5 Mb, 또는 약 2.5 Mb 내지 약 3 Mb의 범위이다. 구체적인 실시 형태에서, 결실은 적어도 500 kb이다. 일 실시 형태에서, 상기 세포는 포유류 세포이다. 일 실시 형태에서, 포유류 세포는 비인간 세포이다. 일 실시 형태에서, 포유류 세포는 설치류로부터 유래된다. 일 실시 형태에서, 설치류는 래트, 마우스 또는 햄스터이다. 일 실시 형태에서, 상기 세포는 만능성 세포이다. 일 실시 형태에서, 포유류 세포는 유도 만능성 줄기(iPS) 세포이다. 일 실시 형태에서, 만능성 세포는 설치류 배아 줄기(ES) 세포, 마우스 배아 줄기(ES) 세포 또는 래트 배아 줄기(ES) 세포이다. 다른 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 Cas 단백질 및 가이드 RNA(gRNA)를 포함한다. 이러한 방법에서, 가이드 RNA(gRNA)는 (a) 제1 인식 부위를 표적으로 하는 CRISPR RNA(crRNA); 및 (b) 트랜스 활성화 CRISPR RNA(tracrRNA)를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 제1 또는 제2 인식 부위는 바로 PAM 서열이 플랭킹된다. 일부 실시 형태에서, Cas 단백질은 Cas9이다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 징크 평거 뉴클레아제(ZFN)이다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 전사 활성화 인자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)이다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 메가뉴클레아제이다.

[0025] Y 염색체를 적어도 10 kb의 핵산 서열을 포함하는 큰 표적화 벡터(LTVEC)의 존재 하에 Cas 단백질 및 CRISPR RNA에 노출시키는 단계를 포함하는, Y 염색체를 변형시키는 방법은 Cas 단백질, CRISPR RNA 및 LTVEC에 노출시킨 후에, Y 염색체를 적어도 10 kb의 핵산 서열을 포함하도록 변형시키는 단계를 포함한다. LTVEC는 적어도 20 kb, 적어도 30 kb, 적어도 40 kb, 적어도 50 kb, 적어도 60 kb, 적어도 70 kb, 적어도 80 kb, 또는 적어도 90 kb의 핵산 서열을 포함할 수 있다. 다른 실시 형태에서, LTVEC는 적어도 100 kb, 적어도 150 kb, 또는 적어도 200 kb의 핵산 서열을 포함한다.

[0026] 또한 (a) Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 포유류 세포를 제공하는 단계 - 여기서, 표적 게놈 유전자좌는 가이드 RNA (gRNA) 표적 서열을 포함함 -; (b) (i) 표적 게놈 유전자좌에 상동성인 표적화 암이 플랭킹된 제1 핵산을 포함하는 큰 표적화 벡터(LTVEC) - 여기서, LTVEC는 적어도 10 kb임 -; (ii) Cas 단백질을 암호화하는 제2 핵산에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 제1 발현 구축물, 및 (iii) gRNA 표적 서열에 혼성화된 뉴클레오티드 서열 및 트랜스 활성화 CRISPR RNA(tracrRNA)를 포함하는 가이드 RNA(gRNA)를 암호화하는 제3 핵산에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 제2 발현 구축물을 포유류 세포로 도입하는 단계 - 여기서, 제1 및 제2 프로모터는 포유류 세포에 활성을 나타냄 -; 및 (c) Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌에 표적화된 유전자 변형을 포함하는 변형된 포유류 세포를 동정하는 단계를 포함하는, Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 방법이 제공된다. 다른 실시 형태에서, LTVEC는 적어도 15 kb, 적어도 20 kb, 적어도 30 kb, 적어도 40 kb, 적어도 50 kb, 적어도 60 kb, 적어도 70 kb, 적어도 80 kb, 또는 적어도 90 kb이다. 다른 실시 형태에서, LTVEC는 적어도 100 kb, 적어도 150 kb, 또는 적어도 200 kb이다. 일 실시 형태에서, 포유류 세포는 비인간 포유류 세포이다. 일 실시 형태에서, 포유류 세포는 섬유아세포이다. 일 실시 형태에서, 포유류 세포는 설치류로부터 유래된다. 일 실시 형태에서, 설치류는 래트, 마우스 또는 햄스터이다. 일 실시 형태에서, 포유류 세포는 만능성 세포이다. 일 실시 형태에서, 만능성 세포는 유도 만능성 줄기(iPS) 세포이다. 일 실시 형태에서, 만능성 세포는 마우스 배아 줄기(ES) 세포 또는 래트 배아 줄기(ES) 세포이다. 일 실시 형태에서, 만능성 세포는 발달 제한된(developmentally restricted) 인간 전구 세포이다. 일 실시 형태에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질이다. 일 실시 형태에서, gRNA 표적 서열은 바로 PAM 서열이 플랭킹된다.

일 실시 형태에서, LTVEC의 5' 상동성 암과 3' 상동성 암의 합계는 약 10 kb 내지 약 150 kb이다. 일 실시 형태에서, LTVEC의 5' 상동성 암과 3' 상동성 암의 합계는 약 10 kb 내지 약 20 kb, 약 20 kb 내지 약 40 kb, 약 40 kb 내지 약 60 kb, 약 60 kb 내지 약 80 kb, 약 80 kb 내지 약 100 kb, 약 100 kb 내지 약 120 kb, 또는 약 120 kb 내지 150 kb이다. 일 실시 형태에서, 표적화된 유전자 변형은 (a) 내인성 핵산 서열의 상동 또는 이종 상동성 핵산 서열로의 치환; (b) 내인성 핵산 서열의 결실; (c) 약 5 kb 내지 약 10 kb, 약 10 kb 내지 약 20 kb, 약 20 kb 내지 약 40 kb, 약 40 kb 내지 약 60 kb, 약 60 kb 내지 약 80 kb, 약 80 kb 내지 약 100 kb, 약 100 kb 내지 약 150 kb, 약 150 kb 내지 약 200 kb, 약 200 kb 내지 약 300 kb, 약 300 kb 내지 약 400 kb, 약 400 kb 내지 약 500 kb, 약 500 kb 내지 약 1 Mb, 약 1 Mb 내지 약 1.5 Mb, 약 1.5 Mb 내지 약 2 Mb, 약 2 Mb 내지 약 2.5 Mb, 또는 약 2.5 Mb 내지 약 3 Mb의 범위의 내인성 핵산 서열의 결실; (d) 외인성 핵산 서열의 삽입; (e) 약 5 kb 내지 약 10 kb, 약 10 kb 내지 약 20 kb, 약 20 kb 내지 약 40 kb, 약 40 kb 내지 약 60 kb, 약 60 kb 내지 약 80 kb, 약 80 kb 내지 약 100 kb, 약 100 kb 내지 약 150 kb, 약 150 kb 내지 약 200 kb, 약 200 kb 내지 약 250 kb, 약 250 kb 내지 약 300 kb, 약 300 kb 내지 약 350 kb, 또는 약 350 kb 내지 약 400 kb의 범위의 외인성 핵산 서열의 삽입; (f) 상동 또는 이종상동성 핵산 서열을 포함하는 외인성 핵산 서열의 삽입; (g) 인간 및 비인간 핵산 서열을 포함하는 키메라 핵산 서열의 삽입; (h) 부위 특이적 재조합 효소 표적 서열이 플랭킹된 조건 대립유전자(conditional allele)의 삽입; (i) 포유류 세포에서 활성인 제3 프로모터에 작동 가능하게 연결된 선택가능한 마커 또는 리포터 유전자의 삽입; 또는 (j) 그 조합을 포함한다. 일 실시 형태에서, 표적 계놈 유전자좌는 (i) 5' 상동성 암에 상동성인 5' 표적 서열; 및 (ii) 3' 상동성 암에 상동성인 3' 표적 서열을 포함한다. 일 실시 형태에서, 5' 표적 서열과 3' 표적 서열은 5 kb 이상 3 Mb 미만으로 분리되어 있다. 일 실시 형태에서, 5' 표적 서열과 3' 표적 서열은 5 kb 이상 10 kb 미만, 10 kb 이상 20 kb 미만, 20 kb 이상 40 kb 미만, 40 kb 이상 60 kb 미만, 60 kb 이상 80 kb 미만, 약 80 kb 이상 100 kb 미만, 100 kb 이상 150 kb 미만, 150 kb 이상 200 kb 미만, 약 200 kb 이상 약 300 kb 미만, 약 300 kb 이상 약 400 kb 미만, 약 400 kb 이상 약 500 kb 미만, 약 500 kb 이상 약 1 Mb 미만, 약 1 Mb 이상 약 1.5 Mb 미만, 약 1.5 Mb 이상 약 2 Mb 미만, 약 2 Mb 이상 약 2.5 Mb 미만, 또는 약 2.5 Mb 이상 약 3 Mb 미만으로 분리되어 있다. 일 실시 형태에서, 제1 및 제2 발현 구축물은 단일 핵산 분자 상에 있다. 일 실시 형태에서, 표적 계놈 유전자좌는 *Sry* 유전자좌를 포함한다.

[0027]

또한 (a) 본 명세서에 기재된 방법에 따라, 비인간 만능성 세포의 Y 염색체 상의 대상으로 하는 계놈 유전자좌를 변형시켜, Y 염색체 상의 표적화된 유전자 변형을 포함하는 유전자 변형 비인간 만능성 세포를 생산하는 단계; (b) (a)의 변형된 비인간 만능성 세포를 비인간 숙주 배아로 도입하는 단계; 및 변형된 만능성 세포를 포함하는 비인간 숙주 배아를 대리모에 임신시키는 단계 - 여기서, 대리모는 표적화된 유전자 변형을 포함하는 F0 자손을 생산하고, 표적화된 유전자 변형은 생식세포계열을 통해 유전됨 - 를 포함하는, 비인간 동물의 Y 염색체 상의 표적화된 유전자 변형 방법이 제공된다. 일 실시 형태에서, 대상으로 하는 계놈 유전자좌는 *Sry* 유전자좌를 포함한다.

[0028]

Y 염색체 상의 표적화된 유전자 변형을 발생시키는 방법 및 그 조성물이 제공된다. 상기 조성물은 *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 XY 만능성 및/또는 전능성 동물 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 포함하는 시험관내 배양물을 포함하며; 이들 세포를 XY F0 생식능력이 있는 암컷의 발생을 촉진시키는 배지에서 배양하는 것을 포함한다. 이러한 조성물은 F0 세대의 생식능력이 있는 암컷 XY 비인간 포유류를 생산하는 다양한 방법에서의 용도가 발견된다.

### 도면의 간단한 설명

[0029]

도 1은 마우스 *Sry* 유전자를 표적화하는 CRISPR Cas9/gRNA의 도식을 나타낸다. VG-1(서열 번호 10); VG-2(서열 번호 11); VG-3(서열 번호 12). 도 1에 나타낸 프라이머 및 프로브는 서열 번호 13 내지 29로 나타낸다.

도 2는 lacZ 리포터 유전자를 사용하여 TALEN 및 CRISPR로 *Sry* 유전자를 표적화하는 도식을 나타낸다. Y 염색체 상의 챌린징(challenging) 유전자좌를 피하기 위해, *Sry* 유전자를 LTVEC 및 LTVEC보다 작은 상동성 암을 갖는 짧은 암(short-armed) 벡터(smallTVEC)로 표적화하였다.

도 3은 배아에서의 LacZ 발현을 예시한다.

도 4는 Cas9 DNA 엔도뉴클레아제와 조합하여 ZFN 또는 CRISPR 가이드 RNA로 매개되는 500 kb보다 큰 Y 염색체 상의 큰 결실의 도식을 나타낸다.

도 5a, 도 5b 및 도 5c는 다양한 클론에서의 큰 Y 염색체 결실의 서열 결정(sequencing) 확인을 나타낸다. 도

5a는 클론 1-D5에 대한 서열 결정 결과이다. Kdm5 업 및 Uspy9 다운 서열은 서열 번호 30; 1-D5 1500F(서열 번호 31); 1-D5 1000R(서열 번호 32)로 나타내고; 도 5b는 클론 5-C4에 대한 서열 결정 결과이다. Kdm5 업 및 Uspy9 다운 서열은 서열 번호 33; 1500F(서열 번호 34); 1000R(서열 번호 35); 1000F(서열 번호 36)로 나타내고; 도 5c는 클론 6-A12에 대한 서열 결정 결과이다. Kdm5 업 및 Uspy9 다운 서열은 서열 번호 37; 1500F(서열 번호 38); 1000R(서열 번호 39); 1000F(서열 번호 40); 1500R(서열 번호 41)로 나타낸다. 도 5b 및 도 5c의 박스형 영역은 마이크로 상동 영역을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0030] 정의

본 명세서에서 상호 교환적으로 사용되는 용어 "단백질", "폴리펩티드", 및 "펩티드"는 암호화 및 비암호화된 아미노산, 및 화학적으로 또는 생화학적으로 변형되거나 유도체화된 아미노산을 비롯하여, 임의의 길이의 아미노산의 폴리머 형태를 포함한다. 상기 용어는 또한 변형된 폴리머, 예컨대 변형된 펩티드 골격을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

본 명세서에서 상호 교환적으로 사용되는 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 리보뉴클레오티드, 데옥시리보뉴클레오티드, 또는 이들의 유사체 또는 변형된 형태를 비롯한 임의의 길이의 뉴클레오티드의 폴리머 형태를 포함한다. 이들은 단일 가닥, 이중 가닥, 및 다중 가닥 DNA 또는 RNA, 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 및 푸린 염기, 피리미딘 염기, 또는 다른 천연, 화학적으로 변형된, 생화학적으로 변형된, 비천연, 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기를 포함하는 폴리머를 포함한다. 편의상, 핵산 크기는 핵산이 이중 가닥 형태이든지 단일 가닥 형태이든지 간에 bp로 나타낼 수 있으며, 후자의 경우에는, bp는 만일 단일 가닥 핵산이 이의 정확히 상보적인 가닥과 이중 나선 구조(duplex)로 될 때에 형성된 것이다.

"코돈 최적화"는 일반적으로 천연 아미노산 서열을 유지하면서 천연 서열의 적어도 하나의 코돈을 숙주 세포의 유전자에서 더욱 빈번하게 또는 가장 빈번하게 사용되는 코돈으로 치환함으로써 특정 숙주 세포에서의 발현 향상을 위해 핵산 서열을 변형시키는 방법을 포함한다. 예를 들어, Cas 단백질을 암호화하는 핵산은 천연 핵산 서열과 비교하여, 세균 세포, 효모 세포, 인간 세포, 비인간 세포, 포유류 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 햄스터 세포, 또는 임의의 다른 숙주 세포를 비롯한 주어진 원핵 또는 진핵 세포에서의 사용 빈도가 높은 코돈으로 치환되도록 변형될 수 있다. 코돈 사용 빈도 테이블은 예를 들어, "코돈 사용 빈도 데이터베이스(Codon Usage Database)"에서 쉽게 이용할 수 있다. 이들 테이블은 다양한 방법으로 조정될 수 있다. 문헌 [Nakamura *et al.* (2000) *Nucleic Acids Research* 28:292]을 참조한다. 특정 숙주에서의 발현을 위해 특정 서열의 코돈 최적화를 위한 컴퓨터 알고리즘도 이용가능하다(예를 들어, 문헌[Gene Forge] 참조).

"작동가능한 연결" 또는 "작동가능하게 연결된"은 2개 이상의 성분(예를 들어, 프로모터 및 다른 서열 요소)의 병렬(juxtaposition)을 포함하는데, 두 성분이 정상적으로 기능하고, 이들 성분 중에서 적어도 하나가 적어도 하나의 다른 성분에 미치는 기능을 매개할 수 있는 가능성을 허용하도록 한다. 예를 들어, 프로모터는 프로모터가 하나 이상의 전사 조절 인자의 유무에 대응하여 암호화 서열의 전사 레벨을 제어하는 경우에, 암호화 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다.

핵산의 "상보성"은 하나의 핵산 가닥의 뉴클레오티드 서열이 이의 핵산 염기 그룹의 배향으로 인해, 대향하는 핵산 가닥 상의 다른 서열과 수소 결합을 형성한다는 것을 의미한다. DNA의 상보적 염기는 전형적으로 A와 T, C와 G이다. RNA에서, 이들은 전형적으로 C와 G, U와 A이다. 상보성은 완전하거나 상당하거나/충분할 수 있다. 2개의 핵산 사이의 완전한 상보성은 2개의 핵산이, 이중 나선 구조의 모든 염기가 왓슨-크릭 염기 결합(Watson-Crick pairing)에 의해 상보적 염기에 결합되는 이중 나선 구조를 형성할 수 있음을 의미한다. "상당한" 또는 "충분한" 상보성은 한 가닥의 서열이 대향하는 가닥의 서열에 전적으로 및/또는 완전히 상보적이지 않지만, 일련의 혼성화 조건(예를 들어, 염 농도 및 온도)에서 안정한 하이브리드 복합체를 형성하도록 두 가닥 상의 염기 사이에 충분한 결합이 일어남을 의미한다. 이러한 조건은 혼성화된 가닥의  $T_m$ 을 예측하는 서열 및 표준 수학적 계산을 이용하여 예측될 수 있거나, 루틴한 방법을 이용하여  $T_m$ 의 실험적 측정에 의해 예측될 수 있다.  $T_m$ 은 2개의 핵산 가닥 사이에 형성된 혼성화 복합체 집단이 50% 변성된 온도를 포함한다.  $T_m$ 보다 낮은 온도에서는 혼성화 복합체의 형성이 촉진되는 반면에,  $T_m$ 보다 높은 온도에서는 혼성화 복합체의 가닥들의 용융 또는 분리가 촉진된다. 기타 공지된  $T_m$  계산은 핵산 구조적 특성을 고려하지만,  $T_m$ 은 예를 들어,  $T_m=81.5+0.41(\% G+C)$ 을 사용하여 1 M NaCl 수용액 중의 기지의 G+C 함량을 갖는 핵산에 대하여 추정될 수 있다.

"혼성화 조건"은 하나의 핵산 가닥이 상보적 가닥 상호작용 및 수소 결합에 의해 제2 핵산 가닥에 결합하여 혼

성화 복합체를 생성하는 누적 환경을 포함한다. 이러한 조건은 핵산을 함유하는 수용액 또는 유기 용액의 화학 성분 및 이의 농도(예를 들어, 염, 퀼레이트제, 포름아미드), 및 혼합물의 온도를 포함한다. 다른 인자, 예컨대 배양 기간 또는 반응실 치수가 환경에 기여할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.sup.nd ed., pp. 1.90-1.91, 9.47-9.51, 11.47-11.57 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)]을 참조한다.

[0037] 혼성화는 염기 간의 미스매치(mismatch)가 가능하더라도, 두 핵산이 상보적 서열을 포함하는 것을 요한다. 두 핵산 간의 혼성화에 적합한 조건은 당업계에 주지된 변수인 핵산 길이 및 상보성 정도에 따라 다르다. 2개의 뉴클레오티드 서열 간의 상보성 정도가 클수록, 이를 서열을 갖는 핵산의 하이브리드에 대한 용융 온도( $T_m$ )의 값이 커진다. 쇼트 스트레치(short stretch)의 상보성(예를 들어, 35개 이하, 30개 이하, 25개 이하, 22개 이하, 20개 이하, 또는 18개 이하의 뉴클레오티드에 대한 상보성)을 갖는 핵산 간의 혼성화의 경우, 미스매치 위치가 중요해진다(상기 문헌[Sambrook *et al.*, 11.7-11.8] 참조). 전형적으로, 혼성화 가능한 핵산 길이는 적어도 약 10개의 뉴클레오티드로 되어 있다. 혼성화 가능한 핵산의 최소 길이의 예로는 적어도 약 15개의 뉴클레오티드, 적어도 약 20개의 뉴클레오티드, 적어도 약 22개의 뉴클레오티드, 적어도 약 25개의 뉴클레오티드, 및 적어도 약 30개의 뉴클레오티드를 포함한다. 게다가, 온도 및 세정액 염 농도는 필요에 따라, 인자, 예컨대 상보성 영역의 길이 및 상보성 정도에 따라 조절될 수 있다.

[0038] 폴리뉴클레오티드의 서열은 특이적으로 혼성화 가능하게 되는 이의 표적 핵산의 서열에 대하여 100% 상보성을 나타낼 필요는 없다. 게다가, 폴리뉴클레오티드는 개재 또는 인접 세그먼트가 혼성화 이벤트(예를 들어, 루프 구조 또는 헤어핀 구조)에 관여하지 않도록 하나 이상의 세그먼트에 대하여 혼성화할 수 있다. 폴리뉴클레오티드(예를 들어, gRNA)는 이들이 표적으로 하는 표적 핵산 서열 내의 표적 부위에 대하여, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 상보성을 포함할 수 있다. 예를 들어, 20개 중 18개의 뉴클레오티드가 표적 부위에 상보적이므로, 특이적으로 혼성화되는 gRNA는 90% 상보성을 나타낼 것이다. 이러한 예에서, 나머지 비상보적 뉴클레오티드는 상보적 뉴클레오티드와 클러스터를 이루거나 그 사이에 상보적 뉴클레오티드가 배치될 수 있으며, 서로 인접하거나 상보적 뉴클레오티드에 인접할 필요는 없다.

[0039] 핵산 내의 특정 스트레치의 핵산 서열 간의 상보성 비율(percent complementarity)은 통상, 당업계에 공지된 BLAST 프로그램(basic local alignment search tool) 및 PowerBLAST 프로그램(Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410; Zhang and Madden (1997) *Genome Res.* 7:649-656)을 사용하거나, 스미스(Smith) 및 와트만(Waterman)의 알고리즘(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)을 사용하는 디폴트 설정을 이용한 Gap 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)을 사용하여 측정될 수 있다.

[0040] 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물은 다양한 상이한 성분을 사용한다. 본 발명의 상세한 설명을 통해, 일부 성분이 활성 변이체 및 단편을 가질 수 있는 것으로 인식된다. 이러한 성분은 예를 들어, Cas 단백질, CRISPR RNA, tracrRNA, 및 가이드 RNA를 포함한다. 각각의 이들 성분에 대한 생물학적 활성은 본 명세서의 다른 곳에 설명되어 있다.

[0041] 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 관련하여, "서열 동일성" 또는 "동일성"은 특정 비교창에 대하여, 최대 일치도로 정렬되는 경우에 동일한 2개의 서열의 잔기에 대하여 언급된다. 서열 동일성 비율이 단백질에 관하여 사용되는 경우에, 동일하지 않은 잔기 위치가 종종 보존 아미노산 치환에 따라 다르며, 여기서 아미노산 잔기가 유사한 화학적 특성(예를 들어, 전하 또는 소수성)을 갖는 다른 아미노산 잔기 대신에 사용되므로, 분자의 기능 특성을 변경시키지 않는다. 서열이 보존적 치환의 점에서 상이한 경우에는, 서열 동일성 비율은 치환의 보존적 성질을 보정하기 위해 상향 조정될 수 있다. 이러한 보존적 치환에 따라 다른 서열은 "서열 유사성" 또는 "유사성"을 갖는다고 한다. 이러한 조정을 행하는 수단은 당업자에게 주지되어 있다. 전형적으로, 이는 보존적 치환을 완전 미스매치보다는 부분 미스매치로서 스코어를 얻어, 서열 동일성 비율을 증가시키는 것을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 동일한 아미노산은 스코어 1로 주어지고, 비보존적 치환은 스코어 0으로 주어지며, 보존적 치환은 스코어 0 내지 1로 주어진다. 보존적 치환의 스코어는 예를 들어, 프로그램 PC/GENE(Intellicogenetics, Mountain View, California)으로 실행되는 바와 같이 계산된다.

[0042] "서열 동일성 비율"은 비교창에 대하여 최적으로 정렬된 2개의 서열을 비교함으로써 결정된 값을 포함하며, 여기서 비교창 내의 폴리뉴클레오티드 서열의 부분은 2개의 서열의 최적 정렬을 위한 참조 서열(부가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여, 부가 또는 결실(즉, 캡)을 포함할 수 있다. 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 두 서열에 나타나는 위치의 개수를 측정하여 매칭된 위치의 개수를 산출하고, 매칭된 위치의 개수를 비교창

내의 위치의 총 개수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 비율을 산출함으로써 그 비율을 계산한다.

[0043] 달리 명시되지 않는 한, 서열 동일성/유사성 값은 하기 파라미터를 사용하여 GAP 버전(Version) 10을 이용하여 구한 값을 포함한다: GAP 웨이트(Weight) 50 및 렌스 웨이트(Length Weight) 3, 및 nwsgapdna.cmp 스코어링 매트릭스(scoring matrix)를 이용한 뉴클레오티드 서열의 % 동일성 및 % 유사성; GAP 웨이트 8 및 렌스 웨이트 2, 및 BLOSUM62 스코어링 매트릭스를 이용한 아미노산 서열의 % 동일성 및 % 유사성; 또는 이의 임의의 등가 프로그램. "등가 프로그램"은 임의의 서열 비교 프로그램을 포함하는데, 당해 임의의 2개의 서열의 경우, GAP 버전 10에 의해 얻은 대응 정렬과 비교하여, 동일한 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 매치 및 동일한 % 서열 동일성을 갖는 정렬을 얻는다.

[0044] 하나 이상의 열거된 요소를 "포함하는" 또는 "들 수 있는(~가 포함되는)" 조성물 또는 방법은 구체적으로 열거되지 않은 다른 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 단백질을 "포함하는" 또는 "~들 수 있는(~가 포함되는)" 조성물은 단백질을 단독으로 포함하거나, 다른 성분과 조합하여 포함할 수 있다.

[0045] 다양한 값의 지정은 해당 범위 내 또는 그 범위를 한정하는 모든 정수, 및 그 범위 내의 정수로 한정되는 모든 부분적인 범위를 포함한다.

[0046] 문맥상 달리 명백하지 않는 한, 용어 "약"은 표시된 값의 측정 표준 오차(예를 들어, SEM) 내의 값을 포함한다.

[0047] 문맥상 달리 명확히 지시하지 않는 한, 관사의 단수형("a", "an" 및 "the")은 복수형 지시 대상(plural reference)을 포함한다. 예를 들어, 용어 "Cas 단백질" 또는 "적어도 하나의 Cas 단백질"은 이들의 혼합물을 비롯하여, 복수의 Cas 단백질을 포함할 수 있다.

[0048] I. F0 세대의 생식능력이 있는 암컷 XY 동물을 생산하기 위한 방법 및 조성물

[0049] 도너 ES 세포 및 숙주 배아로부터 비인간 동물을 생산하기 위한 방법은 공지되어 있다. 도너 ES 세포는 숙주 배아를 생식시키도록 세포의 능력을 향상시키는 특정한 특성을 위해 선택되므로, 도너 ES 세포 및 숙주 배아로 생산된 동물에 어느 정도 또는 상당히 기여한다. 생산된 동물은 주로 ES 세포의 유전자형(예를 들어, XY 또는 XX)에 근거한 수컷 또는 암컷일 수 있다.

[0050] 트랜스제닉 동물을 생산하기 위한 대부분의 ES 세포주는 수컷 XY 유전자형을 갖는다. 포유류의 성결정에 있어서의 Y 염색체의 우성때문에, XY ES 세포를 배반포 숙주 배아로 도입하여 임신시키는 경우, 이는 거의 항상 제1 세대(F0)에서, 키메라, 즉, 수컷 도너 ES 세포(XY)로부터 유래하는 세포, 및 수컷(XY) 또는 암컷(XX)일 수 있는 숙주 배아로부터 유래하는 세포를 포함하는 표현형이 수컷인 동물을 생산한다. 벨로시마우스(VelociMouse) 방법에 의해 8세포기 숙주 배아로 도입하여 임신시킨 경우의 XY ES 세포는 제1 세대(F0)에서, 완전히 XY ES 세포로부터 유래하는 표현형이 수컷인 동물을 생산할 수 있다.

[0051] WO2011/156723에는 XY 도너 세포를 숙주 배아에 도입하여 적절한 숙주에 임신시킨 후에, 생식능력이 있는 XY 암컷 동물을 F0 개체군으로 생산하도록 배양 하의 XY 도너 세포를 유지하기 위한 배지를 사용하는 방법 및 조성물이 제공된다. 이러한 조성물은 주어진 표적화된 유전자 변형에 대하여 동형접합성인 F1 자손을 생산하는데 있어서의 용도가 발견된다.

[0052] 본원은 해부학적으로 정상인 생식능력이 있는 다산성 XY F0 암컷의 생산을 촉진시키는 배지와 병용하여, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 XY 도너 세포의 조합을 사용하는 방법 및 조성물을 제공한다. 이러한 방법 및 조성물에 의해, F0 세대의 생식능력이 있는 암컷 XY 비인간 동물을 생산할 수 있다. 본 명세서에 기재된 배지와 병용한, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 XY ES 세포의 조합에 의해, F0 세대의 생식능력이 있는 암컷 XY 자손의 비율이 상당히 증가된다. 효율적인 수컷에서 암컷으로의 성전환 방법은 국내 축산업에 있어서 가치가 있다. 예를 들어, 암송아지는 수컷보다 낙농 축산업에 있어서 훨씬 더 가치가 있다. 가금류에 대해서도 마찬가지이다. 번식 목적을 위해, 소가 되든지 돼지가 되든지 양이 되든지간에, 몇 마리밖에 안되는 황소, 수퇘지 또는 솟양에 대하여 많은 암컷을 낳는 것이 바람직하다. 따라서, 본 명세서에 제공된 다양한 방법은 다양한 상업상 중요한 육종 산업에서의 용도가 발견된다.

[0053] 또한, 자성화(feminizing) 배지에 배양시키지 않고도 F0 세대의 생식능력이 있는 XY 암컷 비인간 포유류를 생산할 수 있는 XY 배아 줄기(ES) 세포주를 제조하는 방법 및 조성물이 제공된다. 이러한 방법에서, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 XY ES 세포주는 본 명세서의 다른 곳에 제공된 자성화 배지가 없는 경우에(예를 들어, 본 명세서의 다른 곳에 기재된 기본 배지, 예컨대 DMEM에 배양함으로써) F0 세대의 생식능력이 있는 XY 암컷 비인간 포유류를 생산할 수 있는 ES 세포주를 생산할 수 있다.

[0054] A. *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 동물 XY 세포

동물 유래의 다양한 XY 만능성 및/또는 전능성 세포를 포함하는 다양한 조성을 및 방법이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 사용되는 용어 "만능성 세포"는 2개 이상의 분화된 세포형으로 성장되는 능력을 지니는 미분화 세포를 포함한다. 이러한 만능성 및/또는 전능성 XY 세포는 예를 들어, 배아 줄기(ES) 세포 또는 유도 만능성 줄기(iPS) 세포일 수 있다. 본 명세서에 사용되는 용어 "배아 줄기 세포" 또는 "ES 세포"는 배아로의 도입 시에 발생 중의 배아의 조직에 기여할 수 있는 배아 유래 전능성 또는 만능성 세포를 포함한다.

세포, 만능성 및/또는 전능성 세포, XY 세포, ES 세포, iPS 세포, 도너 세포 및/또는 숙주 배아와 관련하여, 용어 "동물"은 포유류, 어류 및 조류를 포함한다. 포유류는 예를 들어, 인간, 비인간 영장류, 원숭이, 유인원, 고양이, 개, 말, 황소, 사슴, 들소, 양, 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 기니피그), 가축(예를 들어, 소의 종류, 예를 들어, 암소, 거세 황소 등; 양의 종류, 예를 들어, 양, 염소 등; 및 돼지의 종류, 예를 들어, 피그 및 수퇘지)을 포함한다. 조류는 예를 들어, 닭, 칠면조, 타조, 거위, 오리 등을 포함한다. 가축 및 농업 용 동물도 포함된다. 세포, XY 세포, ES 세포, 도너 세포 및/또는 숙주 배아와 관련하여, 어구 "비인간 동물"은 인간을 제외한다.

구체적인 실시 형태에서, 만능성 세포는 인간 XY ES 세포, 인간 XY iPS 세포, 인간 성인 XY ES 세포, 발달 제한된 인간 전구 ES 세포, 비인간 XY ES 세포, 비인간 XY iPS 세포, 설치류 XY ES 세포, 설치류 XY iPS 세포, 마우스 XY ES 세포, 마우스 XY iPS 세포, 래트 XY ES 세포, 래트 XY iPS 세포, 햄스터 XY ES 세포, 햄스터 XY iPS 세포, 원숭이 XY ES 세포, 원숭이 XY iPS 세포, 농업용 포유류 XY ES 세포, 농업용 XY iPS 세포, 가축 포유류 XY ES 세포, 또는 가축 XY iPS 세포이다. 게다가, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포는 근교계(inbred strain), 잡종계 또는 비근교계로부터 유래될 수 있다. 또한 만능성 및/또는 전능성 XY 세포가 XYY 핵형 또는 XXY 핵형을 포함할 수 있는 것으로 인식된다.

마우스 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 129 균주, C57BL/6 균주, 129와 C57BL/6의 혼합체, BALB/c 균주, 또는 스위스 웨스터(Swiss Webster) 균주로부터 유래할 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 마우스는 50% 129와 50% C57BL/6로 되어 있다. 일 실시 형태에서, 마우스는 129P1, 129P2, 129P3, 129X1, 129S1(예를 들어, 129S1/SV, 129S1/Svlm), 129S2, 129S4, 129S5, 129S9/SvEvH, 129S6(129/SvEvTac), 129S7, 129S8, 129T1, 129T2인 균주로 이루어지는 균으로부터 선택되는 129 균주이다. 예를 들어, 문헌[Festing *et al.* (1999) *Mammalian Genome* 10:836]을 참조한다. 일 실시 형태에서, 마우스는 C57BL 균주이며, 구체적인 실시 형태에서 C57BL/A, C57BL/An, C57BL/GrFa, C57BL/Kal\_wN, C57BL/6, C57BL/6J, C57BL/6ByJ, C57BL/6NJ, C57BL/6NTac, C57BL/10, C57BL/10ScSn, C57BL/10Cr, 또는 C57BL/01a로부터 유래된다. 구체적인 실시 형태에서, 마우스는 상술한 129 균주와 상술한 C57BL/6 균주의 혼합체이다. 다른 구체적인 실시 형태에서, 마우스는 상술한 129 균주의 혼합체, 또는 상술한 BL/6 균주의 혼합체이다. 구체적인 실시 형태에서, 혼합체의 129 균주는 129S6(129/SvEvTac) 균주이다. 일부 실시 형태에서, 마우스 XY ES 세포는 129 균주로부터 유래된 Y 염색체를 포함한다.

또 다른 실시 형태에서, XY 마우스 ES 세포는 VGF1 마우스 ES 세포이다. VGF1(F1H4로도 알려짐) 마우스 ES 세포는 암컷 C57BL/6NTac 마우스를 수컷 129S6/SvEvTac 마우스와 교배하여 생산되는 하이브리드 배아로부터 유래되었다. 따라서, VGF1 ES 세포는 129S6/SvEvTac 마우스 유래의 Y 염색체를 포함한다. 예를 들어, 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 문헌[Auerbach, W. *et al.* (2000) *Establishment and chimera analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-derived mouse embryonic stem cell lines. Biotechniques* 29, 1024–1028, 1030, 1032]을 참조한다.

래트 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 ACI 래트 균주, 다크 아구티(Dark Agouti; DA) 래트 균주, 위스타(Wistar) 래트 균주, LEA 래트 균주, 스프라그 돌리(Sprague Dawley, SD) 래트 균주, 또는 피셔(Fischer) 래트 균주, 예컨대 피셔 F344 또는 피셔 F6를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 래트 균주로부터 유래될 수 있다. 래트 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 또한 상기에 열거된 2개 이상의 균주의 혼합체로부터 유래되는 균주로부터 얻어질 수 있다. 일 실시 형태에서, 래트 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 DA 균주 및 ACI 균주로부터 선택되는 균주로부터 유래된다. 구체적인 실시 형태에서, 래트 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 ACI 균주로부터 유래된다. ACI 래트 균주는 하얀 색의 배 및 발과, *RT1<sup>av1</sup>* 하플로타입을 가진 블랙 아구티인 것을 특징으로 한다. 이러한 균주는 할란 연구소(Harlan Laboratories)를 비롯한 다양한 공급처로부터 입수 가능하다. 다른 실시 형태에서, 다양한 래트 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세

포)는 아구티 텀(coat) 및  $RT1^{av1}$  하플로타입을 갖는 것을 특징으로 하는 다크 아구티(DA) 래트 균주로부터 유래된다. 이러한 래트는 찰스 리버 연구소(Charles River Laboratories) 및 할란 연구소를 비롯한 다양한 공급처로부터 입수 가능하다. 추가의 실시 형태에서, 래트 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 근교계 래트 균주로부터 유래된다. 구체적인 실시 형태에서, 래트 ES 세포주는 ACI 래트로부터 유래되며, ACI.G1 래트 ES 세포를 포함한다. 또 하나의 실시 형태에서, 래트 ES 세포주는 DA 래트로부터 유래되며, DA.2B 래트 ES 세포주 또는 DA.2C 래트 ES 세포주를 포함한다. 예를 들어, 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는, 2014년 2월 20일자로 출원된 미국 실용 특허 출원 제14/185,703호를 참조한다.

[0061] 다양한 실시 형태에서, 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포), 도너 세포 및/또는 숙주 배아는 하기 중 하나 이상으로부터 유래되지 않는다: 아코돈 속(*Akodon spp.*), 마이오푸스 속(*Myopus spp.*), 마이크로토스 속(*Microtus spp.*), 탈파 속(*Talpa spp.*). 다양한 실시 형태에서, 도너 세포 및/또는 숙주 배아는 정상 야생형 특성이 XY 암컷 생식능력인 종으로부터 유래되지 않는다. 다양한 실시 형태에서, 유전자 변형이 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포), 도너 세포 또는 숙주 배아에 존재하는 경우에는, 유전자 변형은 XYY 또는 XXY, *Tdy*-음성 성전환, *Tdy*-양성 성전환, X0 변형, 이수성(aneuploidy), *fgf9*<sup>-/-</sup> 유전자형, 또는 SOX9 변형이 아니다.

[0062] 상기 방법 및 조성물에 사용되는 만능성 및/또는 전능성 XY 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 유전자 변형을 갖는다. "성결정영역 Y" 단백질 또는 "*Sry*" 단백질은 DNA 결합 단백질의 고이동도군(HMG) 박스 패밀리 구성원인 전사 인자이다. *Sry*는 웅성 성결정을 유도하는 정소결정 인자이다. 각각 본 명세서에 참조로 포함되는 마우스(수탁번호 Q05738); 래트(젠햄크: CAA61882.1) 인간(수탁 번호 Q05066); 고양이(수탁번호 Q67C50), 및 말(수탁번호 P36389)을 비롯한 다양한 유기체 유래의 *Sry* 단백질의 서열이 알려져 있다.

[0063] 일반적으로, *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성은 *Sry* 단백질의 단백질 레벨 및/또는 활성 레벨이 *Sry* 단백질의 발현 및/또는 활성을 억제시키기 위한 유전자 변형 또는 돌연변이를 일으키지 않은 적절한 대조군 세포의 *Sry* 단백질 레벨보다 통계적으로 낮은 경우에 저하시킨다. 구체적인 실시 형태에서, *Sry* 단백질의 농도 및/또는 활성은 *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키기 위한 변형이 유도되지 않은 대조군 세포에 비해, 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 저하된다.

[0064] "대상 세포"는 유전자 변화, 예컨대 본 명세서에 개시된 유전자 변형을 일으킨 것이거나, 이렇게 변화된 세포로부터 유래하고 변화를 포함하는 세포이다. "대조군" 또는 "대조군 세포"는 대상 세포의 표현형 변화를 측정하는 기준점을 제공한다. 일 실시 형태에서, 대조군 세포는 또한 유전자 변형 또는 돌연변이에 의한 활성 저하를 일으키지 않는 것을 제외하고는, *Sry* 활성이 저하된 세포와 가능한 한 밀접하게 매칭된다(예를 들어, 각각의 세포는 동일한 세포주에 유래할 수 있음). 다른 경우에는, 대조군 세포는 예를 들어, (a) 야생형 세포, 즉, 대상 세포를 형성하는 유전자 변화를 위한 출발 물질로서의 동일한 유전자형의 야생형 세포; (b) 출발 물질로서 동일한 유전자형이나, 널(null) 구축물(즉, 대상으로 하는 형질에 대한 효과가 알려져 있지 않은 구축물, 예컨대 표지 유전자를 포함하는 구축물)로 유전자 변형된 세포; (c) 대상 세포의 비유전자 변형 자손인 세포(즉, 대조군 세포와 대상 세포는 동일한 세포주로부터 유래함); (d) 대상 세포와 유전학적으로 동일하나, 대상으로 하는 유전자의 발현을 유도하는 조건 또는 자극에 노출되지 않는 세포; 또는 (e) 유전자 변형이 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 발현 변화를 일으키지 않는 조건 하의 대상 세포 자체를 포함할 수 있다.

[0065] *Sry* 폴리펩티드의 발현 레벨은 직접적으로 예를 들어, 세포 또는 유기체의 *Sry* 폴리펩티드의 레벨을 분석하거나, 간접적으로 예를 들어, *Sry* 폴리펩티드의 활성을 측정함으로써 측정될 수 있다. *Sry* 단백질의 활성을 측정하기 위한 다양한 방법이 공지되어 있다. 각각, 본 명세서에 참조로 포함되는, 문헌[Wang et al. (2013) *Cell* 153:910-918, Mandalos et al. (2012) *PLOS ONE* 7:e45768:1-9] 및 문헌[Wang et al. (2013) *Nat Biotechnol.* 31:530-532]을 참조한다.

[0066] 다른 경우에는, *Sry* 폴리펩티드의 활성 및/또는 레벨을 저하시키는 표적화된 유전자 변형을 갖는 세포는 서던 블롯 분석(Southern blot analysis), DNA 염기 서열 결정(sequencing), PCR 분석, 또는 표현형 분석을 포함하나 이에 한정되지 않는 방법을 이용하여 선택된다. 그 다음에 이러한 세포는 본 명세서에 기재된 다양한 방법, 조성물 및 키트에서 사용된다.

[0067] 표적화된 유전자 변형은 예를 들어, Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌의 표적화된 변화, *Sry* 유전자의 표적화된 변화 또는 다른 원하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 변화를 비롯한 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적

화된 변화를 포함할 수 있다. 이러한 표적화된 변형은 하나 이상의 뉴클레오티드의 부가, 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실, 하나 이상의 뉴클레오티드의 치환, 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 부분의 녹아웃, 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드 또는 이의 부분의 녹인, 내인성 핵산 서열의 이종 핵산 서열로의 치환, 또는 그 조합을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 구체적인 실시 형태에서, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 뉴클레오티드가 변화되어 표적화된 게놈 변형을 형성한다.

[0068] *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성 저하는 *Sry* 유전자의 유전자 변형(즉, 조절 영역, 암호화 영역, 및/또는 인트론 등에서의 유전자 변형)에 기인할 수 있다. 이러한 유전자 변형은 뉴클레오티드의 부가, 결실 또는 게놈으로의 치환을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 이러한 유전자 변형은 예를 들어, *Sry* 유전자로의 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, *Sry* 유전자로부터의 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실, *Sry* 유전자에서의 하나 이상의 뉴클레오티드의 치환, *Sry* 유전자 또는 이의 부분의 녹아웃, *Sry* 유전자 또는 이의 부분의 녹인, 내인성 핵산 서열의 이종 핵산 서열로의 치환, 또는 그 조합을 포함한 *Sry* 유전자 변화를 포함할 수 있다. 따라서, 구체적인 실시 형태에서, *Sry* 폴리펩티드의 활성은 *Sry* 폴리펩티드를 암호화하는 유전자를 파괴함으로써 저하되거나 제거될 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 뉴클레오티드가 *Sry* 유전자에서 변화된다. 다양한 방법을 사용하여, 추가의 표적화된 유전자 변형을 일으킬 수 있다. 예를 들어, 각각 본 명세서에 참조로 포함되는, 문헌[Wang *et al.* (2013) *Cell* 153:910-918, Mandalos *et al.* (2012) *PLOS ONE* 7:e45768:1-9] 및 문헌[Wang *et al.* (2013) *Nat Biotechnol.* 31:530-532]을 참조한다. 또한, Y 염색체 상의 게놈 유전자좌를 변형시키는 본 명세서에 기재된 다양한 방법을 사용하여, 표적화된 유전자 변형을 *Sry* 유전자에 도입할 수 있다.

[0069] 다른 실시 형태에서, *Sry* 폴리펩티드의 활성 및/또는 레벨은 *Sry* 폴리펩티드의 레벨 또는 활성을 억제시키는 폴리뉴클레오티드를 세포로 도입함으로써 저하되거나 제거된다. 폴리뉴클레오티드는 직접적으로 *Sry* 메신저 RNA의 번역을 저지하거나, 간접적으로 *Sry* 단백질을 암호화하는 유전자의 전사 또는 번역을 억제하는 폴리펩티드를 암호화함으로써 *Sry* 폴리펩티드의 발현을 억제할 수 있다. 다른 실시 형태에서, *Sry* 폴리펩티드의 활성은 *Sry* 폴리펩티드의 활성을 억제시키는 폴리펩티드를 암호화하는 서열을 세포로 도입함으로써 저하되거나 제거된다.

[0070] 일 실시 형태에서, XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 *Sry* 단백질의 활성 및/또는 레벨을 저하시키는 조건 *Sry* 대립유전자를 포함한다. "조건 *Sry* 대립유전자"는 원하는 발생 시기에 및/또는 대상으로 하는 원하는 조직 내에서 *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성이 저하되도록 설계된 변형 *Sry* 유전자를 포함한다. 레벨 및/또는 활성 저하는 조건 대립유전자를 발생시키는 변형을 갖지 않거나, 선행 및/또는 후속 시기와 함께 원하는 발생 시기에서의 활성 저하의 경우나, 모든 조직의 평균 활성을 갖는 원하는 조직의 경우의 대조군 세포와 비교될 수 있다. 일 실시 형태에서, 조건 *Sry* 대립유전자는 원하는 발생 시점에서 및/또는 특정 조직에서 스위치 오프(switch off)할 수 있는 *Sry*의 조건 널 대립유전자를 포함한다. 이러한 조건 대립유전자는 유전자 표적화 클론으로부터 유래하는 생식능력이 있는 XY 암컷을 생산하는데 사용될 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에 기재된 바와 같이, 이러한 방법에 의해 F1 세대의 원하는 동형접합성 유전자 변형을 일으킬 수 있다. 이러한 방법에 의해, F2 세대를 번식시키지 않아도 표현형의 신속한 검사가 이루어진다.

[0071] 비제한적인 실시 형태에서, 조건 *Sry* 대립유전자는 그 전체 내용이 참조로 포함되는 US 2011/0104799에 기재된 다기능 대립유전자이다. 구체적인 실시 형태에서, 조건 대립유전자는 (a) 표적 유전자의 전사에 대하여 센스 방향으로의 작동 서열(actuating sequence) 및 센스 또는 안티센스 방향으로의 약물 선택 카세트(DSC); (b) 안티센스 방향으로의 대상으로 하는 뉴클레오티드 서열(NSI) 및 COIN(conditional by inversion module; 엑손-분할 인트론 및 가역적 유전자 트랩 유사 모듈(invertible genetrap-like module)을 이용함; 예를 들어, 그 전체 내용이 참조로 포함되는 US 2011/0104799를 참조함); 및 (c) 제1 재조합 효소에 노출 시에 재조합하여, (i) 작동 서열 및 DSC를 포함하지 않고, (ii) 센스 방향으로의 NSI 및 안티센스 방향으로의 COIN을 포함하는 조건 대립유전자를 생성하는 재조합가능한 단위를 포함한다.

[0072] *Sry* 유전자의 조건 대립유전자는 임의의 세포 종류에서 생성될 수 있으며, XY 만능성 및/또는 전능성 세포로 한정되지 않는다. 비제한적인 방법과 함께 Y 염색체 상의 게놈 유전자좌를 표적으로 하는 이러한 세포 종류는 본 명세서의 다른 곳에서 더욱 상세히 논의된다.

[0073] 본 명세서의 다른 곳에 논의된 바와 같이, *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 유전자 변형을 갖는 만능성 및/또는 전능성 XY 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드에 대한 적어도 하나의 추가의 표적화된 유전자 변형을 추가로 포함할 수 있다. 적어도 하나의 추가의 표적화된 유전자 변형은 하나 이상의 핵산의 치환, 내인성 핵산 서열의 이종 핵산 서열로의 치환, 녹아웃 및 녹인을 포함할 수

있다. 추가의 표적화된 유전자 변형은 Y 염색체, X 염색체 또는 상염색체 상에 일어날 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에 논의된 표적화 플라스미드 및 큰 표적화 백터를 사용하는 것을 비롯하여 다양한 방법을 사용하여, 추가의 표적화된 유전자 변형을 일으킬 수 있다. 또한, 핵이식과 관련된 방법에 관해서는, 각각 본 명세서에 참조로 포함되는 US20080092249, WO/1999/005266A2, US20040177390, WO/2008/017234A1 및 미국 특허 제7,612,250호를 참조한다. 게다가, Y 염색체 상의 게놈 유전자좌(즉, *Sry* 유전자)를 변형시키기 위한 본 명세서에 기재된 다양한 방법은 Y 염색체 상에 위치하지 않는 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드에 대한 표적화된 유전자 변형을 도입하는 데에도 사용될 수 있다.

[0074] *B. Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 만능성 및/또는 전능성 XY 세포를 배양하기 위한 배지]

F0 세대의 XY 생식능력이 있는 암컷을 촉진시키는 다양한 방법 및 조성물에 사용되는 배지는 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, ES 세포, iPS 세포, XY ES 세포, XY iPS 세포 등)를 유지하도록 위한 것이다. 용어 "유지하다", "유지하는" 및 "유지"는 본 명세서에 기재된 만능성 및/또는 전능성 세포(ES 세포 또는 iPS 세포 포함)의 적어도 하나 이상의 특성 또는 표현형의 안정한 보존을 말한다. 이러한 표현형은 만능성 및/또는 전능성, 세포 형태, 유전자 발현 프로파일 및 세포의 다른 기능 특성을 유지하는 것을 포함할 수 있다. 용어 "유지하다", "유지하는" 및 "유지"는 또한 세포 번식 또는 배양 세포수 증가를 포함할 수 있다. 상기 용어는 또한 세포가 계속 만능성을 유지할 수 있는 배양 조건을 고려하며, 그 동안에 세포가 계속해서 분열하여 세포수가 증가할 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다.

[0076] 일부 실시 형태에서, *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 유전자 변형을 갖는 XY 세포는 배양 하의 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, ES 세포, iPS 세포, XY ES 세포, XY iPS 세포 등)를 성장시키거나 유지시키는데 사용하기에 적합한(보충물이 첨가됨) 당업계에 공지된 임의의 기본 배지(예를 들어, DMEM)에 배양함으로써 유지된다. 이러한 경우에는, 배양된 XY ES 세포는 생식능력이 있는 암컷 동물로 성장할 가능성이 있지만 여전히 만능성 및/또는 전능성을 보유하므로, 상기 세포가 수용자(recipient) 배아로 도입되어, 생식능력이 있는 암컷 자손을 생산할 수 있다.

[0077] 다른 실시 형태에서, *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 유전자 변형을 갖는 XY 세포는 일부 세포가 생식능력이 있는 암컷 동물로 성장할 가능성이 있지만 여전히 만능성 및/또는 전능성을 보유하는 XY 세포로 전환하는 충분한 시간 동안 이하에 좀 더 자세히 명시된 배지에 배양함으로써 유지되므로, 상기 세포가 수용자 배아로 도입되어, 생식능력이 있는 암컷 자손을 생산할 수 있다.

[0078] *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 유전자 변형을 갖는 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포, XY iPS 세포 등)를 유지하는데 사용되는 배지는 XY F0 생식능력이 있는 암컷의 발생을 촉진시킨다. 따라서, 이러한 배지에 배양하는 것은 적절한 대조군 배지(예를 들어, DMEM을 기반으로 한 배지)에 배양하는 것과 비교하면, 얻어지는 XY F0 생식능력이 있는 암컷 수를 증가시킨다. 따라서, 증가한 XY F0 생식능력이 있는 암컷 수는 (비인간 동물 XY ES 세포의 숙주 배아로의 도입 및 숙주 배아의 임신 후에) F0 비인간 동물 중 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%가 XY 암컷으로, 성숙기에 이를 때에 F0 XY 암컷 비인간 동물이 생식능력을 나타낼 수 있다.

[0079] 어구 "기본 배지" 또는 "기본 배지들"은 예를 들어, 배양 하의 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, ES 세포, iPS 세포, XY ES 세포, XY iPS 세포 등)를 성장시키거나 유지시키는데 사용하기에 적합한(보충물이 첨가됨) 당업계에 공지된 기본 배지(예를 들어, DMEM)를 포함한다. 생식능력이 있는 XY 암컷을 생산하기에 적합한 기본 배지(즉, "저염 DMEM" 또는 "저삼투압 배지")는 배양 하의 ES 세포를 유지하는데 전형적으로 사용되는 기본 배지와 상이하다. 일반적으로 기본 배지를 논의하기 위해, 생식능력이 있는 XY 암컷을 생산하는데 적합하지 않은 기본 배지가 본 섹션에 "DMEM"으로서 표 1(예를 들어, 전형적인 DMEM 배지)에 기재되어 있다. 생식능력이 있는 XY 암컷을 생산하기에 적합한 기본 배지를 논의하기 위해, 어구 "저염 DMEM" 또는 "저삼투압 DMEM"이 사용된다. 배양 하의 만능성 및/또는 전능성 세포를 유지하는데 전형적으로 사용되는 기본 배지(예를 들어, DMEM)와, 생식능력이 있는 XY 암컷을 생산하기에 적합한 기본 배지(예를 들어, "저염 DMEM") 사이의 차이가 본 명세서에 명확히 설명된다. 어구 "저염 DMEM"이 편의상 사용되고; 생식능력이 있는 XY 암컷을 생산하기에 적합한 DMEM은 "저염"에 한정되지 않는 특성을 나타내지만, 본 명세서에 기재된 특성을 포함한다. 예를 들어, 표 1에 나타낸 DMEM은 본 명세서에 제공된 염화나트륨 및/또는 중탄산나트륨 농도를 변경함으로써 생식능력이 있는 XY 암컷을 생산하기에 적합한 것으로 만들어질 수 있으며, 또한 표 1에 나타낸 DMEM과 비교하여, 상이한 삼투압 및 상이한

전도도가 얻어질 것이다. 기본 배지의 일례는 다양한 형태의 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM))이다(예를 들어, 인비트로젠(Invitrogen) DMEM, Cat. No. 1 1971-025) (표 1). 적합한 저염 DMEM은 KO-DMEM™(인비트로젠 Cat. No. 10829-018)으로 시판 중이다. 기본 배지는 전형적으로, 도너 세포로서 사용하기 위해 배양 하의 세포를 유지하는데 사용되는 경우에 당업계에 공지된 다수의 보충물로 보충된다. 이러한 보충물은 본 발명에서 "보충물" 또는 "+ 보충물"로 표시된다.

[0080] [표 1]

만능성 및/또는 전능성 세포를 유지하거나 배양하기 위한 DMEM 기본 배지		
성분	Mg/L	mM
글리신	30	0.4
L-아르기닌•HCl	84	0.398
L-시스틴•2HCl	63	0.201
L-글루타민	584	4
L-Histidine•HCl•H <sub>2</sub> O	42	0.2
L-아이소류신	105	0.802
L-류신	105	0.802
L-라이신•HCl	146	0.798
L-메티오닌	30	0.201
L-페닐알라닌	66	0.4
L-제린	42	0.4
L-트레오닌	95	0.798
L-트립토판	16	0.0784
L-타이로신 이나트륨염 이수화물	104	0.398
L-발린	94	0.803
염화콜린	4	0.0286
D-판토텐산칼슘	4	8.39 × 10 <sup>-3</sup>
풀산	4	9.07 × 10 <sup>-3</sup>
나이아신아미드	4	0.0328
파리독신•HCl	4	0.0196
리보플라빈	0.4	1.06 × 10 <sup>-3</sup>
티아민•HCl	4	0.0119
L-아이노시톨	7.2	0.04
염화칼슘 (CaCl <sub>2</sub> ) (무수)	200	1.8
질산제 2 철 (Fe(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·9H <sub>2</sub> O)	0.1	2.48 × 10 <sup>-4</sup>
황산마그네슘 (MgSO <sub>4</sub> ) (무수)	97.67	0.814
염화칼륨 (KCl)	400	5.33
D-글루코스 (덱스트로스)	4500	25
페놀 레드	15	0.0399
<b>DMEM 의 NaCl/NaHCO<sub>3</sub> 함량</b>		
중탄산나트륨 (NaHCO <sub>3</sub> )	3700	44.05
염화나트륨 (NaCl)	6400	110.34
<b>저염 DMEM 의 NaCl/NaHCO<sub>3</sub> 함량</b>		
중탄산나트륨 (NaHCO <sub>3</sub> )	<3700	<44.05
염화나트륨 (NaCl)	<6400	<110.34

[0081]

용어 "보충물" 또는 어구 "+ 보충물"은 배양 하의 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 성장시키거나 유지하기 위한, 예를 들어, 배양 하의 도너 세포의 만능성 또는 전능성을 유지하기 위한 기본 배지에 첨가되는 요소를 포함한다. 예를 들어, 배양 하의 만능성 및/또는 전능성 세포를 성장시키거나 유지하기에 적합한 배지 보충물은 소태아혈청(FBS), 글루타민, 항생물질, 페니실린 및 스트렙토마이신(예를 들어, 펜스트렙(penstrep)), 피루브산염(예를 들어, 피루브산나트륨), 비필수 아미노산(예를 들어, MEM NEAA), 2-메르캅토에탄올 및 백혈병 억제인자(LIF)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0083]

일 실시 형태에서, 기본 배지는 예를 들어, 배아로의 주입 및 대리모 마우스의 자궁 내 이식 후에 웅성 성결정 발생 프로그램에 기여하는 능력이 저하된 XY ES 세포 또는 XY iPS 세포를 포함하여, 배양 하의 만능성 세포를 유지하기에 적합한 하나 이상의 보충물을 포함한다.

[0084]

구체적인 실시 형태에서, 배양 하의 만능성 세포를 유지하기에 적합한 하나 이상의 보충물은 FBS(90 ml FBS/0.5 L 기본 배지), 글루타민(2.4 mmol/0.5 L 기본 배지), 피루브산나트륨(0.6 mmol/0.5 L 기본 배지), 비필수 아미노산(< 0.1 mmol/0.5 L 기본 배지), 2-메르캅토에탄올, LIF, 및 하나 이상의 항생물질이다.

[0085]

다른 실시 형태에서, 예를 들어, 대리모 마우스 배아로의 주입 및 자궁 내 도입 후에 웅성 성결정 발생 프로그

램에 기여하는 능력이 저하된 XY ES 세포 또는 XY iPS 세포를 포함하여, 배양 하의 만능성 세포를 유지하기 위한 배지는 하기 보충물이 첨가된 기본 배지 약 500 mL를 포함한다: 약 90 mL FBS(예를 들어, 하이클론(Hyclone) FBS Cat. No. SH30070.03), 약 2.4 mmol의 글루타민(예를 들어, 약 12 mL의 200 mM 글루타민 용액, 예를 들어, 인비트로젠 Cat. No. 25030-081, 페니실린:스트렙토마이신(예를 들어, 60,000 단위의 페니실린 G 나트륨 및 60 mg의 황산스트렙토마이신, 약 51 mg의 NaCl 함유; 예를 들어, 약 6 mL의 인비트로젠 펜스트렙, Cat. No. 15140-122), 약 0.6 mmol의 피루브산나트륨(예를 들어, 6 mL의 100 mM 피루브산나트륨, 인비트로젠 Cat. No. 1360-070), 약 0.06 mmol의 비필수 아미노산(예를 들어, 약 6 mL의 MEM NEAA, 예를 들어, 인비트로젠 Cat. No. 1 1 140-050의 MEM NEAA), 약 1.2 mL의 2-메르캅토에탄올, 및 약 1.2  $\mu$ g의 LIF (예를 들어, 약 120  $\mu$ L의 106 단위/mL LIF 제제; 예를 들어, 약 120  $\mu$ L의 밀리포어(Millipore) ESGRO™-LIF, Cat. No. ESG1 107). 생식능력이 있는 XY 암컷을 생산하기 위해 XY ES 또는 XY iPS 세포를 유지하기 위한 기본 배지를 구성할 때에, 전형적으로 거의 동일한 양의 동일한 보충물이 사용되나, 기본 배지의 조성은 (DMEM, 예를 들어 상기 표에 기재된 배지 와) 상이할 것이며, 그 차이(들)는 본 명세서에 교시된 차이(들)에 상당한다.

[0086] 일부 실시 형태에서, 보충물은 Wnt 조정 배지(conditioned media), 예를 들어, Wnt-3a 조정 배지를 포함한다.

[0087] 일 실시 형태에서, 예를 들어, 배아로의 주입 및 대리모 마우스의 자궁 내 이식 후에 웅성 성결정 발생 프로그램에 기여하는 능력이 저하된 XY ES 세포 또는 XY iPS 세포를 포함하여, 만능성 세포는 기본 배지 및 보충물을 포함하는 배지 중의 시험관내 배양물에 유지되며, 여기서 기본 배지는 하나 이상의 하기 특성을 나타낸다: (a) 삼투압 약 200 mOsm/kg 내지 약 329 mOsm/kg 미만; (b) 전도도 약 11 mS/cm 내지 약 13 mS/cm; (c) 알칼리 금속과 할로겐화물의 염의 농도 약 50 mM 내지 약 110 mM; (d) 탄산염의 농도 약 17 mM 내지 약 30 mM; (e) 알칼리 금속 할로겐화물 염과 탄산염의 총 농도 약 85 mM 내지 약 130 mM; 및/또는 (f) 이들 중 임의의 2개 이상의 조합. 다른 실시 형태에서, XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 WO2011/156723에 기재된 배지 중의 시험관내 배양물에 유지된다.

[0088] 일 실시 형태에서, 기본 배지는 저염 DMEM이다. 구체적인 실시 형태에서, 저염 DMEM은 NaCl 농도가 85 내지 130 mM이다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 저삼투압 DMEM이다. 구체적인 실시 형태에서, 저삼투압 DMEM은 삼투압이 250 내지 310 mOsm/kg이다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 저전도도 DMEM이다. 구체적인 실시 형태에서, 저전도도 DMEM은 전도도가 11 내지 13 mS/cm이다.

[0089] 다른 실시 형태에서, 기본 배지는 약 320, 310, 300, 290, 280, 275, 270, 260, 250 또는 240 mOsm/kg 이하의 삼투압을 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지, 또는 기본 배지 및 보충물을 포함하는 배지는 고작 약 240 내지 320, 250 내지 310, 275 내지 295, 또는 260 내지 300 mOsm/kg의 삼투압을 나타낸다. 구체적인 실시 형태에서, 기본 배지, 또는 기본 배지 및 보충물을 포함하는 배지는 약 270 mOsm/kg의 삼투압을 나타낸다.

[0090] 다른 실시 형태에서, 기본 배지는 약 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, 13.5, 또는 14.0 mS/cm 이하의 전도도를 나타낸다. 일 실시 형태에서, 기본 배지는 고작 약 10 내지 14 mS/cm 또는 11 내지 13 mS/cm의 전도도를 나타낸다. 구체적인 실시 형태에서, 기본 배지는 약 12 내지 13 mS/cm의 전도도를 나타낸다.

[0091] 구체적인 실시 형태에서, 기본 배지는 약 12 내지 13 mS/cm의 전도도 및 약 260 내지 300 mOsm/kg의 삼투압을 나타낸다. 다른 구체적인 실시 형태에서, 기본 배지는 약 90 mM NaCl 농도의 염화나트륨을 포함한다. 다른 구체적인 실시 형태에서, 염화나트륨의 농도는 약 70 내지 95 mM이다. 다른 구체적인 실시 형태에서, 기본 배지는 약 35 mM 미만의 농도의 중탄산나트륨을 포함한다. 다른 구체적인 실시 형태에서, 중탄산나트륨의 농도는 약 20 내지 30 mM이다.

[0092] 일 실시 형태에서, 기본 배지는 알칼리 금속과 할로겐화물의 염의 농도가 약 100 mM 이하를 나타낸다. 일 실시 형태에서, 알칼리 금속과 할로겐화물의 염은 NaCl이다. 일 실시 형태에서, 알칼리 금속과 할로겐화물의 염의 농도는 90, 80, 70, 60 또는 50 mM 이하이다. 일 실시 형태에서, 기본 배지 중의 알칼리 금속과 할로겐화물의 염의 농도는 약 60 내지 105, 70 내지 95, 또는 80 내지 90 mM이다. 구체적인 실시 형태에서, 상기 농도는 약 85 mM이다.

[0093] 일 실시 형태에서, 기본 배지는 탄산염의 농도를 나타낸다. 일 실시 형태에서, 탄산염은 나트륨염이다. 일 실시 형태에서, 나트륨염은 중탄산나트륨이다. 일 실시 형태에서, 기본 배지 중의 탄산염의 농도는 40, 35, 30, 25, 또는 20 mM 이하이다. 일 실시 형태에서, 기본 배지 중의 탄산염의 농도는 약 10 내지 40 mM이고, 또 하나의 실시 형태에서는 약 20 내지 30 mM이다. 구체적인 실시 형태에서, 상기 농도는 약 25 또는 26 mM이다. 또 다른 실시 형태에서, 중탄산나트륨 농도는 약 26 mM, 약 18 mM, 약 18 mM 내지 약 26 mM, 또는 약 18 mM 내지

약 44 mM이다.

- [0094] 일 실시 형태에서, 기본 배지 중의, 알칼리 금속과 할로겐화물의 염과 탄산염의 농도의 합계는 140, 130, 120, 110, 100, 90, 또는 80 mM 이하이다. 일 실시 형태에서, 기본 배지 중의, 알칼리 금속과 할로겐화물의 염과 탄산염의 농도의 합계는 약 80 내지 140, 85 내지 130, 90 내지 120, 95 내지 120, 또는 100 내지 120 mM이다. 구체적인 실시 형태에서, 기본 배지 중의, 알칼리 금속과 할로겐화물의 염과 탄산염의 농도의 합계는 약 115 mM이다.
- [0095] 일 실시 형태에서, 알칼리 금속과 할로겐화물의 염과 탄산염의 몰비는 2.5보다 크다. 일 실시 형태에서, 상기 몰비는 약 2.6 내지 4.0, 2.8 내지 3.8, 3 내지 3.6, 또는 3.2 내지 3.4이다. 일 실시 형태에서, 상기 몰비는 3.3 내지 3.5이다. 구체적인 실시 형태에서, 상기 몰비는 3.4이다.
- [0096] 일 실시 형태에서, 기본 배지는 삼투압 약 250 내지 310 mOsm/kg 및 알칼리 금속과 할로겐화물의 염의 농도 약 60 내지 105 mM을 나타낸다. 추가의 실시 형태에서, 기본 배지는 탄산염의 농도가 약 20 내지 30 mM이다. 추가의 실시 형태에서, 알칼리 금속과 할로겐화물의 염과 탄산염의 농도의 합계는 약 80 내지 140 mM이다. 추가의 실시 형태에서, 기본 배지의 전도도는 약 12 내지 13 mS/cm이다.
- [0097] 일 실시 형태에서, 기본 배지는 약 50 ± 5 mM NaCl 및 약 26 ± 5 mM 탄산염을 포함하며, 삼투압이 약 218 ± 22 mOsm/kg이다. 구체적인 실시 형태에서, 기본 배지는 약 3 mg/mL NaCl 및 2.2 mg/mL 중탄산나트륨을 포함하며, 삼투압이 약 218 mOsm/kg이다.
- [0098] 또 하나의 실시 형태에서, 기본 배지는 약 87 ± 5 mM NaCl 및 약 18 ± 5 mM을 포함하며, 삼투압이 약 261 ± 26 mOsm/kg이다. 구체적인 실시 형태에서, 기본 배지는 약 5.1 mg/mL NaCl 및 약 1.5 mg/mL 중탄산나트륨을 포함하며, 삼투압이 약 261 mOsm/kg이다.
- [0099] 또 하나의 실시 형태에서, 기본 배지는 약 110 ± 5 mM NaCl 및 약 18 ± 5 mM 탄산염을 포함하며, 삼투압이 약 294 ± 29 mOsm/kg이다. 구체적인 실시 형태에서, 기본 배지는 약 6.4 mg/mL NaCl 및 약 1.5 mg/mL 중탄산나트륨을 포함하며, 삼투압이 약 294 mOsm/kg이다.
- [0100] 또 하나의 실시 형태에서, 기본 배지는 약 87 ± 5 mM NaCl 및 약 26 ± 5 mM 탄산염을 나타내며, 삼투압이 약 270 ± 27 mOsm/kg이다. 구체적인 실시 형태에서, 기본 배지는 약 5.1 mg/mL NaCl 및 2.2 mg/mL 중탄산나트륨을 나타내며, 삼투압이 약 270 mOsm/kg이다.
- [0101] 또 하나의 실시 형태에서, 기본 배지는 약 87 ± 5 mM NaCl, 약 26 ± 5 mM 탄산염 및 약 86 ± 5 mM 글루코스를 포함하며, 삼투압이 약 322 ± 32 mOsm/kg이다. 구체적인 실시 형태에서, 기본 배지는 약 5.1 mg/mL NaCl, 약 2.2 mg/mL 중탄산나트륨 및 약 15.5 mg/mL 글루코스를 포함하며, 삼투압이 약 322 mOsm/kg이다.
- [0102] 본 명세서에 개시된 다양한 방법 및 조성물에 사용될 수 있는 추가의 기본 배지로는 50 ± 5 mM NaCl 및 26 ± 5 mM 탄산염을 포함하며, 삼투압이 218 ± 22 mOsm/kg인 기본 배지를 들 수 있다. 특정한 실시 형태에서, 기본 배지는 약 3 mg/mL NaCl 및 2.2 mg/mL 중탄산나트륨을 포함하며, 삼투압이 약 218 mOsm/kg이다.
- [0103] 다른 실시 형태에서, 기본 배지는 50 ± 5 mM NaCl 및 26 ± 5 mM 탄산염을 포함하며, 삼투압이 218 ± 22 mOsm/kg이다. 구체적인 실시 형태에서, 기본 배지는 약 3 mg/mL NaCl 및 2.2 mg/mL 중탄산나트륨을 포함하며, 삼투압이 약 218 mOsm/kg이다.
- [0104] 다른 실시 형태에서, 약 44 mM, 26 mM 또는 18 mM을 비롯한 본 명세서에 개시된 NaHCO<sub>3</sub> 농도를 갖는 고 글루코스 DMEM 배지(LifeTech)는 0.1 mM 비필수 아미노산, 1 mM 피루브산나트륨, 0.1 mM 2-메르캅토에탄올, 2 mM L-글루타민, 50 µg/ml 각각 페니실린 및 스트렙토마이신(LifeTech), 15% FBS(하이클론), 및 2000 U/ml LIF(밀리포어)가 보충되었다.
- [0105] **C. 표적화된 유전자 변형을 일으키기 위한 방법**
- [0106] Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 표적화된 유전자 변형을 일으키기 위한 다양한 방법이 사용될 수 있다. 예를 들어, 어떤 경우에는, 표적화된 유전자 변형은 상동 재조합 이벤트를 통해 표적화된 유전자 변형을 일으킬 시스템을 사용한다. 다른 경우에는, 동물 세포는 표적화된 게놈 위치에서 단일 또는 이중 가닥 절단을 일으키는 뉴클레아제 제제를 사용하여 변형될 수 있다. 그 다음에 단일 또는 이중 가닥 절단은 비상동 말단 결합 경로(NHEJ)에 의해 수복된다. 이러한 시스템은 예를 들어, 표적화된 기능 상실 유전자 변형을 일으키는데 있어서의 용도가 발견된다. 예를 들어, 표적화 플라스미드, 작은 표적화 벡터(small TVEC) 또는 큰 표적화 벡터

의 사용을 비롯하여, 이러한 표적화된 유전자 변형을 일으키기 위한 비제한적인 방법은 본 명세서의 다른 곳에서 상세히 논의된다. 또한 각각, 본 명세서에 참조로 포함되는, 문헌[Wang *et al.* (2013) *Cell* 153:910-918, Mandalos *et al.* (2012) *PLOS ONE* 7:e45768:1-9] 및 문헌[Wang *et al.* (2013) *Nat Biotechnol.* 31:530-532]을 참조한다.

[0107] 구체적인 실시 형태에서, *Sry* 유전자의 표적화된 유전자 변형 및/또는 대상으로 하는 다른 폴리뉴클레오티드의 표적화된 유전자 변형은 만능성 세포(즉, ES 세포)가 본 명세서에 기재된 배지(예를 들어, XY F0 생식능력이 있는 암컷의 발생을 촉진시키는 배지)에서 유지되는 동안에 일어날 수 있는 것으로 확인된다. 대안적으로, *Sry* 유전자 및/또는 대상으로 하는 다른 폴리뉴클레오티드의 표적화된 유전자 변형은 만능성 세포(즉, ES 세포)가 상이한 배지에 유지되고, 이어서 본 명세서에 개시된 배지(예를 들어, XY F0 생식능력이 있는 암컷의 발생을 촉진시키는 배지)로 옮겨지는 동안에 일어날 수 있다.

#### D. 배양 하의 만능성 세포를 배양 및 유지하는 방법

[0109] XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 시험관내 배양물에서 유지하거나 배양하는 방법이 제공되며, 여기서 상기 세포는 *Sry* 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 포함하고, 상기 세포는 본 명세서에 기재된 조건 하에 시험관내 배양물에 유지된다. XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 시험관내 배양물에서 유지하거나 배양하는 이러한 방법은 비인간 동물 XY ES 세포를 숙주 배아에 도입하여, 숙주 배아의 임신 후에 XY F0 생식능력이 있는 암컷 동물수의 증가를 촉진시키는 것이다.

[0110] 본 명세서에 개시된 배지가 이러한 유지 또는 배양 방법에 사용될 수 있지만, 비제한적인 일례로는 배양 하의 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 유지하거나 배양하기에 적합한 기본 배지 및 보충물을 포함하는 배지에 배양하는 것을 포함하며, 여기서 기본 배지, 또는 기본 배지 및 보충물을 포함하는 배지는 약 200 mOsm/kg 내지 약 329 mOsm/kg 미만의 삼투압을 나타낸다.

[0111] 일부 실시 형태에서, 기본 배지, 또는 기본 배지 및 보충물을 포함하는 배지는 하나 이상의 하기 특성을 나타낸다: 전도도 약 11 mS/cm 내지 약 13 mS/cm; 알칼리 금속과 할로겐화물의 염의 농도 약 50 mM 내지 약 110 mM; 탄산염의 농도 약 17 mM 내지 약 30 mM; 알칼리 금속 할로겐화물 염과 탄산염의 총 농도 약 85 mM 내지 약 130 mM; 및/또는 이를 중 임의의 2개 이상의 조합.

[0112] 일 실시 형태에서, 상기 방법은 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 기본 배지 및 보충물을 포함하는 적합한 배지에 유지하거나 배양하는 것을 포함하며, 여기서 기본 배지, 또는 기본 배지 및 보충물을 포함하는 배지는 삼투압 약 240 내지 320 mOsm/kg, 전도도 약 10 내지 14 mS/cm, 알칼리 금속 할로겐화물 염의 농도 약 50 내지 105 mM, 탄산염의 농도 10 내지 40 mM, 및/또는 배합된 알칼리 금속염과 탄산염의 농도 약 80 내지 140 mM을 포함한다. 일 실시 형태에서, XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 숙주 배아로 도입되기 전에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13일간, 또는 2주간, 3주간 또는 4주간 배지(ES 세포를 유지하기 위한 보충물 포함)에 유지된다. 구체적인 실시 형태에서, XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 숙주 배아로 도입되기 전에 약 2 내지 4주간 배지(ES 세포를 유지하기 위한 보충물이 포함된 저염 기본 배지)에 유지된다.

[0113] 또 하나의 실시 형태에서, XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 도너 세포의 숙주 배아로의 도입 전에 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12일간, 2주간, 3주간, 또는 4주간 저염 기본 배지가 포함된 배지에 유지된다. 구체적인 실시 형태에서, XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 세포의 숙주 배아로의 도입 전에 적어도 2 내지 4주간 저염 기본 배지가 포함된 배지에 유지된다.

[0114] 또 하나의 실시 형태에서, XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 XY 생식능력이 있는 F0 암컷을 촉진시키는 배지에 유지되며(예를 들어, 동결보존됨), 도너 세포는 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)의 숙주 배아로의 도입 전에 적어도 1, 2, 3, 4일간 또는 그 이상 동안 XY 생식능력이 있는 F0 암컷을 촉진시키는 배지에 해동되어 유지된다. 구체적인 실시 형태에서, XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 XY 생식능력이 있는 F0 암컷을 촉진시키는 배지에 적어도 1회 통과되고, 상기 세포는 XY 생식능력이 있는 F0 암컷을 촉진시키는 배지에 동결보존되며, 세포는 XY 생식능력이 있는 F0 암컷을 촉진시키는 배지에 해동되어, 숙주 배아로의 도입 전에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13일간, 2주간, 3주간, 4주간 또는 그 이상 동안 성장된다.

- [0115] 또 다른 실시 형태에서, XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 숙주 배아로의 도입 전에 1일간, 2일간, 3일간 또는 4일간 XY 생식능력이 있는 F0 암컷을 촉진시키는 배지에 유지된다. 일 실시 형태에서, XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 3일간 XY 생식능력이 있는 F0 암컷을 촉진시키는 배지에 유지된다.
- [0116] 일 실시 형태에서, XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 숙주 배아로의 도입 전에 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12일간, 2주간, 3주간, 4주간 또는 그 이상 동안 XY 생식능력이 있는 F0 암컷을 촉진시키는 배지에 유지된다. 구체적인 실시 형태에서, 도너 세포는 숙주 배아로의 도입 전에 적어도 1주간 XY 생식능력이 있는 F0 암컷을 촉진시키는 배지에 유지된다. 구체적인 실시 형태에서, XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 숙주 배아로의 도입 전에 2 내지 4주간 XY 생식능력이 있는 F0 암컷을 촉진시키는 배지에 유지된다.
- [0117] 따라서, 배양 하의 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 유지하거나 배양하는 방법이 제공되며, 여기서 세포는 XY 세포의 숙주 배아로의 도입 후 및 적절한 암컷 숙주에서의 임신 후에 암컷 XY 동물의 발생을 촉진시키거나 용이하게 하는 조건 하에 유지된다.
- [0118] 한 측면에서, 본 명세서에 기재된 조건 하에, 배양 하의 도너 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 유지하거나 배양하는 방법이 제공되며, 여기서 도너 XY ES 세포를 숙주 배아로 도입하여 F0 배아를 생산하고, F0 배아를 적절한 동물에 임신시킨 후에, F0 배아는 XY가 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상이고, 성숙기에 이를 때에 생식능력이 있는 암컷인 F0 동물로 성장된다.
- [0119] E. 표적화된 유전자 변형을 갖는 F0 배아 및 F1 자손의 생산
- [0120] 본 명세서에 제공되는, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하된 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 사용하는 다양한 방법 및 조성물은 유전자 변형 동물을 생산하는데 사용될 수 있다. 유전자 변형을 도입하기 위한 다양한 방법이 본 명세서의 다른 곳에서 상세히 논의된다.
- [0121] i. F0 세대의 생식능력이 있는 암컷 XY 비인간 동물의 생산 방법
- [0122] F0 세대의 생식능력이 있는 암컷 XY 비인간 동물의 생산 방법이 제공된다. 이러한 방법은 (a) Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 도너 비인간 동물 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 XY 생식능력이 있는 암컷 ES 세포의 발생을 촉진시키는 배지에서 유지하거나 배양하는 단계; (b) 도너 XY 비인간 동물 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 숙주 배아로 도입하는 단계; (c) 숙주 배아를 임신시키는 단계; 및 (d) F0 XY 암컷 비인간 동물을 얻는 단계 - 여기서, 성숙기에 이를 때에, F0 XY 암컷 비인간 동물은 생식능력을 나타냄 - 를 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 도너 비인간 동물 XY 도너 세포는 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 적어도 하나의 추가의 표적화된 유전자 변형을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 본 명세서의 다른 곳에서 상세히 논의된다.
- [0123] Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 XY ES 세포는 저염 배지없이 유지될 수 있으며, XY 생식능력이 있는 암컷으로 성장할 수 있다.
- [0124] 일부 실시 형태에서, XY 생식능력이 있는 F0 암컷 동물의 발생을 촉진시키는 배지는 배양 하의 비인간 포유류 ES 세포를 유지하거나 배양하기에 적합한 기본 배지 및 보충물을 포함하는 저염 기본 배지를 포함할 수 있으며, 여기서 저염 기본 배지는 하기 중 하나 이상을 포함하는 특성을 나타낸다: 삼투압 약 200 mOsm/kg 내지 약 329 mOsm/kg 미만; 전도도 약 11 mS/cm 내지 약 13 mS/cm; 알칼리 금속과 할로겐화물의 염의 농도 약 50 mM 내지 약 110 mM; 탄산염의 농도 약 17 mM 내지 약 30 mM; 알칼리 금속 할로겐화물 염과 탄산염의 총 농도 약 85 mM 내지 약 130 mM; 및/또는 이들 중 임의의 2개 이상의 조합.
- [0125] 다른 실시 형태에서, F0 세대의 생식능력이 있는 암컷 XY 비인간 동물을 생산하기 위한 이러한 방법은 (a) 50 ± 5 mM NaCl, 26 ± 5 mM 탄산염, 및 218 ± 22 mOsm/kg을 포함하는 기본 배지; (b) 약 3 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중탄산나트륨, 및 218 mOsm/kg을 포함하는 기본 배지; (c) 87 ± 5 mM NaCl, 18 ± 5 mM 탄산염, 및 261 ± 26 mOsm/kg을 포함하는 기본 배지; (d) 약 5.1 mg/mL NaCl, 1.5 mg/mL 중탄산나트륨, 및 261 mOsm/kg을 포함하는 기본 배지; (e) 110 ± 5 mM NaCl, 18 ± 5 mM 탄산염, 및 294 ± 29 mOsm/kg을 포함하는 기본 배지; (f) 약 6.4 mg/mL NaCl, 1.5 mg/mL 중탄산나트륨, 및 294 mOsm/kg을 포함하는 기본 배지; (g) 87 ± 5 mM NaCl, 26 ± 5 mM 탄산염, 및 270 ± 27 mOsm/kg을 포함하는 기본 배지; (h) 약 5.1 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중

탄산나트륨, 및 270 mOsm/kg을 포함하는 기본 배지; (i) 87 ± 5 mM NaCl, 26 ± 5 mM 탄산염, 86 ± 5 mM 글루코스, 및 322 ± 32 mOsm/kg을 포함하는 기본 배지; 및/또는 (j) 약 5.1 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중탄산나트륨, 15.5 mg/mL 글루코스, 및 322 mOsm/kg을 포함하는 기본 배지를 포함하나, 이에 한정되지 않는 본 명세서에 개시된 배지를 사용하여 행해질 수 있다.

[0126] Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖고, XY F0 생식능력이 있는 암컷의 발생을 촉진시키는 배지에서 배양된 유전자 변형 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 숙주 배아에 이식될 수 있다. 숙주 배아에 이식된 세포는 본 명세서에서 "도너 세포"로 명명된다. 구체적인 실시 형태에서, 유전자 변형 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 숙주 배아와 동일한 균주로부터 유래하거나, 숙주 배아와 상이한 균주로부터 유래한다. 마찬가지로, 대리모는 유전자 변형 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포) 및/또는 숙주 배아와 동일한 균주로부터 유래할 수 있거나, 대리모는 유전자 변형 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포) 및/또는 숙주 배아와 상이한 균주로부터 유래할 수 있다. 일 실시 형태에서, XY 도너 세포는 XX 숙주 배아에 이식된다.

[0127] 다양한 숙주 배아는 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 일부 실시 형태에서, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 표적화된 유전자 변형을 갖는 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 대응하는 유기체 유래의 상실기 이전(pre-morula) 단계의 배아, 예를 들어 8세포기 배아로 도입된다. 예를 들어, 모두 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 US 7,576,259, US 7,659,442, US 7,294,754, 및 US 2008-0078000 A1을 참조한다. 다른 실시 형태에서, 도너 ES 세포는 2세포기, 4세포기, 8세포기, 16세포기, 32세포기, 또는 64세포기 숙주 배아 시기의 숙주 배아에 이식될 수 있다. 또 하나의 실시 형태에서, 숙주 배아는 배반포이다. 일 실시 형태에서, 숙주 배아는 배반포 이전(pre-blastocyst) 단계의 배아, 상실기 이전 단계, 상실기, 비응축(uncompacted) 상실기, 및 응축(compacted) 상실기로부터 선택되는 단계의 것이다. 일 실시 형태에서, 마우스 배아를 사용하는 경우, 숙주 배아 단계는 문헌[Theiler (1989) "The House Mouse: Atlas of Mouse Development", Springer-Verlag, New York]에 기재된 TS(Theiler Stage)에 준거하여, TS1, TS2, TS3, TS4, TS5 및 TS6로부터 선택된다. 구체적인 실시 형태에서, TS는 TS1, TS2, TS3, 및 TS4로부터 선택된다. 일 실시 형태에서, 숙주 배아는 투명대를 포함하며, 도너 세포는 투명대의 구멍을 통해 숙주 배아로 도입되는 XY ES 세포인 반면에, 다른 실시 형태에서, 숙주 배아는 투명대가 없는 배아이다. 또 다른 구체적인 실시 형태에서, 상실기 숙주 배아가 접합된다.

[0128] 핵이식 기술도 유전자 변형 동물을 생산하는데 사용될 수 있다. 간략하게, 핵이식 방법은 (1) 난모세포를 제핵(enucleation)하는 단계; (2) 제핵된 난모세포와 결합할 도너 세포 또는 핵을 단리하는 단계; (3) 상기 세포 또는 핵을 제핵된 난모세포에 삽입하여, 재구성 세포를 형성하는 단계; (4) 재구성 세포를 동물의 자궁에 이식하여 배아를 생성하는 단계; 및 (5) 배아를 성장시키는 단계를 포함한다. 이러한 방법에서, 난모세포는 살아있는 동물의 난관 및/또는 난소로부터도 단리될 수 있지만, 일반적으로 사망한 동물로부터 회수된다. 난모세포는 제핵 전에 당업자에게 공지된 다양한 배지에서 성숙될 수 있다. 난모세포의 제핵은 당해 기술 분야의 숙련가에게 공지된 다수의 방법으로 행해질 수 있다. 도너 세포 또는 핵을 제핵된 난모세포로 삽입하여, 재구성 세포를 형성하는 것은 통상 융합 전에 투명대 하에서의 도너 세포의 미량주입에 의해서이다. 융합은 접촉/융합면(전기 융합)에 걸쳐서 DC 전기 펄스를 인가함으로써, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 융합 촉진 화학 물질에 세포를 노출시킴으로써, 또는 센다이 바이러스와 같은 불활성화 바이러스에 의해 유도될 수 있다. 재구성 세포는 전형적으로 핵 공여자 및 수용자 난모세포의 융합 전에, 융합 중에 및/또는 융합 후에 전기적 및/또는 비전기적 수단에 의해 활성화된다. 활성화 방법에는 전기 펄스, 화학적으로 유도된 충격, 정자 진입, 난모세포의 2가 양이온 레벨 증가, 난모세포의 세포 단백질(키나아제 저해제를 통한)의 인산화 감소가 포함된다. 활성화된 재구성 세포 또는 배아는 전형적으로 당업자에게 주지된 배지에서 배양된 다음에, 동물의 자궁에 이식된다. 예를 들어, 각각 본 명세서에 참조로 포함되는 US20080092249, WO/1999/005266A2, US20040177390, WO/2008/017234A1 및 미국 특허 제7,612,250호를 참조한다.

[0129] Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성이 저하된 유전자 변형 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 포함하는 숙주 배아는 포배기까지 배양된 다음에, 대리모에 이식되어, F0 동물이 생산된다. 유전자 변형 게놈 유전자좌를 갖는 동물은 본 명세서에 기재된 대립유전자의 변형(MOA)을 통해 동정될 수 있다.

[0130] 일 실시 형태에서, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성이 저하된 유전자 변형 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 포함하는 숙주 배아는 적절한 숙주에 이식되기 전에 1, 2, 3 또는 4일 이상 동안 XY 생식능력이 있는 암컷 ES 세포의 발생을 촉진시키는 배지(예를 들어, 저염 기본 배지)에 유지된다. 이러한

한 방법은 F0 생식능력이 있는 암컷 동물의 생산을 촉진시키기 위해 제공된다.

[0131] 일 실시 형태에서, 배양된 숙주 배아는 대리모에 이식되고, 배양된 숙주 배아는 대리모에 임신시킨다.

[0132] 구체적인 실시 형태에서, 비인간 동물 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 숙주 배아에 도입하여, 숙주 배아의 임신 후에, F0 비인간 동물 중 적어도 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%는 XY 암컷으로, 성숙기에 이를 때에 F0 XY 암컷 비인간 포유류가 생식능력을 나타낸다.

[0133] 또한, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 표적화된 유전자 변형을 갖는 XY ES 세포 또는 XY iPS 세포를 포함하는 적어도 하나의 이종 줄기 세포를 갖는 내세포괴(inner cell mass)를 포함하는 F0 배아가 제공된다.

[0134] F0 세대의 생식능력이 있는 암컷 XY 비인간 동물을 생산하기 위한 본 명세서에 기재된 다양한 방법은 (1) Sry 폴리펩티드의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 유전자 변형; 및 구체적인 실시 형태에서, (2) 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 추가의 표적화된 유전자 변형을 갖는 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 사용할 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에서 요약된 바와 같이, 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 추가의 표적화된 유전자 변형은 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)에 일어날 수 있다. 이러한 경우에는, F0 생식능력이 있는 암컷 XY 비인간 동물은 하나 이상의 이러한 추가의 표적화된 유전자 변형을 포함할 수 있다.

[0135] 다른 실시 형태에서, F0 생식능력이 있는 암컷 XY 비인간 동물은 그의 일생 동안 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9회의 한배새끼(litter)를 생산한다. 일 실시 형태에서, F0 생식능력이 있는 암컷 XY 비인간 동물은 한배 당 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10마리의 자손을 생산한다. 일 실시 형태에서, F0 생식능력이 있는 암컷 XY 비인간 동물은 한배 당 약 4 내지 6마리의 자손을 생산한다. 일 실시 형태에서, F0 생식능력이 있는 암컷 XY 비인간 동물은 2 내지 6마리의 한배새끼를 생산하며, 여기서 각각의 한배새끼수는 적어도 2, 3, 4, 5 또는 6마리의 자손을 갖는다. 일 실시 형태에서, 자손 중 적어도 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%는 XY 생식능력이 있는 암컷 자손이다.

[0136] 설치류 한배새끼(즉, 마우스 또는 래트 한배새끼)를 생산하는 방법이 또한 제공되며, 본 명세서에 기재된 방법에 따라 제조된 Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성이 저하된 XY 만능성 및/또는 전능성 도너 세포(즉, XY 도너 ES 세포 또는 XY 도너 iPS 세포)를 숙주 배아에 도입하는 단계, 상기 배아를 적절한 대리모에 임신시키는 단계, 및 성숙기에 이르면, 생식능력이 있는 XY 암컷 설치류가 되는 적어도 하나의 XY 암컷 설치류를 포함하는 F0 자손을 얻는 단계를 포함한다. 일 실시 형태에서, 태어난 F0 XY 암컷 설치류 중, 성숙기에 이르면 생식능력을 나타내는 비율은 약 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95% 또는 100%이다.

[0137] 다른 실시 형태에서, 이러한 방법으로 생산된 F0 자손은 약 3%, 약 10% 이상, 또는 약 63% 이상이 유전자 변형 도너 XY 세포로부터 유래한다.

[0138] 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물에 의해, 적어도 1%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% 또는 그 이상의 F0 동물이 표적화된 유전자 변형(즉, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성 저하 및/또는 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 유전자 변형)을 갖게 되므로, 상기 유전자 변형을 F1 자손에게 전달할 수 있다.

[0139] 일 실시 형태에서, F0 세대 암컷 XY 비인간 동물 및/또는 수컷 XY 비인간 동물은 적어도 90%, 92%, 94%, 96%, 98%, 99% 또는 99.8%가 도너 세포로부터 유래한다. 일 실시 형태에서, F0 암컷 XY 비인간 동물 및/또는 F0 수컷 XY 비인간 동물은 털 색깔이 100% 도너 세포로부터 유래한다.

[0140] 일 실시 형태에서, F0 세대의 비인간 암컷 XY 동물은 설치류(즉, 마우스 또는 래트)이며, 털 색깔이 100% 도너 세포로부터 유래한다. 일 실시 형태에서, F0 세대로 생산된 비인간 암컷 XY 비인간 동물은 적어도 90%, 92%, 94%, 96%, 98% 또는 99.8%가 XY 도너 세포로부터 유래한다. 일 실시 형태에서, F0 세대의 비인간 암컷 XY 동물은 약 100%가 도너 세포로부터 유래한다. 일 실시 형태에서, F0 세대의 비인간 암컷 XY 동물에 대한 숙주 배아 세포의 기여는 1/2,000(0.05%)개의 세포를 검출할 수 있는 정량 분석에 의해 결정되고, 암컷 XY 동물 조직은 숙주 배아 세포에 대하여 플러스로 기여하지 않는다.

[0141] *ii. 암컷 생식능력이 있는 XY F0 세대를 번식시키는 다양한 방법*

[0142] 구체적인 실시 형태에서, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 유전자 변형을 갖는 XY 만능성 및/또는

전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)로부터 유래한 얻어진 암컷 생식능력이 있는 XY F0 세대는 어느 한 동물과 교배하여, F1 세대 자손을 얻는다. 구체적인 실시 형태에서, 암컷 생식능력이 있는 XY F0는 야생형 동물과 교배한다. 일 실시 형태에서, 암컷 XY F0 비인간 포유류는 야생형 마우스와 교배하는 경우에 생식능력을 나타낸다. 구체적인 실시 형태에서, 야생형 마우스는 C57BL/6이다. F1 자손은 Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성 저하를 포함하는 표적화된 유전자 변형이 존재하는지를 측정하는 특정 프라이머 및/또는 프로브를 사용하여 유전자형 결정(genotyping)이 행해질 수 있다. 게다가, 추가의 표적화된 유전자 변형이 F0 세대에 존재하는 경우, F1 자손은 이러한 변형이 존재하는지를 측정하는 특정 프라이머 및/또는 프로브를 사용하여 유전자형 결정이 행해질 수 있다. 그 다음에 원하는 용도에 적합한 F1 자손이 동정될 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성이 저하된 유전자 변형을 갖지 않는 F1 자손이 선택된다. 다른 실시 형태에서, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성이 저하된 유전자 변형을 갖지 않고, 적어도 하나의 추가의 표적화된 유전자 변형을 포함하는 F1 자손이 선택된다.

[0143] 하나의 비제한적인 예에서, 특정 프라이머 및/또는 프로브를 사용하여 유전자형 결정 후에, 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 유전자 변형에 대하여 이형접합성이고, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 표적화된 변형을 갖지 않는 F1 동물은 서로 교배된다. 이러한 교배는 대상으로 하는 유전자 변형 계놈 유전자 좌에 대하여 동형접합성이고, Sry 단백질 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 유전자 변형을 포함하지 않는 F2 자손을 생산한다.

[0144] 또한, F1 세대의 표적화된 유전자 변형에 대하여 동형접합성인 트랜스제닉 비인간 동물을 생산하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 (a) Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 표적화된 유전자 변형을 갖는 F0 XY 생식능력이 있는 암컷 비인간 동물을 F0 XY 수컷 비인간 동물과 교배시키는 단계 - 여기서, F0 XY 생식능력이 있는 암컷 비인간 동물 및 F0 XY 수컷 비인간 동물은 각각, 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 동일한 유전자 변형에 대하여 이형접합성임 -, 및 (b) 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 유전자 변형에 대하여 동형접합성인 F1 자손을 얻는 단계를 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 선택된 F1 자손은 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 유전자 변형에 대하여 동형접합성이고, Sry 단백질의 활성 및/또는 레벨을 저하시키는 표적화된 유전자 변형을 갖지 않는다. 이러한 방법은 각각, 동일한 F0 세대의 도너 ES 세포 또는 iPS 세포로부터 완전히 유래한 비인간 동물의 자웅(breeding pair)을 발생시키는데 사용될 수 있다.

[0145] 상술한 F0 동물을 얻기 위해 다양한 방법이 사용될 수 있다. 하나의 비제한적인 실시 형태에서, 임의의 염색체상의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 변형을 갖는 XY 세포 클론이 단리된다. 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 변형을 일으키는데 다양한 방법이 사용될 수 있는 것으로 인식된다. 제2 단계에서, 표적화된 변형은 Sry 유전자에 도입되어, 상기 변형에 의해 Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성이 저하된다. 이러한 방법은 본 명세서의 다른 곳에서 상세히 기술된 바와 같이, XY F0 생식능력이 있는 암컷의 발생을 촉진시키는 배지에서 XY ES 세포를 배양하는 것을 추가로 이용할 것이다. Sry 유전자의 표적화된 변형 방법은 본 명세서의 다른 곳에서 상세히 개시되어 있으며, 예를 들어 본 명세서의 다른 곳에서 기술된 바와 같이 단독으로 또는 뉴클레아제와 조합하여 표적화 벡터(LTVEC 포함)의 사용을 포함할 수 있다(즉, Talen 또는 CRISPR- 또는 ZFN 시스템). 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 제1 표적화된 변형 및 Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 감소시키는 Sry 유전자의 제2 표적화된 변형을 포함하는 서브 클론이 단리된다. 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 변형을 갖는 원래의 XY 클론, 및 Sry 유전자 및 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 변형을 포함하는 XY 서브 클론은 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 별개의 비인간 숙주 배아로 도입된다. 구체적인 실시 형태에서, 비인간 숙주 배아는 상실기 이전 단계의 배아(즉, 8세포기 배아)를 포함한다. 변형된 만능성 세포를 포함하는 각각의 비인간 숙주 배아는 임신을 위해 대리모로 도입된다. 각각의 대리모는 표적화된 게놈 변형을 포함하는 F0 자손(즉, 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 변형을 갖는 F0 XY 수컷, 및 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 변형 및 Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 유전자 변형을 갖는 F0 XY 생식능력이 있는 암컷)을 생산한다. 구체적인 실시 형태에서, 각각의 표적화된 게놈 변형은 생식세포계열을 통해 전달될 수 있다. 이를 각각의 F0 동물은 서로 번식하여, 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 동형접합성 표적화된 변형을 포함하는 F1 동물을 생산한다. F1 세대의 4분의 1은 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 변형에 대하여 동형접합성일 것으로 추정된다. F1 자손은 Sry 유전자의 표적화된 변형을 보유하도록 선택될 수 있거나, F1 자손은 Sry 유전자의 표적화된 변형을 보유하지 않도록 선택될 수 있다.

[0146] 또 하나의 실시 형태에서, 표적화 벡터(및 구체적인 실시 형태에서, 뉴클레아제, 예컨대 Talen, Crispr 또는 Zfn)를 사용하는 Sry 유전자의 표적화된 변형의 도입은 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 유전자 변형에 대한 벡터 표적화와 동시에 일어날 수 있다. 이러한 방법은 Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 유전자

변형을 갖고, 추가로 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 변형을 포함하는 XY ES 세포의 생산을 가능하게 한다.

[0147] 일 실시 형태에서, F1 세대 자손은 완전히 도너 ES 세포로부터 유래한 게놈을 포함한다. 다른 실시 형태에서, 완전히 ES 세포로부터 유래한 마우스를 생산하는 F0 세대 수컷 마우스와 F0 세대 암컷 마우스의 교배 빈도는 100%이다.

[0148] II. Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챌린징(challenging) 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 방법 및 조성물

[0149] 세포의 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 변형시킬 수 있는 방법 및 조성물이 제공된다. 또한, "챌린징" 게놈 유전자좌를 변형시킬 수 있는 방법이 제공된다. 용어 "챌린징 유전자좌"는 통상적인 유전자 표적법에 의해 표적화하기 어려운 염색체 영역을 포함한다. 이러한 유전자좌는 Y 염색체, X 염색체 또는 상염색체에 위치할 수 있다. 특정한 실시 형태에서, 챌린징 유전자좌는 유전자 결핍된, 반복체(repeat)가 풍부한 및/또는 주로 이질 염색질의 염색체 영역 내에 위치하거나 이에 근접하여 위치한다. 예를 들어, 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Bernardini *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:7600-7605 (2014)]을 참조한다. 특정한 실시 형태에서, 챌린징 유전자좌는 염색체 DNA의 접근성이 염색질 구조에 의해 제한되는 염색체 영역 내에 위치하거나 이에 근접하여 위치한다. 특정한 실시 형태에서, 챌린징 유전자좌는 고 비율의 이질 염색질, 예컨대 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 또는 적어도 약 70%의 이질 염색질을 특징으로 하는 염색체 영역 내에 위치하거나 이에 근접하여 위치한다. 특정한 실시 형태에서, 챌린징 유전자좌는 복제 및 재배열을 거치거나, 반복체 또는 역위(inverted) 반복체의 존재를 특징으로 하는 염색체 영역 내에 위치하거나 이에 근접하여 위치한다. 예를 들어, 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Gubbay *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7953-7957 (1992)]을 참조한다.

[0150] 용어 "염색질"은 세포 유전 물질을 응축하고 조직화하여 세포 내에 함유하는 핵단백질 복합체를 포함한다. 용어 "이질 염색질"은 고도로 응축된 상태로 되어 있으며, 일반적으로 전사가 억제되어 있는 게놈 영역을 포함한다. 이질 염색질은 진정 염색질보다 통상 더욱 짙은 색으로 감겨져 있고, 통상 더욱 반복적인 DNA 서열을 갖는다. 용어 "진정 염색질"은 종종 전사 활성이 있고 접근 가능한 염색질 영역이 더욱 확장되고 덜 응축된 것으로 특징으로 하는 게놈 영역을 포함한다.

[0151] 용어 "노출"은 원하는 구성 요소를 밀접하게 배치시키거나 직접 접촉시키는 방법을 사용하는 것을 포함한다.

[0152] 세포의 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챌린징 표적 게놈 유전자좌를 변형시킬 수 있는 방법 및 조성물이 제공된다. 아마도 Y 염색체의 독특한 구조적 특징으로 인해, Y 연쇄 유전자 상의 돌연변이를 발생시키는 마우스 배아 줄기 세포의 통상적인 유전자 표적법은 제한된 성공을 거두었다. 따라서, 종종 마우스의 Y 연쇄 유전자의 기능에 대한 이해는 자연 발생 결실, 랜덤 유전자 트랩 삽입 또는 상염색체 도입 유전자를 갖는 마우스의 연구 조사로부터 얻은 견해로 제한된다. 본 명세서에 제공된 방법에 의해, 뉴클레아제 제제의 부재 하에 또는 뉴클레아제 제제와 조합하여 표적화 벡터를 사용함으로써 Y 염색체 상의 게놈 유전자좌의 표적화를 행할 수 있다.

[0153] 이러한 방법 중 일부는 작은 표적화 벡터 또는 smallTVEC를 이용한다. "smallTVEC"는 짧은 상동성 암을 포함하는 표적화 벡터를 포함한다. smallTVEC 상의 상동성 암의 길이는 약 400 내지 1000 bp일 수 있다. smallTVEC의 상동성 암은 대응하는 표적 부위와의 상동 재조합 이벤트를 촉진시키기에 충분한 길이(예를 들어, 약 400 bp 내지 약 500 bp, 약 500 bp 내지 약 600 bp, 약 600 bp 내지 약 700 bp, 약 700 bp 내지 약 800 bp, 약 800 bp 내지 약 900 bp, 또는 약 900 bp 내지 약 1000 bp 포함)로 될 수 있다. smallTVEC 상의 상동성 암의 바람직한 길이는 약 700 bp 내지 약 800 bp이다. 또 하나의 실시 형태에서, smallTVEC의 5' 상동성 암과 3' 상동성 암의 합계는 약 0.5 kb, 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5kb, 6kb, 7kb, 8kb, 9kb, 약 0.5 kb 내지 약 1 kb, 약 1 kb 내지 약 1.5 kb, 약 1.5 kb 내지 약 2 kb, 약 2 kb 내지 약 3 kb, 약 3 kb 내지 약 4 kb, 약 4 kb 내지 약 5kb, 약 5kb 내지 약 6 kb, 약 6 kb 내지 약 7 kb, 약 8 kb 내지 약 9 kb, 또는 10 kb 이상이다. 이러한 방법에서, 짧은 길이의 상동성 암은 보다 긴 상동성 암을 갖는 표적화 벡터와 비교하여, 표적화 효율을 증가시킨다. 고도의 반복 서열을 갖는 Y 염색체의 특성으로 인해, smallTVEC의 짧은 암은 Y 염색체에 대한 고도로 특이적인 표적화를 가능하게 한다.

[0154] (a) 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위를 포함하는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 세포를 제공하는 단계, (b) 제1 및 제2 표적 부위에 대응하는 제1 및 제2 상동성 암이 플랜킹된 제1 삽입 폴리뉴클레오티드

를 포함하는 제1 표적화 벡터를 세포로 도입하는 단계; 및 (c) Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌에서 통합되는 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 이의 게놈에 포함하는 적어도 하나의 세포를 동정하는 단계를 포함하는, 세포의 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 방법이 제공된다. 구체적인 실시 형태에서, 표적화 벡터의 제1 상동성 암과 제2 상동성 암의 합계는 약 0.5 kb, 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5kb, 6kb, 7kb, 8kb, 9kb, 약 0.5 kb 내지 약 1 kb, 약 1 kb 내지 약 1.5 kb, 약 1.5 kb 내지 약 2 kb, 약 2 kb 내지 약 3 kb, 약 3 kb 내지 약 4 kb, 약 4 kb 내지 약 5kb, 약 5kb 내지 약 6 kb, 약 6 kb 내지 약 7 kb, 약 8 kb 내지 약 9 kb, 또는 10 kb 이상 또는 10 kb 이상 내지 150 kb 미만이다. 일부 실시 형태에서, smallTVEC가 사용된다. 구체적인 실시 형태에서, LTVEC가 사용된다. 챠린징 표적 게놈 유전자좌를 표적화하는 경우에, 유사한 방법이 행해질 수 있다. 하나의 비제한적인 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 XY F0 생식능력이 있는 암컷의 발생을 촉진시키는 배지를 사용하여, XY F0 생식능력이 있는 암컷 동물을 생산시키는 이러한 방법이 수행된다. 다른 예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, *Sry* 유전자의 표적화된 유전자 변형을 생산하는데 사용된다.

[0155] 또한, (a) 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위를 포함하는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 세포를 제공하는 단계, (b) (i) 뉴클레아제 제제 - 여기서, 뉴클레아제 제제는 제1 인식 부위에서 낙 또는 이중 가닥 절단을 유도함 -; 및 (ii) 제1 인식 부위에 충분히 근접하여 위치하고 있는 제1 및 제2 표적 부위에 대응하는 제1 및 제2 상동성 암이 플랭킹된 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 표적화 벡터를 세포로 도입하는 단계; 및 (c) Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌에서 통합되는 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 이의 게놈에 포함하는 적어도 하나의 세포를 동정하는 단계를 포함하는, 세포의 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 방법이 제공된다. 구체적인 실시 형태에서, 표적화 벡터의 제1 상동성 암과 제2 상동성 암의 합계는 약 0.5 kb, 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5kb, 6kb, 7kb, 8kb, 9kb, 약 0.5 kb 내지 약 1 kb, 약 1 kb 내지 약 1.5 kb, 약 1.5 kb 내지 약 2 kb, 약 2 kb 내지 약 3 kb, 약 3 kb 내지 약 4 kb, 약 4 kb 내지 약 5kb, 약 5kb 내지 약 6 kb, 약 6 kb 내지 약 7 kb, 약 8 kb 내지 약 9 kb, 또는 10 kb 이상 또는 10 kb 이상 내지 150 kb 미만이다. 일부 실시 형태에서, smallTVEC가 사용된다. 구체적인 실시 형태에서, LTVEC가 사용된다. 챠린징 표적 게놈 유전자좌를 표적화하는 경우에, 유사한 방법이 행해질 수 있다. 하나의 비제한적인 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 XY F0 생식능력이 있는 암컷의 발생을 촉진시키는 배지를 사용하여, XY F0 생식능력이 있는 암컷 동물을 생산시키는 이러한 방법이 수행된다. 다른 예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, *Sry* 유전자의 표적화된 유전자 변형을 생산하는데 사용된다.

[0156] 표적화 벡터, smallTVEC 또는 LTVEC를 사용하는 Y 염색체 (또는 임의의 챠린징 게놈 유전자좌)의 게놈 유전자좌에서 표적화된 변형을 발생시키는 본 명세서에 개시된 다양한 방법이 임의의 세포 종류에서 행해질 수 있으며, XY 만능성 및/또는 전능성 세포에 한정되지 않는 것으로 인식된다. 이러한 세포 종류는 인간 세포, 비인간 세포, 포유류 세포, 비인간 포유류 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포, 햄스터 세포, 쥐유아세포 또는 임의의 다른 숙주 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 세포는 예를 들어, 유도 만능성 줄기(iPS) 세포, 마우스 배아 줄기(ES) 세포, 래트 배아 줄기(ES) 세포, 인간 배아 줄기(ES) 세포, 또는 발달 제한된 인간 전구 세포를 비롯한 만능성 세포를 포함한다.

[0157] 본 명세서에 제공된 다양한 뉴클레아제 제제(예를 들어, Cas9와 조합한 CRISPR gRNA; ZFN; 또는 TALEN) 중 어느 하나를 사용하여 Y 염색체 상의 큰 결실을 발생시키는 방법이 추가로 개시된다. 이러한 Y 염색체 상의 결실은 내인성 핵산 서열의 결실일 수 있다. 결실은 약 5 kb 내지 약 10 kb, 약 10 kb 내지 약 20 kb, 약 20 kb 내지 약 40 kb, 약 40 kb 내지 약 60 kb, 약 60 kb 내지 약 80 kb, 약 80 kb 내지 약 100 kb, 약 100 kb 내지 약 150 kb, 약 150 kb 내지 약 200 kb, 약 200 kb 내지 약 300 kb, 약 300 kb 내지 약 400 kb, 약 400 kb 내지 약 500 kb, 약 500 kb 내지 약 600 kb, 약 600 kb 내지 약 700 kb, 약 700 kb 내지 약 800 kb, 약 800 kb 내지 약 900 kb, 약 900 kb 내지 약 1 Mb, 약 500 kb 내지 약 1 Mb, 약 1 Mb 내지 약 1.5 Mb, 약 1.5 Mb 내지 약 2 Mb, 약 2 Mb 내지 약 2.5 Mb, 또는 약 2.5 Mb 내지 약 3 Mb의 범위일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 결실은 500 kb 보다 크다. 또 하나의 실시 형태에서, 결실은 약 500 kb 내지 약 600 kb이다. 구체적인 실시 형태에서, 결실은 약 500 kb이다. 이러한 Y 염색체 상의 결실은 임의의 핵산 서열의 결실일 수 있다. 일부 실시 형태에서, 결실은 생식능력/불임과 관련된 유전자를 포함한다. Y 염색체 상의 결실은 다수의 유전자의 결실을 포함할 수 있다. 이러한 방법에서, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 유전자가 결실될 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, Kdm5d 유전자(라이신(K) 특이적 데메틸라아제 5d; 예를 들어, Entrez 유전자 ID 20592(무스 무스쿨루스(*mus musculus*))) 및/또는 Usp9y 유전자(유비퀴틴 특이적 펩티다아제 9, y 연쇄; 예를 들어, Entrez 유전자 ID 107868(무스 무스쿨루스)))는 결실의 대상이 된다. 다른 실시 형태에서, *Sry* 유전자는 결실의 대상이

된다.

[0158] A. 뉴클레아제 제제 및 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위

[0159] 용어 "뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위"는 낉 또는 이중 가닥 절단이 뉴클레아제 제제에 의해 유도되는 DNA 서열을 포함한다. 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위는 세포에 내인성(또는 고유한 것)일 수 있거나, 인식 부위는 세포에 외인성일 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 인식 부위는 세포에 외인성이므로, 세포의 게놈에서 자연적으로 발생하지 않는다. 또 다른 추가의 실시 형태에서, 인식 부위는 세포 및 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드에 외인성이며, 표적 유전자좌에 위치되고자 한다. 추가의 실시 형태에서, 외인성 또는 내인성 인식 부위는 숙주 세포의 게놈에 단 한번만 존재한다. 구체적인 실시 형태에서, 게놈 내에 단 한번만 발생하는 내인성 또는 고유 부위가 동정된다. 그 다음에 이러한 부위는 내인성 인식 부위에서 낉 또는 이중 가닥 절단을 일으킬 뉴클레아제 제제를 설계하는데 사용될 수 있다.

[0160] 인식 부위의 길이는 달라질 수 있으며, 예를 들어, 징크 평거 뉴클레아제 (ZFN) 쌍에 대하여 약 30 내지 36 bp (즉, 각 ZFN에 대하여 약 15 내지 18 bp), 전사 활성화 인자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)에 대하여 약 36 bp, 또는 CRISPR/Cas9 가이드 RNA에 대하여 약 20 bp인 인식 부위를 포함한다.

[0161] 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제의 각 단량체는 적어도 9개의 뉴클레오티드의 인식 부위를 인식한다. 다른 실시 형태에서, 인식 부위는 길이가 약 9 내지 약 12개의 뉴클레오티드, 길이가 약 12 내지 약 15개의 뉴클레오티드, 길이가 약 15 내지 약 18개의 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 18 내지 약 21개의 뉴클레오티드, 및 이러한 부분적인 범위(예를 들어, 9 내지 18개의 뉴클레오티드)의 임의의 조합이다. 주어진 뉴클레아제 제제가 인식 부위에 결합하여, 그 결합 부위를 절단하거나, 뉴클레아제 제제가 인식 부위와 상이한 서열에 결합할 수 있는 것으로 인식된다. 게다가, 용어 "인식 부위"는 낉/절단 부위가 뉴클레아제 제제 결합 부위 내에 존재하는지 외측에 존재하는지 여부에 관계없이, 뉴클레아제 제제 결합 부위 및 낉/절단 부위를 포함한다. 또 하나의 변형 예에서, 뉴클레아제 제제에 의한 절단은 서로 바로 마주보는 뉴클레오티드 위치에서 일어나서, 평활 말단(blunt end) 절단부를 형성할 수 있거나, 다른 경우에는 절개부가 스태거(stagger)되어, 5' 돌출부(overhang) 또는 3' 돌출부일 수 있는, "접착 말단(sticky end)"으로도 불리우는 단일 가닥 돌출부를 형성할 수 있다.

[0162] 낉 또는 이중 가닥 절단을 원하는 인식 부위로 유도하는 임의의 뉴클레아제 제제가 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 자연 발생 또는 천연 뉴클레아제 제제가 원하는 인식 부위에서 낉 또는 이중 가닥 절단을 유도하는 한 상기 뉴클레아제 제제가 사용될 수 있다. 대안적으로, 변형되거나 유전자 조작된 뉴클레아제 제제가 사용될 수 있다. "유전자 조작된 뉴클레아제 제제"는 원하는 인식 부위에서 낉 또는 이중 가닥 절단을 특이적으로 인식하고 유도하도록 이의 천연 형태로부터 유전자 조작된(변형되거나 유래된) 뉴클레아제를 포함한다. 따라서, 유전자 조작된 뉴클레아제 제제는 천연의 자연 발생 뉴클레아제 제제로부터 유래할 수 있거나, 인공적으로 생성되거나 합성될 수 있다. 뉴클레아제 제제의 변형은 단지 단백질 절단제의 하나의 아미노산 또는 핵산 절단제의 하나의 뉴클레오티드에서 일어날 수 있다. 일부 실시 형태에서, 유전자 조작된 뉴클레아제는 인식 부위에서 낉 또는 이중 가닥 절단을 유도하며, 여기서 인식 부위는 천연(유전자 조작되지 않거나 변형되지 않은) 뉴클레아제 제제에 의해 인식되는 서열이 아니었다. 인식 부위 또는 다른 DNA에서 낉 또는 이중 가닥 절단을 형성하는 것은 본 명세서에서 인식 부위 또는 다른 DNA의 "컷팅" 또는 "절단"으로 명명될 수 있다.

[0163] 예시된 인식 부위의 활성 변이체 및 단편도 제공된다. 이러한 활성 변이체는 주어진 인식 부위에 대하여, 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 포함할 수 있으며, 여기서 활성 변이체는 생물학적 활성을 보유하므로, 서열 특이적 방법으로 뉴클레아제 제제에 의해 인식되고 절단될 수 있다. 뉴클레아제 제제에 의한 인식 부위의 이중 가닥 절단을 측정하기 위한 분석은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[TaqMan® qPCR assay, Frendewey D. et al., *Methods in Enzymology*, 2010, 476:295-307]).

[0164] 구체적인 실시 형태에서, 인식 부위는 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 내에 위치된다. 이러한 위치는 선택 마커의 암호화 영역 내 또는 선택 마커의 발현에 영향을 주는 조절 영역 내에 위치할 수 있다. 따라서, 뉴클레아제 제제의 인식 부위는 선택 마커의 인트론, 프로모터, 인핸서, 조절 영역, 또는 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 임의의 비단백질 암호화 영역에 위치할 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 인식 부위에서의 낉 또는 이중 가닥 절단은 선택 마커의 활성을 파괴한다. 기능적 선택 마커의 존재 또는 부재의 측정 방법은 공지되어 있다.

[0165]

일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 전사 활성화 인자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)이다. TAL 이펙터 뉴클레아제는 원핵생물 또는 진핵생물의 게놈의 특정 표적 서열에서 이중 가닥 절단을 형성하는데 사용될 수 있는 서열 특이적 뉴클레아제의 부류이다. TAL 이펙터 뉴클레아제는 천연 또는 유전자 조작된 전사 활성화 인자 유사(TAL) 이펙터 또는 이의 기능적 부분을 엔도뉴클레아제, 예를 들어 *FokI*의 촉매 도메인에 융합함으로써 생성된다. 독특한 모듈러 TAL 이펙터 DNA 결합 도메인에 의해, 잠재적으로 주어진 DNA 인식 특이성을 가진 단백질을 설계할 수 있다. 따라서, TAL 이펙터 뉴클레아제의 DNA 결합 도메인은 특정 DNA 표적 부위를 인식하도록 유전자 조작될 수 있으므로, 원하는 표적 서열에서 이중 가닥 절단을 형성하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 모두 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는, WO 2010/079430; 문헌[Morabitzer *et al.* (2010) *PNAS* 10.1073/pnas.1013133107]; 문헌[Scholze & Boch (2010) *Virulence* 1:428-432]; 문헌[Christian *et al.* *Genetics* (2010) 186:757-761; Li *et al.* (2010) *Nuc. Acids Res.* (2010) doi:10.1093/nar/gkq704]; 및 문헌 [Miller *et al.* (2011) *Nature Biotechnology* 29:143-148]을 참조한다.

[0166]

적절한 TAL 뉴클레아제의 예 및 적절한 TAL 뉴클레아제의 제조 방법이 예를 들어, 미국 특허 출원 제 2011/0239315 A1호, 제2011/0269234 A1호, 제2011/0145940 A1호, 제2003/0232410 A1호, 제2005/0208489 A1호, 제2005/0026157 A1호, 제2005/0064474 A1호, 제2006/0188987 A1호, 및 제2006/0063231 A1호(각각, 본 명세서에 참조로 포함됨)에 개시되어 있다. 다양한 실시 형태에서, TAL 이펙터 뉴클레아제는 예를 들어, 대상으로 하는 유전자좌 또는 대상으로 하는 게놈 유전자좌의 표적 핵산 서열이나 그 부근에서 절단되도록 유전자 조작되며, 여기서 표적 핵산 서열은 표적화 벡터에 의해 변형되는 서열 또는 그 주변에 존재한다. 본 명세서에 제공된 다양한 방법 및 조성물에 사용하기에 적합한 TAL 뉴클레아제는 본 명세서에 기재된 표적화 벡터에 의해 변형되는 표적 핵산 서열 또는 그 부근에서 결합하도록 특별히 설계된 것들을 포함한다.

[0167]

일 실시 형태에서, TALEN의 각 단량체는 2개의 초가변 잔기(hypervariable residue)를 통해 단일 염기쌍을 인식하는 33 내지 35개의 TAL 반복체를 포함한다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 독립(independent) 뉴클레아제에 작동가능하게 연결된 TAL 반복체 기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라 단백질이다. 일 실시 형태에서, 독립 뉴클레아제는 *FokI* 엔도뉴클레아제이다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 제1 TAL 반복체 기반 DNA 결합 도메인 및 제2 TAL 반복체 기반 DNA 결합 도메인을 포함하며, 여기서 제1 및 제2 TAL 반복체 기반 DNA 결합 도메인은 각각, *FokI* 뉴클레아제에 작동가능하게 연결되고, 제1 및 제2 TAL 반복체 기반 DNA 결합 도메인은 가변 길이(12 내지 20 bp)의 스페이서 서열에 의해 분리된 표적 DNA 서열의 각 가닥에서 2개의 인접한 표적 DNA 서열을 인식하고, *FokI* 뉴클레아제 서브유닛은 표적 서열에서 이중 가닥 절단을 형성하는 활성 뉴클레아제를 생성하도록 이량체화한다.

[0168]

본 명세서에 개시된 다양한 방법 및 조성물에 사용되는 뉴클레아제 제제는 징크 평거 뉴클레아제(ZFN)를 추가로 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, ZFN의 각 단량체는 3개 이상의 징크 평거 기반 DNA 결합 도메인을 포함하며, 여기서 각 징크 평거 기반 DNA 결합 도메인은 3 bp 서브사이트에 결합한다. 다른 실시 형태에서, ZFN은 독립 뉴클레아제에 작동가능하게 연결된 징크 평거 기반 DNA 결합 도메인을 포함하는 키메라 단백질이다. 일 실시 형태에서, 독립 엔도뉴클레아제는 *FokI* 엔도뉴클레아제이다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 제1 ZFN 및 제2 ZFN을 포함하며, 여기서 제1 ZFN 및 제2 ZFN은 각각, *FokI* 뉴클레아제 서브유닛에 작동가능하게 연결되고, 제1 및 제2 ZFN은 약 5 내지 7 bp 스페이서에 의해 분리된 표적 DNA 서열의 각 가닥에서 2개의 인접한 표적 DNA 서열을 인식하고, *FokI* 뉴클레아제 서브유닛은 이중 가닥 절단을 형성하는 활성 뉴클레아제를 생성하도록 이량체화한다. 예를 들어, 각각, 본 명세서에 참조로 포함되는 US20060246567; US20080182332; US20020081614; US20030021776; WO/2002/057308A2; US20130123484; US20100291048; WO/2011/017293A2; 및 문헌 [Gaj *et al.* (2013) *Trends in Biotechnology*, 31(7):397-405]을 참조한다.

[0169]

또 다른 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 메가뉴클레아제이다. 메가뉴클레아제는 보존 서열 모티프에 기초한 4개의 패밀리로 분류되고, 패밀리는 LAGLIDADG, GIY-YIG, H-N-H 및 His-Cys 백스 패밀리이다. 이러한 모티프는 금속 이온의 배위 및 인산다이에스테르 결합의 가수분해에 관여한다. 메가뉴클레아제는 이들의 긴 인식 부위와, 이들의 DNA 기질에서의 약간의 서열 다양성에 대한 내성에 주목할 만하다. 메가뉴클레아제 도메인, 구조 및 기능은 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌[Guhan and Muniyappa (2003) *Crit Rev Biochem Mol Biol* 38:199-248]; 문헌[Lucas *et al.*, (2001) *Nucleic Acids Res* 29:960-9]; 문헌[Jurica and Stoddard, (1999) *Cell Mol Life Sci* 55:1304-26]; 문헌[Stoddard, (2006) *Q Rev Biophys* 38:49-95]; 및 문헌[Moure *et al.*, (2002) *Nat Struct Biol* 9:764]을 참조한다. 일부 예에서, 자연 발생 변이체 및/또는 유전자 조작된 유도체 메가뉴클레아제가 사용된다. 동력학, 보조 인자 상호 작용, 발현, 최적 조건 및/또는 인식 부위 특이성을 변형시키고 활성을 스크리닝하는 방법이 공지되어 있으며, 예를 들어, 문헌[Epinat *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Res*

31:2952-62]; 문헌[Chevalier *et al.*, (2002) *Mol Cell* 10:895-905]; 문헌[Gimble *et al.*, (2003) *Mol Biol* 334:993-1008]; 문헌[Seligman *et al.*, (2002) *Nucleic Acids Res* 30:3870-9]; 문헌[Sussman *et al.*, (2004) *J Mol Biol* 342:31-41]; 문헌[Rosen *et al.*, (2006) *Nucleic Acids Res* 34:4791-800]; 문헌[Chames *et al.*, (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e178]; 문헌[Smith *et al.*, (2006) *Nucleic Acids Res* 34:e149]; 문헌[Gruen *et al.*, (2002) *Nucleic Acids Res* 30:e29]; 문헌[Chen and Zhao, (2005) *Nucleic Acids Res* 33:e154]; WO2005105989; WO2003078619; WO2006097854; WO2006097784; 및 WO2004031346을 참조한다.

[0170] I-SceI, I-SceII, I-SceIII, I-SceIV, I-SceV, I-SceVI, I-CeuI, I-CeuAIIIP, I-CreI, I-CrepsbIP, I-CrepsbIIP, I-CrepsbIIIP, I-CrepsbIVP, I-TliI, I-PpoI, PI-PspI, F-SceI, F-SceII, F-SuvI, F-TevI, F-TevII, I-AmaI, I-AniI, I-ChuI, I-CmoeI, I-CpaI, I-CpaII, I-CsmI, I-CvuI, I-CvuAIP, I-DdiI, I-DdiII, I-DirI, I-DmoI, I-HmuI, I-HmuII, I-HsNIP, I-LlaI, I-MsoI, I-NaaI, I-NanI, I-NcIIP, I-NgrIP, I-NitI, I-NjaI, I-Nsp236IP, I-PakI, I-PboIP, I-PcuIP, I-PcuAI, I-PcuVI, I-PgrIP, I-PobIP, I-PorI, I-PorIIP, I-PbpIP, I-SpBetaIP, I-ScaI, I-SexIP, I-SneIP, I-SpomI, I-SpomCP, I-SpomIP, I-SpomIIP, I-SquIP, I-Ssp6803I, I-SthPhiJP, I-SthPhiST3P, I-SthPhiSTe3bP, I-TdeIP, I-TevI, I-TevII, I-TevIII, I-UarAP, I-UarHGPAIP, I-UarHGPA13P, I-VinIP, I-ZbiIP, PI-MtuI, PI-MtuHIP, PI-MtuHIIIP, PI-PfuI, PI-PfuII, PI-PkoI, PI-PkoII, PI-Rma43812IP, PI-SpBetaIP, PI-SceI, PI-TfuI, PI-TfuII, PI-ThyI, PI-TliI, PI-TliII, 또는 이들의 임의의 활성 변이체 또는 단편을 포함하나, 이에 한정되지 않는 메가뉴클레아제가 본 명세서에 사용될 수 있다.

[0171] 일 실시 형태에서, 메가뉴클레아제는 12 내지 40개의 염기쌍의 이중 가닥 DNA 서열을 인식한다. 일 실시 형태에서, 메가뉴클레아제는 계놈의 하나의 완전히 매칭된 표적 서열을 인식한다. 일 실시 형태에서, 메가뉴클레아제는 호밍(homing) 뉴클레아제이다. 일 실시 형태에서, 호밍 뉴클레아제는 LAGLIDADG 패밀리의 호밍 뉴클레아제이다. 일 실시 형태에서, LAGLIDADG 패밀리의 호밍 뉴클레아제는 I-SceI, I-CreI 및 I-DmoI로부터 선택된다.

[0172] 뉴클레아제 제제는 타입 I, 타입 II, 타입 III 및 타입 IV 엔도뉴클레아제를 포함하는 제한 엔도뉴클레아제를 추가로 포함할 수 있다. 타입 I 및 타입 III 제한 엔도뉴클레아제는 특이적 인식 부위를 인식하지만, 전형적으로 절단 부위(인식 부위)로부터 떨어져 있는 수백 쌍의 염기쌍일 수 있는 뉴클레아제 결합 부위에서 떨어진 가변 위치에서 절단한다. 타입 II 시스템에서, 제한 활성은 임의의 메틸라아제 활성과 무관하며, 절단은 전형적으로 결합 부위 내 또는 그 부근의 특정 부위에서 일어난다. 대부분의 타입 II 효소는 회문 서열을 절단하지만, 타입 IIa 효소는 비회문 인식 부위를 인식하고, 인식 부위의 외측을 절단하며, 타입 IIb 효소는 인식 부위 외측의 양측 부위에서 서열을 2회 절단하고, 타입 IIc 효소는 비대칭 인식 부위를 인식하며, 한쪽에 인식 부위로부터 약 1 내지 20개의 뉴클레오티드의 일정한 거리에서 절단한다. 타입 IV 제한효소는 메틸화 DNA를 표적으로 한다. 제한효소는 추가로, 예를 들어 REBASE 데이터베이스에 기재되어 분류되어 있다(webpage at rebase.neb.com; Roberts *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Res* 31:418-20), Roberts *et al.*, (2003) *Nucleic Acids Res* 31:1805-12, and Belfort *et al.*, (2002) in *Mobile DNA II*, pp. 761-783, Eds. Craigie *et al.*, (ASM Press, Washington, DC).

[0173] 다양한 방법 및 조성물에 사용되는 뉴클레아제 제제는 또한 CRISPR/Cas 시스템을 포함할 수 있다. 이러한 시스템은 Cas9 뉴클레아제를 사용할 수 있는데, 경우에 따라서는 그것이 발현되는 원하는 세포 종류에 대하여 코돈 최적화된다. 상기 시스템은 또한, 코돈 최적화된 Cas9와 함께 기능하는 융합된 crRNA-tracrRNA 구축물을 사용한다. 이러한 단일 RNA는 종종 가이드 RNA 또는 gRNA로 명명된다. gRNA 내에서, crRNA 부분은 주어진 인식 부위에 대한 '표적 서열'로 특정되며, tracrRNA는 종종 '스캐폴드(scaffold)'로 명명된다. 이러한 시스템은 다양한 진핵 세포 및 원핵 세포에서 기능하는 것으로 나타났다. 간략하게, 표적 서열을 포함하는 짧은 DNA 단편은 가이드 RNA 발현 플라스미드에 삽입된다. gRNA 발현 플라스미드는 표적 서열(일부 실시 형태에서, 약 20개의 뉴클레오티드), tracrRNA 서열(스캐폴드)의 형태뿐만 아니라, 세포에서 활성인 적절한 프로모터 및 진핵 세포에서의 적절한 프로세싱에 필요한 요소를 포함한다. 많은 시스템은 어닐링되어 이중 가닥 DNA를 형성한 다음에, gRNA 발현 플라스미드에 클로닝된 주문형(custom) 상보적 올리고에 의존한다. 그 다음에 gRNA 발현 카세트 및 Cas9 발현 카세트가 세포로 도입된다. 예를 들어, 각각 본 명세서에 참조로 포함되는, 문헌[Mali P *et al.*, (2013) *Science* 2013 Feb 15; 339 (6121):823-6]; 문헌[Jinek M *et al.* *Science* 2012 Aug 17;337(6096):816-21]; 문헌[Hwang WY *et al.* *Nat Biotechnol* 2013 Mar;31(3):227-9]; 문헌[Jiang W *et al.* *Nat Biotechnol* 2013 Mar;31(3):233-9]; 및 문헌[Cong L *et al.* *Science* 2013 Feb 15;339(6121):819-23]을 참조한다.

[0174] 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물은 세포 내의 계놈을 변형시키기 위해 CRISPR/Cas 시스템 또는 이러한 시스템의 성분을 이용할 수 있다. CRISPR/Cas 시스템은 Cas 유전자와의 발현 또는 활성 유도에 관여하는 전사물 및

다른 요소를 포함한다. CRISPR/Cas 시스템은 타입 I, 타입 II 또는 타입 III 시스템일 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물은 핵산의 부위 특이적 절단을 위해 CRISPR 복합체(Cas 단백질과 복합체를 형성한 가이드 RNA(gRNA)를 포함함)를 이용함으로써 CRISPR/Cas 시스템을 사용한다.

[0175] 본 명세서에 개시된 방법에 사용되는 일부 CRISPR/Cas 시스템은 자연적으로 발생하지 않는다. "자연적으로 발생하지 않는" 시스템은 인간의 순의 관여를 나타내는 모든 것, 예를 들어, 이들의 자연 발생 상태로부터 변경되거나 돌연변이되거나, 이들이 실제로는 자연적으로 결합되어 있는 적어도 하나의 다른 성분을 적어도 실질적으로 함유하지 않거나, 이들이 자연적으로 결합되어 있지 않은 적어도 하나의 다른 성분과 결합된 시스템의 하나 이상의 성분을 포함한다. 예를 들어, 일부 CRISPR/Cas 시스템은 동시에 자연적으로 발생하지 않는 gRNA 및 Cas 단백질을 포함하는 자연적으로 발생하지 않는 CRISPR 복합체를 사용한다.

[0176] (i) A. Cas RNA 가이드 엔도뉴클레아제

[0177] Cas 단백질은 일반적으로 적어도 하나의 RNA 인식 또는 결합 도메인을 포함한다. 이러한 도메인은 가이드 RNA(gRNA, 이하에 더욱 상세히 기술됨)와 상호작용할 수 있다. Cas 단백질은 또한 뉴클레아제 도메인(예를 들어, DNase 또는 RNase 도메인), DNA 결합 도메인, 헬리카제 도메인, 단백질-단백질 상호작용 도메인, 이량체화 도메인 및 기타 도메인을 포함할 수 있다. 뉴클레아제 도메인은 핵산 절단을 위한 촉매 활성을 갖는다. 절단은 핵산 분자의 공유 결합의 파괴를 포함한다. 절단은 평활 말단 또는 스태거된 말단을 생성할 수 있으며, 단일 가닥 또는 이중 가닥으로 될 수 있다.

[0178] Cas 단백질의 예로는 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas5e(CasD), Cas6, Cas6e, Cas6f, Cas7, Cas8a1, Cas8a2, Cas8b, Cas8c, Cas9(Csn1 또는 Csx12), Cas10, Cas10d, CasF, CasG, CasH, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1(CasA), Cse2(CasB), Cse3(CasE), Cse4(CasC), Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 및 C1966, 및 이들의 상동체 또는 변형된 버전(modified version)을 들 수 있다.

[0179] Cas 단백질은 타입 II CRISPR/Cas 시스템으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 Cas9 단백질이거나, Cas9 단백질로부터 유래될 수 있다. Cas9 단백질은 전형적으로 보존 구조를 갖는 4개의 주요 모티프를 공유한다. 모티프 1, 2 및 4는 RuvC 유사 모티프이고, 모티프 3은 HNH 모티프이다. Cas9 단백질은 예를 들어, 화농연쇄구균(스트렙토코커스 피오게네스; *Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코커스 속(*Streptococcus sp.*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 노카르디움 시스 다손빌레이(*Nocardiopsis dassonvillei*), 스트렙토마이세스 프리스티네스파랄리스(*Streptomyces pristinaespiralis*), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(*Streptomyces viridochromogenes*), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(*Streptomyces viridochromogenes*), 스트렙토스포랑기움 로세움(*Streptosporangium roseum*), 스트렙토스포랑기움 로세움(*Streptosporangium roseum*), 알리사이클로바클루스 아시도칼다리우스(*Alicyclobacillus acidocaldarius*), 바실러스 슈도마이코이데스(*Bacillus pseudomycoides*), 바실러스 셀레니티 레두센스(*Bacillus selenitireducens*), 엑시구오박테리움 시비리쿰(*Exiguobacterium sibiricum*), 락토바실러스 델브루에키아(*Lactobacillus delbrueckii*), 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*), 미크로스 킬라 마리나(*Microscilla marina*), 부르크홀데리아레스 박테리움(*Burkholderiales bacterium*), 폴라로모나스 나프탈레니보란스(*Polaromonas naphthalenivorans*), 폴라로모나스 속(*Polaromonas sp.*), 크로코스파에라 와트 소니아(*Crocospaera watsonii*), 시아노테세 속(*Cyanothece sp.*), 마이크로시스티스 아에루기노사(*Microcystis aeruginosa*), 시네코코커스 속(*Synechococcus sp.*), 아세토할로비움 아라바티쿰(*Acetohalobium arabaticum*), 암모니펙스 데겐시아(*Ammonifex degensii*), 칼디셀룰로시립토 베시아(*Caldicellulosiruptor bescii*), 칸디다투스 데술포루디스(*Candidatus Desulforudis*), 클로스트리듐 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리듐 디피실레(*Clostridium difficile*), 피네골디아 마그나(*Finegoldia magna*), 나트라나에로비우스 써모필러스(*Natranaerobius thermophilus*), 펠로토마큘럼 써모프로파오니쿰(*Pelotomaculum thermopropionicum*), 아시티오바실러스 칼두스(*Acidithiobacillus caldus*), 아시디티오바실러스 페로옥시단스(*Acidithiobacillus ferrooxidans*), 알로크로마티움 비노슘(*Allochromatium vinosum*), 마리노박터 속(*Marinobacter sp.*), 니트로소코커스 할로필러스(*Nitrosococcus halophilus*), 니트로소코커스 와트소니(*Nitrosococcus watsonii*), 슈도알테로모나스 할로플란크티스(*Pseudoalteromonas haloplanktis*), 크테도노박테르 라세미페르(*Ktedonobacter racemifer*), 메타노할로비움 에베스티가툼(*Methanohalobium evestigatum*), 아나베나 바리아빌리스(*Anabaena variabilis*), 노들라리아 스푸미게나(*Nodularia spumigena*), 노스톡 속(*Nostoc sp.*), 아르트로스파라 맥시마(*Arthrosphaera maxima*), 아르트로스파라 플라텐시스(*Arthrosphaera platensis*), 아르트로스파라 속(*Arthrosphaera*

*sp.*), 링비아속(*Lyngbya sp.*), 마이크로콜레우스 크토노플라스테스(*Microcoleus chthonoplastes*), 오실라토리아 속(*Oscillatoria sp.*), 페트로토가 모빌리스(*Petrotoga mobilis*), 씨모시포 아프리카누스(*Thermosiphon africanus*) 또는 아카리오클로리스 마리나(*Acaryochloris marina*)로부터 유래될 수 있다. Cas9 패밀리의 주가의 예는 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 WO 2014/131833에 기재되어 있다. 화농연쇄구균 유래의 Cas9 단백질 또는 이의 유도체는 바람직한 효소이다. 화농연쇄구균 유래의 Cas9 단백질에는 SwissProt 수탁 번호 Q99ZW2가 할당되어 있다.

[0180] Cas 단백질은 야생형 단백질(즉, 천연에서 발생하는 것), 변형된 Cas 단백질(즉, Cas 단백질 변이체) 또는 야생형 또는 변형된 Cas 단백질의 단편일 수 있다. Cas 단백질은 또한 야생형 또는 변형된 Cas 단백질의 활성 변이체 또는 단편일 수 있다. 활성 변이체 또는 단편은 야생형 또는 변형된 Cas 단백질 또는 이의 부분에 대하여, 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 포함할 수 있으며, 여기서 활성 변이체는 원하는 절단 부위에서 절단하는 능력을 보유하므로, 낙 유도 또는 이중 가닥 절단 유도 활성을 보유한다. 낙 유도 또는 이중 가닥 절단 유도 활성의 측정법은 공지되어 있으며, 일반적으로 절단 부위를 포함하는 DNA 기질에 대한 Cas 단백질의 전체 활성 및 특이성을 측정한다.

[0181] Cas 단백질은 핵산 결합 친화성, 핵산 결합 특이성 및/또는 효소 활성을 증가시키거나 감소시키도록 변형될 수 있다. Cas 단백질은 또한 단백질의 다른 활성이나 특성, 예를 들어 안정성을 변화시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질의 하나 이상의 뉴클레아제 도메인을 변형, 결실 또는 불활성화시킬 수 있거나, Cas 단백질을 절단하여 단백질의 기능에 필수적이지 않은 도메인을 제거하거나 Cas 단백질의 활성을 최적화시킬 수 있다(예를 들어, 증강시키거나 저하시킴).

[0182] 일부 Cas 단백질은 적어도 2개의 뉴클레아제 도메인, 예컨대 DNase 도메인을 포함한다. 예를 들어, Cas9 단백질은 RuvC 유사 뉴클레아제 도메인 및 HNH 유사 뉴클레아제 도메인을 포함할 수 있다. RuvC 및 HNH 도메인은 각각, DNA의 이중 가닥 절단을 생성하기 위해 상이한 가닥의 이중 가닥 DNA를 절단할 수 있다. 예를 들어, 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Jinek *et al.* (2012) *Science* 337:816-821]을 참조한다.

[0183] 1개 또는 2개의 뉴클레아제 도메인이 결실되거나 돌연변이되어, 더 이상 기능적이지 않거나 뉴클레아제 활성 저하를 가져올 수 있다. 1개의 뉴클레아제 도메인이 결실되거나 돌연변이되는 경우, 생성된 Cas 단백질(예를 들어, Cas9)은 낙카아제(nickase)로 지칭될 수 있으며, 이중 가닥 DNA 내의 CRISPR RNA 인식 서열에서 단일 가닥 절단을 생성할 수 있지만, 이중 가닥 절단을 생성할 수 없다(즉, 상보적 가닥 또는 비상보적 가닥 중 어느 한쪽만 절단할 수 있음). 2개의 뉴클레아제 도메인이 결실되거나 돌연변이되는 경우, 생성된 Cas 단백질(예를 들어, Cas9)은 이중 가닥 DNA의 두 가닥을 절단하는 능력이 저하될 것이다. Cas9를 낙카아제로 전환시키는 돌연변이의 예로는 화농연쇄구균 유래의 Cas9의 RuvC 도메인에서의 D10A(Cas9의 10 위치에서 아스파르테이트가 알라닌으로 치환됨) 돌연변이가 있다. 마찬가지로, 화농연쇄구균 유래의 Cas9의 HNH 도메인에서의 H939A(아미노산 위치 839에서 히스티딘이 알라닌으로 치환됨) 또는 H840A(아미노산 840 위치에서 히스티딘이 알라닌으로 치환됨)는 Cas9를 낙카아제로 전환시킬 수 있다. Cas9를 낙카아제로 전환시키는 돌연변이의 다른 예로는 스트렙토코커스 씨모필러스 유래의 Cas9에 대응하는 돌연변이를 들 수 있다. 예를 들어, 각각, 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는, 문헌[Sapranauskas *et al.* (2011) *Nucleic Acids Research* 39:9275-9282] 및 WO 2013/141680을 참조한다. 이러한 돌연변이는 부위 특이적 돌연변이 유발, PCR 매개 돌연변이 유발 또는 총 유전자 합성(total gene synthesis)과 같은 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 낙카아제를 생성하는 다른 돌연변이의 예는 예를 들어, 각각 본 명세서에 참조로 포함되는, WO/2013/176772A1 및 WO/2013/142578A1에서 찾을 수 있다.

[0184] Cas 단백질은 또한 융합 단백질일 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 절단 도메인, 후성적 변형 도메인, 전사 활성화 도메인 또는 전사 억제인자 도메인에 융합될 수 있다. 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 WO 2014/089290을 참조한다. Cas 단백질은 또한 안정성 향상 또는 저하를 제공하는 이중 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 융합된 도메인 또는 이중 폴리펩티드는 N 말단, C 말단, 또는 Cas 단백질 내부에 위치할 수 있다.

[0185] Cas 단백질은 세포내 국재화(subcellular localization)를 제공하는 이중 폴리펩티드에 융합될 수 있다. 이러한 이중 웨티드는 예를 들어, 핵을 표적화하기 위한 SV40 NLS와 같은 핵 국재화 시그널(NLS), 미토콘드리아를 표적화하기 위한 미토콘드리아 국재화 시그널, ER 보류 시그널(retention signal) 등을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Lange *et al.* (2007) *J. Biol. Chem.* 282:5101-5105]을 참조한다. 이러한 세포내 국재화 시그널은 N 말단, C 말단 또는 Cas 단백질 내의 어디에도 위치할 수 있다. NLS는 염기성 아미노산의 스트레치를 포함할 수 있으며, 모노파르타이트(monopartite) 서열 또는 바이파르타이트(bipartite) 서열일 수 있다.

- [0186] Cas 단백질은 또한 세포 투과성 도메인에 연결될 수 있다. 예를 들어, 세포 투과성 도메인은 HIV-1 TAT 단백질, 인간 B형 간염 바이러스 유래의 TLM 세포 투과성 모티프, MPG, Pep-1, VP22, 단순 헤르페스 바이러스 유래의 세포 투과성 웹티드, 또는 폴리아르기닌 웹티드 서열로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 WO 2014/089290을 참조한다. 세포 투과성 도메인은 N 말단, C 말단 또는 Cas 단백질 내의 어디에도 위치할 수 있다.
- [0187] Cas 단백질은 또한 추적 또는 정제를 용이하게 하기 위한 이종 폴리웹티드, 예를 들어 형광 단백질, 정제 태그 또는 에피토프 태그를 포함할 수 있다. 형광 단백질의 예로는 녹색 형광 단백질(예를 들어, GFP, GFP-2, tagGFP, turbogFP, eGFP, 에메랄드(Emerald), 아자미 그린(Azami Green), 모노머릭 아자미 그린(Monomeric Azami Green), CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), 황색 형광 단백질(예를 들어, YFP, eYFP, 시트린(Citrine), 비너스(Venus), YPet, PhiYFP, ZsYellow1), 청색 형광 단백질(예를 들어, eBFP, eBFP2, 아주라이트(Azurite), mKalamal, GFPuv, 사파이어(Sapphire), T-사파이어), 시안 형광 단백질(예를 들어, eCFP, 세룰리언(Cerulean), CyPet, AmCyan1, 미도리이시-시안(Midoriishi-Cyan)), 적색 형광 단백질(mKate, mKate2, mPlum, DsRed 모노머, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-모노머, HcRed-탠덤(HcRed-Tandem), HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred), 오렌지색 형광 단백질(mOrange, mKO, 쿠사비라-오렌지(Kusabira-Orange), 모노머릭 쿠사비라-오렌지, mTangerine, tdTomato), 및 임의의 다른 적절한 형광 단백질을 들 수 있다. 태그의 예로는 글루타티온-S-트랜스페라아제(GST), 키틴 결합 단백질(CBP), 말토스 결합 단백질, 티오레독신(TRX), 폴리(NANP), 탠덤 친화성 정제(tandem affinity purification; TAP) 태그, myc, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, 적혈구응집소(HA), nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 히스티딘(His), 바이오틴 카르복실 운반 단백질(BCCP), 및 칼모듈린을 들 수 있다.
- [0188] Cas 단백질은 임의의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, Cas 단백질은 gRNA와 복합체를 형성한 Cas 단백질과 같은 단백질의 형태로 제공될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질은 RNA(예를 들어, 메신저 RNA(mRNA)) 또는 DNA와 같은, Cas 단백질을 암호화하는 핵산의 형태로 제공될 수 있다. 임의로, Cas 단백질을 암호화하는 핵산은 특정 세포 또는 유기체에서 단백질로의 효율적인 번역을 위해 코돈 최적화될 수 있다.
- [0189] Cas 단백질을 암호화하는 핵산은 세포의 계놈에 안정하게 통합될 수 있으며, 세포에서 활성인 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 대안적으로, Cas 단백질을 암호화하는 핵산은 발현 구축물의 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 발현 구축물은 대상으로 하는 유전자 또는 다른 핵산 서열(예를 들어, Cas 유전자)의 발현을 유도할 수 있으며, 대상으로 하는 그러한 핵산 서열을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 핵산 구축물을 포함한다. 발현 구축물에서 사용될 수 있는 프로모터는 예를 들어, 만능성 래트, 진핵생물, 포유동물, 비인간 포유류, 인간, 설치류, 마우스, 또는 햄스터 세포에서 활성인 프로모터를 포함한다. 다른 프로모터의 예는 본 명세서의 다른 부분에 기재되어 있다.
- [0190] (ii) B. 가이드 RNA(gRNA)
- [0191] "가이드 RNA" 또는 "gRNA"은 Cas 단백질에 결합하고, 표적 DNA 내의 특정 위치의 Cas 단백질을 표적으로 하는 RNA 분자를 포함한다. 가이드 RNA는 2개의 세그먼트, 즉, "DNA 표적 세그먼트"와 "단백질 결합 세그먼트"를 포함할 수 있다. "세그먼트"는 RNA의 뉴클레오티드의 연속 스트레치와 같은, 분자의 세그먼트, 섹션 또는 영역을 포함한다. 일부 gRNA는 2개의 분리된 RNA 분자, 즉, "활성화(activator)-RNA"와 "표적화(targeter)-RNA"를 포함한다. 다른 gRNA는 "단일 분자 gRNA", "단일 가이드 RNA" 또는 "sgRNA"로도 지칭되는 단일 RNA 분자(단일 RNA 폴리뉴클레오티드)이다. 예를 들어, 각각 본 명세서에 참조로 포함되는, WO/2013/176772A1, WO/2014/065596A1, WO/2014/089290A1, WO/2014/093622A2, WO/2014/099750A2, WO/2013142578A1 및 WO 2014/131833A1을 참조한다. 용어 "가이드 RNA" 및 "gRNA"은 이중 분자 gRNA와 단일 분자 gRNA를 포함한다.
- [0192] 예시적인 2분자 gRNA는 crRNA 유사("CRISPR RNA" 또는 "표적화-RNA" 또는 "crRNA" 또는 "crRNA 반복체") 분자 및 대응하는 tracrRNA 유사("트랜스 작용 CRISPR RNA" 또는 "활성화-RNA" 또는 "tracrRNA" 또는 "스캐폴드") 분자를 포함한다. crRNA는 gRNA의 DNA 표적화 세그먼트(단일 가닥), 및 gRNA의 단백질 결합 세그먼트의 dsRNA 이중 나선 구조의 절반을 형성하는 뉴클레오티드의 스트레치를 포함한다.
- [0193] 대응하는 tracrRNA(활성화-RNA)는 gRNA의 단백질 결합 세그먼트의 dsRNA 이중 나선 구조의 다른 절반을 형성하는 뉴클레오티드의 스트레치를 포함한다. crRNA의 뉴클레오티드의 스트레치는 tracrRNA의 뉴클레오티드의 스트레치에 상보적이며, 이것과 혼성화하여, gRNA의 단백질 결합 도메인의 dsRNA 이중 나선 구조를 형성한다. 이와 같이, 각 crRNA는 대응하는 tracrRNA를 갖는다고 할 수 있다.

- [0194] crRNA와 대응하는 tracrRNA는 혼성화하여, gRNA를 형성한다. 게다가, crRNA는 CRISPR RNA 인식 서열에 혼성화하는 단일 가닥 DNA 표적화 세그먼트를 제공한다. 세포 내에서의 변형에 사용된다면, 주어진 crRNA 또는 tracrRNA 분자의 완전 서열은 RNA 분자가 사용될 종류에 특이적이도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 각각 본 명세서에 참조로 포함되는, 문헌[Malai *et al.* (2013) *Science* 339:823-826]; 문헌[Jinek *et al.* (2012) *Science* 337:816-821]; 문헌[Hwang *et al.* (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:227-229]; 문헌[Jiang *et al.* (2013) *Nat. Biotechnol.* 31:233-239]; 및 문헌[Cong *et al.* (2013) *Science* 339:819-823]을 참조한다.
- [0195] 주어진 gRNA의 DNA 표적화 세그먼트(crRNA)는 표적 DNA의 서열과 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. gRNA의 DNA 표적화 세그먼트는 혼성화를 통해 서열 특이적으로 표적 DNA와 상호 작용한다(즉, 염기쌍 형성). 이와 같이, DNA 표적화 세그먼트의 뉴클레오티드 서열은 달라질 수 있으며, gRNA 및 표적 DNA가 상호 작용할 표적 DNA 내의 위치를 결정한다. 대상 gRNA의 DNA 표적화 세그먼트는 표적 DNA 내의 원하는 서열에 혼성화되도록 변형될 수 있다. 자연 발생적인 crRNA는 Cas9 시스템 및 유기체에 따라 다르지만, 종종 21 내지 46개의 뉴클레오티드 길이의 2개의 직접 반복체(DR)가 플랭킹된 21 내지 72개의 뉴클레오티드 길이의 표적화 세그먼트를 포함한다(예를 들어, WO2014/131833 참조함). 화농연쇄구균의 경우, DR은 36개의 뉴클레오티드 길이이고, 표적화 세그먼트는 30개의 뉴클레오티드 길이이다. 3' 위치의 DR은 대응하는 tracrRNA에 상보적이며, 이것과 혼성화하여, 결국 Cas9 단백질에 결합한다.
- [0196] DNA 표적화 세그먼트는 약 12개의 뉴클레오티드 내지 약 100개의 뉴클레오티드의 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, DNA 표적화 세그먼트는 약 12개의 뉴클레오티드(nt) 내지 약 80개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 50개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 40개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 30개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 25개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 20개의 nt, 또는 약 12개의 nt 내지 약 19개의 nt의 길이를 가질 수 있다. 대안적으로, DNA 표적화 세그먼트는 약 19개의 nt 내지 약 20개의 nt, 약 19개의 nt 내지 약 25개의 nt, 약 19개의 nt 내지 약 30개의 nt, 약 19개의 nt 내지 약 35개의 nt, 약 19개의 nt 내지 약 40개의 nt, 약 19개의 nt 내지 약 45개의 nt, 약 19개의 nt 내지 약 50개의 nt, 약 19개의 nt 내지 약 60개의 nt, 약 19개의 nt 내지 약 70개의 nt, 약 19개의 nt 내지 약 80개의 nt, 약 19개의 nt 내지 약 90개의 nt, 약 19개의 nt 내지 약 100개의 nt, 약 20개의 nt 내지 약 25개의 nt, 약 20개의 nt 내지 약 30개의 nt, 약 20개의 nt 내지 약 35개의 nt, 약 20개의 nt 내지 약 40개의 nt, 약 20개의 nt 내지 약 45개의 nt, 약 20개의 nt 내지 약 50개의 nt, 약 20개의 nt 내지 약 60개의 nt, 약 20개의 nt 내지 약 70개의 nt, 약 20개의 nt 내지 약 80개의 nt, 약 20개의 nt 내지 약 90개의 nt, 또는 약 20개의 nt 내지 약 100개의 nt의 길이를 가질 수 있다.
- [0197] 표적 DNA의 뉴클레오티드 서열(CRISPR RNA 인식 서열)에 상보적인 DNA 표적화 세그먼트의 뉴클레오티드 서열은 적어도 약 12개의 nt의 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, DNA 표적화 서열(즉, 표적 DNA 내의 CRISPR RNA 인식 서열에 상보적인 DNA 표적화 세그먼트 내의 서열)은 적어도 약 12개의 nt, 적어도 약 15개의 nt, 적어도 약 18개의 nt, 적어도 약 19개의 nt, 적어도 약 20개의 nt, 적어도 약 25개의 nt, 적어도 약 30개의 nt, 적어도 약 35개의 nt, 또는 적어도 약 40개의 nt의 길이를 가질 수 있다. 대안적으로, DNA 표적화 서열은 약 12개의 뉴클레오티드(nt) 내지 약 80개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 50개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 45개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 40개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 35개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 30개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 25개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 20개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 19개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 20개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 19개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 18개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 19개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 25개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 30개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 35개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 40개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 45개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 50개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 60개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 70개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 80개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 90개의 nt, 약 12개의 nt 내지 약 100개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 80개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 50개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 45개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 40개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 35개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 30개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 25개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 20개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 19개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 18개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 19개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 25개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 30개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 35개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 40개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 45개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 50개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 60개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 70개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 80개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 90개의 nt, 약 13개의 nt 내지 약 100개의 nt, 또는 약 13개의 nt 내지 약 110개의 nt의 길이를 가질 수 있다. 경우에 따라서는, DNA 표적화 서열은 약 20개의 nt의 길이를 가질 수 있다.
- [0198] tracrRNA는 임의의 형태(예를 들어, 전장 tracrRNA 또는 활성 부분 tracrRNA) 및 다양한 길이로 될 수 있다. 이는 일차 전사물 또는 처리 형태를 포함할 수 있다. 예를 들어, tracrRNA(단일 가이드 RNA의 일부로서 또는 2분자 gRNA의 일부로서 분리된 분자로서)는 야생형 tracrRNA 서열의 전부 또는 일부(예를 들어, 야생형 tracrRNA 서열의 약 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85개 또는 그 이상의 뉴클레오티드, 또는 그 이상)를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 화농연쇄구균 유래의 야생형 tracrRNA 서열의 예로는 171-뉴클레오티드, 89-뉴클레오티드, 75-뉴클레오티드, 및 65-뉴클레오티드 버전을 들 수 있다. 예를 들어, 각각 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는, 문헌[Deltcheva *et al.* (2011) *Nature* 471:602-607]; WO 2014/093661을 참조한다. 단일 가이드 RNA(sgRNA) 내의 tracrRNA의 예로는 sgRNA의 +48, +54, +67 및 +85 버전 내에 발견되는 tracrRNA 세그먼트를 포함하는 것이다.

트를 들 수 있으며, 여기서 "+n"은 야생형 tracrRNA의 +n 이하의 뉴클레오티드가 sgRNA에 포함된다는 것을 나타낸다. 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 US 8,697,359를 참조한다.

[0199] 표적 DNA 내의 DNA 표적화 서열과 CRISPR RNA 인식 서열 사이의 상보성 비율은 적어도 60%(예를 들어, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%)일 수 있다. 표적 DNA 내의 DNA 표적화 서열과 CRISPR RNA 인식 서열 사이의 상보성 비율은 약 20개의 연속 뉴클레오티드에 대하여, 적어도 60%일 수 있다. 일례로서, 표적 DNA 내의 DNA 표적화 서열과 CRISPR RNA 인식 서열 사이의 상보성 비율은 표적 DNA의 상보적 가닥 내의 CRISPR RNA 인식 서열의 5' 말단에 있는 14개의 연속 뉴클레오티드에 대하여 100%이고, 나머지 부분에 대해서는 0%로 낮다. 이러한 경우에, DNA 표적화 서열은 길이가 14개의 뉴클레오티드인 것으로 간주될 수 있다. 다른 예로, 표적 DNA 내의 DNA 표적화 서열과 CRISPR RNA 인식 서열 사이의 상보성 비율은 표적 DNA의 상보적 가닥 내의 CRISPR RNA 인식 서열의 5' 말단에 있는 7개의 연속 뉴클레오티드에 대하여 100%이고, 나머지 부분에 대해서는 0%로 낮다. 이러한 경우에, DNA 표적화 서열은 길이가 7개의 뉴클레오티드인 것으로 간주될 수 있다.

[0200] gRNA의 단백질 결합 세그먼트는 서로 상보적인 2개의 뉴클레오티드 스트레치를 포함할 수 있다. 단백질 결합 세그먼트의 상보적 뉴클레오티드는 혼성화되어, 이중 가닥 RNA 이중 나선 구조(dsRNA)를 형성한다. 대상 gRNA의 단백질 결합 세그먼트는 Cas 단백질과 상호작용하고, gRNA는 결합된 Cas 단백질을 DNA 표적화 세그먼트를 통해 표적 DNA 내의 특정 뉴클레오티드 서열로 유도한다.

[0201] 가이드 RNA는 추가의 바람직한 특징(예를 들어, 변형되거나 조절된 안정성; 세포내 표적화; 형광 표지를 이용한 추적; 단백질 또는 단백질 복합체에 대한 결합 부위 등)을 제공하는 변형 또는 서열을 포함할 수 있다. 이러한 변형의 예로는 예를 들어, 5' 캡(예를 들어, 7-메틸구아닐레이트 캡(m7G)); 3' 폴리아데닐화된 테일(즉, 3' 폴리(A) 테일); 리보스위치(riboswitch) 서열(예를 들어, 단백질 및/또는 단백질 복합체에 의한 조절된 안정성 및/또는 조절된 접근성을 고려함); 안정성 제어 서열; dsRNA 이중 나선 구조(즉, 헤어핀)를 형성하는 서열; 세포내 부위(예를 들어, 핵, 미토콘드리아, 엽록체 등)의 RNA를 표적으로 하는 변형 또는 서열; 추적(예를 들어, 형광 분자에 대한 직접 접합, 형광 검출을 용이하게 하는 부분에 대한 접합, 형광 검출을 가능하게 하는 서열 등)을 제공하는 변형 또는 서열; 단백질(예를 들어, 전사 활성화 인자, 전사 억제인자, DNA 메틸트랜스페라아제, DNA 데메틸라아제, 히스톤 아세틸트랜스페라아제, 히스톤 데아세틸라아제 등을 비롯한, DNA에 작용하는 단백질)에 대한 결합 부위를 제공하는 변형 또는 서열; 및 이들의 조합을 들 수 있다.

[0202] 가이드 RNA는 임의의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, gRNA는 2개의 분자(분리된 crRNA 및 tracrRNA) 또는 1개의 분자(sgRNA)로서의 RNA 형태 및 임의로 Cas 단백질과의 복합체 형태로 제공될 수 있다. gRNA는 또한 RNA를 암호화하는 DNA의 형태로 제공될 수 있다. gRNA를 암호화하는 DNA는 단일 RNA 분자(sgRNA) 또는 분리된 RNA 분자(예를 들어, 분리된 crRNA 및 tracrRNA)를 암호화할 수 있다. 후자의 경우, gRNA를 암호화하는 DNA는 각각, crRNA 및 tracrRNA를 암호화하는 분리된 DNA 분자로서 제공될 수 있다.

[0203] gRNA를 암호화하는 DNA는 세포의 계놈에 안정하게 통합될 수 있으며, 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 대안적으로, gRNA를 암호화하는 DNA는 발현 구축물의 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 이러한 프로모터는 예를 들어, 만능성 래트, 진핵생물, 포유동물, 비인간 포유류, 인간, 설치류, 마우스, 또는 햄스터 세포에서 활성을 나타낼 수 있다. 경우에 따라서는, 프로모터는 RNA 폴리머라아제 III 프로모터, 예를 들어 인간 U6 프로모터, 래트 U6 폴리머라아제 III 프로모터 또는 마우스 U6 폴리머라아제 III 프로모터이다. 다른 프로모터의 예는 본 명세서의 다른 부분에 기재되어 있다.

[0204] 대안적으로, gRNA는 다양한 다른 방법으로 제조될 수 있다. 예를 들어, gRNA는 예를 들어, T7 RNA 폴리머라아제를 사용하여, 시험관내 전사에 의해 제조될 수 있다(예를 들어, WO 2014/089290 및 WO 2014/065596를 참조함). 가이드 RNA는 화학 합성에 의해 제조되는 합성적으로 생산된 분자일 수도 있다.

[0205] (iii) C. CRISPR RNA 인식 서열

[0206] 용어 "CRISPR RNA 인식 서열"은 결합을 위한 충분한 조건이 존재한다면, gRNA의 DNA 표적화 세그먼트가 결합할 표적 DNA에 존재하는 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, CRISPR RNA 인식 서열은 가이드 RNA가 상보성을 갖도록 설계된 서열을 포함하며, 여기서 CRISPR RNA 인식 서열과 DNA 표적 서열 사이의 혼성화는 CRISPR 복합체의 형성을 촉진시킨다. 혼성화를 일으켜 CRISPR 복합체의 형성을 촉진시키기에 충분한 상보성이 있다면, 완전 상보성이 반드시 필요한 것은 아니다. CRISPR RNA 인식 서열은 또한 하기에서 보다 상세히 설명되는, Cas 단백질에 대한 절단 부위를 포함한다. CRISPR RNA 인식 서열은 예를 들어, 세포핵 또는 세포질에, 또는 미토콘드리아

또는 엽록체와 같은 세포 소기관 내에 위치할 수 있는 임의의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0207] 표적 DNA 내의 CRISPR RNA 인식 서열은 Cas 단백질 또는 gRNA에 의해 표적화될 수 있다(즉, 결합되거나 혼성화되거나 상보적일 수 있다). 적절한 DNA/RNA 결합 조건은 통상 세포에 존재하는 생리적 조건을 포함한다. 다른 적절한 DNA/RNA 결합 조건(예를 들어, 무세포계에서의 조건)은 당해 분야에 공지되어 있다(문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook *et al.*, Harbor Laboratory Press 2001) 참조함]. Cas 단백질 또는 gRNA에 상보적이며 이들과 혼성화되는 표적 DNA의 가닥은 "상보적 가닥"으로 지칭될 수 있으며, "상보적 가닥"에 상보적인(따라서, Cas 단백질 또는 gRNA에 상보적이지 않은) 표적 DNA의 가닥은 "비상보적 가닥" 또는 "주형 가닥"으로 지칭될 수 있다.

[0208] Cas 단백질은 gRNA의 DNA 표적화 세그먼트가 결합할 표적 DNA에 존재하는 핵산 서열의 내부 또는 외부의 부위에서 핵산을 절단할 수 있다. "절단 부위"는 Cas 단백질이 단일 가닥 절단 또는 이중 가닥 절단을 일으키는 핵산 위치를 포함한다. 예를 들어, CRISPR 복합체(CRISPR RNA 인식 서열에 혼성화되어, Cas 단백질과 복합체를 형성한 gRNA를 포함함)의 형성은 gRNA의 DNA 표적화 세그먼트가 결합될 표적 DNA 내에 존재하는 핵산 서열 또는 그 부근에(예를 들어, 상기 핵산 서열로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50개 또는 그 이상의 염기쌍 내에) 한 가닥 또는 두 가닥의 절단을 일으킬 수 있다. 절단 부위가 gRNA의 DNA 표적화 세그먼트가 결합할 핵산 서열의 외부에 있다면, 절단 부위는 여전히 "CRISPR RNA 인식 서열" 내에 있는 것으로 간주된다. 절단 부위는 핵산의 한 가닥에만 또는 두 가닥에 있을 수 있다. 절단 부위는 핵산의 두 가닥의 동일한 위치에 있을 수 있거나(평활 말단을 생성함), 각 가닥의 상이한 부위에 있을 수 있다(스테거된 말단을 생성함). 스테거된 말단은 예를 들어, 2개의 Cas 단백질을 사용하여 생성될 수 있으며, 각각은 각 가닥의 상이한 절단 부위에서 단일 가닥 절단을 일으켜 이중 가닥 절단을 일으킨다. 예를 들어, 제1 낙카아제는 이중 가닥 DNA(dsDNA)의 제1 가닥에 단일 가닥 절단을 일으킬 수 있고, 제2 낙카아제는 돌출 서열이 생성되도록 dsDNA의 제2 가닥에 단일 가닥 절단을 일으킬 수 있다. 경우에 따라서는, 제1 가닥의 낙카아제의 CRISPR RNA 인식 서열은 제2 가닥의 낙카아제의 CRISPR RNA 인식 서열로부터 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 250, 500 또는 1,000개의 염기쌍으로 분리되어 있다.

[0209] Cas9에 의한 표적 DNA의 부위 특이적 절단은 표적 DNA에서, (i) gRNA와 표적 DNA 사이의 염기쌍 형성 상보성과 (ii) PAM으로 지정되는 짧은 모티프에 의해 결정되는 위치에서 발생할 수 있다. PAM은 CRISPR RNA 인식 서열에 플랭킹될 수 있다. 임의로, CRISPR RNA 인식 서열은 PAM이 플랭킹될 수 있다. 예를 들어, Cas9의 절단 부위는 PAM 서열의 상류 또는 하류에 약 1 내지 약 10개, 또는 약 2 내지 약 5개의 염기쌍(예를 들어, 3개의 염기쌍)으로 될 수 있다. 경우에 따라서는(예를 들어, 화농연쇄구균 유래의 Cas9 또는 근연종의 Cas9가 사용되는 경우), 비상보적 가닥의 PAM 서열은 5'-N<sub>1</sub>GG-3'일 수 있으며, 여기서 N<sub>1</sub>은 임의의 DNA 뉴클레오티드이고, 표적 DNA의 비상보적 가닥의 CRISPR RNA 인식 서열의 3' 바로 옆에 위치한다. 이와 같이, 상보적 가닥의 PAM 서열은 5'-CC N<sub>2</sub>-3'일 것이며, 여기서 N<sub>2</sub>는 임의의 DNA 뉴클레오티드이고, 표적 DNA의 상보적 가닥의 CRISPR RNA 인식 서열의 5' 바로 옆에 위치한다. 몇몇 그러한 경우에는, N<sub>1</sub> 및 N<sub>2</sub>는 상보적일 수 있고, N<sub>1</sub>-N<sub>2</sub> 염기쌍은 임의의 염기쌍일 수 있다(예를 들어, N<sub>1</sub>=C와 N<sub>2</sub>=G; N<sub>1</sub>=G와 N<sub>2</sub>=C; N<sub>1</sub>=A와 N<sub>2</sub>=T; N<sub>1</sub>=T와 N<sub>2</sub>=A).

[0210] CRISPR RNA 인식 서열의 예로는 gRNA의 DNA 표적화 세그먼트에 상보적인 DNA 서열, 또는 PAM 서열 이외의 이러한 DNA 서열을 포함한다. 예를 들어, 표적 모티프는 Cas 단백질에 의해 인식되는 NGG 모티프 바로 앞의 20-뉴클레오티드 DNA 서열일 수 있다(예를 들어, WO 2014/165825 참조) 5' 말단의 구아닌은 세포에서의 RNA 폴리머아제에 의한 전사를 촉진시킬 수 있다. CRISPR RNA 인식 서열의 다른 예는 시험관내에서의 T7 폴리머아제에 의한 효율적인 전사를 용이하게 하기 위해 5' 말단에 2개의 구아닌 뉴클레오티드(예를 들어, GGN<sub>20</sub>NGG; 서열 번호 9)를 포함할 수 있다. 예를 들어, WO 2014/065596을 참조한다.

[0211] CRISPR RNA 인식 서열은 세포에 대하여 내인성이거나 외인성인 핵산 서열일 수 있다. CRISPR RNA 인식 서열은 유전자 산물(예를 들어, 단백질)을 암호화하는 서열 또는 비암호화 서열(예를 들어, 조절 서열)일 수 있거나, 두 가지를 포함할 수 있다.

[0212] 일 실시 형태에서, 표적 서열은 바로 PAM 서열이 플랭킹된다. 일 실시 형태에서, 대상으로 하는 유전자좌는 서열 번호 1의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일 실시 형태에서, gRNA는 CRISPR RNA(crRNA) 및 트랜스 활성화 CRISPR RNA(tracrRNA)를 암호화하는 제3 핵산 서열을 포함한다. 또 하나의 실시 형태에서, 만능성 래트 세포의 계놈은 표적 서열에 상보적인 표적 DNA 영역을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, Cas 단백질은 Cas9이다. 일부 실시 형태에서, gRNA는 (a) 서열 번호 2의 핵산 서열의 키메라 RNA; 또는 (b) 서열 번호 3의 핵산 서열의 키

메라 RNA를 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 상기 crRNA는 서열 번호 4, 서열 번호 5 또는 서열 번호 6에 기재된 서열을 포함한다. 일부 이러한 방법에서, 상기 tracrRNA는 서열 번호 7 또는 서열 번호 8에 기재된 서열을 포함한다.

[0213]

뉴클레아제 제제의 활성 변이체 및 단편(즉, 유전자 조작된 뉴클레아제 제제)도 제공된다. 이러한 활성 변이체는 천연 뉴클레아제 제제에 대하여, 적어도 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 포함할 수 있으며, 여기서 활성 변이체는 원하는 인식 부위에서 절단하는 능력을 보유하므로, 낙 또는 이중 가닥 절단 유도 활성을 보유한다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 임의의 뉴클레아제 제제는 천연 엔도뉴클레아제 서열로부터 변형될 수 있고, 천연 뉴클레아제 제제에 의해 인식되지 않은 인식 부위에서 낙 또는 이중 가닥 절단을 인식하여 유도하도록 설계될 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 유전자 조작된 뉴클레아제는 대응하는 천연 뉴클레아제 제제의 인식 부위와 상이한 인식 부위에서 낙 또는 이중 가닥 절단을 유도하는 특이성을 갖는다. 낙 유도 또는 이중 가닥 절단 유도 활성의 측정법은 공지되어 있으며, 일반적으로 인식 부위를 포함하는 DNA 기질에 대한 엔도뉴클레아제의 전체 활성 및 특이성을 측정한다.

[0214]

뉴클레아제 제제는 당해 분야에 공지된 임의의 수단에 의해 세포 내로 도입될 수 있다. 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리펩티드는 세포 내로 직접 도입될 수 있다. 대안적으로, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 세포 내로 도입될 수 있다. 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 세포 내로 도입되는 경우에, 뉴클레아제 제제는 세포 내에서 일시적으로, 조건적으로 또는 구성적으로 발현될 수 있다. 따라서, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 발현 카세트에 포함될 수 있고, 조건부 프로모터, 유도성 프로모터, 구성적 프로모터 또는 조직 특이적 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 대상으로 하는 이러한 프로모터는 본 명세서의 다른 곳에서 더욱 상세히 논의된다. 대안적으로, 뉴클레아제 제제는 뉴클레아제 제제를 암호화하는 mRNA로서 세포 내로 도입된다.

[0215]

구체적인 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 세포의 계놈에 안정적으로 통합되고, 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 다른 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 동일한 표적화 벡터에 존재하지만, 다른 경우에는 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 표적화 벡터로부터 분리된 벡터 또는 플라스미드에 존재한다.

[0216]

뉴클레아제 제제가 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드의 도입을 통해 세포에 제공되는 경우에, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 이러한 폴리뉴클레오티드는 뉴클레아제 제제를 암호화하는 천연 폴리뉴클레오티드 서열과 비교하여, 대상으로 하는 세포에서의 사용 빈도가 높은 코돈으로 치환되도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 천연 폴리뉴클레오티드 서열과 비교하여, 대상으로 하는 세균 세포, 효모 세포, 인간 세포, 비인간 세포, 포유류 세포, 설치류 세포, 마우스 세포, 래트 세포 또는 임의의 다른 숙주 세포를 비롯한 대상으로 하는 주어진 원핵 또는 진핵 세포에서의 사용 빈도가 높은 코돈으로 치환되도록 변형될 수 있다.

[0217]

B. 큰 표적화 벡터(LTVEC) 또는 작은 표적화 벡터(SmallTVEC)와 함께 CRISPR/Cas 시스템을 사용한 챠린징 계놈 유전자좌 또는 Y 염색체 유전자좌의 변형

[0218]

챌린징 계놈 유전자좌 또는 Y 염색체 유전자좌를 변형시키기 위한 비제한적인 방법은 염색체(즉, Y 염색체)를 적어도 10 kb의 핵산 서열을 포함하는 큰 표적화 벡터(LTVEC)의 존재 하에 Cas 단백질 및 CRISPR RNA에 노출시키는 단계를 포함하며, 여기서 Cas 단백질, CRISPR RNA 및 LTVEC에 노출된 후에, 염색체(즉, Y 염색체)는 적어도 10 kb의 핵산 서열을 포함하도록 변형된다.

[0219]

상기 방법은 본 명세서에 기재된 LTVEC 또는 smallTVEC 중 어느 하나를 사용할 수 있다. 비제한적인 실시 형태에서, LTVEC 또는 smallTVEC는 적어도 20 kb, 적어도 30 kb, 적어도 40 kb, 적어도 50 kb, 적어도 60 kb, 적어도 70 kb, 적어도 80 kb, 적어도 90 kb, 적어도 100 kb, 적어도 150 kb, 또는 적어도 200 kb의 핵산 서열을 포함한다. 다른 실시 형태에서, LTVEC의 5' 상동성 암과 3' 상동성 암의 합계는 약 10 kb 내지 약 150 kb, 약 10 kb 내지 약 20 kb, 약 20 kb 내지 약 40 kb, 약 40 kb 내지 약 60 kb, 약 60 kb 내지 약 80 kb, 약 80 kb 내지 약 100 kb, 약 100 kb 내지 약 120 kb, 또는 약 120 kb 내지 150 kb이다. 또 하나의 실시 형태에서, smallTVEC의 5' 상동성 암과 3' 상동성 암의 합계는 약 0.5 kb, 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5kb, 6kb, 7kb, 8kb, 9kb, 약 0.5 kb 내지 약 1 kb, 약 1 kb 내지 약 1.5 kb, 약 1.5 kb 내지 약 2 kb, 약 2 kb 내지 약 3 kb, 약 3 kb 내지 약 4 kb, 약 4 kb 내지 약 5kb, 약 5kb 내지 약 6 kb, 약 6 kb 내지 약 7 kb, 약 8 kb 내

지 약 9 kb, 또는 10 kb 이상이다.

[0220] 또한 (a) 챠린징 표적 유전자좌 또는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 포유류 세포를 제공하는 단계 - 여기서, 표적 게놈 유전자좌는 가이드 RNA(gRNA) 표적 서열을 포함함 -; (b) (i) 표적 게놈 유전자좌에 상동성인 표적화 암이 플랭킹된 제1 핵산을 포함하는 큰 표적화 백터(LTVEC) - 여기서, LTVEC는 적어도 10 kb임 -, (ii) Cas 단백질을 암호화하는 제2 핵산에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 제1 발현 구축물, 및 (iii) gRNA 표적 서열에 혼성화되는 뉴클레오티드 서열 및 트랜스 활성화 CRISPR RNA(tracrRNA)를 포함하는 가이드 RNA(gRNA)를 암호화하는 제3 핵산에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 제2 발현 구축물을 포유류 세포로 도입하는 단계 - 여기서, 제1 및 제2 프로모터는 포유류 세포에 활성을 나타냄 -; 및 (c) 챠린징 표적 게놈 유전자좌 또는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌에 표적화된 유전자 변형을 포함하는 변형된 포유류 세포를 동정하는 단계를 포함하는, 챠린징 표적 유전자좌 또는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 방법이 제공된다. 구체적인 실시 형태에서, 제1 및 제2 발현 구축물은 단일 핵산 분자 상에 있다. 다른 실시 형태에서, Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌는 *Sry* 유전자좌이다.

[0221] 상기에 요약된 바와 같이, 일 실시 형태에서, Cas 단백질은 Cas9 단백질을 포함할 수 있다. 또 하나의 실시 형태에서, gRNA 표적 서열은 바로 PAM 서열이 플랭킹된다.

[0222] 상기 방법은 본 명세서에 기재된 LTVEC 또는 smallTVEC 중 어느 하나를 사용할 수 있다. 비제한적인 실시 형태에서, LTVEC 또는 smallTVEC는 적어도 0.5 kb, 적어도 1 kb, 적어도 5 kb, 적어도 10 kb, 적어도 15 kb, 적어도 20 kb, 적어도 30kb, 적어도 40 kb, 적어도 50 kb, 적어도 60 kb, 적어도 70 kb, 적어도 80 kb, 적어도 90 kb, 적어도 100 kb, 적어도 150 kb, 또는 적어도 200 kb이다. 다른 실시 형태에서, LTVEC의 5' 상동성 암과 3' 상동성 암의 합계는 약 10 kb 내지 약 150 kb, 약 10 kb 내지 약 20 kb, 약 20 kb 내지 약 40 kb, 약 40 kb 내지 약 60 kb, 약 60 kb 내지 약 80 kb, 약 80 kb 내지 약 100 kb, 약 100 kb 내지 약 120 kb, 또는 약 120 kb 내지 150 kb이다.

[0223] CRISPR/Cas 시스템을 사용하는 다양한 방법(또는 본 명세서에 개시된 임의의 방법)은 예를 들어, 포유류 세포, 비인간 포유류 세포, 섬유아세포, 설치류 세포, 래트 세포, 마우스 세포 또는 햄스터 세포에서 행해질 수 있다. 상기 세포는 만능성 세포, 유도 만능성 줄기(iPS) 세포, 마우스 배아 줄기(ES) 세포, 래트 배아 줄기(ES) 세포, 인간 배아 줄기(ES) 세포 또는 발달 제한된 인간 전구 세포일 수 있다.

[0224] 이하에서 상세히 논의되는 바와 같이, 예를 들어 상기에 요약된 CRISPR/CAS 시스템을 사용하여, 비인간 만능성 세포의 챠린징 게놈 유전자좌 또는 Y 염색체 상의 대상으로 하는 게놈 유전자좌(즉, *Sry* 유전자좌)를 변형시킨 후에, 생산되는 유전자 변형 비인간 만능성 세포는 비인간 숙주 배아에 도입될 수 있고; 상기 변형 만능성 세포를 포함하는 비인간 숙주 배아를 대리모에 임신시킨다. 대리모는 표적화된 유전자 변형을 포함하는 F0 자손을 생산한다. 구체적인 실시 형태에서, 표적화된 유전자 변형은 생식세포계열을 통해 전달될 수 있다.

#### C. 선택 마커

[0225] 다양한 선택 마커가 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 이러한 마커는 본 명세서의 다른 곳에 개시되어 있으며, G418, 하이그로마이신, 블라스티사이딘, 네오마이신 또는 퓨로마이신과 같은 항생물질에 대한 내성을 부여하는 선택 마커를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 이러한 발현 카세트 및 이의 다양한 조절 성분은 본 명세서의 다른 곳에서 더욱 상세히 논의된다.

#### D. 표적 게놈 유전자좌

[0226] Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 게놈 유전자좌에서 적어도 하나의 삽입 폴리뉴클레오티드의 통합을 가능하게 하는 다양한 방법 및 조성물이 제공된다. 본 명세서에 사용되는 "Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌"는 삽입 폴리뉴클레오티드를 통합하고자 하는 Y 염색체 상의 DNA의 임의의 세그먼트 또는 영역을 포함한다.

[0227] 표적화된 Y 염색체 상의 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 게놈 유전자좌는 세포에 고유할 수 있거나, 세포의 염색체에 통합된 DNA의 이종 또는 외인성 세그먼트를 포함할 수 있다. 이러한 DNA의 이종 또는 외인성 세그먼트는 도입유전자, 발현 카세트, 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 또는 게놈 DNA의 이종 또는 외인성 영역을 포함할 수 있다. Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 게놈 유전자좌는 예를 들어, 인식 부위, 선택 마커, 사전에 통합된 삽입 폴리뉴클레오티드, 뉴클레아제 제제를 암호화하는 폴리뉴클레오티드, 프

로모터 등을 비롯한 표적화된 게놈 통합 시스템 중 어느 하나를 포함할 수 있다. 대안적으로, Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챌린징 표적 게놈 유전자좌는 효모 인공 염색체(YAC), 세균 인공 염색체(BAC), 인간 인공 염색체, 또는 적절한 숙주 세포에 포함되는 임의의 다른 유전자 조작된 게놈 영역 내에 위치할 수 있다. 따라서, 구체적인 실시 형태에서, Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챌린징 표적 게놈 유전자좌는 비인간 포유류, 비인간 세포, 설치류, 인간, 래트, 마우스, 햄스터, 토끼, 돼지, 소, 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 흰족제비, 영장류(예를 들어, 마모셋, 붉은털 원숭이), 가축 포유류(domesticated mammal) 또는 농업 포유류(farm mammal) 또는 대상으로 하는 임의의 다른 유기체, 또는 이들의 조합으로부터 유래되는 천연, 이종 또는 외인성 게놈 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0230] Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌의 비제한적인 예로는 Sry 유전자, Uty 유전자, Eif2s3y 유전자, Ddx3y 유전자, 유전자, Ube1y 유전자, Tspy 유전자, Usp9y 유전자, Zfy1 유전자 및 Zfy2 유전자, 및 Kdm5d, Eif2s3y, Tspy, Uty, Ddx3y 및 Usp9y 유전자를 포함하는 Y 염색체 상의 영역을 들 수 있다. Y 염색체 상의 이러한 유전자좌는 비인간 포유류, 포유동물, 설치류, 인간, 래트, 마우스, 햄스터, 토끼, 돼지, 소, 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 흰족제비, 영장류(예를 들어, 마모셋, 붉은털 원숭이), 가축 포유류 또는 농업 포유류 또는 대상으로 하는 임의의 다른 유기체, 또는 이들의 조합으로부터 유래될 수 있다. 이러한 세포는 예를 들어, 유도 만능성 줄기(iPS) 세포, 마우스 배아 줄기(ES) 세포, 래트 배아 줄기(ES) 세포, 인간 배아(ES) 세포, 또는 발달 제한된 인간 전구 세포를 비롯한 만능성 세포를 포함한다.

[0231] 본 명세서의 다른 곳에 기술된 바와 같이, Sry 단백질의 활성 또는 레벨이 저하된 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(예를 들어, XY ES 세포 또는 iPS 세포)를 포함하는 다양한 방법 및 조성물이 제공된다. Y 염색체 상의 게놈 유전자좌를 변형시키기 위한 본 명세서에 기재된 다양한 방법은 Y 염색체 상에 위치하지 않는 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드에 대한 표적화된 유전자 변형을 도입하는 데에도 사용될 수 있다.

[0232] E. 표적화 백터 및 삽입 폴리뉴클레오티드

[0233] 상술한 바와 같이, 본 명세서에 제공되는 방법 및 조성물은 표적화 백터를 단독으로 또는 뉴클레아제 제제와 조합하여 사용한다. "상동 재조합"은 통상적으로 상동 영역 내의 교차 부위에서 두 DNA 분자 사이의 DNA 단편의 교환을 지칭하는데 사용된다.

[0234] i. 삽입 폴리뉴클레오티드

[0235] 본 명세서에 사용되는 "삽입 폴리뉴클레오티드"는 표적 게놈 유전자좌에서 통합하고자 하는 DNA 세그먼트를 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 표적 게놈 유전자좌는 Y 염색체 상에 있다. 다른 실시 형태에서, 표적 게놈 유전자좌는 챌린징 게놈 유전자좌이다. 일 실시 형태에서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 대상으로 하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 다른 실시 형태에서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있다. 주어진 발현 카세트는 발현에 영향을 미치는 다양한 조절 성분과 함께, 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드, 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 리포터 유전자를 포함할 수 있다. 삽입 폴리뉴클레오티드 내에 포함될 수 있는 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드, 선택 마커 및 리포터 유전자의 비제한적인 예는 본 명세서의 다른 곳에서 상세히 논의된다.

[0236] 구체적인 실시 형태에서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 게놈 핵산을 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 게놈 핵산은 동물, 마우스, 인간, 비인간, 설치류, 비인간, 래트, 햄스터, 토끼, 돼지, 소, 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 흰족제비, 영장류(예를 들어, 마모셋, 붉은털 원숭이), 가축 포유류 또는 농업 포유류, 조류 또는 대상으로 하는 임의의 다른 유기체, 또는 이들의 조합으로부터 유래된다.

[0237] 추가의 실시 형태에서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 조건 대립유전자를 포함한다. 일 실시 형태에서, 조건 대립유전자는 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 US 2011/0104799에 기재된 다기능 대립유전자이다. 구체적인 실시 형태에서, 조건 대립유전자는 (a) 표적 유전자의 전사에 대하여 센스 방향으로의 작동 서열 및 센스 또는 안티센스 방향으로의 약물 선택 카세트; (b) 안티센스 방향으로의 대상으로 하는 뉴클레오티드 서열(NSI) 및 COIN(엑손-분할 인트론 및 가역적 유전자 트랩 유사 모듈을 이용함; 예를 들어, 그 전체 내용이 참조로 포함되는 US 2011/0104799를 참조함); 및 (c) 제1 재조합 효소에 노출 시에 재조합하여, (i) 작동 서열 및 DSC를 포함하지 않고, (ii) 센스 방향으로의 NSI 및 안티센스 방향으로의 COIN을 포함하는 조건 대립유전자를 생성하는 재조합가능한 단위를 포함한다.

[0238] 삽입 폴리뉴클레오티드는 약 5kb 내지 약 200kb, 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 30kb, 약 30kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 50kb, 약 60kb 내지 약 70kb, 약 80kb 내지 약 90kb, 약

90kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 110kb, 약 120kb 내지 약 130kb, 약 130kb 내지 약 140kb, 약 140kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 160kb, 약 160kb 내지 약 170kb, 약 170kb 내지 약 180kb, 약 180kb 내지 약 190kb, 약 190kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb일 수 있다.

[0239]

구체적인 실시 형태에서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 부위 특이적 재조합 표적 서열이 플랭킹된 핵산을 포함한다. 전체 삽입 폴리뉴클레오티드는 이러한 부위 특이적 재조합 표적 서열이 플랭킹될 수 있지만, 삽입 폴리뉴클레오티드 내의 대상으로 하는 임의의 영역 또는 개별 폴리뉴클레오티드도 이러한 부위가 플랭킹될 수 있는 것으로 인식된다. 본 명세서에 사용되는 용어 "재조합 부위"는 부위 특이적 재조합 효소에 의해 인식되고, 재조합 이벤트를 위한 기질로 작용할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 용어 "부위 특이적 재조합 효소"는 2개의 재조합 부위가 단일 핵산 분자 내 또는 분리된 핵산 분자에서 물리적으로 분리되는 재조합 부위 사이의 재조합을 용이하게 할 수 있는 효소군을 포함한다. 부위 특이적 재조합 효소의 예로는 Cre, F1p 및 Dre 재조합 효소를 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 부위 특이적 재조합 효소는 재조합 효소 폴리펩티드를 세포로 도입하거나 부위 특이적 재조합 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포에 도입하는 것을 비롯한 임의의 방법에 의해 세포에 도입될 수 있다. 부위 특이적 재조합 효소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 삽입 폴리뉴클레오티드 내에 또는 분리된 폴리뉴클레오티드 내에 위치할 수 있다. 부위 특이적 재조합 효소는 예를 들어, 유도성 프로모터, 세포에 내인성인 프로모터, 세포에 이종성인 프로모터, 세포 특이적 프로모터, 조직 특이적 프로모터, 또는 발달 단계 특이적 프로모터를 포함한, 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 삽입 폴리뉴클레오티드 또는 삽입 폴리뉴클레오티드 내의 대상으로 하는 임의의 폴리뉴클레오티드에 플랭킹될 수 있는 부위 특이적 재조합 표적 서열은 loxP, lox511, lox2272, lox66, lox71, loxM2, lox5171, FRT, FRT11, FRT71, attp, att, FRT, rox, 및 이들의 조합을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0240]

다른 실시 형태에서, 부위 특이적 재조합 부위는 삽입 폴리뉴클레오티드 내에 포함되는, 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 리포터 유전자에 플랭킹된다. 이러한 경우에는, 표적화된 게놈 유전자좌에서 삽입 폴리뉴클레오티드의 통합 후에, 부위 특이적 재조합 부위 사이의 서열이 제거될 수 있다.

[0241]

일 실시 형태에서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 이러한 선택 마커는 네오마이신 포스포트랜스페라아제(neo<sup>r</sup>), 하이그로마이신 B 포스포트랜스페라아제(hyg<sup>r</sup>), 퓨로마이신-N-아세틸트랜스페라아제(puro<sup>r</sup>), 블라스티사이딘 S 데아미나아제(bsr<sup>r</sup>), 잔틴/구아닌 포스포리보실 트랜스페라아제(gpt), 또는 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나아제(HSV-k), 또는 이들의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 일 실시 형태에서, 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드를 표적화된 게놈 유전자좌로 연속적으로 타일링(tiling)하는 경우, 선택 마커는 상술한 바와 같이, 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 부위 특이적 재조합 표적 서열이 플랭킹된다.

[0242]

삽입 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 리포터 유전자는 LacZ, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, 비너스, YPet, 고감도 황색 형광 단백질(EYFP), 에메랄드, 고감도 녹색 형광 단백질(EGFP), CyPet, 시안 형광 단백질(CFP), 세룰리언, T-사파이어, 루시페라아제, 알칼리 포스파타아제, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 리포터 단백질을 암호화한다. 이러한 리포터 유전자는 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 이러한 프로모터는 유도성 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 내인성인 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 이종성인 프로모터, 세포 특이적 프로모터, 조직 특이적 프로모터 또는 발달 단계 특이적 프로모터일 수 있다.

[0243]

### ii. 표적화 벡터

[0244]

표적화 벡터는 삽입 폴리뉴클레오티드를 Y 염색체 상의 표적화된 게놈 유전자좌 또는 챌린징 표적 유전자좌로 도입하거나, 대상으로 하는 다른 염색체 상에 도입하는데 사용된다. 표적화 벡터는 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 삽입 폴리뉴클레오티드에 플랭킹되는 상류 및 하류 상동성 암을 추가로 포함한다. 삽입 폴리뉴클레오티드에 플랭킹되는 상동성 암은 표적화된 게놈 유전자좌 내의 게놈 영역에 대응한다. 참조하기 쉽게, 표적화된 게놈 유전자좌 내의 대응하는 게놈 영역은 본 명세서에서 "표적 부위"로 명명된다. 따라서, 일례를 들면, 표적화 벡터는 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 내의 제1 인식 부위에 충분히 근접하여 위치하는 제1 및 제2 표적 부위에 대응하는 제1 및 제2 상동성 암이 플랭킹된 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

이로써, 표적화 벡터는 세포 계놈 내의 상동성 암과 대응하는 표적 부위 사이에서 발생하는 상동 재조합 이벤트를 통해 표적화된 계놈 유전자좌로의 삽입 폴리뉴클레오티드의 통합을 돋는다.

[0245] 표적화 벡터의 상동성 암은 예를 들어, 길이가 약 400 bp 내지 약 500 bp, 약 500 bp 내지 약 600 bp, 약 600 bp 내지 약 700 bp, 약 700 bp 내지 약 800 bp, 약 800 bp 내지 약 900 bp, 또는 약 900 bp 내지 약 1000 bp; 또는 적어도 5 내지 10, 5 내지 15, 5 내지 20, 5 내지 25, 5 내지 30, 5 내지 35, 5 내지 40, 5 내지 45, 5 내지 50, 5 내지 55, 5 내지 60, 5 내지 65, 5 내지 70, 5 내지 75, 5 내지 80, 5 내지 85, 5 내지 90, 5 내지 95, 5 내지 100, 100 내지 200, 또는 200 내지 300 kb, 또는 그 이상을 비롯하여, 대응하는 표적 부위와의 상동 재조합 이벤트를 촉진시키기에 충분한 길이로 될 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 표적화 암의 합계는 적어도 0.5 kb, 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5 kb, 6 kb, 7 kb, 8 kb, 9 kb 또는 적어도 10 kb이다. 다른 실시 형태에서, 상동성 암의 합계는 약 0.5 kb 내지 약 1 kb, 약 1 kb 내지 약 1.5 kb, 약 1.5 kb 내지 약 2 kb, 약 2 kb 내지 약 3 kb, 약 3 kb 내지 약 4 kb, 약 4 kb 내지 약 5 kb, 약 5 kb 내지 약 6 kb, 약 6 kb 내지 약 7 kb, 약 7 kb 내지 약 8 kb, 약 8 kb 내지 약 9 kb, 또는 약 10 kb 내지 약 150 kb이다. 더욱 상세히 후술하는 바와 같이, 큰 표적화 벡터는 보다 길이가 긴 표적화를 사용할 수 있다.

[0246] 표적화 벡터의 상류 및 하류 상동성 암에 대응하는 표적화된 계놈 유전자좌 내의 표적 부위는 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 위치한 "인식 부위에 충분히 근접하여" 위치한다. 본 명세서에 사용되는 표적화 벡터의 상류 및 하류 상동성 암은 거리가 인식 부위에서의 낙 또는 이중 가닥 절단 시에 표적 부위와 상동성 암 사이의 상동 재조합 이벤트의 발생을 촉진시키는 정도인 경우에 인식 부위에 "충분히 근접하여 위치한다". 따라서, 구체적인 실시 형태에서, 표적화 벡터의 상류 및/또는 하류 상동성 암에 대응하는 표적 부위는 주어진 인식 부위의 적어도 10개의 뉴클레오티드 내지 약 14 kb 내에 존재한다. 구체적인 실시 형태에서, 인식 부위는 표적 부위 중 적어도 하나 또는 둘 다에 바로 인접한다.

[0247] 표적화 벡터의 상동성 암에 대응하는 표적 부위와, 선택 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 내의 인식 부위의 공간 관계는 달라질 수 있다. 예를 들어, 두 표적 부위는 인식 부위의 5'에 위치할 수 있고, 두 표적 부위는 인식 부위의 3'에 위치할 수 있거나, 표적 부위는 인식 부위에 플랭킹될 수 있다.

[0248] 구체적인 실시 형태에서, 표적 계놈 유전자좌는 (i) 5' 상동성 암에 상동성인 5' 표적 서열; 및 (ii) 3' 상동성 암에 상동성인 3' 표적 서열을 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, 5' 표적 서열과 3' 표적 서열은 적어도 5 kb 이상 3 Mb 미만, 적어도 5 kb 이상 10 kb 미만, 적어도 10 kb 이상 20 kb 미만, 적어도 20 kb 이상 40 kb 미만, 적어도 40 kb 이상 60 kb 미만, 적어도 60 kb 이상 80 kb 미만, 적어도 약 80 kb 이상 100 kb 미만, 적어도 100 kb 이상 150 kb 미만, 적어도 150 kb 이상 200 kb 미만, 적어도 약 200 kb 이상 약 300 kb 미만, 적어도 약 300 kb 이상 약 400 kb 미만, 적어도 약 400 kb 이상 약 500 kb 미만, 적어도 약 500 kb 이상 약 1Mb 미만, 적어도 약 1 Mb 이상 약 1.5 Mb 미만, 적어도 약 1.5 Mb 이상 약 2 Mb 미만, 적어도 약 2 Mb 이상 약 2.5 Mb 미만, 또는 적어도 약 2.5 Mb 이상 약 3 Mb 미만으로 분리되어 있다.

[0249] 본 명세서에 사용되는 상동성 암 및 표적 부위는 상동 재조합 반응을 위한 기질로서 작용하도록 서로에 대하여 충분한 레벨의 서열 동일성을 공유할 때 서로 "대응하는" 또는 "대응한다". "상동성"이란, 대응하는 서열과 동일하거나 서열 동일성을 공유하는 DNA 서열을 의미하는 것이다. 주어진 표적 부위와, 표적화 벡터에 발견되는 대응하는 상동성 암 사이의 서열 동일성은 상동 재조합이 일어날 수 있는 임의의 정도의 서열 동일성일 수 있다. 예를 들어, 표적화 벡터(또는 이의 단편)의 상동성 암과 표적 부위(또는 이의 단편)가 공유하는 서열 동일성의 양은 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성일 수 있으므로, 서열은 상동 재조합을 일으킨다. 게다가, 상동성 암과 대응하는 표적 부위 사이의 대응하는 상동성 영역은 절단된 인식 부위에서 상동 재조합을 촉진시키기에 충분한 임의의 길이로 될 수 있다. 예를 들어, 주어진 상동성 암 및/또는 대응하는 표적 부위는 상동성 암이 세포의 계놈 내의 대응하는 표적 부위와 상동 재조합을 수행하기에 충분한 상동성을 갖도록, 길이가 약 400 bp 내지 약 500 bp, 약 500 bp 내지 약 600 bp, 약 600 bp 내지 약 700 bp, 약 700 bp 내지 약 800 bp, 약 800 bp 내지 약 900 bp, 또는 약 900 bp 내지 약 1000 bp(본 명세서의 다른 곳에 기재된 smallTVEC 벡터에 대해 기재된 바와 같음); 또는 적어도 약 5 내지 10, 5 내지 15, 5 내지 20, 5 내지 25, 5 내지 30, 5 내지 35, 5 내지 40, 5 내지 45, 5 내지 50, 5 내지 55, 5 내지 60, 5 내지 65, 5 내지 70, 5 내지 75, 5 내지 80, 5 내지 85, 5 내지 90, 5 내지 95, 5 내지 100, 100 내지 200 또는 200 내지 300 kb, 또는 그 이상(본 명세서의 다른 곳에 기재된 LTVEC 벡터에 기재된 바와 같음)인 대응하는 상동 영역을 포함할 수 있다.

- [0250] 참조하기 쉽게, 상동성 암은 본 명세서에서 상류 및 하류 상동성 암을 지칭한다. 이 용어는 표적화 벡터 내에서 상동성 암과 삽입 폴리뉴클레오티드의 상대적인 위치에 관한 것이다.
- [0251] 따라서, 표적화 벡터의 상동성 암은 Y 염색체 상의 표적화된 게놈 유전자좌를 갖거나 챠린징 표적 유전자좌 내의 표적 위치에 대응하도록 설계된다. 따라서, 상동성 암은 세포에 고유한 게놈 유전자좌에 대응할 수 있거나, 도입유전자, 발현 카세트, 또는 게놈 DNA의 이종 또는 외인성 영역을 포함하나 이에 한정되지 않는, Y 염색체에 통합된 DNA의 이종 또는 외인성 세그먼트의 영역에 대응할 수 있다. 대안적으로, 표적화 벡터의 상동성 암은 효모 인공 염색체(YAC), 세균 인공 염색체(BAC), 인간 인공 염색체, 또는 적절한 숙주 세포에 포함되는 임의의 다른 유전자 조작된 게놈 영역의 영역에 대응할 수 있다. 또한, 표적화 벡터의 상동성 암은 BAC 라이브러리(library), 코스미드(cosmid) 라이브러리 또는 P1 파지 라이브러리의 영역에 대응하거나 이로부터 유래할 수 있다. 따라서, 구체적인 실시 형태에서, 표적화 벡터의 상동성 암은 비인간 포유류, 설치류, 인간, 래트, 마우스, 햄스터, 토끼, 돼지, 소, 사슴, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 흰족제비, 영장류(예를 들어, 마모셋, 붉은 털 원숭이), 가축 포유류 또는 농업 포유류, 조류, 또는 대상으로 하는 임의의 다른 유기체에 고유한, 이종 또는 외인성인 Y 염색체 상의 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 유전자좌에 대응한다. 추가의 실시 형태에서, 상동성 암은 통상적인 방법을 사용하여 표적화할 수 없거나, 뉴클레아제 제제에 의해 유도되는 낙 또는 이종 가닥 절단이 없을 때에 단지 부정확하게 또는 단지 상당히 낮은 효율로 표적화될 수 있는 세포의 게놈 유전자좌에 대응한다. 일 실시 형태에서, 상동성 암은 합성 DNA로부터 유래된다.
- [0252] 또 다른 실시 형태에서, 상류 및 하류 상동성 암은 표적화된 게놈과 동일한 게놈에 대응한다. 일 실시 형태에서, 상동성 암은 관련 게놈으로부터 유래되며, 예를 들어, 표적화된 게놈은 제1 균주의 마우스 게놈이고, 표적화 암은 제2 균주의 마우스 게놈으로부터 유래되며, 여기서 제1 균주 및 제2 균주는 상이하다. 다른 실시 형태에서, 상동성 암은 동일한 동물의 게놈으로부터 유래되거나, 동일한 균주의 게놈으로부터 유래되며, 예를 들어, 표적화된 게놈은 제1 균주의 마우스 게놈이고, 표적화 암은 동일한 마우스 유래의 마우스 게놈으로부터 유래되거나 동일한 균주로부터 유래된다.
- [0253] 표적화 벡터(예컨대, 큰 표적화 벡터)는 또한 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 선택 카세트 또는 리포터 유전자를 포함할 수 있다. 선택 카세트는 선택 마커를 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 핵산 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 이러한 프로모터는 유도성 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 내인성인 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 이종성인 프로모터, 세포 특이적 프로모터, 조직 특이적 프로모터 또는 발달 단계 특이적 프로모터일 수 있다. 일 실시 형태에서, 선택 마커는 네오마이신 포스포트랜스페라아제(neo<sup>r</sup>), 하이그로마이신 B 포스포트랜스페라아제(hyg<sup>r</sup>), 퓨로마이신-N-아세틸트랜스페라아제(puro<sup>r</sup>), 블라스티사이딘 S 데아미나아제(bsr<sup>r</sup>), 잔틴/구아닌 포스포리보실 트랜스페라아제(gpt) 및 단순 헤르페스 바이러스 티미딘 키나아제(HSV-k), 및 이들의 조합으로부터 선택된다. 표적화 벡터의 선택 마커는 상류 및 하류 상동성 암이 풀랭킹 될 수 있거나, 상동성 암에 대하여 5' 또는 3'인 것으로 발견될 수 있다.
- [0254] 일 실시 형태에서, 표적화 벡터(예컨대, 큰 표적화 벡터)는 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하며, 여기서 리포터 유전자는 LacZ, mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, 비너스, YPet, 고감도 황색 형광 단백질(EYFP), 애메랄드, 고감도 녹색 형광 단백질(EGFP), CyPet, 시안 형광 단백질(CFP), 세룰리언, T-사파이어, 루시페라아제, 알칼리 포스파타아제, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 리포터 단백질을 암호화한다. 이러한 리포터 유전자는 세포에서 활성인 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 이러한 프로모터는 유도성 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 내인성인 프로모터, 리포터 유전자 또는 세포에 이종성인 프로모터, 세포 특이적 프로모터, 조직 특이적 프로모터 또는 발달 단계 특이적 프로모터일 수 있다.
- [0255] 하나의 비제한적인 실시 형태에서, 표적화 벡터(예를 들어, 큰 표적화 벡터 포함)와 뉴클레아제 제제의 병용에 의해, 표적화 벡터 단독 사용과 비교하여, 표적화 효율 증가를 가져온다. 일 실시 형태에서, 표적화 벡터를 뉴클레아제 제제와 함께 사용하는 경우에, 표적화 벡터의 표적화 효율은 표적화 벡터를 단독으로 사용하는 것과 비교하면, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 또는 적어도 10배로 증가된다.
- [0256] *iii. 큰 표적화 벡터*
- [0257] 본 명세서에 사용되는 용어 "큰 표적화 벡터" 또는 "LVEC"는 세포에서 상동성 표적화를 수행하도록 의도된 다른 접근법에 의해 전형적으로 사용되는 것보다 큰 핵산 서열에 대응하고 이로부터 유래되는 상동성 암을 포함하고/하거나 세포에서 상동 재조합 표적화를 수행하도록 의도된 다른 접근법에 의해 전형적으로 사용되는 것보다 큰

핵산 서열을 포함하는 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 큰 표적화 벡터를 포함한다. 구체적인 실시 형태에서, LTVEC의 상동성 암 및/또는 삽입 폴리뉴클레오티드는 진핵 세포의 계놈 서열을 포함한다. LTVEC의 크기는 너무 커서 통상적인 분석, 예를 들어, 서던 블로팅 및 장거리(예를 들어, 1kb 내지 5kb) PCR에 의한 표적화 이벤트의 스크리닝을 가능하게 할 수 없다. LTVEC의 예로는 세균 인공 염색체(BAC), 인간 인공 염색체 또는 효모 인공 염색체(YAC)로부터 유래된 벡터를 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. LTVEC의 비제한적인 예 및 이들을 제조하는 방법은 예를 들어, 각각 본 명세서에 참조로 포함되는, 미국 특허 제6,586,251호, 제6,596,541호, 제7,105,348호 및 WO 2002/036789(PCT/US01/45375)에 기재되어 있다.

[0258] LTVEC는 적어도 약 10kb, 약 15kb, 약 20kb, 약 30kb, 약 40kb, 약 50kb, 약 60kb, 약 70kb, 약 80kb, 약 90kb, 약 100kb, 약 150kb, 약 200kb, 약 10kb 내지 약 15kb, 약 15 kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 30kb, 약 30kb 내지 약 50kb, 약 50kb 내지 약 300kb, 약 50kb 내지 약 75kb, 약 75kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 125kb, 약 125kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 175kb, 약 175kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 225kb, 약 225kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 275kb, 또는 약 275kb 내지 약 300kb를 들 수 있으나, 이에 한정되지 않는 길이로 될 수 있다.

[0259] 일 실시 형태에서, LTVEC는 약 5kb 내지 약 200kb, 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 30kb, 약 30kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 50kb, 약 60kb 내지 약 70kb, 약 80kb 내지 약 90kb, 약 90kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 110kb, 약 120kb 내지 약 130kb, 약 130kb 내지 약 140kb, 약 140kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 160kb, 약 160kb 내지 약 170kb, 약 170kb 내지 약 180kb, 약 180kb 내지 약 190kb, 약 190kb 내지 약 200kb, 약 200kb 내지 약 250kb, 약 250kb 내지 약 300kb, 약 300kb 내지 약 350kb, 또는 약 350kb 내지 약 400kb의 범위의 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0260] 다른 경우에는, LTVEC는 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같이 약 5kb 내지 약 200kb, 또는 약 5kb 내지 약 3.0Mb인 주어진 서열로 치환할 수 있도록 설계될 수 있다. 일 실시 형태에서, 치환은 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 30kb, 약 30kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 50kb, 약 50kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 70kb, 약 80kb 내지 약 90kb, 약 90kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 110kb, 약 110kb 내지 약 120kb, 약 120kb 내지 약 130kb, 약 130kb 내지 약 140kb, 약 140kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 160kb, 약 160kb 내지 약 170kb, 약 170kb 내지 약 180kb, 약 180kb 내지 약 190kb, 약 190kb 내지 약 200kb, 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 200kb, 약 300kb 내지 약 400kb, 약 400kb 내지 약 500kb, 약 500kb 내지 약 1Mb, 약 1Mb 내지 약 1.5Mb, 약 1.5Mb 내지 약 2Mb, 약 2Mb 내지 약 2.5Mb, 또는 약 2.5Mb 내지 약 3Mb이다.

[0261] 일 실시 형태에서, LTVEC의 상동성 암은 BAC 라이브러리, 코스미드 라이브러리 또는 P1 파지 라이브러리로부터 유래된다. 다른 실시 형태에서, 상동성 암은 세포의 표적화된 계놈 유전자좌로부터 유래되며, 경우에 따라서는, LTVEC가 표적화하도록 설계된 표적 계놈 유전자좌는 통상적인 방법을 사용하여 표적화될 수 없다. 또 다른 실시 형태에서, 상동성 암은 합성 DNA로부터 유래된다.

[0262] 일 실시 형태에서, LTVEC의 상류 상동성 암과 하류 상동성 암의 합계는 적어도 10kb이다. 다른 실시 형태에서, 상류 상동성 암은 약 5kb 내지 약 100kb의 범위이다. 일 실시 형태에서, 하류 상동성 암은 약 5kb 내지 약 100kb의 범위이다. 다른 실시 형태에서, 상류 상동성 암과 하류 상동성 암의 합계는 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 30kb, 약 30kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 50kb, 약 50kb 내지 약 60kb, 약 60kb 내지 약 70kb, 약 70kb 내지 약 80kb, 약 80kb 내지 약 90kb, 약 90kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 110kb, 약 110kb 내지 약 120kb, 약 120kb 내지 약 130kb, 약 130kb 내지 약 140kb, 약 140kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 160kb, 약 160kb 내지 약 170kb, 약 170kb 내지 약 180kb, 약 180kb 내지 약 190kb, 약 190kb 내지 약 200kb, 또는 약 190kb 내지 약 200kb이다. 일 실시 형태에서, 결실의 크기는 LTVEC의 5' 상동성 암과 3' 상동성 암의 합계의 크기와 동일하거나 유사하다.

[0263] 일 실시 형태에서, LTVEC는 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 선택 카세트 또는 리포터 유전자를 포함한다.

[0264] iv. 상동 재조합에 의한 Y 염색체 상의 인식 부위 부근에 삽입 폴리 뉴클레오티드를 통합하는 방법

[0265] (a) Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌를 포함하는 세포를 제공하는 단계, (b) 제1 및 제2 표적 부위에 대응하는 제1 및 제2 상동성 암이 플랭킹된 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 표적화 벡터를 세포로 도입하는 단계; 및 (c) Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌에서 통합되는 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 이의 계놈에 포

함하는 적어도 하나의 세포를 동정하는 단계를 포함하는, 세포의 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 방법이 제공된다. 챠린징 염색체 유전자좌를 표적으로 하는 유사한 방법이 수행될 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에서 상세히 논의되는 바와 같이, 구체적인 실시 형태에서, 표적화 백터의 제1 상동성 암과 제2 상동성 암의 합계는 약 0.5 kb, 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5kb, 6kb, 7kb, 8kb, 9kb, 약 0.5 kb 내지 약 1 kb, 약 1 kb 내지 약 1.5 kb, 약 1.5 kb 내지 약 2 kb, 약 2 kb 내지 약 3 kb, 약 3 kb 내지 약 4 kb, 약 4 kb 내지 약 5kb, 약 5kb 내지 약 6 kb, 약 6 kb 내지 약 7 kb, 약 8 kb 내지 약 9 kb, 또는 10 kb 이상 또는 10 kb 이상 내지 150 kb 미만이다. 구체적인 실시 형태에서, LTVEC가 사용된다. 다른 구체적인 실시 형태에서, smallITVEC가 사용된다. 하나의 비제한적인 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 XY F0 생식능력이 있는 암컷의 발생을 촉진시키는 배지를 사용하여, XY F0 생식능력이 있는 암컷 동물을 생산시키는 이러한 방법이 수행된다. 다른 예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, Sry 유전자의 표적화된 유전자 변형을 생성하는데 사용된다.

[0266] 또한, (a) 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위를 포함하는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 세포를 제공하는 단계, (b) (i) 뉴클레아제 제제 - 여기서, 뉴클레아제 제제는 제1 인식 부위에서 너 또는 이중 가닥 절단을 유도함 -; 및 (ii) 제1 인식 부위에 충분히 근접하여 위치하고 있는 제1 및 제2 표적 부위에 대응하는 제1 및 제2 상동성 암이 플랭킹된 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 표적화 백터를 세포로 도입하는 단계; 및 (c) Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌에서 통합되는 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 이의 게놈에 포함하는 적어도 하나의 세포를 동정하는 단계를 포함하는, 세포의 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 방법이 제공된다. 챠린징 표적 유전자좌를 표적으로 하는 유사한 방법이 수행될 수 있다. 본 명세서의 다른 곳에서 상세히 논의되는 바와 같이, 구체적인 실시 형태에서, 표적화 백터의 제1 상동성 암과 제2 상동성 암의 합계는 약 0.5 kb, 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 3 kb, 4 kb, 5kb, 6kb, 7kb, 8kb, 9kb, 약 0.5 kb 내지 약 1 kb, 약 1 kb 내지 약 1.5 kb, 약 1.5 kb 내지 약 2 kb, 약 2 kb 내지 약 3 kb, 약 3 kb 내지 약 4 kb, 약 4 kb 내지 약 5kb, 약 5kb 내지 약 6 kb, 약 6 kb 내지 약 7 kb, 약 8 kb 내지 약 9 kb, 또는 10 kb 이상 또는 10 kb 이상 내지 150 kb 미만이다. 구체적인 실시 형태에서, LTVEC가 사용된다. 다른 구체적인 실시 형태에서, smallITVEC가 사용된다. 하나의 비제한적인 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 XY F0 생식능력이 있는 암컷의 발생을 촉진시키는 배지를 사용하여, XY F0 생식능력이 있는 암컷 동물을 생산시키는 이러한 방법이 수행된다. 다른 예에서, 본 명세서에 기재된 방법은 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, Sry 유전자의 표적화된 유전자 변형을 생성하는데 사용된다.

[0267] 다양한 방법이 또한 게놈 표적 유전자좌에 통합된 삽입 폴리 뉴클레오티드를 갖는 세포를 동정하는데 사용될 수 있다. 게놈 표적 유전자좌에서의 삽입 폴리뉴클레오티드의 삽입은 "대립유전자의 변형"을 일으킨다. 용어 "대립유전자의 변형" 또는 "MOA"는 게놈에서 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌(들)의 하나의 대립유전자의 완전 DNA 서열의 변형을 포함한다. "대립유전자의 변형(MOA)"의 예로는 단일 뉴클레오티드만큼 적은 결실, 치환 또는 삽입, 또는 대상으로 하는 유전자(들) 또는 염색체 유전자좌(들)에 걸친 많은 킬로베이스의 결실뿐만 아니라, 이를 양극단 사이의 모든 가능한 변형이 포함되나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0268] 다양한 실시 형태에서, 표적화된 변형의 확인을 용이하게 하기 위해, 고 처리량 정량 분석, 즉, 대립유전자의 변형(MOA) 분석이 이용된다. 본 명세서에 기재된 MOA 분석에 의해, 유전자 변형 후에 부모 염색체에서 변형된 대립유전자(들)의 대규모의 스크리닝을 행할 수 있다. MOA 분석은 정량적 PCR, 예를 들어, 실시간 PCR(qPCR)을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 분석 기술을 통해 수행될 수 있다. 예를 들어, 실시간 PCR은 표적 유전자좌를 인식하는 제1 프라이머-프로브 세트 및 비표적화된 참조 유전자좌를 인식하는 제2 프라이머-프로브 세트를 포함한다. 또한, 프라이머-프로브 세트는 중폭 서열을 인식하는 형광 프로브를 포함한다. 정량 분석은 또한 형광 매개 원위치(*in situ*) 혼성화(FISH), 비교 게놈 혼성화, 등온 DNA 중폭, 고정화 프로브(들)에 대한 정량적 혼성화, 인베이더 프로브(Invader Probes)®, MMP 어세이(assays)®, TaqMan® 몰레큘러 비이컨(Molecular Beacon) 및 이클립스(Eclipse)™ 프로브 기술을 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한 분석 기술을 통해 수행될 수 있다(예를 들어, 그 전체 내용이 본 명세서에 포함되는 US2005/0144655를 참조함).

[0269] 다양한 실시 형태에서, 너 또는 이중 가닥 절단의 존재 하에서의 표적 게놈 유전자좌에서의 표적화 백터(LTVEC 또는 smallITVEC)의 표적화 효율은 너 또는 이중 가닥 절단의 부재 시(예를 들어, 대상으로 하는 게놈 유전자좌에서 동일한 표적화 백터 및 동일한 상동성 암, 및 대응하는 표적 부위를 사용하지만, 너 또는 이중 가닥 절단을 생성시키는 뉴클레아제 제제가 첨가되지 않는 경우)보다 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배 높다.

[0270] 상술한 다양한 방법은 임의의 수의 삽입 폴리뉴클레오티드를 Y 염색체 상의 주어진 표적화된 게놈 유전자좌 또

는 챠린징 표적 유전자좌로 표적화된 통합을 할 수 있도록 순차적으로 반복될 수 있다. 따라서, 다양한 방법은 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 삽입 폴리뉴클레오티드를 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 유전자좌로 삽입시킨다. 특정한 실시 형태에서, 이러한 순차적 타일링 방법은 동물 세포 또는 포유류 세포(즉, 인간, 비인간, 설치류, 마우스, 원숭이, 래트, 햄스터, 가축 포유류 또는 농업 동물)로부터 유래된 큰 게놈 영역을 Y 염색체 상의 표적화된 게놈 유전자좌로 재구성할 수 있다. 이러한 경우에는, 암호화 및 비암호화 영역을 포함하는 게놈 영역의 이동 및 재구성은 고유 게놈 영역 내에 발견된 암호화 영역, 비암호화 영역 및 카피 수 다양성을 적어도 부분적으로 보유함으로써 주어진 영역의 복잡성을 보존하게 한다. 따라서, 다양한 방법은 예를 들어, 대상으로 하는 임의의 포유류 세포 또는 동물 내에 "이종" 또는 "외인성" 게놈 영역을 생성시키는 방법을 제공한다. 하나의 비제한적인 예에서, 비인간 동물 내의 "인간화" 게놈 영역이 생성된다.

[0271] 또한, Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 것과 함께, 본 명세서에 개시된 다양한 방법 및 조성물을 이용하여, 다른 염색체 상의 표적화된 유전자 변형도 생성할 수 있음을 인식한다.

#### v. 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드

[0273] 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 다양한 삽입 폴리뉴클레오티드에 포함될 수 있으며, 이것에 의해 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 유전자좌에 통합될 수 있다. 본 명세서에 개시된 방법은 표적화된 게놈 유전자좌에 통합될 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 이상의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다.

[0274] Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 유전자좌에서 통합될 때에 삽입 폴리뉴클레오티드 내의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 유전자 변형을 세포에 도입할 수 있다. 유전자 변형은 내인성 핵산 서열의 결실 및/또는 외인성 또는 이종 또는 이종상동성 폴리뉴클레오티드의 표적 게놈 유전자좌로의 부가를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 유전자 변형은 표적 게놈 유전자좌에서 내인성 핵산 서열을 대상으로 하는 외인성 폴리뉴클레오티드로 치환하는 것을 포함한다. 따라서, 본 명세서에 제공되는 방법은 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌에서의 녹아웃, 결실, 삽입, 치환("녹인"), 점돌연변이, 도메인 교환(swap), 엑손 교환, 인트론 교환, 조절 서열 교환, 유전자 교환, 또는 이들의 조합을 포함하는 유전자 변형의 생성을 가능하게 한다. 이러한 변형은 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7 또는 임의의 후속 삽입 폴리뉴클레오티드를 표적 게놈 유전자좌로의 통합 시에 발생할 수 있다.

[0275] 삽입 폴리뉴클레오티드 내의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 표적 게놈 유전자좌에서 통합된 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 도입되는 세포에 고유하거나 상동성인 서열을 포함할 수 있거나; 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 도입되는 세포에 이종성일 수 있거나; 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 도입되는 세포에 외인성일 수 있거나; 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 도입되는 세포에 이종상동성일 수 있거나; 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 도입되는 세포와 상이한 종으로부터 유래될 수 있다. 서열과 관련하여, 본 명세서에 사용되는 "상동"은 세포에 고유한 서열이다. 서열과 관련하여, 본 명세서에 사용되는 "이종"은 외래종으로부터 유래된 서열이거나, 동일한 종으로부터 유래되는 것이라면, 의도적인 인간 개입에 의해 조성물 및/또는 게놈 유전자좌에서 이의 천연 형태로부터 실질적으로 변형된 서열이다. 서열과 관련하여, 본 명세서에 사용되는 "외인성"은 외래종으로부터 유래된 서열이다. 본 명세서에 사용되는 "이종상동성"은 다른 종(즉, 종 변이체)의 공지된 참조 서열과 기능적으로 동등한 하나의 종으로부터 유래된 폴리뉴클레오티드이다. 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 비인간, 설치류, 햄스터, 마우스, 래트, 인간, 원숭이, 조류, 농업 포유류 또는 비농업 포유류를 포함하나, 이에 한정되지 않는 대상으로 하는 유기체로부터 유래될 수 있다. 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 암호화 영역, 비암호화 영역, 조절 영역 또는 게놈 DNA를 추가로 포함할 수 있다. 따라서, 제1, 제2, 제3, 제4, 제5, 제6, 제7 및/또는 임의의 후속 삽입 폴리뉴클레오티드는 이러한 서열을 포함할 수 있다.

[0276] 일 실시 형태에서, 삽입 폴리뉴클레오티드 내의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌에서 통합된 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 마우스 핵산 서열, 인간 핵산, 비인간 핵산, 설치류 핵산, 래트 핵산, 햄스터 핵산, 원숭이 핵산, 농업 포유류 핵산 또는 비농업 포유류 핵산에 상동성이다. 또 다른 실시 형태에서, 표적 유전자좌에서 통합된 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 게놈 핵산의 단편이다. 일 실시 형태에서, 게놈 핵산은 마우스 게놈 핵산, 인간 게놈 핵산, 비인간 핵산, 설치류 핵산, 래트 핵산, 햄스터 핵산, 원숭이 핵산, 농업 포유류 핵산 또는 비농업 포유류 핵산, 또는 이들의 조합이다.

[0277] 일 실시 형태에서, 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 상술한 바와 같이, 약 500개의 뉴클레오티드 내지 약 200kb의 범위일 수 있다. 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 약 500개의 뉴클레오티드 내지 약 5kb, 약 5kb 내

지 약 200kb, 약 5kb 내지 약 10kb, 약 10kb 내지 약 20kb, 약 20kb 내지 약 30kb, 약 30kb 내지 약 40kb, 약 40kb 내지 약 50kb, 약 60kb 내지 약 70kb, 약 80kb 내지 약 90kb, 약 90kb 내지 약 100kb, 약 100kb 내지 약 110kb, 약 120kb 내지 약 130kb, 약 130kb 내지 약 140kb, 약 140kb 내지 약 150kb, 약 150kb 내지 약 160kb, 약 160kb 내지 약 170kb, 약 170kb 내지 약 180kb, 약 180kb 내지 약 190kb, 또는 약 190kb 내지 약 200kb일 수 있다.

삽입 폴리뉴클레오티드 내의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌에서 삽입되거나 챠린징 표적 유전자좌로 삽입된 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 폴리펩티드를 암호화할 수 있거나, miRNA를 암호화할 수 있거나, 긴 비암호화 RNA를 암호화할 수 있거나, 예를 들어, 조절 서열, 프로모터 서열, 인핸서 서열, 전사 억제인자 결합 서열 또는 비단백질 암호화 서열의 결실을 포함하나, 단백질 암호화 서열의 결실을 포함하지 않는 대상으로 하는 임의의 조절 영역 또는 비암호화 영역을 포함할 수 있다. 또한, 삽입 폴리뉴클레오티드 내의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 유전자좌에서 삽입된 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 신경계, 골격계, 소화계, 순환계, 근육계, 호흡기계, 심혈관계, 림프계, 내분비계, 비뇨기계, 생식기계 또는 이들의 조합에서 발현된 단백질을 암호화할 수 있다.

삽입 폴리뉴클레오티드 내의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌 또는 챌린징 표적 유전자좌에서 통합된 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 암호화 서열의 유전자 변형을 포함할 수 있다. 이러한 유전자 변형은 암호화 서열의 결실 돌연변이 또는 두 암호화 서열의 융합을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

삽입 폴리뉴클레오티드 내의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 유전자좌에서 통합된 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 돌연변이 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일 실시 형태에서, 돌연변이 단백질은 결합 특성 변화, 국소성 변화, 발현 변화 및/또는 발현 패턴 변화를 특징으로 한다. 일 실시 형태에서, 삽입 폴리뉴클레오티드 내의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 유전자좌에서 통합된 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 질환 대립유전자를 포함한다. 이러한 경우에는, 질환 대립유전자는 우성 대립유전자일 수 있거나, 질환 대립유전자는 열성 대립유전자이다. 또한, 질환 대립유전자는 단일 뉴클레오티드 다형(SNP) 대립유전자를 포함할 수 있다. 돌연변이 단백질을 암호화하는 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 포유류, 비인간 포유류, 설치류, 마우스, 래트, 인간, 원숭이, 농업 포유류 또는 가축 포유류를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 유기체로부터 유래될 수 있는, 돌연변이 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

삽입 폴리뉴클레오티드 내의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 유전자좌에서 통합된 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 또한 예를 들어, 프로모터 서열, 인핸서 서열, 전사 억제인자 결합 서열 또는 전사 종결 서열을 비롯한 조절 서열을 포함할 수 있다. 구체적인 실시 형태에서, 삽입 폴리뉴클레오티드 내의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드 및/또는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌 또는 챠린징 표적 유전자좌에서 통합된 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 비단백질 암호화 서열의 결실을 갖지만, 단백질 암호화 서열의 결실을 포함하지 않는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일 실시 형태에서, 비단백질 암호화 서열의 결실은 조절 서열의 결실을 포함한다. 또 하나의 실시 형태에서, 조절 요소의 결실은 프로모터 서열의 결실을 포함한다. 일 실시 형태에서, 조절 요소의 결실은 인핸서 서열의 결실을 포함한다. 이러한 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드는 포유류, 비인간 포유류, 설치류, 마우스, 래트, 인간, 원숭이, 농업 포유류 또는 가축 포유류를 포함하나 이에 한정되지 않는 임의의 유기체로부터 유래될 수 있는, 돌연변이 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다.

kb 내지 약 250 kb, 약 250 kb 내지 약 300 kb, 약 300 kb 내지 약 350 kb, 또는 약 350 kb 내지 약 400 kb의 범위의 외인성 핵산 서열의 삽입; 상동 또는 이종상동성 핵산 서열을 포함하는 외인성 핵산 서열의 삽입; 인간 및 비인간 핵산 서열을 포함하는 키메라 핵산 서열의 삽입; 부위 특이적 재조합 효소 표적 서열이 플랭킹된 조건 대립유전자의 삽입; 포유류 세포에서 활성인 제3 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자 또는 선택 가능한 마커의 삽입; 또는 그 조합을 포함한다.

[0283] *III. 서열을 도입하여 트랜스제닉 동물을 생산하는 방법*

상술한 바와 같이, Y 염색체 상에 위치하거나, 챠린징 표적 유전자좌에 위치하거나, Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성이 저하된 하나 이상의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 표적화된 유전자 변형을 가능하게 하는 방법 및 조성물이 본 명세서에 제공된다. 또한, Y 염색체 또는 챠린징 표적 염색체 유전자좌 상의 서열에 대한 표적화된 유전자 변형 이외에도, 추가의 표적화된 유전자 변형이 다른 염색체 상에서 이루어질 수 있다는 것이 인식된다. 이러한 표적화된 유전자 변형을 가능하게 하는 이러한 시스템은 다양한 성분을 사용할 수 있으며, 참조하기 쉽게, 본 명세서에서 용어 "표적화된 게놈 통합 시스템"은 일반적으로 통합 이벤트에 요구되는 모든 성분(즉, 다양한 뉴클레아제 제제, 인식 부위, 삽입 DNA 폴리뉴클레오티드, 표적화 벡터, 표적 게놈 유전자좌 및 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드)을 포함한다.

[0285] 본 명세서에 제공된 방법은 표적화된 게놈 통합 시스템의 다양한 성분을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 구축물을 세포에 도입하는 것을 포함한다. "도입"은 서열이 세포 내부에 접근하도록 서열(폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드)을 세포에 제시하는 것을 의미한다. 본 명세서에 제공된 방법은 폴리뉴클레오티드가 적어도 하나의 세포 내부에 접근하는 것을 제외하고는, 표적화된 게놈 통합 시스템의 임의의 성분을 세포에 도입하는 특정 방법에 의존하지 않는다. 폴리뉴클레오티드를 다양한 세포 종류에 도입하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있으며, 안정한 트랜스펙션 방법, 일시적 트랜스펙션 방법 및 바이러스 매개 방법을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0286] 일부 실시 형태에서, 상기 방법 및 조성물에 사용되는 세포는 이들의 게놈에 안정하게 혼입된 DNA 구축물을 갖는다. "안정적으로 혼입된" 또는 "안정적으로 도입된"은 뉴클레오티드 서열이 세포의 게놈에 통합되고 그의 자손에 의해 유전될 수 있도록 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입하는 것을 의미한다. 모든 프로토콜은 DNA 구축물 또는 표적화된 게놈 통합 시스템의 다양한 성분의 안정적인 혼입을 위해 사용될 수 있다.

[0287] 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열을 세포에 도입하기 위한 프로토콜 및 트랜스펙션 프로토콜은 달라질 수 있다. 비제한적인 트랜스펙션 방법으로는 리포솜; 나노 입자; 인산칼슘(Graham et al. (1973). *Virology* 52 (2): 456–67, Bacchetti et al. (1977) *Proc Natl Acad Sci USA* 74 (4): 1590–4 and, Kriegler, M (1991). *Transfer and Expression: A Laboratory Manual*. New York: W. H. Freeman and Company. pp. 96–97); 덴드리머; 또는 양이온성 폴리머, 예컨대 DEAE-덱스트란 또는 폴리에틸렌이민의 사용을 포함하는 화학 기반 트랜스펙션 방법이 포함된다. 비화학적 방법으로는 일렉트로포레이션; 소노포레이션; 및 광학적 트랜스펙션(optical transfection)이 포함된다. 입자 기반 트랜스펙션은 유전자 총(gene gun), 자석 보조 트랜스펙션(magnet assisted transfection) (Bertram, J. (2006) *Current Pharmaceutical Biotechnology* 7, 277–28)의 사용을 포함한다. 바이러스 방법도 트랜스펙션에 사용될 수 있다.

[0288] 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 표적화 벡터, smallTVEC 또는 큰 표적화 벡터(LTVEC)와 동시에 세포로 도입된다. 대안적으로, 뉴클레아제 제제는 일정 기간에 걸쳐서 표적화 벡터, smallTVEC 또는 LTVEC와 별도로 도입된다. 일 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 표적화 벡터, smallTVEC 또는 LTVEC의 도입 전에 도입되지만, 다른 실시 형태에서, 뉴클레아제 제제는 표적화 벡터, smallTVEC 또는 LTVEC의 도입 후에 도입된다.

[0289] 비인간 동물은 본 명세서에 개시된 다양한 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 이러한 방법은 (1) 본 명세서에 개시된 방법을 사용하여, 하나 이상의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드를 비인간 동물의 만능성 세포의 Y 염색체의 표적 게놈 유전자좌에서 통합하여, Y 염색체의 표적화된 게놈 유전자좌에 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 변형 만능성 세포를 생성시키는 단계; (2) Y 염색체의 표적 게놈 유전자좌에 하나 이상의 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드를 갖는 유전자 변형 만능성 세포를 선택하는 단계; (3) 유전자 변형 만능성 세포를 상실기 이전 단계의 비인간 동물의 숙주 배아에 도입하는 단계; 및 (4) 유전자 변형 만능성 세포를 포함하는 숙주 배아를 대리모에 이식하여, 유전자 변형 만능성 세포로부터 유래된 F0 세대를 생성시키는 단계를 포함한다. 챠린징 표적 염색체 유전자좌를 표적으로 하는 유사한 방법이 사용될 수 있다. 비인간 동물은 비인간 포유류, 설치류, 마우스, 래트, 햄스터, 원숭이, 농업 포유류 또는 가축 포유류, 또는 어류 또는 조류일 수 있다.

[0290]

만능성 세포는 인간 ES 세포, 비인간 ES 세포, 설치류 ES 세포, 마우스 ES 세포, 래트 ES 세포, 햄스터 ES 세포, 원숭이 ES 세포, 농업 포유류 ES 세포 또는 가축 포유류 ES 세포일 수 있다. 다른 실시 형태에서, 만능성 세포는 포유류 세포, 인간 세포, 비인간 포유류 세포, 인간 만능성 세포, 인간 ES 세포, 인간 성인 줄기 세포, 발달 제한된 인간 전구 세포, 인간 iPS 세포, 인간 세포, 설치류 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 햄스터 세포이다. 일 실시 형태에서, 표적화된 유전자 변형은 Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시킨다. 이러한 경우, 만능성 세포는 XY ES 세포 또는 XY iPS 세포를 포함할 수 있다. F0 생식능력이 있는 XY 암컷 동물의 발생을 촉진시키기 위해 그러한 세포를 배양하는 방법은 본 명세서의 다른 곳에서 상세히 기술된다.

[0291]

핵이식 기술도 비인간 포유류 동물을 생산하는데 사용될 수 있다. 간략하게, 핵이식 방법은 (1) 난모세포를 제핵하는 단계; (2) 제핵된 난모세포와 결합할 도너 세포 또는 핵을 단리하는 단계; (3) 상기 세포 또는 핵을 제핵된 난모세포에 삽입하여, 재구성 세포를 형성하는 단계; (4) 재구성 세포를 동물의 자궁에 이식하여 배아를 생성하는 단계; 및 (5) 배아를 성장시키는 단계를 포함한다. 이러한 방법에서, 난모세포는 살아있는 동물의 난관 및/또는 난소로부터도 단리될 수 있지만, 일반적으로 사망한 동물로부터 회수된다. 난모세포는 제핵 전에 당업자에게 공지된 다양한 배지에서 성숙될 수 있다. 난모세포의 제핵은 당해 기술 분야의 숙련가에게 공지된 다수의 방법으로 행해질 수 있다. 도너 세포 또는 핵을 제핵된 난모세포로 삽입하여, 재구성 세포를 형성하는 것은 통상 융합 전에 투명대 하에서의 도너 세포의 미량주입에 의해서이다. 융합은 접촉/융합면(전기 융합)에 걸쳐서 DC 전기 펄스를 인가함으로써, 폴리에틸렌 글리콜과 같은 융합 촉진 화학 물질에 세포를 노출시킴으로써, 또는 센다이 바이러스와 같은 불활성화 바이러스에 의해 유도될 수 있다. 재구성 세포는 전형적으로 핵 공여자 및 수용자 난모세포의 융합 전에, 융합 중에 및/또는 융합 후에 전기적 및/또는 비전기적 수단에 의해 활성화된다. 활성화 방법에는 전기 펄스, 화학적으로 유도된 충격, 정자 진입, 난모세포의 2가 양이온 레벨 증가, 난모세포의 세포 단백질(키나아제 저해제를 통한)의 인산화 감소가 포함된다. 활성화된 재구성 세포 또는 배아는 전형적으로 당업자에게 주지된 배지에서 배양된 다음에, 동물의 자궁에 이식된다. 예를 들어, 각각 본 명세서에 참조로 포함되는, US20080092249, WO/1999/005266A2, US20040177390, WO/2008/017234A1 및 미국 특허 제7,612,250호를 참조한다.

[0292]

(a) 본 명세서에 기재된 다양한 방법을 사용하여, 비인간 동물의 Y 염색체 상의 표적화된 게놈 유전자좌를 원핵 세포에서 변형시키는 단계; (b) 표적화된 게놈 유전자좌에 유전자 변형을 포함하는 변형된 원핵 세포를 선택하는 단계; (c) 변형된 원핵 세포의 게놈으로부터 유전자 변형 표적화 벡터를 단리하는 단계; (d) 유전자 변형 표적화 벡터를 비인간 동물의 만능성 세포에 도입하여, Y 염색체의 표적화된 게놈 유전자좌에 삽입 핵산을 포함하는 유전자 변형 만능성 세포를 생성시키는 단계; (e) 유전자 변형 만능성 세포를 선택하는 단계; (f) 유전자 변형 만능성 세포를 상실기 이전 단계의 비인간 동물의 숙주 배아에 도입하는 단계; 및 (g) 유전자 변형 만능성 세포를 포함하는 숙주 배아를 대리모에 이식하여, 유전자 변형 만능성 세포로부터 유래되는 F0 세대를 생성시키는 단계를 포함하는, 생식세포계열에 본 명세서에 기재된 하나 이상의 유전자 변형을 포함하는 비인간 동물을 생산하는 다른 방법이 제공된다. 이러한 방법에서, 표적화 벡터는 큰 표적화 벡터 또는 smallTVEC를 포함할 수 있다. 챠린징 표적 유전자좌를 표적으로 하는 유사한 방법이 사용될 수 있다. 비인간 동물은 비인간 포유류, 설치류, 마우스, 래트, 햄스터, 원숭이, 농업 포유류 또는 가축 포유류일 수 있다. 만능성 세포는 인간 ES 세포, 비인간 ES 세포, 설치류 ES 세포, 마우스 ES 세포, 래트 ES 세포, 햄스터 ES 세포, 원숭이 ES 세포, 농업 포유류 ES 세포 또는 가축 포유류 ES 세포일 수 있다. 다른 실시 형태에서, 만능성 세포는 포유류 세포, 인간 세포, 비인간 포유류 세포, 인간 만능성 세포, 인간 ES 세포, 인간 성인 줄기 세포, 발달 제한된 인간 전구 세포, 인간 iPS 세포, 인간 세포, 설치류 세포, 래트 세포, 마우스 세포, 햄스터 세포이다. 일 실시 형태에서, 표적화된 유전자 변형은 Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시킨다. 이러한 경우, 만능성 세포는 XY ES 세포 또는 XY iPS 세포를 포함할 수 있다. F0 생식능력이 있는 XY 암컷 동물의 발생을 촉진시키기 위해 그러한 세포를 배양하는 방법은 본 명세서의 다른 곳에서 상세히 기술된다.

[0293]

다른 방법에서, 단리 단계(c)는 (c1) 유전자 변형 표적화 벡터(즉, 유전자 변형 LTVEC)를 선형화(linearizing)하는 단계를 추가로 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 도입 단계(d)는 (d1) 본 명세서에 기재된 뉴클레아제 제제를 만능성 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함한다. 일 실시 형태에서, 선택 단계(b) 및/또는 (e)는 본 명세서에 기재된 선택가능한 제제를 원핵 세포 또는 만능성 세포에 적용하여 행해진다. 일 실시 형태에서, 선택 단계(b) 및/또는 (e)는 본 명세서에 기재된 대립유전자의 변형(MOA) 분석을 통해 행해진다.

[0294]

원핵 세포에서 세균 상동 재조합(BHR)을 통해 동물 세포의 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 추가의 방법이 제공되며, (a) Y 염색체의 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 원핵 세포를 제공하는 단계; (b) 제1 상류 상동성 암 및 제1 하류 상동성 암이 플랭킹된 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 표적화 벡터(상술한 바와 같음)를 원핵

세포에 도입하고(여기서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 포유류 게놈 영역을 포함함), 제1 인식 부위 또는 그 부근에 닉 또는 이중 가닥 절단을 생성시키는 뉴클레아제 제제를 원핵 세포에 도입하는 단계, 및 (c) 염색체의 표적 게놈 유전자좌에 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 표적화된 원핵 세포를 선택하는 단계 - 여기서, 원핵 세포는 BHR을 매개하는 재조합 효소를 발현시킬 수 있음 - 를 포함한다. 챠린징 표적 유전자좌를 표적으로 하는 유사한 방법이 사용될 수 있다. 단계(a) 내지 (c)는 본 명세서에 개시된 바와 같이 연속적으로 반복되어, 표적화된 게놈 유전자좌의 다수의 삽입 폴리뉴클레오티드를 원핵 세포에 도입할 수 있다. 표적화된 게놈 유전자좌가 원핵 세포로 "구축"되면, Y 염색체의 변형된 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 표적화 벡터가 원핵 세포로부터 단리되어, 포유류 세포 내의 Y 염색체의 표적 게놈 유전자좌로 도입될 수 있다. 그 다음에, Y 염색체의 변형된 게놈 유전자좌를 포함하는 포유류 세포는 비인간 트랜스제닉 동물로 될 수 있다.

[0295] 원핵 세포에서 세균 상동 재조합(BHR)을 통해 동물 세포의 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 추가의 방법이 제공되며, (a) Y 염색체의 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 원핵 세포를 제공하는 단계; (b) 제1 상류 상동성 암 및 제1 하류 상동성 암이 플랭킹된 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 표적화 벡터(상술한 바와 같음)를 원핵 세포에 도입하는 단계 - 여기서, 삽입 폴리뉴클레오티드는 포유류 게놈 영역을 포함함 -, 및 (c) 염색체의 표적 게놈 유전자좌에 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 표적화된 원핵 세포를 선택하는 단계 - 여기서, 원핵 세포는 BHR을 매개하는 재조합 효소를 발현시킬 수 있음 - 를 포함한다. 챠린징 표적 유전자좌를 표적으로 하는 유사한 방법이 사용될 수 있다. 단계(a) 내지 (c)는 본 명세서에 개시된 바와 같이 연속적으로 반복되어, 표적화된 게놈 유전자좌의 다수의 삽입 폴리뉴클레오티드를 원핵 세포에 도입할 수 있다. 표적화된 게놈 유전자좌가 원핵 세포로 "구축"되면, Y 염색체의 변형된 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 표적화 벡터가 원핵 세포로부터 단리되어, 포유류 세포 내의 Y 염색체의 표적 게놈 유전자좌로 도입될 수 있다. 그 다음에, Y 염색체의 변형된 게놈 유전자좌를 포함하는 포유류 세포는 비인간 트랜스제닉 동물로 될 수 있다.

[0296] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 표적 게놈 유전자좌의 다양한 유전자 변형은 벨로시진(VELOCIGENE)® 유전자 공학 기술을 사용하여 세균 인공 염색체(BAC) DNA로부터 유래된 LTVEC를 사용한 세균 세포에서의 일련의 상동 재조합 반응(BHR)에 의해 행해질 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,586,251호 및 문헌[Valenzuela, D. M. et al. (2003), High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis, *Nature Biotechnology* 21(6): 652-659], 그 전체 내용이 참조로 본 명세서에 포함됨).

[0297] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 다양한 유전자 변형을 포함하는 표적화된 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)는 벨로시마우스(VELOCIMOUSE)® 방법을 통해, 삽입 도너 세포로서 사용되며, 대응하는 유기체 유래의 상실기 이전 단계의 배아, 예를 들어 8세포기 마우스 배아로 도입된다(예를 들어, 모두 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는, US 7,576,259, US 7,659,442, US 7,294,754 및 US 2008-0078000 A1). 유전자 변형 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)를 포함하는 비인간 동물 배아는 포배기까지 배양된 다음에, 대리모에 이식되어, F0 세대가 생산된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 다양한 유전자 변형을 포함하는 표적화된 포유류 ES 세포는 포배기 배아에 도입된다. Y 염색체의 유전자 변형 게놈 유전자좌를 갖는 비인간 동물은 본 명세서에 기재된 대립유전자의 변형(MOA) 분석을 통해 동정될 수 있다. 유전자 변형 XY 만능성 및/또는 전능성 세포(즉, XY ES 세포 또는 XY iPS 세포)로부터 유래된 생산된 F0 세대 비인간 동물을 야생형 비인간 동물과 교배시켜 F1 세대 자손을 얻는다. 특정 프라이머 및/또는 프로브로 유전자형을 결정한 후에, 유전자 변형 게놈 유전자좌에 대하여 이형접합성인 F1 비인간 동물을 서로 교배시켜, Y 염색체의 유전자 변형 게놈 유전자좌 또는 유전자 변형 챠린징 표적 유전자좌에 동형접합성인 F2 세대 비인간 동물 자손을 생산시킨다.

#### IV. 세포 및 발현 카세트

[0299] 본 명세서에 기재된 다양한 방법은 세포의 Y 염색체 또는 챠린징 표적 유전자좌에 대한 게놈 유전자좌 표적화 시스템을 사용한다. 이러한 세포는 원핵 세포, 예컨대 대장균(*E. coli*)을 비롯한 세균 세포, 또는 진핵 세포, 예컨대 효모, 곤충, 양서류, 식물 또는 포유류 세포(마우스 세포, 래트 세포, 토끼 세포, 돼지 세포, 소 세포, 사슴 세포, 양 세포, 염소 세포, 닭 세포, 고양이 세포, 개 세포, 흰족제비 세포, 영장류(예를 들어, 마모셋, 붉은털 원숭이) 세포 등, 및 가축 포유류 유래의 세포 또는 농업 포유류 유래의 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않음)를 포함한다. 일부 세포는 비인간, 특히 비인간 포유류 세포이다. 일부 실시 형태에서, 적절한 유전자 변형가능한 만능성 세포가 용이하게 입수 가능하지 않는 포유류의 경우, 예를 들어 Oct3/4, Sox2, KLF4, Myc, Nanog, LIN28 및 Glis1을 포함하나 이에 한정되지 않는 만능성 유도 인자의 조합을 체세포에 도입하는 것을 통해, 체세포를 만능성 세포에 다시 프로그래밍하기 위한 다른 방법이 사용된다. 이러한 방법에서, 세포는 또한 포유류 세포, 인간 세포, 비인간 포유류 세포, 비인간 세포, 설치류, 래트, 마우스, 햄스터 유래의 세포, 섬유

아세포 또는 임의의 다른 숙주 세포일 수 있다. 다른 실시 형태에서, 세포는 만능성 세포, 유도 만능성 줄기(iPS) 세포, 비인간 배아 줄기(ES) 세포이다. 이러한 세포는 예를 들어, 유도 만능성 줄기(iPS) 세포, 마우스 배아 줄기(ES) 세포, 래트 배아 줄기(ES) 세포, 인간 배아 줄기(ES) 세포 또는 발달 제한된 인간 전구 세포, 설치류 배아 줄기(ES) 세포, 마우스 배아 줄기(ES) 세포 또는 래트 배아 줄기(ES) 세포를 비롯한 만능성 세포를 포함한다.

[0300]

용어 "폴리뉴클레오티드", "폴리뉴클레오티드 서열", "핵산 서열" 및 "핵산 단편"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 이를 용어는 뉴클레오티드 서열 등을 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 임의로 합성, 비천연 또는 변성 뉴클레오티드 염기를 포함하는 단일 또는 이중 가닥인 RNA 또는 DNA 폴리머일 수 있다. DNA 폴리머 형태의 폴리뉴클레오티드는 cDNA, 계놈 DNA, 합성 DNA 또는 이들의 혼합물의 하나 이상의 세그먼트로 구성될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 천연 분자 및 합성 유사체를 포함하는 데옥시리보뉴클레오티드 및 리보뉴클레오티드, 및 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 본 명세서에 제공된 폴리뉴클레오티드는 또한 단일 가닥 형태, 이중 가닥 형태, 헤어핀, 스템-앤드-루프 구조(stem-and-loop structure) 등을 포함하지만 이에 한정되지 않는 모든 형태의 서열을 포함한다.

[0301]

또한 재조합 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 용어 "재조합 폴리뉴클레오티드" 및 "재조합 DNA 구축물"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 재조합 구축물은 핵산 서열의 인공 또는 이종 조합, 예를 들어 천연에서 함께 발견되지 않는 조절 서열 및 암호화 서열을 포함한다. 다른 실시 형태에서, 재조합 구축물은 상이한 공급원으로부터 유래된 조절 서열 및 암호화 서열, 또는 동일한 공급원으로부터 유래되나 천연에서 발견되는 것과 상이한 방식으로 배열된 조절 서열 및 암호화 서열을 포함할 수 있다. 이러한 구축물은 그 자체로 사용될 수 있거나 벡터와 함께 사용될 수 있다. 벡터가 사용되면, 벡터의 선택은 당해 기술 분야의 숙련가에게 주지된 바와 같이 숙주 세포를 형질전환시키는데 사용되는 방법에 의존한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터가 사용될 수 있다. 스크리닝은 그 중에서도 특히, DNA의 서던 분석, mRNA 발현의 노던 분석, 단백질 발현의 면역 블로팅 분석 또는 표현형 분석 등으로 수행될 수 있다.

[0302]

구체적인 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 하나 이상의 성분은 만능성 및/또는 전능성 세포의 발현을 위한 발현 카세트에 제공될 수 있다. 카세트는 본 명세서에 제공된 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 5' 및 3' 조절 서열을 포함할 수 있다. "작동가능하게 연결된"은 2개 이상의 요소 간의 기능적 연결을 의미한다. 예를 들어, 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드와 조절 서열(즉, 프로모터) 사이의 작동가능한 연결은 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 가능하게 하는 기능적 연결이다. 작동가능하게 연결된 요소는 인접하거나 인접하지 않을 수 있다. 2개의 단백질 암호화 영역의 결합을 언급하는데 사용되는 경우, 작동가능하게 연결된다는 것은 암호화 영역이 동일한 리딩 프레임에 있음을 의미한다. 다른 예에서, 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 적절한 전사 조절을 유지하기 위해 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 사일렌서(silencer) 서열 등)에 작동가능하게 연결될 수 있다. 카세트는 추가로, ES 세포에 동시 도입되는 적어도 하나의 대상으로 하는 추가의 폴리뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 대안적으로, 대상으로 하는 추가의 폴리뉴클레오티드는 다수의 발현 카세트에 제공될 수 있다. 이러한 발현 카세트는 조절 영역의 전사 조절 하에 재조합 폴리뉴클레오티드를 삽입하기 위한 다수의 제한 부위 및/또는 재조합 부위를 갖고 있다. 발현 카세트는 추가로 선택 표지 유전자를 포함할 수 있다.

[0303]

발현 카세트는 5'-3' 전사 방향으로, 전사 및 번역 개시 영역(즉, 프로모터), 본 명세서에 제공된 재조합 폴리뉴클레오티드, 및 대상으로 하는 숙주 세포 또는 포유류 세포에서 기능적인 전사 및 번역 종결 영역(즉, 종결 영역)을 포함할 수 있다. 조절 영역(즉, 프로모터, 전사 조절 영역, 및 전사 및 번역 종결 영역) 및/또는 본 명세서에 제공된 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포 또는 서로에 대하여 고유하거나/유사할 수 있다. 대안적으로, 조절 영역 및/또는 본 명세서에 제공된 폴리뉴클레오티드는 숙주 세포 또는 서로에 대하여 이종성일 수 있다. 예를 들어, 이종 폴리뉴클레오티드에 작동가능하게 연결된 프로모터는 폴리뉴클레오티드가 유래된 종과 상이한 종으로부터 유래되거나, 동일한/유사한 종으로부터 유래한 경우, 하나 또는 둘 다가 실질적으로 그들의 원래 형태 및/또는 계놈 유전자좌로부터 변형되거나, 프로모터가 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드의 천연 프로모터가 아니다. 대안적으로, 조절 영역 및/또는 본 명세서에 제공된 재조합 폴리뉴클레오티드는 전적으로 합성될 수 있다.

[0304]

종결 영역은 전사 개시 영역과 함께 고유하거나, 작동가능하게 연결된 재조합 폴리뉴클레오티드와 함께 고유하거나, 숙주 세포와 함께 고유하거나, 프로모터, 재조합 폴리뉴클레오티드, 숙주 세포 또는 이들의 임의의 조합에 대한 다른 공급원(즉, 외래 또는 이종)으로부터 유래될 수 있다.

- [0305] 발현 카세트를 제조함에 있어서, DNA 서열을 적절한 배향으로 제공하도록 다양한 DNA 단편을 조작할 수 있다. 이러한 목적으로, DNA 단편을 결합하는데 어댑터 또는 링커가 사용될 수 있거나, 편리한 제한 부위, 불필요한 DNA의 제거, 제한 부위의 제거 등을 제공하는데 다른 조작이 포함될 수 있다. 이러한 목적으로, 시험관내 돌연변이 유발, 프라이머 수복, 제한, 어닐링, 재치환, 예를 들어, 전이 및 염기전환(transversion)이 포함될 수 있다.
- [0306] 다수의 프로모터가 본 명세서에 제공된 발현 카세트에 사용될 수 있다. 프로모터는 원하는 결과에 따라 선택될 수 있다. 대상으로 하는 폴리뉴클레오티드의 발현의 시기, 위치 및/또는 레벨을 조절하기 위해 발현 카세트 내의 다양한 프로모터를 사용함으로써 다양한 용도를 강화할 수 있음이 인식된다. 그러한 발현 구축물은 또한 필요에 따라, 프로모터 조절 영역(예를 들어, 유도성, 구성적, 환경적으로 또는 발생학적으로 조절된, 세포 또는 조직 특이적/선택적 발현을 부여하는 것), 전사 개시 부위, 리보솜 결합 부위, RNA 프로세싱 신호, 전사 종결 부위 및/또는 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다.
- [0307] 비제한적인 실시 형태는 하기를 포함한다:
- [0308] 1. (a) Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 비인간 포유류 XY 배아 줄기(ES) 세포; 및
- [0309] (b) 배양 하의 비인간 포유류 ES 세포를 유지하기에 적합한 기본 배지 및 보충물을 포함하는 배지 - 여기서, 상기 배지는 하나 이상의 하기 특성, 즉, 삼투압 약 200 mOsm/kg 내지 약 329 mOsm/kg 미만; 전도도 약 11 mS/cm 내지 약 13 mS/cm; 알칼리 금속과 할로겐화물의 염의 농도 약 50 mM 내지 약 110 mM; 탄산염의 농도 약 17 mM 내지 약 30 mM; 알칼리 금속 할로겐화물 염과 탄산염의 총 농도 약 85 mM 내지 약 130 mM; 및/또는 이들 중 임의의 2개 이상의 조합을 나타냄 - 를 포함하는 시험관내 배양물.
- [0310] 2. 비인간 포유류 XY ES 세포가 설치류로부터 유래되는 청구항 1의 시험관내 배양물.
- [0311] 3. 설치류가 마우스인 청구항 2의 시험관내 배양물.
- [0312] 4. 마우스 XY ES 세포가 VGF1 마우스 ES 세포인 실시 형태 3의 시험관내 배양물.
- [0313] 5. 설치류가 래트 또는 햄스터인 실시 형태 2의 시험관내 배양물.
- [0314] 6. Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하하는 Sry 유전자의 유전자 변형에 기인하는 실시 형태 1 내지 5 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0315] 7. Sry 유전자의 유전자 변형이 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실, 하나 이상의 뉴클레오티드의 치환, 녹아웃, 녹인, 내인성 핵산 서열의 이종 핵산 서열로의 치환, 또는 그 조합을 포함하는 실시 형태 6의 시험관내 배양물.
- [0316] 8. 비인간 포유류 ES 세포가 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 표적화된 유전자 변형을 포함하는 실시 형태 1 내지 7 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0317] 9. 표적화된 유전자 변형이 삽입, 결실, 녹아웃, 녹인, 점돌연변이 또는 그 조합을 포함하는 실시 형태 8의 시험관내 배양물.
- [0318] 10. 표적화된 유전자 변형이 이종 폴리뉴클레오티드의 XY ES 세포 계놈으로의 적어도 하나의 삽입을 포함하는 실시 형태 8의 시험관내 배양물.
- [0319] 11. 표적화된 유전자 변형이 상염색체 상에 일어나는 실시 형태 8 내지 10 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0320] 12. 기본 배지가  $50 \pm 5$  mM NaCl,  $26 \pm 5$  mM 탄산염, 및  $218 \pm 22$  mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0321] 13. 기본 배지가 약 3 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중탄산나트륨, 및 218 mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0322] 14. 기본 배지가  $87 \pm 5$  mM NaCl,  $18 \pm 5$  mM 탄산염, 및  $261 \pm 26$  mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0323] 15. 기본 배지가 약 5.1 mg/mL NaCl, 1.5 mg/mL 중탄산나트륨, 및 261 mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나의 시험관내 배양물.

- [0324] 16. 기본 배지가  $110 \pm 5$  mM NaCl,  $18 \pm 5$  mM 탄산염, 및  $294 \pm 29$  mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0325] 17. 기본 배지가 약  $6.4$  mg/mL NaCl,  $1.5$  mg/mL 중탄산나트륨, 및  $294$  mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0326] 18. 기본 배지가  $87 \pm 5$  mM NaCl,  $26 \pm 5$  mM 탄산염, 및  $270 \pm 27$  mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0327] 19. 기본 배지가 약  $5.1$  mg/mL NaCl,  $2.2$  mg/mL 중탄산나트륨, 및  $270$  mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0328] 20. 기본 배지가  $87 \pm 5$  mM NaCl,  $26 \pm 5$  mM 탄산염,  $86 \pm 5$  mM 글루코스, 및  $322 \pm 32$  mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0329] 21. 기본 배지가 약  $5.1$  mg/mL NaCl,  $2.2$  mg/mL 중탄산나트륨,  $15.5$  mg/mL 글루코스, 및  $322$  mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 1 내지 11 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0330] 22. 비인간 포유류 XY ES 세포를 숙주 배아에 도입하여, 숙주 배아의 임신 후에, F0 비인간 포유류 중  $80\%$  이상이 XY 암컷으로, 성숙기에 이를 때에 F0 XY 암컷 비인간 포유류가 생식능력을 나타내는 실시 형태 1 내지 21 중 어느 하나의 시험관내 배양물.
- [0331] 23. (a) Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성을 저하시키는 변형을 갖는 도너 비인간 포유류 XY 배아 줄기(ES) 세포를 배양 하의 비인간 포유류 ES 세포를 유지하기에 적합한 기본 배지 및 보충물을 포함하는 배지에서 배양하는 단계 - 여기서, 상기 배지는 하나 이상의 하기 특성, 즉, 삼투압 약  $200$  mOsm/kg 내지 약  $329$  mOsm/kg 미만; 전도도 약  $11$  mS/cm 내지 약  $13$  mS/cm; 알칼리 금속과 할로겐화물의 염의 농도 약  $50$  mM 내지 약  $110$  mM; 탄산염의 농도 약  $17$  mM 내지 약  $30$  mM; 알칼리 금속 할로겐화물 염과 탄산염의 총 농도 약  $85$  mM 내지 약  $130$  mM; 및/또는 이들 중 임의의 2개 이상의 조합을 나타냄 -;
- [0332] (b) 도너 XY 비인간 포유류 ES 세포를 숙주 배아로 도입하는 단계;
- [0333] (c) 숙주 배아를 임신시키는 단계; 및
- [0334] (d) 성숙기에 이를 때에 생식능력이 있는 F0 XY 암컷 비인간 포유류를 얻는 단계를 포함하는, F0 세대의 생식능력이 있는 XY 암컷 비인간 포유류의 생산 방법.
- [0335] 24. 비인간 포유류 XY ES 세포가 설치류로부터 유래되는 실시 형태 23의 방법.
- [0336] 25. 설치류가 마우스인 실시 형태 24의 방법.
- [0337] 26. 마우스 XY ES 세포가 VGF1 마우스 ES 세포인 실시 형태 25의 방법.
- [0338] 27. 설치류가 래트 또는 햄스터인 실시 형태 24의 방법.
- [0339] 28. Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성 저하가 Sry 유전자의 유전자 변형에 기인하는 실시 형태 23 내지 27 중 어느 하나의 방법.
- [0340] 29. Sry 유전자의 유전자 변형이 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실, 하나 이상의 뉴클레오티드의 치환, 녹아웃, 녹인, 내인성 핵산 서열의 이종 핵산 서열로의 치환, 또는 그 조합을 포함하는 실시 형태 28의 방법.
- [0341] 30. 비인간 포유류 ES 세포가 1개, 2개, 3개 또는 그 이상의 표적화된 유전자 변형을 포함하는 실시 형태 23 내지 29 중 어느 하나의 방법.
- [0342] 31. 표적화된 유전자 변형이 삽입, 결실, 녹아웃, 녹인, 점돌연변이 또는 그 조합을 포함하는 실시 형태 30의 방법.
- [0343] 32. 표적화된 유전자 변형이 이종 폴리뉴클레오티드의 XY ES 세포 계놈으로의 적어도 하나의 삽입을 포함하는 실시 형태 30의 방법.
- [0344] 33. 표적화된 유전자 변형이 상염색체 상에 일어나는 실시 형태 30 내지 32 중 어느 하나의 방법.
- [0345] 34. 기본 배지가  $50 \pm 5$  mM NaCl,  $26 \pm 5$  mM 탄산염, 및  $218 \pm 22$  mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 23 내

지 33 중 어느 하나의 방법.

[0346] 35. 기본 배지가 약 3 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중탄산나트륨, 및 218 mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 23 내지 33 중 어느 하나의 방법.

[0347] 36. 기본 배지가 87 ± 5 mM NaCl, 18 ± 5 mM 탄산염, 및 261 ± 26 mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 23 내지 33 중 어느 하나의 방법.

[0348] 37. 기본 배지가 약 5.1 mg/mL NaCl, 1.5 mg/mL 중탄산나트륨, 및 261 mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 23 내지 33 중 어느 하나의 방법.

[0349] 38. 기본 배지가 110 ± 5 mM NaCl, 18 ± 5 mM 탄산염, 및 294 ± 29 mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 23 내지 33 중 어느 하나의 방법.

[0350] 39. 기본 배지가 약 6.4 mg/mL NaCl, 1.5 mg/mL 중탄산나트륨, 및 294 mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 23 내지 33 중 어느 하나의 방법.

[0351] 40. 기본 배지가 87 ± 5 mM NaCl, 26 ± 5 mM 탄산염, 및 270 ± 27 mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 23 내지 33 중 어느 하나의 방법.

[0352] 41. 기본 배지가 약 5.1 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중탄산나트륨, 및 270 mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 23 내지 33 중 어느 하나의 방법.

[0353] 42. 기본 배지가 87 ± 5 mM NaCl, 26 ± 5 mM 탄산염, 86 ± 5 mM 글루코스, 및 322 ± 32 mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 23 내지 33 중 어느 하나의 방법.

[0354] 43. 기본 배지가 약 5.1 mg/mL NaCl, 2.2 mg/mL 중탄산나트륨, 15.5 mg/mL 글루코스, 및 322 mOsm/kg을 나타내는 실시 형태 23 내지 33 중 어느 하나의 방법.

[0355] 44. (a) Sry 단백질의 레벨 및/또는 활성이 저하된 F0 XY 생식능력이 있는 암컷을 동일한 ES 세포 클론으로부터 유래되는 코호트 클론 동포종, F0 XY 수컷 비인간 포유류와 교배시키는 단계 - 여기서, F0 XY 생식능력이 있는 암컷 비인간 포유류 및 F0 XY 수컷 비인간 포유류는 각각 유전자 돌연변이에 대하여 이형접합성임 -; 및 (b) 유전자 변형에 대하여 동형접합성인 F1 자손 마우스를 얻는 단계를 포함하는, F1 세대의 표적화된 유전자 돌연변이에 대하여 동형접합성인 트랜스제닉 비인간 포유류를 생산하는 방법.

[0356] 45. (a) 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위를 포함하는 Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌를 포함하는 세포를 제공하는 단계, (b) (i) 뉴클레아제 제제 - 여기서, 뉴클레아제 제제는 제1 인식 부위에서 넉 또는 이중 가닥 절단을 유도함 -; 및 (ii) 제1 인식 부위에 충분히 근접하여 위치하고 있는 제1 및 제2 표적 부위에 대응하는 제1 및 제2 상동성 암이 플랭킹된 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 표적화 벡터를 세포로 도입하는 단계 - 여기서, 제1 상동성 암과 제2 상동성 암의 합계는 적어도 4kb 이상 150 kb 미만임 -; 및 (c) 표적 계놈 유전자좌에서 통합되는 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 이의 계놈에 포함하는 적어도 하나의 세포를 동정하는 단계를 포함하는, 세포의 Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌를 변형시키는 방법.

[0357] 46. (a) 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위를 포함하는 Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌를 포함하는 세포를 제공하는 단계,

[0358] (b) 제1 및 제2 표적 부위에 대응하는 제1 및 제2 상동성 암이 플랭킹된 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 표적화 벡터를 세포로 도입하는 단계 - 여기서, 제1 상동성 암과 제2 상동성 암의 합계는 적어도 4kb 이상 150 kb 미만임 -; 및

[0359] (c) 표적 계놈 유전자좌에서 통합되는 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 이의 계놈에 포함하는 적어도 하나의 세포를 동정하는 단계를 포함하는, 세포의 Y 염색체 상의 표적 계놈 유전자좌를 변형시키는 방법.

[0360] 47. 상기 세포가 포유류 세포인 실시 형태 45 또는 46의 방법.

[0361] 48. 포유류 세포가 비인간 세포인 실시 형태 47의 방법.

[0362] 49. 포유류 세포가 설치류로부터 유래되는 실시 형태 47의 방법.

[0363] 50. 설치류가 래트, 마우스 또는 햄스터인 실시 형태 49의 방법.

[0364] 51. 상기 세포가 만능성 세포인 실시 형태 45 내지 50 중 어느 하나의 방법.

- [0365] 52. 포유류 세포가 유도 만능성 줄기(iPS) 세포인 실시 형태 45 내지 50 중 어느 하나의 방법.
- [0366] 53. 만능성 세포가 비인간 배아 줄기(ES) 세포인 실시 형태 51의 방법.
- [0367] 54. 만능성 세포가 설치류 배아 줄기(ES) 세포, 마우스 배아 줄기(ES) 세포 또는 래트 배아 줄기(ES) 세포인 실시 형태 51의 방법.
- [0368] 55. 뉴클레아제 제제가 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA인 실시 형태 45 및 47 내지 54 중 어느 하나의 방법.
- [0369] 56. 뉴클레아제 제제가 징크 평거 뉴클레아제(ZFN)인 실시 형태 45 및 47 내지 54 중 어느 하나의 방법.
- [0370] 57. 뉴클레아제 제제가 전사 활성화 인자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)인 실시 형태 45 및 47 내지 54 중 어느 하나의 방법.
- [0371] 58. 뉴클레아제 제제가 메가뉴클레아제인 실시 형태 45 및 47 내지 54 중 어느 하나의 방법.
- [0372] 59. 뉴클레아제 제제가 CRISPR RNA 가이드 Cas9 엔도뉴클레아제인 실시 형태 45 및 47 내지 54 중 어느 하나의 방법.
- [0373] 60. Y 염색체를 적어도 10 kb의 핵산 서열을 포함하는 큰 표적화 벡터(LTVEC)의 존재 하에 Cas 단백질 및 CRISPR RNA에 노출시키는 단계 - 여기서, Cas 단백질, CRISPR RNA 및 LTVEC에 노출시킨 후에, Y 염색체는 적어도 10 kb의 핵산 서열을 포함하도록 변형됨 - 를 포함하는, Y 염색체를 변형시키는 방법.
- [0374] 61. LTVEC가 적어도 20 kb, 적어도 30 kb, 적어도 40 kb, 적어도 50 kb, 적어도 60 kb, 적어도 70 kb, 적어도 80 kb, 또는 적어도 90 kb의 핵산 서열을 포함하는 실시 형태 60의 방법.
- [0375] 62. LTVEC가 적어도 100 kb, 적어도 150 kb, 또는 적어도 200 kb의 핵산 서열을 포함하는 실시 형태 60의 방법.
- [0376] 63. (a) Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 포유류 세포를 제공하는 단계 - 여기서, 표적 게놈 유전자좌는 가이드 RNA (gRNA) 표적 서열을 포함함 -; (b) 포유류 세포로 (i) 표적 게놈 유전자좌에 상동성인 표적화 암이 플랭킹된 제1 핵산을 포함하는 큰 표적화 벡터(LTVEC) - 여기서, LTVEC는 적어도 10 kb임 -; (ii) Cas 단백질을 암호화하는 제2 핵산에 작동가능하게 연결된 제1 프로모터를 포함하는 제1 발현 구축물, 및 (iii) gRNA 표적 서열에 혼성화된 뉴클레오티드 서열 및 트랜스 활성화 CRISPR RNA(tracrRNA)를 포함하는 가이드 RNA(gRNA)를 암호화하는 제3 핵산에 작동가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 제2 발현 구축물을 도입하는 단계 - 여기서, 제1 및 제2 프로모터는 포유류 세포에서 활발함 -; 및 (c) Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌에 표적화된 유전자 변형을 포함하는 변형된 포유류 세포를 동정하는 단계를 포함하는, Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 방법.
- [0377] 64. LTVEC가 적어도 15 kb, 적어도 20 kb, 적어도 30 kb, 적어도 40 kb, 적어도 50 kb, 적어도 60 kb, 적어도 70 kb, 적어도 80 kb, 또는 적어도 90 kb인 실시 형태 63의 방법.
- [0378] 65. LTVEC가 적어도 100 kb, 적어도 150 kb, 또는 적어도 200 kb인 실시 형태 63의 방법.
- [0379] 66. 포유류 세포가 비인간 포유류 세포인 실시 형태 63의 방법.
- [0380] 67. 포유류 세포가 섬유아세포인 실시 형태 63의 방법.
- [0381] 68. 포유류 세포가 설치류로부터 유래되는 실시 형태 63의 방법.
- [0382] 69. 설치류가 래트, 마우스 또는 햄스터인 실시 형태 68의 방법.
- [0383] 70. 포유류 세포가 만능성 세포인 실시 형태 63의 방법.
- [0384] 71. 만능성 세포가 유도 만능성 줄기(iPS) 세포인 실시 형태 70의 방법.
- [0385] 72. 만능성 세포가 마우스 배아 줄기(ES) 세포 또는 래트 배아 줄기(ES) 세포인 실시 형태 70의 방법.
- [0386] 73. 만능성 세포가 발달 제한된 인간 전구 세포인 실시 형태 70의 방법.
- [0387] 74. Cas 단백질이 Cas9 단백질인 실시 형태 63의 방법.
- [0388] 75. gRNA 표적 서열에 바로 PAM 서열이 플랭킹되는 실시 형태 74 방법.

- [0389] 76. LTVEC의 5' 상동성 암과 3' 상동성 암의 합계가 약 10 kb 내지 약 150 kb인 실시 형태 63의 방법.
- [0390] 77. LTVEC의 5' 상동성 암과 3' 상동성 암의 합계가 약 10 kb 내지 약 20 kb, 약 20 kb 내지 약 40 kb, 약 40 kb 내지 약 60 kb, 약 60 kb 내지 약 80 kb, 약 80 kb 내지 약 100 kb, 약 100 kb 내지 약 120 kb, 또는 약 120 kb 내지 150 kb인 실시 형태 76의 방법.
- [0391] 78. 표적화된 유전자 변형이 (a) 내인성 핵산 서열의 상동 또는 이종상동성 핵산 서열로의 치환; (b) 내인성 핵산 서열의 결실; (c) 약 5 kb 내지 약 10 kb, 약 10 kb 내지 약 20 kb, 약 20 kb 내지 약 40 kb, 약 40 kb 내지 약 60 kb, 약 60 kb 내지 약 80 kb, 약 80 kb 내지 약 100 kb, 약 100 kb 내지 약 150 kb, 또는 약 150 kb 내지 약 200 kb, 약 200 kb 내지 약 300 kb, 약 300 kb 내지 약 400 kb, 약 400 kb 내지 약 500 kb, 약 500 kb 내지 약 1 Mb, 약 1 Mb 내지 약 1.5 Mb, 약 1.5 Mb 내지 약 2 Mb, 약 2 Mb 내지 약 2.5 Mb, 또는 약 2.5 Mb 내지 약 3 Mb의 범위의 내인성 핵산 서열의 결실; (d) 외인성 핵산 서열의 삽입; (e) 약 5 kb 내지 약 10 kb, 약 10 kb 내지 약 20 kb, 약 20 kb 내지 약 40 kb, 약 40 kb 내지 약 60 kb, 약 60 kb 내지 약 80 kb, 약 80 kb 내지 약 100 kb, 약 100 kb 내지 약 150 kb, 약 150 kb 내지 약 200 kb, 약 200 kb 내지 약 250 kb, 약 250 kb 내지 약 300 kb, 약 300 kb 내지 약 350 kb, 또는 약 350 kb 내지 약 400 kb의 범위의 외인성 핵산 서열의 삽입; (f) 상동 또는 이종상동성 핵산 서열을 포함하는 외인성 핵산 서열의 삽입; (g) 인간 및 비인간 핵산 서열을 포함하는 키메라 핵산 서열의 삽입; (h) 부위 특이적 재조합 효소 표적 서열이 플랭킹된 조건 대립 유전자(conditional allele)의 삽입; (i) 포유류 세포에서 활성인 제3 프로모터에 작동가능하게 연결된 선택가능한 마커 또는 리포터 유전자의 삽입; 또는 (j) 그 조합을 포함하는 실시 형태 63의 방법.
- [0392] 79. 표적 게놈 유전자좌가 (i) 5' 상동성 암에 상동성인 5' 표적 서열; 및 (ii) 3' 상동성 암에 상동성인 3' 표적 서열을 포함하는 실시 형태 63의 방법.
- [0393] 80. 5' 표적 서열과 3' 표적 서열이 적어도 5 kb 이상 3 Mb 미만으로 분리되어 있는 실시 형태 79의 방법.
- [0394] 81. 5' 표적 서열과 3' 표적 서열이 적어도 5 kb 이상 10 kb 미만, 적어도 10 kb 이상 20 kb 미만, 적어도 20 kb 이상 40 kb 미만, 적어도 40 kb 이상 60 kb 미만, 적어도 60 kb 이상 80 kb 미만, 적어도 약 80 kb 이상 100 kb 미만, 적어도 100 kb 이상 150 kb 미만, 적어도 150 kb 이상 200 kb 미만, 적어도 약 200 kb 이상 약 300 kb 미만, 적어도 약 300 kb 이상 약 400 kb 미만, 적어도 약 400 kb 이상 약 500 kb 미만, 적어도 약 500 kb 이상 약 1 Mb 미만, 적어도 약 1 Mb 이상 약 1.5 Mb 미만, 적어도 약 1.5 Mb 이상 약 2 Mb 미만, 적어도 약 2 Mb 이상 약 2.5 Mb 미만, 또는 적어도 약 2.5 Mb 이상 약 3 Mb 미만으로 분리되어 있는 실시 형태 79의 방법.
- [0395] 82. 제1 및 제2 발현 구축물이 단일 핵산 분자 상에 있는 실시 형태 63의 방법.
- [0396] 83. 표적 게놈 유전자좌가 *Sry* 유전자좌를 포함하는 실시 형태 63의 방법.
- [0397] 84. (a) 실시 형태 4의 방법에 따라, 비인간 만능성 세포의 Y 염색체 상의 대상으로 하는 게놈 유전자좌를 변형시켜, Y 염색체 상의 표적화된 유전자 변형을 포함하는 유전자 변형 비인간 만능성 세포를 생산하는 단계; (b) (a)의 변형된 비인간 만능성 세포를 비인간 숙주 배아로 도입하는 단계; 및 (c) 변형된 만능성 세포를 포함하는 비인간 숙주 배아를 대리모에 임신시키는 단계 - 여기서, 대리모는 표적화된 유전자 변형을 포함하는 F0 자손을 생산하고, 표적화된 유전자 변형은 생식세포계열을 통해 전파됨 - 를 포함하는, 비인간 동물의 Y 염색체 상의 표적화된 유전자 변형 방법.
- [0398] 85. 대상으로 하는 게놈 유전자좌가 *Sry* 유전자좌를 포함하는 실시 형태 84의 방법.
- [0399] 86. (a) 뉴클레아제 제제에 대한 인식 부위를 포함하는 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 포함하는 세포를 제공하는 단계, (b) (i) 뉴클레아제 제제 - 여기서, 뉴클레아제 제제는 제1 인식 부위에서 낙 또는 이중 가닥 절단을 유도함 -; 및 (ii) 제1 인식 부위에 충분히 근접하여 위치하고 있는 제1 및 제2 표적 부위에 대응하는 제1 및 제2 상동성 암이 플랭킹된 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제1 표적화 벡터를 세포로 도입하는 단계 - 여기서, 제1 상동성 암 및/또는 제2 상동성 암의 길이는 적어도 400 bp 이상 1000 bp 미만임 -; 및 (c) 표적 게놈 유전자좌에서 통합되는 제1 삽입 폴리뉴클레오티드를 이의 게놈에 포함하는 적어도 하나의 세포를 동정하는 단계를 포함하는, 세포의 Y 염색체 상의 표적 게놈 유전자좌를 변형시키는 방법.
- [0400] 87. 제1 상동성 암 및/또는 제2 상동성 암의 길이가 약 700 bp 내지 약 800 bp인 실시 형태 86의 방법.
- [0401] 88. 변형이 내인성 핵산 서열의 결실을 포함하는 실시 형태 86의 방법.
- [0402] 89. 결실이 약 5 kb 내지 약 10 kb, 약 10 kb 내지 약 20 kb, 약 20 kb 내지 약 40 kb, 약 40 kb 내지 약

60 kb, 약 60 kb 내지 약 80 kb, 약 80 kb 내지 약 100 kb, 약 100 kb 내지 약 150 kb, 약 150 kb 내지 약 200 kb, 약 200 kb 내지 약 300 kb, 약 300 kb 내지 약 400 kb, 약 400 kb 내지 약 500 kb, 약 500 kb 내지 약 1 Mb, 약 1 Mb 내지 약 1.5 Mb, 약 1.5 Mb 내지 약 2 Mb, 약 2 Mb 내지 약 2.5 Mb, 또는 약 2.5 Mb 내지 약 3 Mb의 범위인 실시 형태 88의 방법.

[0403] 90. 결실이 적어도 500 kb인 실시 형태 88의 방법.

[0404] 본 발명의 방법 및 조성물은 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 본 명세서에 기재된 실시 형태로 제한되는 것으로 해석되어서는 안되고; 오히려, 이들 실시 형태는 본 발명이 적용 법적 요건을 충족시키도록 제공된다. 본 명세서 전반에 걸쳐서, 동일한 참조 부호는 동일한 구성 요소를 나타낸다.

[0405] 본 명세서에 기술된 방법 및 조성물의 다양한 변형 및 또 다른 실시 형태가 이러한 방법 및 조성물이 속하는 기술 분야의 숙련가에게 상술한 상세한 설명 및 관련 도면에 제시된 교시내용의 이점을 가지면서 구상할 수 있을 것이다. 따라서, 상기 방법 및 조성물은 개시된 특정 실시 형태에 한정되지 않으며, 변형 및 기타 실시 형태는 첨부된 청구범위의 범주 내에 포함되는 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 특정 용어가 사용되지만, 이들은 제한하기 위한 것이 아니고, 일반적이고 기술적인 의미로만 사용된다.

[0406] 하기 실시예는 제한하는 것이 아니라, 예시할 목적으로 제공된다.

#### 실시예

##### 실시예 1. TALEN 또는 CRISPR에 의한 Y 염색체 유전자 *Sry*의 표적화

[0409] *Sry*에 대한 lacZ 치환 대립유전자를 포함하는 표적화된 결실은 약 700 bp의 상류 상동성 암, 베타-갈락토시다아제 암호화 서열(lacZ) 다음에 폴리아데닐화 신호, 제1 엑손, 제1 인트론 및 제2 엑손의 일부를 비롯한 인간 유비퀴틴 C 프로모터를 포함하는 loxP 부위가 플랭킹된 네오마이신 내성 카세트, 네오마이신 포스포트랜스페라아제 암호화 서열, 및 폴리아데닐화 신호, 및 약 650 bp의 하류 상동성 암의 순으로 포함하는 표적화 벡터로 발생되었다. 표적화 벡터로 *Sry* 유전자를 정확하게 표적화함으로써 생성된 대립유전자는 약 1kb의 *Sry* 오픈 리딩 프레임을 결실시키고 lacZ-neo 카세트로 교체하여, 베타-갈락토시다아제 암호화 서열이 *Sry* 개시 코돈에서 인프레임으로 융합되었다. 표적화 벡터는 VGB6(B6A6로도 알려짐) C57BL/6 및 VGF1(F1H4로도 알려짐) C57BL/129 F1 하이브리드 ES 세포주에서 *Sry* 유전자를 표적화하는데 사용되었다. VGF1(F1H4) 마우스 ES 세포는 암컷 C57BL/6NTac 마우스를 수컷 129S6/SvEvTac 마우스와 교배하여 생산되는 하이브리드 배아로부터 유래되었다. 따라서, VGF1 ES 세포는 129S6/SvEvTac 마우스 유래의 Y 염색체를 포함한다. VGF1 세포주에서 생산된 암컷 XY 마우스는 129S6/SvEvTac 마우스로부터 유래된 Y 염색체를 포함한다.

##### 실시예 2. Y 염색체 유전자 *Sry*의 TALEN- 또는 CRISPR 유발 돌연변이

[0411] 아마도 Cas9 DNA 엔도뉴클레아제와 함께, TALEN 또는 CRISPR 가이드 RNA의 작용에 의해 *Sry* 유전자에 3 bp 내지 1.2 kb 및 그 이상의 범위의 이중 가닥 DNA 절단의 비상동 말단 결합(NHEJ) 수복의 결과인 결실 돌연변이가 생성되었다(도 1 참조). *Sry* 유전자에서 TALEN- 및 CRISPR 유발 돌연변이를 포함하는 ES 세포는 또한 NIH KOMP 프로젝트 VG12778 LTVEC(URL "velocigene.com/komp/detail/12778"의 월드 와이드 웹(www)에서 인터넷을 통해 이용가능함)의 랜덤 트랜스제닉 삽입을 포함하였으며, 이는 *Sry* 암호화 서열의 결실 및 *Sry* 개시 코돈, 및 38 및 37kb의 상동성 암이 플랭킹되고 bMQ 라이브러리(129S7/SvEv Brd-Hprt b-m2)의 BAC에 기초한 네오마이신 내성 유전자와 인프레임으로 융합된 lacZ를 포함하는 삽입 카세트로의 교체를 포함한다. LTVEC는 이의 상동성 암에 *Sry*의 발현을 위한 모든 공지된 조절 요소를 포함한다. 이의 lacZ 암호화 베타-갈락토시다아제는 *Sry* 유전자의 조작 특이적 및 발달 단계 특이적 발현을 위한 리포터로서 작용한다. LTVEC 삽입을 수반하는 TALEN- 및 CRISPR 유발 돌연변이는 VGB6(B6A6로도 알려짐) 및 VGF1(F1H4로도 알려짐) ES 세포주에서 생성되었다.

[0412] 본 발명자들은 *Sry* 유전자에서 HMG 박스 DNA 결합 모티프 암호화 서열(상류 인식 서열: 5'-TCCCGTGGTGAGAGGCAC-3' (서열 번호 72); 하류 인식 서열: 5'-TATTTGCATGCTGGGAT-3' (서열 번호 73))의 일부를 표적으로 하도록 설계된 TALEN(TALEN-1)을 얻었다. TALEN-1은 여러 실험에서 *Sry* 유전자좌에서 NHEJ 돌연변이를 생성시키는데 유효하였다.

[0413] VGB6 및 VGF1 마우스 ES 세포는 TALEN 유발 돌연변이로 생성되었다. 표 1은 모든 클론의 목록과 이들이 가지고 있는 결실 돌연변이의 크기를 포함한다(표 1의 ND는 돌연변이가 qPCR 분석에 의해 검출되지만, 돌연변이의 정확한 문자 특성은 측정되지 않았음을 나타낸다.). 모든 클론은 또한 적어도 하나의 NIH KOMP 프로젝트 VG12778 LTVEC의 카페를 보유한다.

[0414]

[표 1]

Sry 유전자의 TALEN- 및 CRISPR 유발 돌연변이			
ES 세포	클론	돌연변이 유발제	결실 (bp)
VGB6	DE7	TALEN-1	9
	DE11	TALEN-1	303*
	DG5	TALEN-1	627
	DH1	TALEN-1	ND
	EA2	TALEN-1	ND
	ED4	TALEN-1	>1200
	EF4	TALEN-1	16
	EG7	TALEN-1	>1200
VGB6	RD3	TALEN-1	>1200
	RE9	TALEN-1	ND
	RF3	TALEN-1	9
	RG7	TALEN-1	15
	SF7	TALEN-1	3
	SG11	TALEN-1	6
	SH2	TALEN-1	>200
	SH11	TALEN-1	2
VGF1	TB1	TALEN-1	11
	TC2	TALEN-1	5
	UA5	TALEN-1	15
	UB5	TALEN-1	1201
	UE12	TALEN-1	9
	WE11	TALEN-1	>1200
VGB6	OG6	CRISPR-2	9
	QE8	CRISPR-3	5
VGF1	AU-B6	CRISPR-4	5
	AU-C12	CRISPR-4	8
	AW-H5	CRISPR-5	22

\*50 bp 삽입도 포함함

[0415]

Sry 돌연변이 클론의 미량주입 결과를 표 2에 나타내고, 성전환 암컷의 번식 결과를 표 3에 나타낸다.

[0416]

[표 2]

Sry 돌연변이 ES 세포 클론을 8 세포기 배아에 미량주입하여 생산된 F0 세대 벨로시마우스				
ES 세포	클론	Sry 돌연변이	암컷 VM	수컷 VM
VGB6	ED4	>1 kb 결실	2	0
	EG7	>1 kb 결실	19	0
	GB4	없음	0	3
	GG1	없음	0	5
	DE11	303 bp 결실; 50 bp 삽입	1	0
	DG5	627 bp 결실	11	0
VGF1	TA3	없음	0	5
	TA4	없음	0	11
	TB1	11 bp 결실	2	0
	TC2	5 bp 결실	8	0
	TH4	없음	2	6
	UB5	1,201 bp 결실	6	0
	WE11	>1.2 kb 결실	7	0
	UA5	15 bp 결실	4	0
	UE12	9 bp 결실	8	0

[0417]

[0419]

[표 3]

<i>Sry</i> 유전자에 돌연변이가 있는 XY 암컷 벨로스마우스의 번식 결과					
ES 세포	클론	<i>Sry</i> 결실 (bp)	XY 암컷 ID #	생산된 한배새끼	태어난 새끼들
VGB6	EG7	>1,200	1460403	0	
			1460404	0	
			1460405	0	
			1460406	1	0*
			1460408	0	
			1460409	0	
			1460410	0	
VGB6	DG5	627	1460428	0	
			1460429	0	
			1460430	0	
			1460431	0	
			1460432	0	
			1460436	0	
			1460437	0	
			1460438	0	
			1460440	0	
			1460441	0	
VGF1	UB5	1,201	1525585	5	33
			1525586	5	25
			1525587	5	32
			1525588	3	35
			1525589	3	19
VGF1	WE11	>1,200	1525573	3	4
			1525574	5	21
			1525575	4	11
			1525576	4	14
			1525577	4	16
			1525578	2	4
			1525579	2	6
VGF1	TB1	11	1525700	5	30
			1525701	4	28
VGF1	TC2	5	1525706	1	2
			1525707	5	10
			1525708	1	6
			1525709	4	17
			1525710	1	3
			1525711	3	9
			1525712	4	12
			1525713	2	7
VGF1	UA5	15	1594102	2	5
			1594103	2	7
			1594104	1	3
			1594105	2	15
VGF1	UE12	9	1594117	1	6
			1594118	2	12
			1594119	1	11
			1594120	2	8
			1594121	2	21
			1594122	2	15
			1594123	2	10

\*XY 암컷 ID# 1460406는 조산 위기(near-term crisis)를 겪고 분만 할 수 없었기 때문에, 출산 전에 안락사시켜야만 했음. 사망한 새끼들(4마리 수컷, 5마리 암컷)을 해부하여 회수하였더니, 한 마리도 *Sry* 돌연변이를 나타내지 않았음.

[0420]

[0421] *Sry*의 불활성화로 인해 예상대로, VGB6 ES 세포에서 유래한 *Sry* 돌연변이가 있는 벨로시마우스는 모두 암컷이었다(표 2). *Sry* 돌연변이가 없지만 적어도 하나의 NIH KOMP VG12778 LTVEC의 카페를 보유한 것은 수컷 벨로시마우스 만을 생산하였다(표 2, 클론 GB4와 GG1). 17마리의 *Sry* 돌연변이 암컷 B6 벨로시마우스가 시험 사육되었을 때, 약 4개월간의 사육 셋업 후에 한 마리만 임신되었고(표 3), 암컷은 조산 위기를 겪고 분만 할 수 없었기 때문에, 출산 전에 안락사시켜야만 했다. 해부하여 회수한 사망한 새끼들(4마리 수컷, 5마리 암컷)은 모두 WT 이었으며, 한 마리도 *Sry* 돌연변이를 나타내지 않았다. VGB6 ES 세포로 생산된 거의 모든 *Sry* 돌연변이 마우스가 불임으로서, *Sry* 돌연변이에 관한 문헌과 일치하는 것으로 결론이 내려졌다. 그러나, 본 발명자들의 데이터는 VGF1 클론과 매우 상이한 결과를 보여 주었다.

[0422]

먼저, VGF1 ES 세포를 자성화하는(feminizing) 본 발명자들의 KO-DMEM과 같은 저 삼투력 성장 배지에서 평소와 같이 유지하였는데, 이러한 배지에서 성장한 미량주입된 XY 클론 중 일부는 돌연변이를 가지고 있지 않더라도, 생식능력이 있는 XY 암컷, 즉, XY 암컷 현상을 일으킬 것이다. 일례로는 *Sry* 돌연변이를 갖지 않지만, 적어도 하나의 NIH KOMP VG12778 LTVEC의 카페를 보유한 클론 TH4가 있다. 이러한 클론은 2마리의 암컷과 6마리의 수컷 벨로시마우스를 생산하였다(표 2). *Sry* 돌연변이가 없는 2개의 다른 VGF1 클론(TA3 및 TA4, 표 2)은 수컷 벨로시마우스 만을 생산하였다. 본 발명자들은 *Sry* 돌연변이를 갖는 VGF1 XY ES 세포도 배지에 의해 자성화될

수 있는지 여부를 확인하길 원했다. 다시 말하면, 이들이 VGB6 Sry 돌연변이 ES 세포와는 달리, 일부의 생식능력이 있는 XY Sry 돌연변이 암컷을 생산할까?(VGB6 ES 세포는 KO-DMEM과 같은 저 삼투력 배지에서 유지될 수 없어서, 마우스 생산 능력을 보유할 수 없다는 점에 주목한다.). 대답은 표 3에 나타낸 바와 같이 "예"이다.

[0423] TALEN에 의해 유발된 작은 결실이 5 bp 내지 1 kb 이상의 범위인 6개의 VGF1 ES 세포 클론을 미량주입하였다. 모든 생산된 암컷 벨로시마우스 중 32마리를 사육하였다. 놀랍게도, Sry 돌연변이 XY 암컷 벨로시마우스가 모두 생식능력이 있으며; 각각, 적어도 1회 한배새끼를 생산하였다(표 3). 대부분의 Sry 돌연변이 XY 암컷은 정상적인 한배새끼수를 갖는 다수회의 한배새끼를 생산하지만, 일부 XY 암컷은 1회 또는 2회의 많지 않은 한배새끼를 생산하였다. 유전자형이 결정된 이러한 번식에서 299 마리의 F1 마우스 중, 약 절반(146, 49%)은 정상적인 XY 수컷 또는 정상적인 XX 암컷이다. F1 마우스 중 174 마리(58%)는 표현형 암컷인 반면에, 125 마리(42%)는 표현형 수컷이었다. 26 마리의 암컷(암컷의 15%, 총 F1 세대의 8.7%)은 돌연변이 Sry 대립유전자를 포함하는 다수의 비정상적인 유전자형(XXY, XYY, XO, XXYY)이 Sry 돌연변이 XY 암컷 벨로시마우스의 F1 자손에서 관찰되었다

[0424] XY ES 세포로부터 생식능력이 있는 XY 암컷 벨로시마우스를 효율적으로 생산하는 방법이 발견되었다. 자성화 성장 배지에서 유지된 ES 세포에서의 Sry 유전자의 불활성화 돌연변이가 발생하면, 고 비율의 생식능력이 있는 XY 암컷 마우스가 얻어지고, 수컷으로 번식시키는 경우, 주로 정상 X 및 Y 염색체를 가진 수컷 및 암컷 마우스가 생산된다.

[0425] 실시예 3. Y 염색체 유전자 Sry의 TALEN 유발 돌연변이 후의 KO-DMEM 또는 DMEM에서의 배아 회수

[0426] LTVEC에 의한 마우스 Sry의 정확한 표적화는 Sry 돌연변이를 가진 XY인 F0 암컷으로부터 유래된 F1 자손의 유전자형 결정에 의해 확인되거나 무효화되었다. Sry 돌연변이를 가진 LacZ/Neo 카세트의 F1 마우스에서의 동시 분리(Sry LOA 분석에 의해 평가됨)는 정확한 표적화를 강하게 시사하고 있다. LacZ/Neo가 돌연변이와 함께 동시에 분리되지 않는다는 것은 원래의 클론이 계놈의 다른 부분에서 LacZ/Neo 트랜스제닉 삽입과 관련된 Sry 결실 돌연변이(TALEN에 의해 유발됨)를 포함하고 있었다는 것을 나타낸다.

[0427] Sry 돌연변이가 있는 XY 암컷 유래의 자손은 높은 빈도의 다양한 비정상 핵형을 나타내었다(XXY, XYY 및 XO 포함). 성염색체수를 X 및 Y 염색체 상의 유전자에 대한 비혈연 대립유전자 결손(LOA) 측정법을 사용하여 평가하였다. 그 다음에 Sry의 카피 수를 LOA 측정법을 사용하여 측정하였다. 돌연변이 Sry 대립유전자의 존재에 의해, 마우스에서 Y 염색체 카피 수가 Sry 카피 수를 초과한 것(예를 들어, 1 카피의 Y 및 0 카피의 Sry, 또는 2 카피의 Y 및 1 카피의 Sry)으로 추측되었다. 최종적으로, LacZ 및 Neo의 존재를 TaqMan 분석을 이용하여 측정하였다.

[0428] TALEN 뉴클레아제와 함께 Sry LTVEC에 의해 생산하여 KO-DMEM에서 성장시킨 원래의 클론 세트에서, LacZ/Neo 카세트가 Sry 돌연변이와 동시에 분리되지 않는다는 것이 명백하였다. 이러한 클론 유래의 샘플 한배새끼는 표 4에 나타낸다.

[0429] [표 4]

TALEN 뉴클레아제와 함께 Sry LTVEC에 의해 생산된 클론의 스크리닝

마우스	성별	X 염색체 카피 수	Y 염색체 카피 수	Sry 카피 수	LacZ	Neo	유전자형	코멘트
1656721	M	1	1	1	0	0	X+Y+	
1656722	M	1	1	1	1	1	X+Y+	LacZ/Neo 존재하나, Sry 돌연변이 없음
1656723	M	1	1	1	0	0	X+Y+	
1656724	M	1	2	1	0	0	X+Y+YΔ	Sry 돌연변이 있으나, LacZ/Neo 존재하지 않음
1656725	F	2	0	0	1	1	X+X+	LacZ/Neo 존재하나, Sry 돌연변이 없음
1656726	F	2	1	0	0	0	X+X+ YΔ	Sry 돌연변이 있으나, LacZ/Neo 존재하지 않음
1656727	F	2	1	0	1	1	X+X+ YΔ	
1656728	F	1	0	0	1	1	X+	LacZ/Neo 존재하나, Sry 돌연변이 없음
1656729	F	1	0	0	0	0	X+	

[0430]

[0431] TALEN 뉴클레아제와 함께 *Sry* LTVEC에 의해 생산하여 DMEM에서 성장시킨 후속 클론 세트에서, LacZ/Neo 카세트가 *Sry* 돌연변이와 완전히 동시 분리되어 정확한 표적화를 나타냈다. 이러한 클론 유래의 전형적인 한배새끼는 표 5에 나타낸다.

[0432] [표 5]

TALEN 뉴클레아제와 함께 *Sry* LTVEC에 의해 생산된 클론에 대한 스크리닝 결과

마우스	성별	X 염색체 카피 수	Y 염색체 카피 수	<i>Sry</i> 카피 수	LacZ	Neo	유전자형
1848360	M	1	1	1	0	0	X+Y+
1848361	M	1	1	1	0	0	X+Y+
1848362	M	1	1	1	0	0	X+Y+
1848363	M	1	1	1	0	0	X+Y+
1848364	M	1	2	1	1	1	X+Y+ YΔ
1848365	F	2	1	0	1	1	X+X+ YΔ
1848366	F	1	1	0	1	1	X+YΔ
1848367	F	1	1	0	1	1	X+X+ YΔ

[0433]

[0434] 실시예 4: *Sma*1TVEC 또는 LTVEC에 의한 *Sry*의 TALEN 및 CRISPR을 사용한 표적화

[0435]

도 2에 나타낸 바와 같이, *Sry*에 대한 lacZ 치환 대립유전자를 포함하는 표적화된 결실은 Cas9 DNA 엔도뉴클레아제와 병용하여, TTALEN 뉴클레아제 또는 CRISPR 가이드 RNA와 함께 LTVEC 또는 작은 표적화 벡터(smallITVEC)로 생성되었다. smallITVEC는 약 700 내지 800 bp의 상류 상동성 암, 베타-갈락토시다아제 암호화 서열(lacZ) 다음에 폴리아데닐화 신호, 제1 엑손, 제1 인트론 및 제2 엑손의 일부를 비롯한 인간 유비퀴틴 C 프로모터를 포함하는 loxP 부위가 플랭킹된 네오마이신 내성 카세트, 네오마이신 포스포트랜스페라아제 암호화 서열, 및 폴리아데닐화 신호, 및 약 700 내지 800 bp의 하류 상동성 암의 순으로 포함하였다. 표적화 벡터로 *Sry* 유전자를 정확하게 표적화함으로써 생성된 대립유전자는 약 1kb의 *Sry* 오픈 리딩 프레임을 결실시키고 lacZ-neo 카세트로 교체하여, 베타-갈락토시다아제 암호화 서열이 *Sry* 개시 코돈에서 인프레임으로 융합되었다. 상기 표적화 벡터는 VGF1(F1H4로도 알려짐) C57BL6/129 F1 하이브리드 ES 세포주 및 VGB6 ES 세포주(B6A6로도 알려짐)에서 *Sry* 유전자를 표적화하는데 사용되었다.

[0436]

표 6에 예시된 바와 같이, 4개의 상이한 gRNA 및 1개의 TALEN 쌍을 사용하여 생성된 클론을 생성하고, TaqMan 분석법에 의해 대립유전자의 절단 및 결손을 스크리닝하였다.

[0437] [표 6]

대립유전자의 절단 및 결손에 대한 스크리닝 결과

대립유전자의 절단 및 결손에 대한 스크리닝 결과			smallITVEC 표적화	
위치	gRNA 또는 TALEN	스크리닝된 클론	KO	총 표적 효율 (%)
HMG 박스	gRNA 2	192	4	2.1
HMG 박스	gRNA 3	192	5	2.6
3' 말단	gRNA 4	192	3	1.6
3' 말단	gRNA 5	192	5	2.6
HMG 박스	TALEN 쌍 1	384	1	0.3
n.a.	없음	384	1	0.3

[0438]

[0439] LTVEC 트랜스제닉 클론은 동일한 lacZ 패턴을 갖는 배아를 생산하였다. 도 3은 배아에서의 LacZ 발현을 예시한다.

[0440]

표 7은 *Sry*의 TALEN을 사용한 LTVEC 표적화된 결실-치환 돌연변이를 갖는 통상적인 DMEM 기반 배지에서 성장한 ES 세포로부터 유래된 XY 암컷의 생식능력 결과를 나타낸다. 예기치 않게 KO-DMEM 기반 배지에서 성장한 ES 세포(표 3)와 유사한 실험 결과와 비교하여, DMEM 기반 배지에서의 LTVEC 표적화는 정확히 표적화된 *Sry* 결실 및 lacZ-neo 삽입을 갖는 클론을 생성하였다. 4개의 표적화된 클론으로부터 유래된 41 마리의 XY<sup>Sry(lacZ)</sup> 암컷 중 40 마리가 교배 시에 정상으로 태어난 새끼들을 생산하였다 - 98% 생식률. 따라서, 본 발명자들은 돌연변이 ES 세포로부터 고도로 생식능력이 있는 XY 암컷을 생산하는 두 가지 새로운 방법을 고안했다: (1) KO-DMEM 기반 배지에서 성장한 ES 세포에서의 *Sry*의 TALEN 유발 불활성화 돌연변이; 및 (2) DMEM 기반 배지에서 성장한 ES 세포에서의 TALEN을 사용한 LTVEC 표적화된 정확한 결실-치환 돌연변이.

[0441]

[표 7]

## Sry TALEN 돌연변이 XY 암컷의 생산

클론	ES 세포주	대립유전자 설명	XY 암컷 벨로시마우스	변식된 XY 암컷	생식능력이 있는 XY 암컷	생식률 (%)
DMEM	X-C4	표적화된 <i>lacZ-neo</i>	5	2	2	100
	X-E10	표적화된 <i>lacZ-neo</i>	1	1	1	100
	X0F3	표적화된 <i>lacZ-neo</i>	5	3	3	100
	X-G3	표적화된 <i>lacZ-neo</i>	9	3	2	67
VGF1 총 개			53	41	40	98

[0442]

## 실시예 5: ZFN에 의해 매개되는 Y 염색체 상의 큰 결실

[0443]

도 4에 예시된 바와 같이, Kdm5d 및 Usp9y 유전자를 표적으로 하는 ZFN을 사용하여 Y 염색체 상에 500 kb 이상의 큰 결실을 발생시켰다. 표 8은 Y 염색체 상의 징크 평거 서열의 예를 제공한다.

[0444]

[표 8]

## Y 염색체 상의 징크 평거 서열

표적 이름	Y 염색체 플레이트	징크 평거 서열	ZFN#	서열 번호
KDM5D	NM011419-r43102a1	ttAGGTAGGTAGACAGGGATgtttctg	ZFN1	42
	NM011419-43108a1	atCCAGTCtCTGAAGGAAGCTctgacta	ZFN2	43
	NM011419-r19880a1	caAAAGCTTCAGGGGGActttacactc	ZFN3	44
	NM011419-19887a1	ttTGAGCAGGCTACACAGGAAGtactt	ZFN4	45
	NM011419-r17347a1	aaGCGGTGgCAATAGGCAaaagatgtgg	ZFN5	46
	NM011419-17353a1	ctGAAGTCCCCAAGGGAGTAtggagatg	ZFN6	47
	NM011419-r17350a1	agAAAGCGGTGGCAaTAGGCAaaagatg	ZFN7	48
	NM011419-17356a1	aaGCCCCAAGGGAGTAtggagatgccc	ZFN8	49
DDX3Y	NM012008-r8130a1	acTCCAACGACTATGACcactccgttca	ZFN1	50
	NM012008-8136a1	acAGATCAGATGAAGATgactggcaaa	ZFN2	51
	NM012008-r7172a1	ctTTCAAGGAAAAAAAGaacaaaaccca	ZFN3	52
	NM012008-7178a1	ggTCTGTGATAAGGACAGTTcaggatgg	ZFN4	53
	NM012008-r20472a1	taATCTGACTGAGAATGGTtagtagaa	ZFN5	54
	NM012008-20479a1	caGATGGTCCAGGAGAGGCTttagggc	ZFN6	55
	NM012008-r7267a1	atTGGGCTTCCcTCTGGAatcacgagat	ZFN7	56
	NM012008-7274a1	ttTCAGTGTATCGTGGAAAGTggatccagg	ZFN8	57
USP9Y	NM148943-r92561a1	ctGGTTGGAAATCGTActgtaaaagac	ZFN1	58
	NM148943-92567a1	gcAAAGAGGTTGAGGAATtggacatatt	ZFN2	59
	NM148943-r11830a1	gaGGAGTTGGAGAAGTCtattggaa	ZFN3	60
	NM148943-11836a1	atATGAACAAGGCCAAGggatgtccaa	ZFN4	61
	NM148943-r108581a1	acTCAGAAGAAGGATTAGGAAtgcatttg	ZFN5	62
	NM148943-108588a1	atGCTTAgAAATGTATCAGTTcatcttg	ZFN6	63
	NM148943-r16244a1	tcCATAAGGATTTGGAAaaagacacag	ZFN7	64
	NM148943-16251a1	agGCTGTGAGTGGATGGAAgttggaaat	ZFN8	65

[0445]

한 실험에서, VGB6 클론 D-G5 및 E-G7 유래의 330만개의 ES 세포(표 3)를 ZFN mRNA 쌍 Kdm5d-ZFN5(NM011419-r17347a1)/ZFN6(NM011419-17353a1) 및 Usp9y-ZFN3(NM148943-r11830a1)/ZFN4(NM148943-11836a1) (각각 10  $\mu$ g), 및 Ch25h 유전자(0.67  $\mu$ g)를 표적으로 하는 LTVEC로 전기 전송하여, 퓨로마이신 내성을 선택하였다. 퓨로마이신 내성 콜로니를 선별하여, 결실을 스크리닝하였다. 그 결과를 표 9에 나타낸다.

[0446]

## [표 9]

## 12778D-G5 및 12778E-G7에서의 큰 Y 염색체 결실에 대한 스크리닝 결과

부모 클론	퓨로마이신 내성 콜로니 수	스크리닝된 콜로니 수	확인된 결실 클론 수
12778D-G5	244	192	4
12778E-G7	638	384	8

[0447]

표 10은 E-G7 부모 클론(표 3)으로부터 유래된 1개의 결실 클론(4306A-D5) 및 D-G5 부모 클론(표 3)으로부터 유래된 2개의 결실 클론(4306E-C4 및 4306F-A12)에 대하여 정확히 측정된 정확한 크기의 500 kb보다 큰 결실을 나타낸다.

[0448]

## [표 10]

## Kdm5d 및 Usp9y의 ZFN 매개 결실

클론	Y 염색체 상의 결실 좌표	크기(bp)
4306A-D5	250569-785404	534835
4306E-C4	520363-785402	535039
4306F-A12	250373-785404	535031

[0449]

[0453] *Kdm5d*, *Eif2s3y*, *Uty*, *Ddx3y* 및 *Usp9y* 유전자의 결실(도 4)은 도 5에 나타낸 바와 같은 대립유전자 결손 측정법 및 DNA 염기 서열 결정에서 확인되었다. 클론 4306A-D5를 8세포기 배아로 미량주입하여 대리모에 이식하였더니, 9 마리의 XY 암컷 완전 ES 세포 유래 벨로시마우스가 생산되었다. 클론 4306A-D5 유래의 XY 암컷은 모두 생식능력이 없었다.

[0454] 실시예 6: CRISPR/Cas에 의해 매개되는 Y 염색체 상의 큰 결실

[0455] Cas9 DNA 엔도뉴클레아제와 함께 CRISPR 가이드 RNA를 사용하여, *Kdm5d* 유전자와 *Usp9y* 유전자 사이의 영역을 표적으로 하는 Y 염색체 상의 큰 결실을 생성시켰다. gRNA는 *Kdm5d* 유전자와 *Usp9y* 유전자를 표적으로 하도록 설계되었다. 하기 gRNA는 *Kdm5d*를 표적으로 하도록 설계되었다: *Kdm5dgA* (가이드 #1) UUUGCCGAAUAUGCUCUCGU (서열 번호 66); *Kdm5dgB* (가이드 #2) UUGCCGAAUAUGCUCUCGUG (서열 번호 67); 및 *Kdm5dgC* (가이드 #5) CGGGCAUCUCCAUACUCCCU (서열 번호 68). 하기 gRNA는 *Usp9y*를 표적으로 하도록 설계되었다: *Usp9ygA* (가이드 #1) UAGCUCGUUGUGUAGCACCU (서열 번호 69); *Usp9ygB* (가이드 #1) UAUAGUUUCUUCGGGGUAAC (서열 번호 70); 및 *Usp9ygC* (가이드 #2) GGAAUACCCUUCUAUAGGCC (서열 번호 71).

[0456] Cas9을 발현하는 플라스미드 5  $\mu$ g, *Kdm5d* gRNA B 및 *Usp9y* gRNA C를 발현하는 플라스미드 각각 10  $\mu$ g, 및 *Ch25h* 유전자(0.67 ug)를 표적으로 하는 LTVEC로 VGF1 마우스 ES 세포를 전기 천공하여, 퓨로마이신 내성을 선택하였다.

[0457] 도 4에 예시된 바와 같이, *Kdm5dgB*(gRNA B) 및 *Usp9ygC*(gRNA C)를 사용하여, *Kdm5d* 및 *Usp9y* 유전자의 결실을 표적화하였다. 생성된 클론에 대하여, *Kdm5d* 및 *Usp9y* 유전자 및 그 사이에 개재하는 유전자(*Eif2s3y*, *Uty* 및 *Ddx3y*), 및 표적화된 결실 이외의 유전자(*Zfy2* 및 *Sry*)의 서열에 대한 대립유전자 결손 측정법에 의해 결실을 스크리닝하였다. 표 11에 나타낸 바와 같이, 큰 결실을 포함하는 4개의 클론을 얻었다. 클론 R-A8을 8세포기 배아로 미량주입하여 대리모에 이식하였더니, 7 마리의 XY 수컷 및 3 마리의 XY 암컷 완전 ES 세포 유래 벨로시마우스가 생산되었다.

[0458] [표 11]

CRISPR 가이드 RNA 및 Cas9에 의해 매개되는 큰 결실을 확인하는 TaqMan 분석

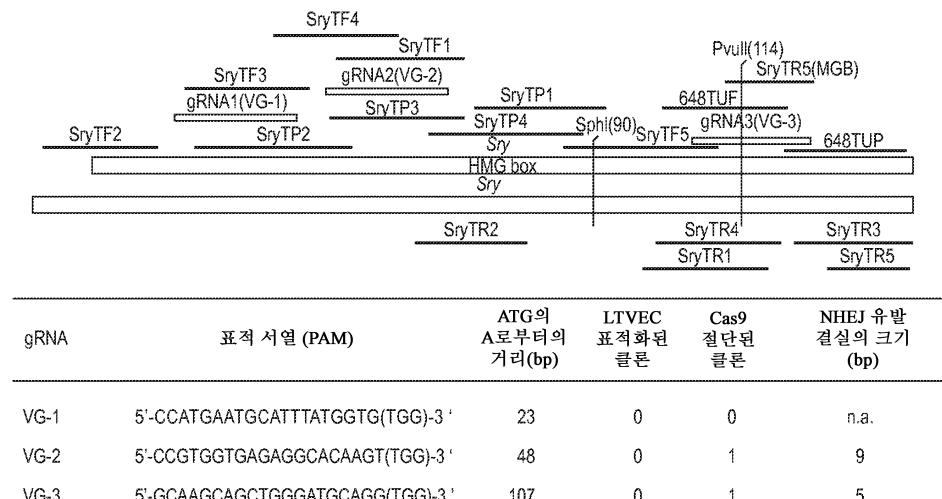
클론	대립유전자 결손 카피 수 측정					주석
	19178TD ( <i>Eif2s3y</i> )	16697TD ( <i>Uty</i> )	<i>Ddx3yZF12</i> ( <i>Ddx3y</i> )	<i>Zfy2</i>	<i>Sry</i>	
Q-F1	0	0	0	1	1	큰 결실
R-A8	0	0	0	1	1	큰 결실
R-C2	0	0	0	~0.5	1	큰 결실, 부분 결손 Y
R-E11	1	1	1	1	1	WT 대조군으로서 첨가된 클론

[0459]

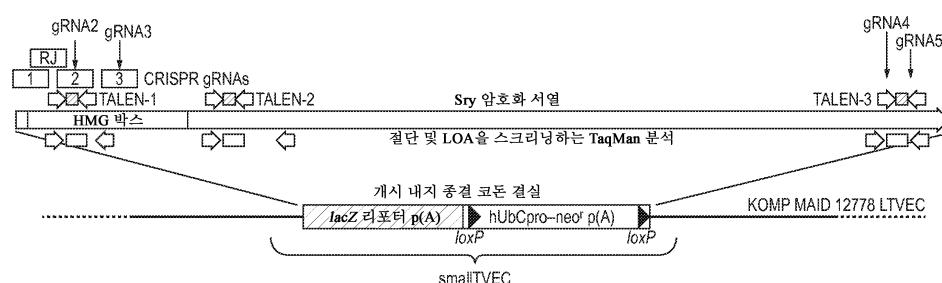
[0460] 본 명세서에 언급된 모든 공보 및 특허 출원은 본 발명이 속하는 당업자의 레벨을 나타낸다. 모든 공보 및 특허 출원은 각각의 개별 공보 또는 특허 출원이 구체적으로 개별적으로 참조로 포함되도록 지시된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 원용된다. 기탁 번호와 같은 인용문과 관련된 정보가 시간에 따라 변경되는 경우, 출원서의 유효 출원일에 유효한 정보의 버전이 의도되며, 유효 출원일은 최초로 인용문을 제공하는 실제 출원일 또는 우선 출원일을 의미한다. 임의의 실시 형태의 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 한, 본 발명의 측면, 단계 또는 특징은 임의의 다른 것과 조합하여 사용될 수 있다. 범위에 대한 언급은 그 범위 내의 모든 정수, 범위 내의 모든 하위 범위를 포함한다. 여러 범위에 대한 언급은 이러한 범위의 합성을 포함한다.

## 도면

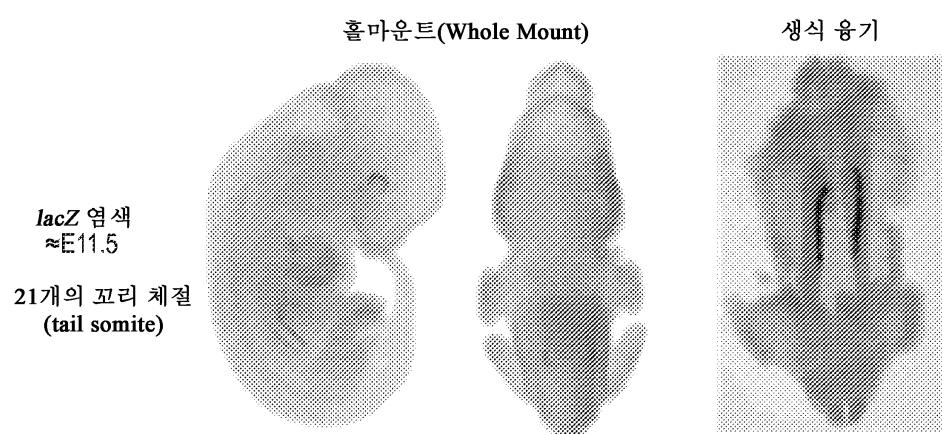
## 도면1



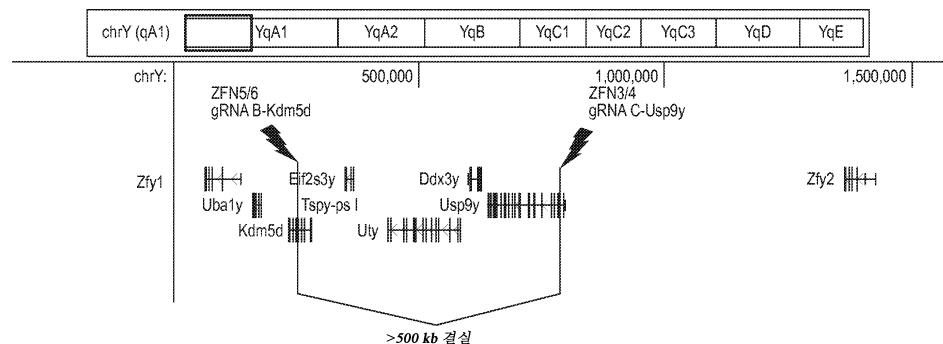
## 도면2



## 도면3



## 도면4



## 도면5a

□ Kdm5 업 및 Usp9y 다운	AATTACCACATC:TTTTGCCCTATTG:CCA:CCGCTTGAGGAGT:TGTTGGAGAAAGTCTCATGGAA:GAATCAGATGA
□ 1500F	AATTACCACATCTTTGCCCTATTGCTAA:     :     :ATACTGGAGAAAGTCTCATGGCAACGAATCAGATGA
□ 1000R	AATTACCACACATC:TTTTGCCCTATTGACAAA:     :     :ATGTTGGAGAAAGTCTCATGGAA:GAATCAAATTG

## 도면5b

□ Kdm5 업 및 Usp9y 다운	CTATCAGATAGGATAATTTGAGTTT:CATATTGTATGGTATAGGAGACTCTCATGGAAAGAATCAGATGATGAGATCTTAAT
□ 1500F	CTATCAGATAGGATAATTTGAGTTT:CATATTGT:     :     :GGAGAAGTCTCATGGAAAGAATCAGATGATGAGATCTTAAT
□ 1000R	CTATCAGATAGGATAATTTGAGTTT:CATATTGT:     :     :GGAGAAGTCTCATGGAAAGAATCAGATGATGAGATCTTAAT
□ 1000F	CTATCAGATAGGATAATTTGAGTTT:CATATTGT:     :     :GGCGAAGTCTCATGGAAAGAATCAGATGATGAGATCTTAAT

## 도면5c

□ Kdm5 업 및 Usp9y 다운	TCAGATAGGATAATTTGAGTTT:CATATTGTATGGTATAGGAGACTCTCATGG
□ 1500F	TCAGATAGGATAATTTGAGTTT:CATATTGT:     :     :T:GGAGAAGTCTCATGG
□ 1000R	TCAGATAGGATAATTTGAGTTT:CATATTGT:     :     :T:GGAGAAGTCTCATGG
□ 1000F	TCCCAGATAGGATAATTTGAGTTT:CATATTGT:     :     :T:GCCGAAGTCTCATGG
□ 1500R	TTTAGAGTTTTCATATTGT:     :     :T:GGGAGAAGTCTCATGG

## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Frendewey, David

Droguett, Gustavo

Gagliardi, Anthony

Kuno, Junko

Auerbach, Wojtek

Valenzuela, David M.

&lt;120&gt; METHODS AND COMPOSITIONS FOR TARGETED

GENETIC MODIFICATIONS AND METHODS OF USE

&lt;130&gt; 057766-463545

<150> US 62/017,582  
 <151> 2014-06-26  
 <150> US 62/017,627  
 <151> 2014-06-26  
 <160> 73

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0  
 <210> 1  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> a target locus that is linked to a guide RNA  
 (gRNA)

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,  
 19, 20, 21  
 <223> n = A,T,C or G  
 <400> 1

gnnnnnnnnn nnnnnnnnnn ngg 23

<210> 2  
 <211> 80  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> a guide RNA (gRNA)

<400> 2  
 guuuuagagc uagaaaugc aaguuaaaaau aaggcuaguc cguuaucAAC uugaaaaagu 60  
 ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 3  
 <211> 42

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; a guide RNA (gRNA)

&lt;400&gt; 3

guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cg 42

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; a crRNA

&lt;400&gt; 4

guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau 30

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; a crRNA

&lt;400&gt; 5

guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aag 33

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; a crRNA

&lt;400&gt; 6

gaguccgagc agaagaagaa guuuua 26

<210> 7

<211> 12

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a tracrRNA

<400> 7

aaggcuaguc cg

12

<210> 8

<211> 50

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a tracrRNA

<400> 8

aaggcuaguc cguuaucAAC uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuu

50

<210> 9

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> a target locus that is linked to a guide RNA

(gRNA)

<220>

<221> misc\_feature

<222> 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,  
19, 20, 21

<223> n = A,T,C or G

<400> 9

gnnnnnnnnn nnnnnnnnnn nng

23

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VG-1 gRNA target sequence

&lt;400&gt; 10

ccatgaatgc atttatggtg tgg 23

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VG-2 gRNA target sequence

&lt;400&gt; 11

ccgtggtagg aggccacaagt tgg 23

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; VG-3 gRNA target sequence

&lt;400&gt; 12

gcaaggcagct gggatgcagg tgg 23

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic sryTF1 primer

&lt;400&gt; 13

cgtggtgaga ggcacaagtt 20

&lt;210&gt; 14

<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic sryTR1 primer	
<400> 14	
gagatcagca agcagctgg	19
<210> 15	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic sryTP1 probe	
<400> 15	
cccagcagaa tcccgcatg ca	22
<210> 16	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic sryTF2 primer	
<400> 16	
tggagggcca tgtcaagc	18
<210> 17	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic sryTR2 primer	
<400> 17	
acaagttggc ccagcaga	18
<210> 18	
<211> 26	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic sryTP2 probe	
<400> 18	
tgaatgcatt tatggtgtgg tcccggt	26
<210> 19	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic sryTF3 primer	
<400> 19	
atgaatgcat ttatggtgtg	20
<210> 20	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic sryTR3 primer	
<400> 20	
aggtggaaaa gccttaca	18
<210> 21	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic sryTP3 probe	
<400> 21	
ccgtggtagt aggccacaagt tgg	23
<210> 22	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

<223> Synthetic sryTF4 primer	
<400> 22	
gtgtggtccc gtggtgaga	19
<210> 23	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic sryTR4 primer	
<400> 23	
agatcagcaa gcagctggga	20
<210> 24	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic sryTP4 probe	
<400> 24	
aagtggccc agcagaatcc cagc	24
<210> 25	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic sryTF5 primer	
<400> 25	
catgcaaaat acagagatca gcaa	24
<210> 26	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic sryTR5 primer	

&lt;400&gt; 26

ggaaaagcct taca 14

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic sryTP5 probe

&lt;400&gt; 27

cagctggat gcagg 15

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic 648TUF primer

&lt;400&gt; 28

gatcagcaag cagctggat 20

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic 648TUP probe

&lt;400&gt; 29

cagggtggaaa agccttaca 19

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 73

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 30

aattaccaca tctttgcct attgccaccc cttgaggagt tggatggatgttgcattgg 60

aagaatcaga tga	73
<210> 31	
<211> 65	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	

<400> 31	
aattaccaca tcctttgcc tattgtccaa atactggaga agtctcattt caacgaatca 60	
gatga	65

<210> 32	
<211> 63	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	

<400> 32	
aattaccaca tcctttgcct attgacaaaa tggggagaa gtctcatgg aagaatcaaa 60	
ttg	63

<210> 33	
<211> 90	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic	

<400> 33	
ctatcagata ggatattta gagtttcat attgtatgga ggagtgttg gagaagtctc 60	

attggaagaa tcagatgtg agatcttaat	90
<210> 34	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

<223> Synthetic

<400> 34

ctatcgata ggatattta gagttgttgg agaagtctca ttggaagaat cagatgtga 60

gatcttaat 69

<210> 35

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 35

ctatcgata ggatattta gagttgttgg agaagtctca ttggaagaat cagatgtga 60

gatcttaat 69

<210> 36

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 36

ctatcacata ggatattta gagttgttgg cgaagtctca ttggaagaat cagatgtga 60

gatcttaat 69

<210> 37

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 37

tcagatagga tattttagag ttttcatatt gtatggtat aggaggagtt gttggagaag 60

tctcattgg 69

<210> 38

<211> 49

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 38

tcagatagga tatTTtagag tttcatatt gttggagaag tctcatgg 49

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 49

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 39

tcagataggg tatTTtagag tttcatatt gttggagaag tctcatggg 49

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 49

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 40

tcccatagga tatTTtagag ttctcatatt gctgccgaag tctcatgc 49

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic

&lt;400&gt; 41

tttagagtt ttcatattt tgggagaag tctcattgg 39

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 28

&lt;212&gt; DNA

<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic KDM5D ZFN1 target sequence	
<400> 42	
ttagtaggt agacagggat gtttctg	28
<210> 43	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic KDM5D ZFN2 target sequence	
<400> 43	
atccagtctc tgaaggaagc tctgacta	28
<210> 44	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic KDM5D ZFN3 target sequence	
<400> 44	
caaagcttc aggggactc ttacactc	28
<210> 45	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic KDM5D ZFN4 target sequence	
<400> 45	
tttgcagg ctacacagga gtataactt	28
<210> 46	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	

<223> Synthetic KDM5D ZFN5 target sequence

<

<400> 46

aagcggtggc aataggcaaa agatgtgg

28

<210> 47

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic KDM5D ZFN6 target sequence

<400> 47

ctgaagtccc caagggagta tggagatg

28

<210> 48

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic KDM5D ZFN7 target sequence

<400> 48

agaaagcggt ggcaataggc aaaagatg

28

<210> 49

<211> 28

<212> DNA

<213

> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic KDM5D ZFN8 target sequence

<400> 49

aagtcccaa gggagtatgg agatgcc

28

<210> 50

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DDX3Y ZFN1 target sequence

<400> 50  
 actccaaacgatcatgaccac tccgttca 28  
 <210> 51  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic DDX3Y ZFN2 target sequence  
 <400> 51  
 acagatcaga tgaagatgac tggtaaaa 28  
 <210> 52  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic DDX3Y ZFN3 target sequence  
 <400> 52  
 ctttcaagga aaaaaagaac aaaacccaa 28  
 <210> 53  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic DDX3Y ZFN4 target sequence  
 <400> 53  
 ggtctgtgat aaggacagtt caggatgg 28  
 <210> 54  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic DDX3Y ZFN5 target sequence  
 <  
 400> 54

taaatctgac tgagaatggg tagtagaa	28
<210> 55	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic DDX3Y ZFN6 target sequence	
<400> 55	
cagatgggcc aggagaggct ttgaaggc	28
<210> 56	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic DDX3Y ZFN7 target sequence	
<400> 56	
attgggcttc cctctgaaat cacgagat	28
<210> 57	
<211> 28	
<212> DNA	
<213>	
> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic DDX3Y ZFN8 target sequence	
<400> 57	
tttcagtgtat cgtggaagtgc gatccagg	28
<210> 58	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> Synthetic USP9Y ZFN1 target sequence	
<400> 58	
ctggtttggaa aatcgtaactg taaaagac	28
<210> 59	

<211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic USP9Y ZFN2 target sequence  
 <400> 59  
 gcaaagagg tgaggattt gacatatt 28

<210> 60  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic USP9Y ZFN3 target sequence  
 <400> 60  
 gagggagttt tggagaagtc tcattgga 28  
 <210> 61  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic USP9Y ZFN4 target sequence  
 <400> 61  
 atatgaacaa ggccaaggatg atgctcca 28  
 <210> 62  
 <211> 28  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Synthetic USP9Y ZFN5 target sequence  
 <  
 <400> 62  
 actcagaaga aggatttagga atgctttg 28  
 <210> 63  
 <211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic USP9Y ZFN6 target sequence

<400> 63

atgcttagaa atgtatcagt tcatacttg 28

<210> 64

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic USP9Y ZFN7 target sequence

<400> 64

tccataagga tttggaaaa agacacag 28

<210> 65

<211> 28

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic USP9Y ZFN8 target sequence

<400> 65

aggctgtgag tggatgaaag tttgaaat 28

<210> 66

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Kdm5dgA gRNA 1

<400> 66

uuugccgaau augcucucgu 20

<210> 67

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Kdm5dgb gRNA 2

&lt;400&gt; 67

uugccgaaua ugcucucgug

20

&lt;210&gt; 68

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Kdm5dgc gRNA 5

&lt;400&gt; 68

cgggcaucuc cauacuccu

20

&lt;210&gt; 69

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Usp9ygA gRNA 1

&lt;400&gt; 69

uagcucguug uguagcaccu

20

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic Usp9ygB gRNA 1

&lt;400&gt; 70

uauaguuucu ucgggguaac

20

&lt;210&gt; 71

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Synthetic Usp9ygC gRNA 2

<400> 71

ggauaccuu cuauaggccc 20

<210> 72

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic HMG box DNA binding motif upstream recognition sequence

<400> 72

tcccggtggtg agaggcac 18

<210> 73

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic HMG box DNA binding motif downstream recognition sequence

<400> 73

tatttgcat gctggat 18