(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0151871
(43) 공개일자 2024년10월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) *C12N 9/00* (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 9/93 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7033152
(22) 출원일자(국제) 2023년03월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년10월04일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/063672
(87) 국제공개번호 WO 2023/168397
국제공개일자 2023년09월07일
(30) 우선권주장
63/268,857 2022년03월04일 미국(US)

(71) 출원인
시그마-알드리치 컴퍼니., 엘엘씨
미국 미주리 63103 세인트 루이스 스프러스 스트리트 3050
(72) 발명자
라벨레테, 제임스
미국, 미주리 63103, 세인트 루이스, 스프루스 스트리트 3050, 씨/오 시그마-알드리치 코., 엘엘씨
오토, 메리
미국, 미주리 63103, 세인트 루이스, 스프루스 스트리트 3050, 씨/오 시그마-알드리치 코., 엘엘씨
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
강명구

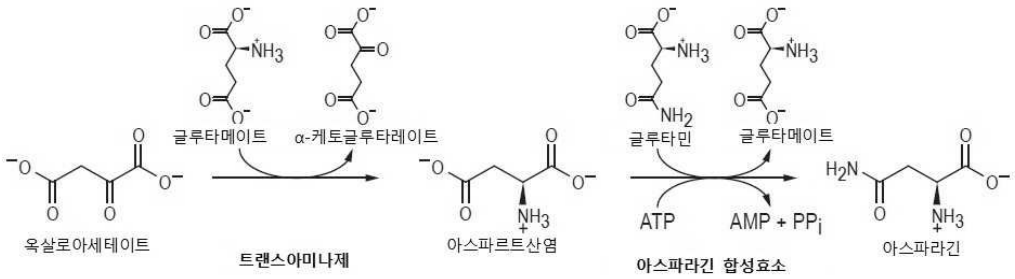
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **아스파라긴 생합성 경로를 통한 대사 선택**

(57) 요 약

본원 발명은 아스파라긴 합성효소(ASNS)의 감소 또는 제거된 발현을 포함하는 분리된 포유류 세포를 제공한다. 또한 이러한 세포를 제조하기 위한 방법 및 이러한 세포를 재조합 단백질의 생산에 이용하기 위한 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1



아스파라긴 생합성의 마지막 단계는 비중복 효소인 아스파라긴 합성효소(ASNS)가 필요한 단일 경로를 통해 완료된다. 기능적 ASNS 단백질이 없는 경우, 세포는 아미노산 아스파라긴의 외부 공급원이 필요하다.

(52) CPC특허분류
C12P 21/02 (2013.01)
C12Y 603/05004 (2013.01)
(72) 발명자
라자프스키, 데이비드
미국, 미주리 63103, 세인트 루이스, 스프루스 스트리트 3050, 씨/오 시그마-알드리치 코., 엘엘씨
구스틴, 제이슨 에이.
미국, 미주리 63103, 세인트 루이스, 스프루스 스트리트 3050, 씨/오 시그마-알드리치 코., 엘엘씨
보르그슐테, 트리싸
미국, 미주리 63103, 세인트 루이스, 스프루스 스트리트 3050, 씨/오 시그마-알드리치 코., 엘엘씨

명 세 서

청구범위

청구항 1

재조합 단백질 제품을 생산하기 위한 방법으로서, 다음 단계를 포함하는 방법:

(a) 내인성 아스파라긴 합성효소(ASNS)의 발현이 감소되거나 제거되도록 조작된 포유류 세포주를 제공하는 단계;

(b) 포유류 세포주에 폴리뉴클레오티드를 도입하되, 상기 폴리뉴클레오티드는 기능성 ASNS 유전자와 재조합 단백질을 인코딩하는 단계;

(c) 세포주를 배양하는 단계; 및

(d) 재조합 단백질을 정제하여 재조합 단백질 제품을 형성하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, (a)의 포유류 세포주는 내인성 글루타민 합성효소(GS)의 발현이 감소되거나 제거되는 것을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 내인성 ASNS 발현은 포유류 세포주의 내인성 ASNS 유전자를 불활성화함으로써 감소되거나 제거되는 것인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 내인성 ASNS 유전자는 표적화 엔도뉴클레아제 매개 유전체 변형 기술을 이용하여 불활성화되는 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 표적화 엔도뉴클레아제는 CRISPR 리보핵단백질 복합체 또는 한 쌍의 아연 핑거 뉴클레아제인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 포유류 세포주는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주, 아기 햄스터 신장(BHK) 세포주, NS0 생쥐 골수종 세포주, HEK293 세포주 또는 Vero 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 세포주는 CHO 세포주인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 재조합 단백질 제품은 항체, 항체 단편, 백신, 성장 인자, 사이토킨, 호르몬 또는 응고 인자에서 선택되는 것인 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 항체는 이중특이적 또는 다중특이적 항체인 방법.

청구항 10

생물학적 생산 시스템에서 이용하기 위한 유전자 조작된 포유류 세포주로서, 상기 포유류 세포주는 내인성 ASNS의 발현이 감소되거나 제거되도록 조작된 포유류 세포주.

청구항 11

제10항에 있어서, ASNS의 발현은 ASNS를 인코딩하는 염색체 서열의 적어도 하나의 대립유전자의 불활성화를 통해 감소되거나 제거되는 것인 포유류 세포주.

청구항 12

제11항에 있어서, ASNS를 인코딩하는 염색체 서열의 두 대립유전자 모두 불활성화되는 것인 포유류 세포주.

청구항 13

제10항에 있어서, 세포주는 내인성 글루타민 합성효소(GS)의 발현이 감소되거나 제거되도록 조작되는 포유류 세포주.

청구항 14

제12항에 있어서, 염색체 서열은 표적화 엔도뉴클레아제 매개 유전체 변형 기술을 이용하여 불활성화되는 것인 포유류 세포주.

청구항 15

제14항에 있어서, 표적화 엔도뉴클레아제는 리보핵단백질 복합체 또는 한 쌍의 아연 핑거 뉴클레아제인 포유류 세포주.

청구항 16

제15항에 있어서, 비인간 세포주는 중국 햄스터 난소(CHO) 세포주, 아기 햄스터 신장(BHK) 세포주, NS0 생쥐 골수종 세포주, HEK293 세포주 또는 Vero 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포주인 포유류 세포주.

청구항 17

제16항에 있어서, 세포주는 CHO 세포주인 포유류 세포주.

청구항 18

제17항에 있어서, 세포 생존율, 생존 세포 밀도, 역가, 성장률, 증식 반응, 세포 형태 및/또는 일반적인 세포 건강이 비조작된 부모 포유류 세포주와 유사한 것인 포유류 세포주.

청구항 19

제10항에 있어서, 항체, 항체 단편, 백신, 성장 인자, 사이토킨, 호르몬 또는 응고 인자에서 선택된 재조합 단백질을 인코딩하는 적어도 하나의 핵산을 추가로 포함하는 것인 포유류 세포주.

청구항 20

제19항에 있어서, 항체는 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체인 포유류 세포주.

청구항 21

기능성 ASNS와 적어도 하나의 관심 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 22

다음을 포함하는 폴리뉴클레오티드:

a) 기능성 ASNS를 인코딩하는 핵산 서열;

b) 기능성 GS를 인코딩하는 핵산 서열; 및

c) 관심 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열.

청구항 23

제1항에 있어서, 기능성 ASNS 유전자는 이종성 프로모터 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 기능성 ASNS 유전자는 내인성 프로모터 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 내인성 프로모터는 내인성 ASNS 프로모터인 방법.

청구항 26

제22항에 있어서, 기능성 ASNS는 내인성 ASNS 프로모터를 포함하는 것인 폴리뉴클레오티드.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **분야**

[0002] 본원 발명은 생물학적 생산 시스템에서 이용하기 위한 포유류 세포주에 관한 것으로, 포유류 세포주는 아스파라긴 생합성 경로의 구성요소의 발현이 감소되거나 제거되도록 조작되어 아스파라긴 영양요구 세포주를 생성한다.

배 경 기 술

[0003] **배경**

[0004] 생물 제조를 위한 고생산성 클론 세포주 개발은 전형적으로 글루타민 합성효소(글루타민 선택의 경우 GS), 디히드로폴레이트 수용체(히포크산틴 및 티미딘 선택의 경우 DHFR), 항생제 선택(푸로마이신, 히그로마이신, 블라스티시딘 등) 또는 P5C 합성효소(P5CS-프롤린 선택)와 같은 하나 이상의 잘 알려진 선택 방법을 활용한다. GS 시스템은 업계의 표준이 되었지만, 이중특이적 항체, 다중특이적 항체 및 발현을 위해 이펙터 단백질이 필요한 기타 다중사슬 효소/단백질 또는 단백질/효소와 같은 분자의 생산을 용이하게 하기 위해 두 개 이상의 벡터를 세포주에 도입할 수 있도록 다중 선택 방법을 허용하는 세포주가 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] **요약**

[0006] 본원 발명의 다양한 측면 중 하나는 생물학적 생산 시스템에서 이용하기 위한 포유류 세포주를 제공하는 것이며, 여기서 포유류 세포주는 내인성 아스파라긴 합성효소(ASNS) 유전자의 발현이 감소되거나 제거되도록 조작된다. 내인성으로 발현되는 기능성 ASNS 단백질이 없는 경우 세포는 아미노산 아스파라긴의 외인성 공급원을 필요로 한다. 염색체 ASNS 서열은 표적화 엔도뉴클레아제 매개 유전체 변형, 예를 들면 CRISPR 리보핵단백질(RNP) 복합체 또는 아연 핑거 뉴클레아제를 이용하여 불활성화될 수 있다. 본원 발명의 다른 측면은 포유류 세포주를 제공하는 것이며, 여기서 포유류 세포주는 내인성 ASNS 유전자의 발현이 감소되거나 제거되고 내인성 글루타민 합성효소(GS) 유전자의 발현이 감소되거나 제거되도록 조작된다.

[0007] 본원 발명의 또 다른 측면은 발현된 생물치료용 단백질의 생산성이 향상된 세포주를 선택하기 위한 공정을 포함한다. 본원 발명의 다른 측면은 다중 선택 시스템을 활용하여 이펙터 단백질의 발현을 보다 편리하게 필요로 하는 이중특이적 항체 또는 생물치료용 단백질의 발현을 위한 생물생산 시스템을 제공하는 것이다. 이 공정은 임의의 포유류 세포주에서 적어도 하나의 재조합 단백질을 발현하는 것을 포함한다.

[0008] 본원 발명의 다른 측면 및 반복 내용은 아래에서 더 자세히 설명한다.

도면의 간단한 설명

[0009] **도면의 간단한 설명**

도 1은 아스파라긴 생합성의 마지막 단계에서 아스파라긴 합성효소의 역할을 보여준다.

도 2는 선호하는 ZFN 결합 부위(밑줄)를 포함하여 CHOZN® GS$^{-/-}$ CHO 세포에서 ASNS의 cDNA 서열을 나타낸다.

도 3은 ASNS 유전자가 CHOZN® CHO GS$^{-/-}$ 세포주 유전체에 두 개의 사본으로 존재한다는 것을 나타내는 데이터를 보여준다.

도 4는 도 2에서 확인된 결합 부위를 표적으로 한 ZFN의 절단 활성을 보여준다.

도 5는 ZFN 절단으로 인한 ASNS 코딩 서열의 변화를 보여준다.

도 6은 글루타민 및/또는 아스파라긴 기반 선택 시스템에 이용되는 벡터를 보여준다.

도 7은 ASNS 유전자(프로모터)의 내인성 발현 제어 서열을 나타내며, 여기에는 유전자도입 벡터(밑줄)에 이용된 서열이 포함된다.

도 8은 ASNS 녹아웃 클론을 이용한 효과적인 아스파라긴 선택을 보여준다.

도 9는 아스파라긴 기반 선택 시스템에 의해 구동되는 효과적인 IgG 발현을 보여준다.

도 10은 각각 GS, ASNS 또는 이중 GS+ASNS 선택을 이용하여 GFP, RFP 또는 GFP+RFP를 발현하는 풀의 성장 및 생존율 데이터를 나타낸다.

도 11은 GS와 ASNS가 둘 모두 녹아웃된 CHO 세포 및 GS 코딩 서열, ASNS 코딩 서열, 또는 GS와 ASNS 코딩 서열 둘 모두를 포함하는 플라스미드를 활용한 효과적인 선택을 보여준다.

도 12는 각각 GS, ASNS 또는 이중 GS+ASNS 선택을 이용하여 GFP, RFP 또는 GFP+RFP를 발현하는 풀의 형광 발현 데이터를 나타낸다.

도 13은 각각 GS, ASNS 또는 이중 GS+ASNS 선택을 이용하여 IgG 중쇄 및 IgG 경쇄를 발현하는 풀의 IgG 발현 데이터를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] **상세한 설명**

[0011] 본원 발명은 내인성 ASNS 유전자의 발현이 감소되거나 제거되도록 조작된 포유류 세포주를 제공한다. 또한 내인성 GS 유전자의 발현이 감소되거나 제거되고 내인성 ASNS 유전자의 발현이 감소되거나 제거되도록 조작된 포유류 세포주가 제공된다. 상기 조작된 세포주를 생산하기 위한 방법, 그리고 재조합 단백질을 생산하기 위해 상기 조작된 세포주를 선택하고 이용하는 방법이 제공된다.

[0012] ***(I) 조작된 세포주***

[0013] 본원 발명의 한 측면은 내인성 ASNS 유전자의 발현이 감소되거나 제거되도록 조작된 포유류 세포주를 포함한다. 대안적으로 포유류 세포주는 내인성 ASNS 유전자와 내인성 GS 유전자 둘 모두의 발현이 감소되거나 제거되도록 조작된다.

[0014] ASNS의 발현이 감소 또는 제거되거나 ASNS 및 GS의 발현이 감소된 본원에 개시된 세포주는 ASNS 또는 GS 단백질을 인코딩하는 염색체 서열을 변형하도록 유전자 조작된다. 염색체 서열은 아래 섹션(III)에서 자세히 설명하는 표적 엔도뉴클레아제 매개 유전체 편집 기술을 이용하여 변형될 수 있다. 예를 들어, 염색체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오티드의 결실, 적어도 하나의 뉴클레오티드의 삽입, 적어도 하나의 뉴클레오티드의 치환, 또는 이들의 조합을 포함하도록 변형될 수 있으며, 이로써 해독틀이 이동되고 단백질 제품이 생성되지 않는다(즉, 염색체 서열이 불활성화된다). ASNS 또는 GS를 인코딩하는 염색체 서열의 대립유전자 하나를 불활성화하면 단백질의 발현이 감소된다(즉, 녹다운된다). ASNS 또는 GS를 인코딩하는 염색체 서열의 대립유전자 둘 모두를 불활성화하면 단백질의 발현이 없다(즉, 녹아웃된다).

[0015] 일부 실시형태에서, ASNS의 발현 수준은 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99%, 또는 약 99% 초과로 감소될 수 있다. 다른 실시형태에서, ASNS의 발현 수준은 당해 분야의 표준 기술(예: 웨스턴 면역블로팅 분석, ELISA 효소 분석, SDS 폴리아크릴아미드 겔 전기영동 등)을 이용하여 검출 불가능한 수준으로 감소될 수 있다.

[0016] 일반적으로, 본원에 개시된 조작된 세포주의 세포 생존율, 생존 세포 밀도, 역가, 성장률, 증식 반응, 세포 형

태, 아폽토시스 및 자가포식 수준 및/또는 일반적인 세포 건강은 아스파라긴 및/또는 외인성 ASNS 코딩 서열로 보충될 때 조작되지 않은 부모 세포와 유사하다.

[0017] **(a) 세포 유형**

[0018] 본원에 개시된 조작된 세포주는 포유류 세포주이다. 일부 실시형태에서, 조작된 세포주는 인간 세포주로부터 유래될 수 있다. 적합한 인간 세포주의 비제한적 예로는 인간 배아 신장 세포(HEK293, HEK293T); 인간 결합 조직 세포(HT-1080); 인간 자궁경부암 세포(HELA); 인간 배아 망막 세포(PER.C6); 인간 신장 세포(HKB-11); 인간 간 세포(Huh-7); 인간 폐 세포(W138); 인간 간 세포(Hep G2); 인간 U2-OS 골육종 세포, 인간 A549 폐 세포, 인간 A-431 표피 세포, CACO-2 인간 대장 선암종 세포, 인간 다능성 줄기 세포, Jurkat 인간 T 림프구 세포 또는 인간 K562 골수 세포가 있다. 다른 실시형태에서, 조작된 세포주는 비인간 세포주로부터 유래될 수 있다. 적합한 세포주에는 또한 중국 햄스터 난소(CHO) 세포; 아기 햄스터 신장(BHK) 세포; 생쥐 골수종 NS0 세포; 생쥐 골수종 Sp2/0 세포; 생쥐 유선 C127 세포; 생쥐 배아 섬유모세포 3T3 세포(NIH3T3); 생쥐 B 림프종 A20 세포; 생쥐 흑색종 B16 세포; 생쥐 근모세포 C2C12 세포; 생쥐 배아 중간엽 C3H-10T1/2 세포; 생쥐 암종 CT26 세포, 생쥐 전립선 DuCuP 세포; 생쥐 유방 EMT6 세포; 생쥐 간암 Hepa1c1c7 세포; 생쥐 골수종 J5582 세포; 생쥐 상피 MTD-1A 세포; 생쥐 심근 MyEnd 세포; 생쥐 신장 RenCa 세포; 생쥐 췌장 RIN-5F 세포; 생쥐 흑색종 X64 세포; 생쥐 림프종 YAC-1 세포; 쥐 교모세포종 9L 세포; 쥐 B 림프종 RBL 세포; 쥐 신경모세포종 B35 세포; 쥐 간암 세포(HTC); 버팔로 쥐 간 BRL 3A 세포; 개 신장 세포(MDCK); 개 유방(CMT) 세포; 쥐 골육종 D17 세포; 쥐 단핵구/대식세포 DH82 세포; 원숭이 신장 SV-40 형질전환 섬유모세포(COS7) 세포; 원숭이 신장 CVI-76 세포; 또는 아프리카 녹색 원숭이 신장(VERO, VERO-76) 세포가 포함된다. 포유류 세포주의 광범위한 목록은 American Type Culture Collection 카탈로그(ATCC, Manassas, VA)에서 찾을 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 세포주는 생쥐 세포주가 아니다. 특정 실시형태에서, 조작된 세포주는 CHO 세포주이다. 적합한 CHO 세포주에는 CHO-K1, CHO-K1SV, CHO GS-/-, CHO S, DG44, DuxB11 및 이들의 유도체가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0019] 다양한 실시형태에서, 부모 세포주는 글루타민 합성효소(GS), 디히드로폴레이트 환원효소(DHFR), 히포크산틴-구아닌 포스포리보실전달효소(HPRT) 또는 이들의 조합이 결핍될 수 있다. 예를 들어, GS, DHFR 및/또는 HPRT를 인코딩하는 염색체 서열은 불활성화될 수 있다. 특정 실시형태에서, GS, DHFR 및/또는 HPRT를 인코딩하는 모든 염색체 서열은 부모 세포주에서 불활성화된다.

[0020] **(b) 재조합 단백질을 인코딩하는 선택적 핵산**

[0021] 일부 실시형태에서, 본원에 개시된 조작된 세포주는 재조합 단백질을 인코딩하는 적어도 하나의 핵산을 추가로 포함할 수 있다. 일반적으로, 재조합 단백질은 이종성이며, 이는 단백질이 세포에 본래부터 존재하지 않는다는 것을 의미한다. 재조합 단백질은 항체, 항체의 단편, 단일클론 항체, 인간화 항체, 인간화 단일클론 항체, 키메라 항체, IgG 분자, IgG 중쇄, IgG 경쇄, IgA 분자, IgD 분자, IgE 분자, IgM 분자, 백신, 성장 인자, 사이토킨, 인터페론, 인터류킨, 호르몬, 응고(또는 응고) 인자, 혈액 성분, 효소, 치료용 단백질, 건강기능성 단백질, 상기 중 어느 것의 기능성 단편 또는 기능성 변이체, 또는 상기 중 어느 것의 단백질 및/또는 기능성 단편 또는 변이체를 포함하는 융합 단백질에서 선택된 치료용 단백질일 수 있으나 이들에 국한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 재조합 단백질은 이중특이적 항체 또는 다중특이적 항체이거나, 발현을 위해 이펙터 단백질을 필요로 하는 단백질이다.

[0022] 일부 실시형태에서, 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 아스파라긴 합성효소(ASNS), 히포크산틴-구아닌 포스포리보실전달효소(HPRT), 디히드로폴레이트 환원효소(DHFR) 및/또는 글루타민 합성효소(GS)를 인코딩하는 서열에 연결될 수 있으므로, ASNS, HPRT, DHFR 및/또는 GS가 선택 가능한 마커로 이용될 수 있다. 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 또한 적어도 하나의 항생제 내성 유전자를 인코딩하는 서열 및/또는 형광 단백질과 같은 마커 단백질을 인코딩하는 서열에 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 발현 구조물의 일부일 수 있다. 발현 구조물 또는 벡터는 추가 발현 제어 서열(예: 인핸서 서열, 코자크 서열, 폴리아데닐화 서열, 전사 종결 서열 등), 선택 가능한 마커 서열, 복제 원점 등을 포함할 수 있다. 추가 정보는 "Current Protocols in Molecular Biology" Ausubel et al., John Wiley & Sons, New York, 2003 또는 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" Sambrook & Russell, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 3rd edition, 2001에서 찾아볼 수 있다.

[0023] 일부 실시형태에서, 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 염색체 외부에 위치할 수 있다. 즉, 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 플라스미드, 코스미드, 인공 염색체, 미니염색체 또는 다른 염색체 외부 구조물로부터 일시적으로 발현될 수 있다. 다른 실시형태에서, 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산은 세포의 유전체에 염색체적으로

통합될 수 있다. 통합은 무작위적이거나 표적화될 수 있다. 따라서, 재조합 단백질은 안정적으로 발현될 수 있다. 이 실시형태의 일부 반복에서, 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 적절한 이종성 발현 제어 서열(즉, 프로모터)에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 다른 반복에서, 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 내인성 발현 제어 서열의 제어하에 놓일 수 있다. 재조합 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 상동성 재조합, 표적화 엔도뉴클레아제 매개 유전체 편집, 바이러스 벡터, 트랜스포존, 재조합효소 매개 카세트 교환 시스템, 플라스미드 및 기타 잘 알려진 수단을 이용하여 세포주의 유전체에 통합될 수 있다. 추가 지침은 Ausubel et al. 2003, *위와 같음* 및 Sambrook & Russell, 2001, *위와 같음*에서 찾을 수 있다.

[0024] ***(II) 키트***

[0025] 본원 발명의 추가 측면은 재조합 단백질을 생산하기 위한 키트를 제공하며, 여기서 키트는 위의 섹션 (I)에서 자세히 설명한 임의의 조작된 세포주를 포함한다. 키트는 세포 성장 배지, 형질감염 시약, 플라스미드 벡터, 선택 배지, 재조합 단백질 정제 수단, 완충액 등을 추가로 포함할 수 있다. 본원에서 제공되는 키트는 일반적으로 세포주를 성장시키고 이들을 이용하여 재조합 단백질을 생산하기 위한 지침을 포함한다. 키트에 포함된 지침은 포장재에 부착되거나 포장 삽입물로 포함될 수 있다. 지침은 전형적으로 서면 또는 인쇄된 자료이지만, 이들에 국한되지 않는다. 이러한 지침을 저장하고 최종 사용자에게 전달할 수 있는 모든 매체가 본원 발명에 의해 고려된다. 이러한 매체에는 전자 저장 매체(예: 자기 디스크, 테이프, 카트리지, 칩), 광학 매체(예: CD ROM) 등이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 본원에서 이용되는 용어 "지침"에는 지침을 제공하는 인터넷 사이트의 주소가 포함될 수 있다.

[0026] ***(III) 조작된 세포주를 제조하기 위한 방법***

[0027] 본원 발명의 또 다른 측면은 ASNS 및/또는 GS의 발현이 감소되거나 제거된 세포주를 제조 또는 조작하기 위한 방법을 제공하는데, 이는 상기 섹션(I)에서 설명된다. ASNS 및/또는 GS를 인코딩하는 염색체 서열은 다양한 기술을 이용하여 녹다운 또는 녹아웃될 수 있다. 일반적으로, 조작된 세포주는 표적화 엔도뉴클레아제 매개 유전체 변형 공정을 이용하여 제조된다. 당업자는 상기 조작된 세포주가 또한 부위 특이적 재조합 시스템, 무작위 돌연변이 또는 당해 분야에 알려진 다른 방법을 이용하여 제조될 수 있음을 이해한다.

[0028] 일반적으로, 조작된 세포주는 관심 있는 부모 세포주에 적어도 하나의 표적화 엔도뉴클레아제 또는 상기 표적화 엔도뉴클레아제를 인코딩하는 핵산을 도입하는 단계를 포함하는 방법에 의해 제조되며, 여기서 표적화 엔도뉴클레아제는 ASNS 및/또는 GS를 인코딩하는 염색체 서열을 표적으로 한다. 표적화 엔도뉴클레아제는 특정 염색체 서열을 인식하고 결합하여 이중 가닥 절단을 도입한다. 일부 실시형태에서, 이중 가닥 절단은 비상동성 말단 결합(NHEJ) 복구 과정에 의해 복구된다. NHEJ는 오류가 발생하기 쉽기 때문에, 적어도 하나의 뉴클레오티드의 결실, 삽입 및/또는 치환이 발생하여 염색체 서열의 해독틀이 파괴되어 단백질 제품이 생성되지 않거나 예를 들면 단백질의 효소 활성 부위가 파괴되어 비기능성 단백질이 생성될 수 있다. 다른 실시형태에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 또한 표적 염색체 서열의 일부와 실질적인 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오티드를 공동 도입함으로써 상동성 재조합 반응을 통해 염색체 서열을 변경하는 데 이용될 수 있다. 이러한 상황에서, 표적화 엔도뉴클레아제에 의해 도입된 이중 가닥 절단은 상동성 지향 복구 과정에 의해 복구되어 염색체 서열과 폴리뉴클레오티드의 교환이 염색체 서열이 변화되거나 변경되는 방식(예: 외인성 서열의 통합에 의해)으로 수행된다.

[0029] **(a) 표적화 엔도뉴클레아제**

[0030] 다양한 표적화 엔도뉴클레아제를 이용하여 ASNS 및/또는 GS를 인코딩하는 염색체 서열을 변형할 수 있다. 표적화 엔도뉴클레아제는 자연적으로 발생하는 단백질이거나 조작된 단백질일 수 있다. 적합한 표적화 엔도뉴클레아제에는 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), CRISPR 뉴클레아제, 전사 활성인자 유사 이펙터(TALE) 뉴클레아제(TALEN), 메가뉴클레아제, 키메라 뉴클레아제, 부위 특이적 엔도뉴클레아제 및 인공 표적 DNA 이중 가닥 절단 유도제가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0031] *(i) 아연 핑거 뉴클레아제*

[0032] 특정 실시형태에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 한 쌍의 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN)일 수 있다. ZFN은 특정 표적 서열에 결합하고 표적 절단 부위에 이중 가닥 절단을 도입한다. 전형적으로 ZFN은 DNA 결합 도메인(즉, 아연 핑거)와 절단 도메인(즉, 뉴클레아제)을 포함하며, 이들은 각각 아래에 설명되어 있다.

[0033] *DNA 결합 도메인*. DNA 결합 도메인 또는 아연 핑거는 선택한 모든 핵산 서열을 인식하고 결합하도록 조작될 수 있다. 참조: 예를 들면, Beerli et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nat. Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin.

Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; Zhang et al. (2000) J. Biol. Chem. 275(43):33850-33860; Doyon et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26:702-708; 및 Santiago et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:5809-5814. 조작된 아연 핑거 결합 도메인은 자연적으로 발생하는 아연 핑거 단백질과 비교하여 새로운 결합 특이성을 가질 수 있다. 조작 방법에는 합리적 설계 및 다양한 유형의 선택이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 합리적 설계에는 예를 들면 이중항, 삼중항 및/또는 사중항 뉴클레오티드 서열과 개별 아연 핑거 아미노산 서열을 포함하는 데이터베이스를 이용하는 것이 포함되며, 여기서 각 이중항, 삼중항 또는 사중항 뉴클레오티드 서열은 특정 삼중항 또는 사중항 서열에 결합하는 아연 핑거의 하나 이상의 아미노산 서열과 연관된다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,453,242 및 6,534,261을 참조하며, 이들의 개시 내용은 본원에 전체적으로 참고로 포함되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 6,453,242에 설명된 알고리즘은 미리 선택된 서열을 표적으로 하는 아연 핑거 결합 도메인을 설계하는 데 이용될 수 있다. 비축중성 인식 코드 테이블을 이용하는 합리적 설계와 같은 대체 방법도 특정 서열을 표적으로 하는 아연 핑거 결합 도메인을 설계하는 데 이용될 수 있다(Sera et al. (2002) Biochemistry 41:7074-7081). DNA 서열에서 잠재적인 표적 부위를 식별하고 아연 핑거 결합 도메인을 설계하기 위한 공개적으로 이용 가능한 웹 기반 도구는 당해 분야에 알려져 있다. 예를 들어, DNA 서열에서 잠재적인 표적 부위를 식별하기 위한 도구는 zincfingertools.org에서 찾을 수 있다. 아연 핑거 결합 도메인을 설계하기 위한 도구는 zifit.partners.org/ZiFiT에서 찾을 수 있다. (또한 Mandell et al. (2006) Nuc. Acid Res. 34:W516-W523; Sander et al. (2007) Nuc. Acid Res. 35:W599-W605를 참조한다).

[0034] 아연 핑거 결합 도메인은 길이가 약 3개 뉴클레오티드 내지 약 21개 뉴클레오티드인 DNA 서열을 인식하고 결합하도록 설계될 수 있다. 한 실시형태에서, 아연 핑거 결합 도메인은 길이가 약 9개 내지 약 18개 뉴클레오티드인 DNA 서열을 인식하고 결합하도록 설계될 수 있다. 일반적으로, 본원에서 이용되는 아연 핑거 뉴클레아제의 아연 핑거 결합 도메인은 적어도 3개의 아연 핑거 인식 영역 또는 아연 핑거를 포함하며, 여기서 각 아연 핑거는 3개의 뉴클레오티드에 결합한다. 한 실시형태에서, 아연 핑거 결합 도메인은 4개의 아연 핑거 인식 영역을 포함한다. 다른 실시형태에서, 아연 핑거 결합 도메인은 5개의 아연 핑거 인식 영역을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 아연 핑거 결합 도메인은 6개의 아연 핑거 인식 영역을 포함한다. 아연 핑거 결합 도메인은 임의의 적합한 표적 DNA 서열에 결합하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,607,882; 6,534,261 및 6,453,242를 참조하며, 이들의 개시 내용은 본원에 전체적으로 참고로 포함되어 있다.

[0035] 아연 핑거 인식 영역을 선택하는 대표적인 방법에는 파지 디스플레이와 2-하이브리드 시스템이 포함되며, 이들은 미국 특허 번호 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759; 및 6,242,568에서뿐만 아니라 WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 및 GB 2,338,237에 기술되어 있으며, 이들은 각각 본원에 전체적으로 참고로 포함되어 있다. 또한, 아연 핑거 결합 도메인에 대한 결합 특이성의 향상은 예를 들면 WO 02/077227에 기술되어 있으며, 이의 전체 내용은 본원에 참고로 포함되어 있다.

[0036] 아연 핑거 결합 도메인 및 융합 단백질(및 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드)의 설계와 구축 방법은 당업자에게 알려져 있으며, 예를 들면, 본원에 전체적으로 참고로 포함된 미국 특허 번호 7,888,121에 자세히 설명되어 있다. 아연 핑거 인식 영역 및/또는 다중 핑거 아연 핑거 단백질은 예를 들면 길이가 5개 이상의 아미노산인 링커를 포함한 적합한 링커 서열을 이용하여 함께 연결될 수 있다. 길이가 6개 이상의 아미노산인 링커 서열의 비제한적 예에 대해서는 본원에 전체적으로 참고로 포함된 미국 특허 번호 6,479,626; 6,903,185; 및 7,153,949를 참조한다. 본원에 설명된 아연 핑거 결합 도메인은 단백질의 개별 아연 핑거 사이에 적합한 링커의 조합을 포함할 수 있다.

[0037] *절단 도메인.* 아연 핑거 뉴클레아제는 또한 절단 도메인을 포함한다. 아연 핑거 뉴클레아제의 절단 도메인 부분은 모든 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로부터 얻을 수 있다. 절단 도메인이 유래될 수 있는 엔도뉴클레아제의 비제한적인 예로는 제한 엔도뉴클레아제 및 호밍 엔도뉴클레아제가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 예를 들어, New England Biolabs Catalog 또는 Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388을 참조한다. DNA를 절단하는 추가 효소가 알려져 있다(예: S1 뉴클레아제; 녹두 뉴클레아제; 췌장 DNase I; 미구균 뉴클레아제; 효모 HO 엔도뉴클레아제). 또한 Linn et al. (eds.) Nucleases, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993을 참조한다. 이들 효소 중 하나 이상(또는 이의 기능성 단편)은 절단 도메인의 공급원으로 이용될 수 있다.

[0038] 절단 도메인은 또한 상기 설명한 바와 같이 절단 활성을 위해 이량체화가 필요한 효소 또는 그 일부로부터 유래될 수 있다. 각 뉴클레아제가 활성 효소 이량체의 단량체를 포함하기 때문에 절단을 위해 두 개의 아연 핑거 뉴클레아제가 필요할 수 있다. 대안적으로 단일 아연 핑거 뉴클레아제가 두 단량체를 모두 포함하여 활성 효소 이

량체를 생성할 수 있다. 본원에서 이용되는 "활성 효소 이량체"는 핵산 분자를 절단할 수 있는 효소 이량체이다. 두 절단 단량체는 동일한 엔도뉴클레아제(또는 이의 기능성 단편)로부터 유래될 수 있거나, 각 단량체는 다른 엔도뉴클레아제(또는 이의 기능성 단편)로부터 유래될 수 있다.

[0039] 두 개의 절단 단량체를 이용하여 활성 효소 이량체를 형성하는 경우, 두 아연 핑거에 대한 인식 부위는 두 아연 핑거가 그들 각각의 인식 부위에 결합되어 절단 단량체가 서로에 대해 공간적 방향으로 배치되어 절단 단량체가 예를 들면 이량체화에 의해 활성 효소 이량체를 형성할 수 있도록 하는 것이 바람직하다. 결과적으로 인식 부위의 가까운 가장자리는 약 5개 내지 약 18개의 뉴클레오티드에 의해 분리될 수 있다. 예를 들어, 가까운 가장자리는 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개의 뉴클레오티드에 의해 분리될 수 있다. 그러나 임의의 정수 개의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 쌍이 두 인식 부위 사이에 끼어들 수 있다는 것이 이해될 것이다(예: 약 2개 내지 약 50개 뉴클레오티드 쌍 또는 그 초과). 예를 들어, 본원에서 자세히 설명한 것과 같은 아연 핑거 뉴클레아제의 인식 부위의 가까운 가장자리는 6개의 뉴클레오티드에 의해 분리될 수 있다. 일반적으로 절단 부위는 인식 부위 사이에 있다.

[0040] 제한 엔도뉴클레아제(제한 효소)는 많은 종에 존재하며 DNA에 서열 특이적으로 결합(인식 부위에서)하고 결합 부위 또는 그 근처에서 DNA를 절단할 수 있다. 특정 제한 효소(예: IIS형)는 인식 부위로부터 떨어진 부위에서 DNA를 절단하며 분리 가능한 결합 및 절단 도메인을 갖는다. 예를 들어, IIS형 효소 FokI는 한 가닥에서는 인식 부위로부터 9개 뉴클레오티드 떨어진 곳, 다른 가닥에서는 인식 부위로부터 13개 뉴클레오티드 떨어진 곳에서 DNA의 이중 가닥 절단을 촉매한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,356,802; 5,436,150 및 5,487,994뿐만 아니라 Li et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279; Li et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887; Kim et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31978-31982를 참조한다. 따라서, 아연 핑거 뉴클레아제는 적어도 하나의 IIS형 제한 효소로부터의 절단 도메인과 하나 이상의 아연 핑거 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 이는 조작되거나 조작되지 않을 수 있다. 예시적인 IIS형 제한 효소는 예를 들면 국제 공개 WO 07/014,275에 기술되어 있으며, 이의 개시 내용은 본원에 전체적으로 참고로 포함되어 있다. 추가 제한 효소는 또한 분리 가능한 결합 및 절단 도메인을 포함하며, 이들 역시 본원 발명에 의해 고려된다. 예를 들어, Roberts et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420을 참조한다.

[0041] 결합 도메인으로부터 절단 도메인을 분리할 수 있는 예시적인 IIS형 제한 효소는 FokI이다. 이 특정 효소는 이량체로 활성이다(Bitinaite et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 10, 570-10, 575). 따라서 본원 발명의 목적을 위해 아연 핑거 뉴클레아제에 이용된 FokI 효소의 일부는 절단 단량체로 간주된다. 따라서 FokI 절단 도메인을 이용한 표적 이중 가닥 절단의 경우, 각각 FokI 절단 단량체를 포함하는 두 개의 아연 핑거 뉴클레아제를 이용하여 활성 효소 이량체를 재구성할 수 있다. 대안적으로 아연 핑거 결합 도메인과 두 개의 FokI 절단 단량체를 포함하는 단일 폴리펩티드 분자를 이용할 수도 있다.

[0042] 특정 실시형태에서, 절단 도메인은 동종이량체화를 최소화하거나 방지하는 하나 이상의 조작된 절단 단량체를 포함한다. 비제한적인 예로서, FokI의 위치 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537 및 538의 아미노산 잔기는 모두 FokI 절단 절반 도메인의 이량체화에 영향을 미치는 표적이다. 절대 이종이량체를 형성하는 FokI의 예시적인 조작된 절단 단량체에는 FokI의 아미노산 잔기 위치 490 및 538에서 돌연변이를 포함하는 첫 번째 절단 단량체와 아미노산 잔기 위치 486 및 499에서 돌연변이를 포함하는 두 번째 절단 단량체의 쌍이 포함된다.

[0043] 따라서, 조작된 절단 단량체의 한 실시형태에서, 아미노산 위치 490에서의 돌연변이는 Glu(E)를 Lys(K)로 대체하고; 아미노산 잔기 538에서의 돌연변이는 Iso(I)를 Lys(K)로 대체하고; 아미노산 잔기 486에서의 돌연변이는 Gln(Q)을 Glu(E)로 대체하고; 위치 499에서의 돌연변이는 Iso(I)를 Lys(K)로 대체한다. 구체적으로, 조작된 절단 단량체는 한 절단 단량체에서 위치 490을 E에서 K로, 538을 I에서 K로 돌연변이시켜 "E490K:I538K"로 지정된 조작된 절단 단량체를 생성하고, 다른 절단 단량체에서 위치 486을 Q에서 E로, 499를 I에서 K로 돌연변이시켜 "Q486E:I499K"로 지정된 조작된 절단 단량체를 생성함으로써 제조될 수 있다. 위에 설명된 조작된 절단 단량체는 변칙적 절단이 최소화되거나 전폐된 절대 이종이량체 돌연변이체이다. 조작된 절단 단량체는 예를 들면, 미국 특허 번호 7,888,121에 설명된 대로 야생형 절단 단량체(FokI)의 부위 특이적 돌연변이를 통해 적절한 방법을 이용하여 제조할 수 있으며, 이는 본원에 전체적으로 포함되어 있다.

[0044] *추가 도메인.* 일부 실시형태에서, 아연 핑거 뉴클레아제는 또한 적어도 하나의 핵 국소화 서열(NLS)을 포함한다. NLS는 염색체의 표적 서열에 이중 가닥 절단을 도입하기 위해 아연 핑거 뉴클레아제 단백질을 핵으로

표적화하는 것을 용이하게 하는 아미노산 서열이다. 핵 국소화 신호는 당해 분야에 알려져 있다(예를 들면, Lange et al., J. Biol. Chem., 2007, 282:5101-5105 참조). 핵 국소화 신호의 비제한적 예로는 PKKKRKV(서열 번호:1), PKKKRRV(서열 번호:2), KRPAATKKAGQAKKKK(서열 번호:3), YGRKKRRQRRR(서열 번호:4), RKKRRQRRR(서열 번호:5), PAAKRVKLD(서열 번호:6), RQRRNELKRSP(서열 번호:7), VSRKRPRP(서열 번호:8), PPKKARED(서열 번호:9), PQPKKKPL(서열 번호:10), SALIKKKKKMAP(서열 번호:11), PKQKKRK(서열 번호:12), RKLKKKIKKL(서열 번호:13), REKKKFLKRR(서열 번호:14), KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK(서열 번호:15), RKCLQAGMNLEARKTKK(서열 번호:16), NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY(서열 번호:17) 및 RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV(서열 번호:18)가 있다. NLS는 아연 핑거 뉴클레아제의 N 말단, C 말단 또는 내부 위치에 위치할 수 있다.

[0045] 추가 실시형태에서, 아연 핑거 뉴클레아제는 또한 적어도 하나의 세포 침투 도메인을 포함할 수 있다. 적합한 세포 침투 도메인의 예로는 제한 없이 GRKKRRQRRRPPQPKKKRKV(서열 번호:19), PLSSIFSRIGDPPKKKRKV(서열 번호:20), GALFLGWLGAAGSTMGAPKKKRKV(서열 번호:21), GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV(서열 번호:22), KETWWETWWTEWSQPKKKRKV(서열 번호:23), YARAAARQARA(서열 번호:24), THRLPRRRRRR(서열 번호:25), GGRRARRRRRR(서열 번호:26), RRQRRTSKLMKR(서열 번호:27), GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL(서열 번호:28), KALAWEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA(서열 번호:29) 및 RQIKIWFQNRRMKWKK(서열 번호:30)가 있다. 세포 침투 도메인은 아연 핑거 뉴클레아제의 N 말단, C 말단 또는 내부 위치에 위치할 수 있다.

[0046] 다른 실시형태에서, 아연 핑거 뉴클레아제는 적어도 하나의 마커 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 마커 도메인의 비제한적인 예로는 형광 단백질, 정제 태그 및 에피토프 태그가 있다. 한 실시형태에서, 마커 도메인은 형광 단백질일 수 있다. 적합한 형광 단백질의 비제한적 예로는 녹색 형광 단백질(예: GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, 단량체성 Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), 황색 형광 단백질(예: YFP, EYFP, 시트린(Citrine), Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), 청색 형광 단백질(예: EBFP, EBFP2, 아주리트(Azurite), mKalama1, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), 청록색 형광 단백질(예: ECFP, 세루리안(Cerulean), CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), 적색 형광 단백질(mKate, mKate2, mPlum, DsRed 단량체, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-단량체, HcRed-탠덤, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRasberry, mStrawberry, Jred), 그리고 오렌지색 형광 단백질(mOrange, mKO, Kusabira-Orange, 단량체성 Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) 또는 다른 적합한 형광 단백질이 있다. 다른 실시형태에서, 마커 도메인은 정제 태그 및/또는 에피토프 태그일 수 있다. 적합한 태그에는 폴리(His) 태그, FLAG(또는 DDK) 태그, Halo 태그, AcV5 태그, AU1 태그, AU5 태그, 비오틴 카르복실 운반 단백질(BCCP), 칼모듈린 결합 단백질(CBP), 키틴 결합 도메인(CBD), E 태그, E2 태그, ECS 태그, eXact 태그, Glu-Glu 태그, 글루타치온-S-전달효소(GST), HA 태그, HSV 태그, KT3 태그, 말토오스 결합 단백질(MBP), MAP 태그, Myc 태그, NE 태그, NusA 태그, PDZ 태그, S 태그, S1 태그, SBP 태그, Softag 1 태그, Softag 3 태그, Spot 태그, Strep 태그, SUMO 태그, T7 태그, 탠덤 친화성 정제(TAP) 태그, 티오레독신(TRX), V5 태그, VSV-G 태그 및 Xa 태그가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 마커 도메인은 아연 핑거 뉴클레아제의 N 말단, C 말단 또는 내부 위치에 위치할 수 있다.

[0047] 적어도 하나의 핵 국소화 신호, 적어도 하나의 세포 침투 도메인 및/또는 적어도 하나의 마커 도메인은 하나 이상의 화학 결합(예: 공유 결합)을 통해 아연 핑거 뉴클레아제에 직접 연결될 수 있다. 대안적으로 적어도 하나의 핵 국소화 신호, 적어도 하나의 세포 침투 도메인 및/또는 적어도 하나의 마커 도메인은 하나 이상의 링커를 통해 아연 핑거 뉴클레아제에 간접 연결될 수 있다. 적합한 링커에는 아미노산, 펩티드, 뉴클레오티드, 핵산, 유기 링커 분자(예: 말레이미드 유도체, N-에톡시벤질이미다졸, 비페닐-3,4',5-트리카르복실산, p-아미노벤질옥시카르보닐 등), 이황화 링커 및 중합체 링커(예: PEG)가 포함된다. 링커는 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 아릴, 헤테로아릴, 아랄킬, 아랄케닐, 아랄키닐 등을 포함하지만 이들에 국한되지 않는 하나 이상의 스페이싱 기를 포함할 수 있다. 링커는 중성일 수 있거나 양전하 또는 음전하를 가질 수 있다. 또한, 링커는 절단 가능하여 링커를 다른 화학기에 연결하는 링커의 공유 결합이 pH, 온도, 염 농도, 빛, 촉매 또는 효소를 포함한 특정 조건하에 끊어지거나 절단될 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 펩티드 링커일 수 있다. 펩티드 링커는 유연한 아미노산 링커 또는 단단한 아미노산 링커일 수 있다. 적합한 링커의 추가 예는 당해 분야에서 잘 알려져 있으며, 링커를 설계하는 프로그램은 쉽게 이용할 수 있다(Crasto *et al.*, Protein Eng., 2000, 13(5):309-312).

[0048] *(ii) CRISPR 리보핵단백질(RNP)*

[0049] 다른 실시형태에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 군집화된 규칙적 간격의 짧은 회문성 반복(CRISPR) 뉴클레아제일 수 있다. CRISPR 뉴클레아제는 세균 또는 고세균 CRISPR/CRISPR-연관(Cas) 시스템으로부터 유래된 RNA 안내 뉴

클레아제이다. CRISPR RNP 시스템은 CRISPR 뉴클레아제와 안내 RNA로 구성된다.

[0050] 뉴클레아제. CRISPR 뉴클레아제는 다양한 세균 및 고세균에 존재하는 I형(즉, IA, IB, IC, ID, IE 또는 IF), II형(즉, IIA, IIB 또는 IIC), III형(즉, IIIA 또는 IIIB), V형 또는 VI형 CRISPR 시스템으로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, CRISPR 뉴클레아제는 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*) 종(예: 스트렙토코쿠스 피오게네스(*S. pyogenes*), 스트렙토코쿠스 써모필루스(*S. thermophilus*), 스트렙토코쿠스 파스테우리아누스(*S. pasteurianus*)), 캄필로박터(*Campylobacter*) 종(예: 캄필로박터 제주니(Campylobacter jejuni)), 프란시셀라(*Francisella*) 종(예: 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*)), 아카리오클로리스(*Acaryochloris*) 종, 아세토할로비움(*Acetohalobium*) 종, 아시다미노코쿠스(*Acidaminococcus*) 종, 아시디티오바실루스(*Acidithiobacillus*) 종, 알리사이클로바실루스(*Alicyclobacillus*) 종, 알로크로마티움(*Allochromatium*) 종, 암모니펙스(*Ammonifex*) 종, 아나바에나(*Anabaena*) 종, 아르트로스피라(*Arthrospira*) 종, 바실루스(*Bacillus*) 종, 버크홀데리아목(*Burkholderiales*) 종, 칼디셀룰로시럽토(*Caldicelulosiruptor*) 종, 칸디다투스(*Candidatus*) 종, 클로스트리듐(*Clostridium*) 종, 크로코스파에라(*Crocosphaera*) 종, 시아노테세(*Cyanothece*) 종, 엑시구오박테리움(*Exiguobacterium*) 종, 피네골디아(*Finegoldia*) 종, 크테도노박터(*Ktedonobacter*) 종, 라크노스피라시에(*Lachnospiraceae*) 종, 락토바실루스(*Lactobacillus*) 종, 린그비아(*Lyngbya*) 종, 마리노박터(*Marinobacter*) 종, 메타노할로비움(*Methanohalobium*) 종, 마이크로실라(*Microscilla*) 종, 마이크로콜레우스(*Microcoleus*) 종, 마이크로시스티스(*Microcystis*) 종, 나트라나에로비우스(*Natranaerobius*) 종, 나이세리아(*Neisseria*) 종, 니트로소코쿠스(*Nitrosococcus*) 종, 노카르디옵시스(*Nocardiopsis*) 종, 노둘라리아(*Nodularia*) 종, 노스톡(*Nostoc*) 종, 오실라토리아(*Oscillatoria*) 종, 폴라로모나스(*Polaromonas*) 종, 펠로토마쿨럼(*Pelotomaculum*) 종, 슈도알테로모나스(*Pseudoalteromonas*) 종, 페트로토가(*Petrotoga*) 종, 프레보텔라(*Prevotella*) 종, 스타필로코쿠스(*Staphylococcus*) 종, 스트렙토미세스(*Streptomyces*) 종, 스트렙토스포랑기움(*Streptosporangium*) 종, 시네코코쿠스(*Synechococcus*) 종, 써모시포(*Thermosipho*) 종, 또는 우미균류(*Verrucomicrobia*) 종으로부터 유래될 수 있다. 다른 실시형태에서, CRISPR 뉴클레아제는 고세균 CRISPR 시스템, CRISPR/CasX 시스템 또는 CRISPR/CasY 시스템(Burstein *et al.*, Nature, 2017, 542(7640):237-241)으로부터 유래될 수 있다.

[0051] 일부 실시형태에서, CRISPR 뉴클레아제는 II형 CRISPR 뉴클레아제로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, II형 CRISPR 뉴클레아제는 Cas9 단백질일 수 있다. 적합한 Cas9 뉴클레아제에는 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*) Cas9(SpCas9), 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*) Cas9(FnCas9), 스타필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)(SaCas9), 스트렙토코쿠스 써모필루스(*Streptococcus thermophilus*) Cas9(StCas9), 스트렙토코쿠스 파스테우리아누스(*Streptococcus pasteurianus*)(SpaCas9), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) Cas9(CjCas9), 수막염균(*Neisseria meningitis*) Cas9(NmCas9), 또는 나이세리아 시네레아(*Neisseria cinerea*) Cas9(NcCas9)가 포함된다. 다른 실시형태에서, CRISPR 뉴클레아제는 Cpf1 뉴클레아제와 같은 V형 CRISPR 뉴클레아제로부터 유래될 수 있다. 적합한 Cpf1 뉴클레아제에는 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*) Cpf1(FnCpf1), 아시다미노코쿠스(*Acidaminococcus*) 종 Cpf1(AsCpf1), 또는 라크노스피라시에 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium*) ND2006 Cpf1(LbCpf1)이 포함된다. 또 다른 실시형태에서, CRISPR 뉴클레아제는 렙토트리키아 와데이(*Leptotrichia wadei*) Cas13a(LwaCas13a) 또는 렙토트리키아 샤히이(*Leptotrichia shahii*) Cas13a(LshCas13a)와 같은 VI형 CRISPR 뉴클레아제로부터 유래될 수 있다.

[0052] CRISPR 뉴클레아제는 야생형 CRISPR 뉴클레아제, 변형된 CRISPR 뉴클레아제, 또는 야생형 또는 변형된 CRISPR 뉴클레아제의 단편일 수 있다. CRISPR 뉴클레아제는 핵산 결합 친화성 및/또는 특이성을 증가시키고, 효소 활성을 변경하고, 및/또는 단백질의 다른 특성을 변화시키도록 변형될 수 있다. 예를 들어, CRISPR 뉴클레아제의 뉴클레아제(즉, DNase, RNase) 도메인은 변형, 결실 또는 불활성화될 수 있다. CRISPR 뉴클레아제는 뉴클레아제의 기능에 필수적이지 않은 도메인을 제거하기 위해 절두될 수 있다.

[0053] CRISPR 뉴클레아제는 두 개의 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 예를 들어, Cas9 뉴클레아제는 안내 RNA 상보성 가닥을 절단하는 HNH 도메인과 비상보성 가닥을 절단하는 RuvC 도메인을 포함하고; Cpf1 뉴클레아제는 RuvC 도메인과 NUC 도메인을 포함하고; Cas13a 뉴클레아제는 두 개의 HNEPN 도메인을 포함한다. 두 뉴클레아제 도메인이 모두 기능하는 경우, CRISPR 뉴클레아제는 이중 가닥 절단을 도입한다. 두 뉴클레아제 도메인 중 하나는 하나 이상의 돌연변이 및/또는 결실에 의해 불활성화될 수 있으며, 따라서 이중 가닥 서열의 한쪽 가닥에 단일 가닥 절단을 도입하는 변이체를 생성한다. 예를 들어, Cas9 뉴클레아제의 RuvC 도메인에서 하나 이상의 돌연변이(예: D10A, D8A, E762A 및/또는 D986A)는 안내 RNA 상보성 가닥을 틈내는 HNH 틈내기효소를 생성하고; 그리고 Cas9 뉴클레아제의 HNH 도메인에서 하나 이상의 돌연변이(예: H840A, H559A, N854A, N856A 및/또는 N863A)는

안내 RNA 비상보성 가닥을 틈내는 RuvC 틈내기효소를 생성한다. 비슷한 돌연변이는 Cpf1 및 Cas13a 뉴클레아제를 틈내기효소로 전환할 수 있다. 염색체 서열의 반대 가닥을 표적으로 하는 두 개의 CRISPR 틈내기효소(한 쌍의 오프셋 안내 RNA를 통해)를 조합으로 이용하여 염색체 서열에서 이중 가닥 절단을 생성할 수 있다. 이중 CRISPR 틈내기효소 RNP는 표적 특이성을 높이고 비표적 효과를 줄일 수 있다.

[0054] *추가 도메인.* CRISPR 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 서열(NLS)을 추가로 포함할 수 있다. NLS는 염색체의 표적 서열에 이중 가닥 절단을 도입하기 위해 아연 핑거 뉴클레아제 단백질을 핵으로 표적화하는 것을 용이하게 하는 아미노산 서열이다. 핵 국소화 신호는 당해 분야에 알려져 있다(예를 들면, Lange et al., J. Biol. Chem., 2007, 282:5101-5105 참조). 핵 국소화 신호의 비제한적 예로는 PKKKRKV(서열 번호:1), PKKKRRV(서열 번호:2), KRPAATKKAGQAKKKK(서열 번호:3), YGRKKRRQRRR(서열 번호:4), RKKRRQRRR(서열 번호:5), PAAKRVKLD(서열 번호:6), RQRRNELKRSP(서열 번호:7), VSRKRPRP(서열 번호:8), PPKKARED(서열 번호:9), PQPKKKPL(서열 번호:10), SALIKKKKKMAP(서열 번호:11), PKQKKRK(서열 번호:12), RKLKKKIKKL(서열 번호:13), REKKKFLKRR(서열 번호:14), KRKGDEVDGVDEVAKKKSKK(서열 번호:15), RKCLQAGMNLEARKTKK(서열 번호:16), NQSSNFGPMKGGNFGGRSSGPYGGGGQYFAKPRNQGGY(서열 번호:17) 및 RMRIZFKNKGKDTAELRRRRVEVSVELRKAKKDEQILKRRNV(서열 번호:18)가 있다. NLS는 CRISPR 뉴클레아제의 N 말단, C 말단 또는 내부 위치에 위치할 수 있다.

[0055] 추가 실시형태에서, CRISPR 뉴클레아제는 또한 적어도 하나의 세포 침투 도메인을 포함할 수 있다. 적합한 세포 침투 도메인의 예로는 제한 없이 GRKKRRQRRRPPQPKKKRKV(서열 번호:19), PLSSIFSRIGDPPKKKRKV(서열 번호:20), GALFLGWLGAAGSTMGAPKKKRKV(서열 번호:21), GALFLGFLGAAGSTMGAWSQPKKKRKV(서열 번호:22), KETWWETWWTEWSQPKKKRKV(서열 번호:23), YARAAARQARA(서열 번호:24), THRLPRRRRRR(서열 번호:25), GGRRARRRRRR(서열 번호:26), RRQRRTSKLMKR(서열 번호:27), GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL(서열 번호:28), KALAWEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKCEA(서열 번호:29) 및 RQIKIWFQNRRMKWKK(서열 번호:30)가 있다. 세포 침투 도메인은 CRISPR 단백질의 N 말단, C 말단 또는 내부 위치에 위치할 수 있다.

[0056] 다른 실시형태에서, CRISPR 뉴클레아제는 적어도 하나의 마커 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 마커 도메인의 비제한적인 예로는 형광 단백질, 정제 태그 및 에피토프 태그가 있다. 한 실시형태에서, 마커 도메인은 형광 단백질일 수 있다. 적합한 형광 단백질의 비제한적 예로는 녹색 형광 단백질(예: GFP, GFP-2, tagGFP, turboGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, 단량체성 Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), 황색 형광 단백질(예: YFP, EYFP, 시트린(Citrine), Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), 청색 형광 단백질(예: EBFP, EBFP2, 아주리트(Azurite), mKalama1, GFPuv, Sapphire, T-sapphire), 청록색 형광 단백질(예: ECFP, 세루리안(Cerulean), CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), 적색 형광 단백질(mKate, mKate2, mPlum, DsRed 단량체, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-단량체, HcRed-탠덤, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRasberry, mStrawberry, Jred), 그리고 오렌지색 형광 단백질(mOrange, mKO, Kusabira-Orange, 단량체성 Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) 또는 다른 적합한 형광 단백질이 있다. 다른 실시형태에서, 마커 도메인은 정제 태그 및/또는 에피토프 태그일 수 있다. 적합한 태그에는 폴리(His) 태그, FLAG(또는 DDK) 태그, Halo 태그, AcV5 태그, AU1 태그, AU5 태그, 비오틴 카르복실 운반 단백질(BCCP), 칼모듈린 결합 단백질(CBP), 키틴 결합 도메인(CBD), E 태그, E2 태그, ECS 태그, eXact 태그, Glu-Glu 태그, 글루타치온-S-전달효소(GST), HA 태그, HSV 태그, KT3 태그, 말토오스 결합 단백질(MBP), MAP 태그, Myc 태그, NE 태그, NusA 태그, PDZ 태그, S 태그, S1 태그, SBP 태그, Softag 1 태그, Softag 3 태그, Spot 태그, Strep 태그, SUMO 태그, T7 태그, 탠덤 친화성 정제(TAP) 태그, 티오레독신(TRX), V5 태그, VSV-G 태그 및 Xa 태그가 포함되지만 이들에 국한되지 않는다. 마커 도메인은 CRISPR 뉴클레아제의 N 말단, C 말단 또는 내부 위치에 위치할 수 있다.

[0057] 적어도 하나의 핵 국소화 신호, 적어도 하나의 세포 침투 도메인 및/또는 적어도 하나의 마커 도메인은 하나 이상의 화학 결합(예: 공유 결합)을 통해 CRISPR 뉴클레아제에 직접 연결될 수 있다. 대안적으로 적어도 하나의 핵 국소화 신호, 적어도 하나의 세포 침투 도메인 및/또는 적어도 하나의 마커 도메인은 하나 이상의 링커를 통해 CRISPR 뉴클레아제에 간접 연결될 수 있다. 적합한 링커에는 아미노산, 펩티드, 뉴클레오티드, 핵산, 유기 링커 분자(예: 말레이미드 유도체, N-에톡시벤질이미다졸, 비페닐-3,4',5-트리카르복실산, p-아미노벤질옥시카르보닐 등), 이황화 링커 및 중합체 링커(예: PEG)가 포함된다. 링커는 알킬렌, 알케닐렌, 알키닐렌, 알킬, 알케닐, 알키닐, 알콕시, 아릴, 헤테로아릴, 아랄킬, 아랄케닐, 아랄키닐 등을 포함하지만 이들에 국한되지 않는 하나 이상의 스페이싱 기를 포함할 수 있다. 링커는 중성일 수 있거나 양전하 또는 음전하를 가질 수 있다. 또한, 링커는 절단 가능하여 링커를 다른 화학기에 연결하는 링커의 공유 결합이 pH, 온도, 염 농도, 빛, 촉매 또는 효소를 포함한 특정 조건하에 끊어지거나 절단될 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커는 펩티드 링커일 수 있다. 펩티드 링커는 유연한 아미노산 링커 또는 단단한 아미노산 링커일 수 있다. 적합한 링커의 추가 예는 당해

분야에서 잘 알려져 있으며, 링커를 설계하는 프로그램은 쉽게 이용할 수 있다.

[0058] *안내 RNA*. CRISPR 뉴클레아제는 안내 RNA에 의해 표적 부위로 안내된다. 안내 RNA는 표적 부위와 혼성화하고 CRISPR 뉴클레아제와 상호 작용하여 CRISPR 뉴클레아제를 염색체 서열의 표적 부위로 지향시킨다. 표적 부위는 서열이 프로토스페이서 인접 모티프(PAM)와 경계를 이루는 것을 제외하고는 서열 제한이 없다. 다른 세균 종으로부터의 CRISPR 단백질은 다른 PAM 서열을 인식한다. 예를 들어, PAM 서열에는 5'-NGG(SpCas9, FnCAs9), 5'-NGRRT(SaCas9), 5'-NNAGAAW(StCas9), 5'-NNNNGATT(NmCas9), 5-NNNNRYAC(CjCas9) 및 5'-TTTV(Cpf1)가 포함되며, 여기서 N은 임의의 뉴클레오티드로 정의되고, R은 G 또는 A로 정의되고, W는 A 또는 T로 정의되고, Y는 C 또는 T로 정의되고, V는 A, C 또는 G로 정의된다. Cas9 PAM은 표적 부위의 3'에 위치하고, cpf1 PAM은 표적 부위의 5'에 위치한다.

[0059] 안내 RNA는 세 영역으로 구성된다: 표적 부위의 서열에 상보적인 5' 말단의 첫 번째 영역, 스템 루프 구조를 형성하는 두 번째 내부 영역, 본질적으로 단일 가닥으로 유지되는 세 번째 3' 영역. 각 안내 RNA의 첫 번째 영역은 각 안내 RNA가 CRISPR 뉴클레아제를 특정 표적 부위로 안내하도록 서로 다르다. 각 안내 RNA의 두 번째 및 세 번째 영역(골격 영역이라고도 함)은 모든 안내 RNA에서 동일할 수 있다.

[0060] 안내 RNA의 첫 번째 영역은 표적 부위의 서열(즉, 프로토스페이서 서열)에 상보적이어서 안내 RNA의 첫 번째 영역은 표적 부위의 서열과 염기쌍을 이룰 수 있다. 안내 RNA의 첫 번째 영역(즉, crRNA)과 표적 서열 사이의 상보성은 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 그 초과일 수 있다. 일반적으로, 안내 RNA의 첫 번째 영역의 서열과 표적 부위의 서열 사이에는 부정합이 없다(즉, 상보성이 완전하다). 다양한 실시형태에서, 안내 RNA의 첫 번째 영역은 약 10개의 뉴클레오티드 내지 약 25개 초과의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 안내 RNA의 첫 번째 영역과 염색체 서열의 표적 부위 사이의 염기 대합 영역은 길이가 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 25, 또는 25개 초과의 뉴클레오티드일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 안내 RNA의 첫 번째 영역은 길이가 약 19, 20 또는 21개 뉴클레오티드이다.

[0061] 안내 RNA는 또한 이차 구조를 형성하는 두 번째 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이차 구조는 스템(또는 헤어핀)과 루프를 포함한다. 루프와 스템의 길이는 다양할 수 있다. 예를 들어, 루프는 약 3개 내지 약 10개 뉴클레오티드 길이의 범위일 수 있고, 스템은 약 6개 내지 약 20개 염기쌍 길이의 범위일 수 있다. 스템은 1개 내지 약 10개 뉴클레오티드의 하나 이상의 돌출부를 포함할 수 있다. 따라서, 두 번째 영역의 전체 길이는 약 16개 내지 약 60개 뉴클레오티드 길이의 범위일 수 있다. 예시적인 실시형태에서, 루프는 약 4개 뉴클레오티드 길이이고, 스템은 약 12개 염기쌍을 포함한다.

[0062] 안내 RNA는 또한 3' 말단에 본질적으로 단일 가닥으로 유지되는 세 번째 영역을 포함한다. 따라서 세 번째 영역은 관심 세포의 어떠한 염색체 서열과도 상보성이 없으며 안내 RNA의 나머지 부분과도 상보성이 없다. 세 번째 영역의 길이는 다양할 수 있다. 일반적으로 세 번째 영역은 길이가 약 4개 뉴클레오티드 초과이다. 예를 들어, 세 번째 영역의 길이는 약 5개 내지 약 60개 뉴클레오티드 길이의 범위일 수 있다.

[0063] 안내 RNA의 두 번째와 세 번째 영역(또는 골격)의 통합 길이는 약 30개 내지 약 120개 뉴클레오티드 길이의 범위일 수 있다. 한 측면에서, 안내 RNA의 두 번째와 세 번째 영역의 통합 길이는 약 70개 내지 약 100개 뉴클레오티드 길이의 범위일 수 있다.

[0064] 일부 실시형태에서, 안내 RNA는 세 영역 모두를 포함하는 하나의 분자를 포함한다. 다른 실시형태에서, 안내 RNA는 두 개의 별개 분자를 포함할 수 있다. 첫 번째 RNA 분자는 안내 RNA의 첫 번째(5') 영역과 안내 RNA의 두 번째 영역의 "스템"의 절반을 포함할 수 있다. 두 번째 RNA 분자는 안내 RNA의 두 번째 영역의 "스템"의 다른 절반과 안내 RNA의 세 번째 영역을 포함할 수 있다. 따라서, 이 실시형태에서, 첫 번째 및 두 번째 RNA 분자는 각각 서로 상보적인 뉴클레오티드의 서열을 포함한다. 예를 들어, 한 실시형태에서, 첫 번째 및 두 번째 RNA 분자는 각각 다른 서열과 염기쌍을 이루어 기능성 안내 RNA를 형성하는 서열(약 6개 내지 약 20개 뉴클레오티드)을 포함한다.

[0065] *(iii) 기타 표적화 엔도뉴클레아제*

[0066] 추가 실시형태에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 메가뉴클레아제일 수 있다. 메가뉴클레아제는 긴 인식 서열을 특징으로 하는 엔도데옥시리보뉴클레아제이다, 즉 인식 서열은 일반적으로 약 12개 염기쌍 내지 약 40개 염기쌍의 범위에 있다. 이러한 요구 사항의 결과로, 인식 서열은 일반적으로 소정의 유전체에서 단 한 번만 발생한다. 메가뉴클레아제 중에서 LAGLIDADG라는 호밍 엔도뉴클레아제 패밀리는 유전체 연구와 유전체 조작을 위한 귀중한 도구가 되었다(예를 들면, Arnould et al., 2011, Protein Eng Des Sel, 24(1-2):27-31 참조). 다른 적합한 메

가뉴클레아제에는 I-CreI 및 I-Dmol이 포함된다. 메가뉴클레아제는 당업자에게 잘 알려진 기술을 이용하여 인식 서열을 변형함으로써 특정 염색체 서열을 표적화할 수 있다.

[0067] 추가 실시형태에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 전사 활성인자 유사 이펙터(TALE) 뉴클레아제일 수 있다. TALE은 식물 병원체 크산토모나스(*Xanthomonas*)로부터의 전사 인자로, 새로운 DNA 표적에 결합하도록 쉽게 조작할 수 있다. TALE 또는 이의 절두된 버전은 FokI와 같은 엔도뉴클레아제의 촉매 도메인에 연결되어 TALE 뉴클레아제 또는 TALEN(Sanjana et al., 2012, Nat Protoc, 7(1):171-192) 및 Arnould et al., 2011, Protein Engineering, Design & Selection, 24(1-2):27-31)이라고 하는 표적화 엔도뉴클레아제를 생성할 수 있다.

[0068] 대안적 실시형태에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 키메라 뉴클레아제일 수 있다. 키메라 뉴클레아제의 비제한적인 예로는 ZF-메가뉴클레아제, TAL-메가뉴클레아제, Cas9-FokI 융합, ZF-Cas9 융합, TAL-Cas9 융합 등이 있다. 당업자는 이러한 키메라 뉴클레아제 융합을 생성하기 위한 수단에 익숙하다.

[0069] 다른 실시형태에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 부위 특이적 엔도뉴클레아제일 수 있다. 특히, 부위 특이적 엔도뉴클레아제는 인식 서열이 유전체에서 드물게 발생하는 "희귀 절단자" 엔도뉴클레아제일 수 있다. 대안적으로, 부위 특이적 엔도뉴클레아제는 관심 부위를 절단하도록 조작될 수 있다(Friedhoff et al., 2007, Methods Mol Biol 352:1110123). 일반적으로, 부위 특이적 엔도뉴클레아제의 인식 서열은 유전체에서 단 한 번만 발생한다. 대안적인 추가 실시형태에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 인공 표적 DNA 이중 가닥 절단 유도제일 수 있다.

[0070] **(b) 표적화 엔도뉴클레아제를 세포로 전달**

[0071] 이 방법은 표적화 엔도뉴클레아제를 관심 있는 부모 세포주에 도입하는 단계를 포함한다. 표적화 엔도뉴클레아제는 정제된 분리된 단백질 또는 표적화 엔도뉴클레아제를 인코딩하는 핵산으로서 세포에 도입될 수 있다. 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 인코딩 핵산이 mRNA인 실시형태에서, mRNA는 5' 캡핑 및/또는 3' 폴리아데닐화될 수 있다. 인코딩 핵산이 DNA인 실시형태에서, DNA는 선형 또는 원형일 수 있다. 핵산은 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 일부일 수 있으며, 여기서 인코딩 DNA는 적합한 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 당업자는 적절한 벡터, 프로모터, 기타 제어 요소 및 벡터를 관심 있는 세포에 도입하는 수단에 익숙하다. 표적화 엔도뉴클레아제가 CRISPR 뉴클레아제인 실시형태에서, CRISPR 뉴클레아제 시스템은 gRNA-단백질 복합체로서 세포에 도입될 수 있다.

[0072] 표적화 엔도뉴클레아제 분자(들)는 다양한 수단을 통해 세포 내로 도입될 수 있다. 적합한 전달 수단에는 미세주입, 전기천공, 초음파천공, 유전자총, 인산칼슘 매개 형질감염, 양이온 형질감염, 리포좀 형질감염, 덴드리머 형질감염, 열 충격 형질감염, 뉴클레오펙션 형질감염, 자기감염, 리포펙션, 임팔레펙션, 광학 형질감염, 핵산의 독점적 에이전트 강화 흡수, 리포좀, 면역리포좀, 비로좀 또는 인공 비리온을 통한 전달이 포함된다. 특정 실시형태에서, 표적화 엔도뉴클레아제 분자(들)는 뉴클레오펙션을 통해 세포 내로 도입된다.

[0073] 선택적 공여자 폴리뉴클레오티드. 표적 유전체 변형 또는 조작을 위한 방법은 또한 표적 염색체 서열에 비해 적어도 하나의 뉴클레오티드 변화를 갖는 서열을 포함하는 적어도 하나의 공여자 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입하는 단계를 포함할 수 있다. 공여자 폴리뉴클레오티드는 표적화 엔도뉴클레아제에 의해 도입된 이중 가닥 절단이 상동성 지향 복구 과정에 의해 복구될 수 있고 공여자 폴리뉴클레오티드의 서열이 염색체 서열에 삽입되거나 염색체 서열과 교환되어 염색체 서열을 변형시킬 수 있도록 염색체 서열의 표적 부위 또는 그 근처의 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는다. 예를 들어, 공여자 폴리뉴클레오티드는 표적 부위의 한쪽 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 첫 번째 서열과 표적 부위의 다른 쪽의 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 두 번째 서열을 포함할 수 있다. 공여자 폴리뉴클레오티드는 표적 염색체 서열에 통합하기 위한 공여자 서열을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 공여자 서열은 외인성 서열(예: 마커 서열)일 수 있으며, 외인성 서열이 통합되면 해독틀이 파괴되고 표적 염색체 서열이 불활성화된다.

[0074] 염색체 서열의 표적 부위 또는 그 근처의 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 공여자 폴리뉴클레오티드의 첫 번째 및 두 번째 서열의 길이는 다양할 수 있으며 다양할 것이다. 일반적으로 공여자 폴리뉴클레오티드의 첫 번째 및 두 번째 서열 각각은 길이가 적어도 약 10개 뉴클레오티드이다. 다양한 실시형태에서, 염색체 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 공여자 폴리뉴클레오티드 서열은 길이가 약 15개 뉴클레오티드, 약 20개 뉴클레오티드, 약 25개 뉴클레오티드, 약 30개 뉴클레오티드, 약 40개 뉴클레오티드, 약 50개 뉴클레오티드, 약 100개 뉴클레오티드 또는 100개 초과의 뉴클레오티드일 수 있다.

[0075] "실질적인 서열 동일성"이라는 문구는 폴리뉴클레오티드의 서열이 관심 염색체 서열과 적어도 약 75%의 서열 동일성을 갖는다는 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드의 서열은 관심 염색체 서열과 약 75%,

76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는다.

[0076] 공여자 폴리뉴클레오티드의 길이는 다양할 수 있고 다양할 것이다. 예를 들어, 공여자 폴리뉴클레오티드는 길이가 약 20개 뉴클레오티드에서 최대 약 200,000개 뉴클레오티드까지 다양할 수 있다. 다양한 실시형태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드는 길이가 약 20개 뉴클레오티드 내지 약 100개 뉴클레오티드, 길이가 약 100개 뉴클레오티드 내지 약 1000개 뉴클레오티드, 길이가 약 1000개 뉴클레오티드 내지 약 10,000개 뉴클레오티드, 길이가 약 10,000개 뉴클레오티드 내지 약 100,000개 뉴클레오티드, 또는 길이가 약 100,000개 뉴클레오티드 내지 약 200,000개 뉴클레오티드의 범위일 수 있다.

[0077] 전형적으로, 공여자 폴리뉴클레오티드는 DNA이다. DNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. DNA는 선형 또는 원형일 수 있다. 일부 실시형태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드는 약 200개 미만의 뉴클레오티드를 포함하는 단일 가닥 선형 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 다른 실시형태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드는 벡터의 일부일 수 있다. 적합한 벡터에는 DNA 플라스미드, 바이러스 벡터, 세균 인공 염색체(BAC) 및 효모 인공 염색체(YAC)가 포함된다. 또 다른 실시형태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드는 PCR 단편이거나 리포좀 또는 폴록사머와 같은 전달 운반제와 복합체를 이룬 핵산일 수 있다.

[0078] 공여자 폴리뉴클레오티드(들)는 표적화 엔도뉴클레아제 분자(들)와 동시에 세포에 도입될 수 있다. 대안적으로 공여자 폴리뉴클레오티드(들)와 표적화 엔도뉴클레아제 분자(들)는 순차적으로 세포에 도입될 수 있다. 표적화 엔도뉴클레아제 분자(들) 대 공여자 폴리뉴클레오티드(들)의 비율은 다양할 수 있으며 다양할 것이다. 일반적으로 표적화 엔도뉴클레아제 분자(들) 대 공여자 폴리뉴클레오티드(들)의 비율은 약 1:10 내지 약 10:1이다. 다양한 실시형태에서, 표적화 엔도뉴클레아제 분자(들) 대 폴리뉴클레오티드(들)의 비율은 약 1:10, 1:9, 1:8, 1:7, 1:6, 1:5, 1:4, 1:3, 1:2, 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 또는 10:1일 수 있다. 한 실시형태에서, 비율은 약 1:1이다.

[0079] **(c) 세포 배양**

[0080] 이 방법은 또한 표적화 엔도뉴클레아제에 의해 도입된 이중 가닥 절단이 (i) 염색체 서열이 적어도 하나의 뉴클레오티드의 결실, 삽입 및/또는 치환에 의해 변형되도록 하는 비상동성 말단 결합 복구 과정 또는, 선택적으로 (ii) 염색체 서열이 폴리뉴클레오티드의 서열과 교환되어 염색체 서열이 변형되도록 하는 상동성 지향 복구 과정에 의해 복구될 수 있도록 적절한 조건하에 세포를 유지하는 단계를 추가로 포함한다. 표적화 엔도뉴클레아제(들)를 인코딩하는 핵산(들)이 세포에 도입되는 실시형태에서, 이 방법은 세포가 표적화 엔도뉴클레아제(들)를 발현하도록 적절한 조건하에 세포를 유지하는 단계를 포함한다.

[0081] 일반적으로 세포는 세포 성장 및/또는 유지에 적합한 조건하에 유지된다. 적합한 세포 배양 조건은 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 Santiago et al. (2008) PNAS 105:5809-5814; Moehle et al. (2007) PNAS 104:3055-3060; Urnov et al. (2005) Nature 435:646-651; 및 Lombardo et al (2007) Nat. Biotechnology 25:1298-1306에 설명되어 있다. 당업자는 세포 배양 방법이 당해 분야에 알려져 있으며 세포 유형에 따라 다를 수 있음을 알고 있다. 모든 경우에 특정 세포 유형에 가장 적합한 기술을 결정하기 위해 일상적인 최적화를 이용할 수 있다.

[0082] 이 과정의 단계 동안, 표적화 엔도뉴클레아제(들)는 염색체 서열의 표적 절단 부위(들)에서 이중 가닥 절단(들)을 인식하고, 결합하고, 생성하며, 이중 가닥 절단(들)을 복구하는 동안 적어도 하나의 뉴클레오티드의 결실, 삽입 및/또는 치환이 표적 염색체 서열에 도입된다. 특정 실시형태에서, 표적 염색체 서열은 불활성화된다.

[0083] 관심 염색체 서열이 변형되었다는 확인이 되면, 단일 세포 클론을 분리하여 유전자형을 분석할 수 있다(DNA 염기서열분석 및/또는 단백질 분석을 통해). 하나의 변형된 염색체 서열을 포함하는 세포는 추가 염색체 서열을 변형하기 위해 하나 이상의 추가 라운드의 표적 유전체 변형을 거쳐 이중 녹아웃, 삼중 녹아웃 등을 생성할 수 있다.

[0084] **(IV) 재조합 단백질 생산**

[0085] 본원 발명의 또 다른 측면은 생물학적 생산 시스템에서 재조합 단백질을 생산하기 위한 방법을 포함한다. 적합한 재조합 단백질은 섹션 (I)(c)에 설명되어 있다. 이 방법은 상기 섹션 (I)에 설명된 임의의 조작된 세포주에서 관심 재조합 단백질을 발현시키고 발현된 재조합 단백질을 정제하는 단계를 포함한다. 재조합 단백질을 생산 또는 제조하는 수단은 당해 분야에 잘 알려져 있다(예를 들면, "Biopharmaceutical Production Technology",

Subramanian (ed), 2012, Wiley-VCH; ISBN: 978-3-527-33029-4 참조).

[0086] 재조합 단백질은 여과와 같은 정화 단계, 그리고 친화성 크로마토그래피, 단백질 A(또는 G) 크로마토그래피, 이온 교환(즉, 양이온 및/또는 음이온) 크로마토그래피와 같은 하나 이상의 크로마토그래피 단계를 포함하는 과정을 통해 정제될 수 있다.

[0087] **정의**

[0088] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 이용된 모든 기술 및 과학 용어는 본원 발명이 속하는 기술 분야의 숙련자가 일반적으로 이해하는 의미를 갖는다. 다음 참고문헌은 당업자에게 본원 발명에서 이용된 많은 용어의 일반적인 정의를 제공한다: Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2nd ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5th Ed., R. Rieger et al. (eds.), Springer Verlag (1991); 및 Hale & Marham, The Harper Collins Dictionary of Biology (1991). 본원에서 이용된 다음 용어는 달리 명시되지 않는 한 해당 용어에 부여된 의미를 갖는다.

[0089] 본원 발명의 요소 또는 이들의 바람직한 실시형태(들)를 소개할 때, 관사 "a", "an", "the" 및 "상기"는 하나 이상의 요소가 있다는 것을 의미하도록 의도된다. 용어 "포함하는", "포함하는" 및 "갖는"은 포괄적이며 나열된 요소 이외에 추가 요소가 있을 수 있음을 의미하도록 의도된다.

[0090] 본원에서 이용되는 용어 "내인성 서열"은 세포에 본래 존재하는 염색체 서열을 의미한다.

[0091] "외인성 서열"이란 용어는 세포에 본래 존재하지 않는 염색체 서열이나 다른 염색체 위치로 이동된 염색체 서열을 의미한다.

[0092] "조작된" 또는 "유전자 변형된" 세포는 유전체가 변형되거나 조작된 세포를 의미한다, 즉, 세포는 적어도 하나의 뉴클레오티드 삽입, 적어도 하나의 뉴클레오티드 결실 및/또는 적어도 하나의 뉴클레오티드 치환을 포함하도록 조작된 적어도 하나의 염색체 서열을 포함한다.

[0093] "유전체 변형" 및 "유전체 편집"이라는 용어는 특정 내인성 염색체 서열이 변경되어 염색체 서열이 변형되는 과정을 의미한다. 염색체 서열은 적어도 하나의 뉴클레오티드 삽입, 적어도 하나의 뉴클레오티드 결실 및/또는 적어도 하나의 뉴클레오티드 치환을 포함하도록 변형될 수 있다. 변형된 염색체 서열은 불활성화되어 생성물이 생성되지 않는다. 대안적으로 염색체 서열은 변경된 생성물이 생성되도록 변형될 수 있다.

[0094] 본원에서 이용되는 "유전자"는 유전자 산물을 인코딩하는 DNA 영역(엑손 및 인트론 포함)과 유전자 산물의 생성을 조절하는 모든 DNA 영역을 의미하며, 이러한 조절 서열이 코딩 및/또는 전사된 서열에 인접해 있는지 여부는 상관없다. 따라서 유전자에는 프로모터 서열, 종결자, 리보솜 결합 부위 및 내부 리보솜 진입 부위와 같은 번역 조절 서열, 인핸서, 사일런서, 인슐레이터, 경계 요소, 복제 원점, 매트릭스 부착 부위 및 유전자좌 제어 영역이 포함되지만 이들에 국한되지 않는다.

[0095] "이종성"이라는 용어는 관심 있는 세포나 종에 본래 존재하지 않는 실체를 의미한다.

[0096] 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 선형 또는 원형 구조의 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 중합체를 의미한다. 본원 발명의 목적을 위해 이러한 용어는 중합체의 길이와 관련하여 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 이러한 용어는 천연 뉴클레오티드의 알려진 유사체뿐만 아니라 염기, 당 및/또는 인산염 모이어티에서 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일반적으로 특정 뉴클레오티드의 유사체는 동일한 염기 대합 특이성을 갖는다; 즉, A의 유사체는 T와 염기쌍을 이룬다. 핵산 또는 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드는 포스포디에스테르, 포스포티오에이트, 포스포라미디트, 포스포로디아미데이트 결합 또는 이들의 조합으로 연결될 수 있다.

[0097] "뉴클레오티드"라는 용어는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드를 의미한다. 뉴클레오티드는 표준 뉴클레오티드(즉, 아데노신, 구아노신, 시티딘, 티미딘 및 우리딘) 또는 뉴클레오티드 유사체일 수 있다. 뉴클레오티드 유사체는 변형된 퓨린 또는 피리미딘 염기 또는 변형된 리보오스 모이어티를 갖는 뉴클레오티드를 의미한다. 뉴클레오티드 유사체는 자연적으로 발생하는 뉴클레오티드(예: 이노신) 또는 비자연적으로 발생하는 뉴클레오티드일 수 있다. 뉴클레오티드의 당 또는 염기 모이어티에 대한 변형의 비제한적 예로는 아세틸기, 아미노기, 카르복실기, 카르복시메틸기, 히드록실기, 메틸기, 포스포릴기 및 티올기의 추가(또는 제거)와 염기의 탄소 및 질소 원자를 다른 원자로 치환하는 것(예: 7-데아자 퓨린)이 있다. 뉴클레오티드 유사체에는 디데옥시 뉴클레오티드, 2'-O-메틸 뉴클레오티드, 잠금 핵산(LNA), 펩티드 핵산(PNA) 및 모르폴리노도 포함된다.

[0098] "폴리펩티드" 및 "단백질"이라는 용어는 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하는 데 상호교환적으로 이용된다.

[0099] 본원에서 이용되는 용어 "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 변형 또는 편집될 염색체 서열의 일부를 정의하며, 결합을 위한 충분한 조건이 존재한다는 전제하에 표적화 엔도뉴클레아제가 인식하고 결합하도록 조작된 핵산 서열을 의미한다.

[0100] "상류" 및 "하류"라는 용어는 고정된 위치를 기준으로 핵산 서열의 위치를 나타낸다. 상류는 위치에 대해 5'(즉, 가닥의 5' 말단 근처)인 영역을 나타내고 하류는 위치에 대해 3'(즉, 가닥의 3' 말단 근처)인 영역을 나타낸다.

[0101] 핵산 및 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 기술은 당해 분야에 알려져 있다. 전형적으로 이러한 기술에는 유전자에 대한 mRNA의 뉴클레오티드 서열을 결정하고/하거나 이에 의해 인코딩된 아미노산 서열을 결정하고 이러한 서열을 두 번째 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열과 비교하는 것이 포함된다. 유전체 서열도 이러한 방식으로 결정 및 비교할 수 있다. 일반적으로 동일성은 두 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 정확한 뉴클레오티드-뉴클레오티드 또는 아미노산-아미노산 대응 관계를 의미한다. 두 개 이상의 서열(폴리뉴클레오티드 또는 아미노산)은 동일성 백분율을 결정하여 비교할 수 있다. 핵산 또는 아미노산 서열이든 관계없이 두 서열의 동일성 백분율은 두 개의 정렬된 서열 간의 정확한 정합 수를 더 짧은 서열의 길이로 나누고 100을 곱한 것이다. 핵산 서열에 대한 대략적인 정렬은 Smith and Waterman, Advances in Applied Mathematics 2:482-489 (1981)의 로컬 상동성 알고리즘에 의해 제공된다. 이 알고리즘은 Dayhoff, Atlas of Protein Sequences and Structure, M. O. Dayhoff ed., 5 suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C., USA, and normalized by Gribskov, Nucl. Acids Res. 14(6):6745-6763 (1986)에 의해 개발되고 Gribskov, Nucl. Acids Res. 14(6):6745-6763 (1986)에 의해 정규화된 채점 매트릭스를 이용하여 아미노산 서열에 적용할 수 있다. 서열의 동일성 백분율을 결정하기 위한 이 알고리즘의 모범적인 구현은 Genetics Computer Group(Madison, Wis.)에서 "BestFit" 유틸리티 애플리케이션으로 제공된다. 서열 간의 동일성 또는 유사성 백분율을 계산하기 위한 다른 적합한 프로그램은 전반적으로 당해 분야에 알려져 있으며, 예를 들면 또 다른 정렬 프로그램은 기본 매개변수로 이용되는 BLAST이다. 예를 들어, BLASTN 및 BLASTP는 다음 기본 매개변수를 이용하여 이용할 수 있다: 유전 코드=표준; 필터=없음; 가닥=둘 모두; 컷오프=60; 기대=10; 매트릭스=BLOSUM62; 설명=50개 서열; 정렬 기준=높은 점수; 데이터베이스=중복되지 않음, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS 번역+Swiss 단백질+Spupdate+PIR. 이러한 프로그램의 세부사항은 GenBank 웹사이트에서 찾을 수 있다. 본원에 설명된 서열과 관련하여, 원하는 서열 동일성 정도의 범위는 약 80% 내지 100% 및 그 사이의 정수 값이다. 전형적으로 서열 간의 동일성 백분율은 적어도 70-75%, 바람직하게는 80-82%, 더 바람직하게는 85-90%, 훨씬 더 바람직하게는 92%, 훨씬 더 바람직하게는 95%, 가장 바람직하게는 98%의 서열 동일성이다.

[0102] 상기 설명한 세포 및 방법은 발명의 범위를 벗어나지 않고 다양한 변경이 가능하므로, 상기 설명 및 아래에 제시된 실시예에 포함된 모든 내용은 제한적인 의미가 아닌 예시적인 것으로 해석되어야 한다.

[0103] **실시예**

[0104] 다음 실시예는 본원 발명의 특정 측면을 예시한다.

[0105] ***실시예 1: 아스파라긴 매개 선택 시스템 설계***

[0106] 아스파라긴 매개 대사 선택 시스템을 개발하기 위해, 비필수 아미노산인 아스파라긴(Asn)에 대한 영양요구 CHO 세포주가 먼저 개발되었다. 아스파라긴 합성 경로와 관련된 모든 유전자를 식별하기 위한 포괄적인 검색이 Reactome 및 KEGG 데이터베이스에 대해 수행되었다. 내인성 글루타민 가수분해 아스파라긴 합성효소 유전자(ASNS)가 Asn 합성을 담당하는 유일한 비중복 유전자로 식별되었다(도 1). Asn 영양요구 CHO 세포주를 생성하기 위해 MilliporeSigma의 글루타민(Gln) 영양요구 CHOZN® $GS^{-/-}$ 세포주(CHOZN®)가 활용되었다. 내인성 ASNS 코딩 서열(도 2)은 CHOZN® 세포주의 전체 유전체 염기서열분석(WGS)을 통해 밝혀졌으며, 디지털 드롭렛 PCR(ddPCR) 분석(도 3)을 통해 CHOZN® 유전체에 두 개의 사본이 존재하는 것으로 밝혀졌다. 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN)는 ASNS 단백질의 활성 아단위를 인코딩하는 ASNS 유전자의 열 번째 엑손을 파괴하도록 설계되었다. ZFN 표적 서열은 도 2에서 밑줄로 표시되어 있다. CHOZN® 세포는 37℃, 5% CO2에서 진탕 조건하에 6mM L-글루타민(MilliporeSigma G7513)(Fusion + Gln)이 보충된 EX-CELL® CD CHO Fusion 배지(MilliporeSigma 14365C)에서

배양했다. 세포를 형질감염 1일 전 0.5e6에서 파종하여 배양을 대수적 성장 단계로 유지했다. 1.0e6개 세포는 전기천공을 이용하여 각 ZFN 암에 대해 6μg의 mRNA로 형질감염했다. ZFN 절단 활성은 Surveyor 뉴클레아제 S 돌연변이 검출 분석을 통해 평가했다(도 4). 형질감염 세포는 6mM L-글루타민(MilliporeSigma G7513)과 2mM L-무수 아스파라긴(MilliporeSigma 1043502)(Fusion + Gln + Asn)이 보충된 3mL의 EX-CELL® CD CHO Fusion 배지(MilliporeSigma 14365C)가 들어 있는 6웰 배양 플라스크로 옮겼다. 세포는 48시간 동안 정적 환경에서 30℃, 5% CO2에서 배양한 후, 후속 48시간 동안 37℃/5% CO2 정적 환경으로 옮겼다. 형질감염 96시간 후, ZFN 변형 CHOZN® 세포를 T-75 플라스크로 정률 증가시켰다. ZFN 변형 풀로부터의 단일 세포 클론은 형광 활성화 세포 분류기(FACS)를 통해 96웰 배양 평판으로 분리했다. 단일 세포 클론은 차세대 염기서열분석(NGS)을 통해 평가하여 ASNS의 두 사본 모두가 성공적으로 유전적으로 파괴된 클론을 식별했다(도 5).

[0107] 독립형 시스템과 이중 대사 선택 시스템의 일부로서 아스파라긴 매개 선택 기전의 효능을 입증하기 위해 다양한 분자를 발현하는 안정적인 선택된 세포 집단이 생성되었다. 이 시스템의 검증에 이용된 분자에는 Cayenne Red 형광 단백질(RFP), Dasher Green 형광 단백질(GFP) 및 인간 IgG1이 포함된다. CHOZN® GS$^{-/-}$ ASNS$^{-/-}$ 세포는 Fusion + Gln + Asn 배지에서 배양되었다. 현재 작업에 이용된 발현 벡터에는 실험 설계에 따라 아스파라긴 합성효소(ASNS) 또는 글루타민 합성효소(GS) 선택 마커가 포함된다. 뮤린 ASNS(단백질: 아스파라긴 합성효소 {글루타민 가수분해}; 유전자: ASNS; UniProtKB ID: Q61024) 또는 뮤린 GS(단백질: 글루타민 합성효소 {글루타민산 염 암모니아 리가아제}; 유전자: Glul; UniProtKB ID: P15105)의 발현은 5' 내인성 발현 제어 서열(프로모터)에 의해 또는 유전자의 3' 말단에 SV40 폴리아데닐화 서열이 있는 5' SV40 프로모터에 의해 구동되었다(도 6 및 7).

[0108] CHOZN® GS$^{-/-}$ ASNS$^{-/-}$ 세포를 37℃, 5% CO2에서 진탕 조건하에 Fusion +Gln +Asn에서 배양했다. 세포를 형질감염 1일 전 0.5e6에서 파종하여 배양을 대수적 성장 단계로 유지했다. 1.0e6개 세포는 전기천공을 이용하여 12μg의 플라스미드 DNA로 형질감염했다. 형질감염 세포는 Fusion +Gln +Asn이 들어 있는 T-25 배양 플라스크로 옮겼고, 형질감염 48시간 후에 추가로 2mL의 배지를 첨가했다. 형질감염 96시간 후에 세포는 펠렛화하고 배지를 흡인한 다음, 적절한 선택 배지 12mL에 4e5개의 생존 세포/mL을 재현탁시키고 T-75 플라스크로 옮겼다. 글루타민 기반 선택은 Fusion -Gln을 이용하여 수행되었고, 아스파라긴 기반 선택은 Fusion -Asn을 이용하여 수행되었으며, 글루타민/아스파라긴 이중 선택은 낮은 농도의 글루타민과 -Asn과 함께 Fusion을 이용하여 수행되었다. 다양한 선택 배양물의 세포 생존율 및 생존 세포 밀도는 시간 경과에 따라 모니터링되었다. 선택으로부터 회복되면, 안정된 선택 배양물은 정률 증가와 진탕 조건에 대한 적응을 위해 TPP® TubeSpin Bioreactor 튜브(TPP®)로 옮겨졌다.

[0109] EX-CELL® Advanced CHO 유가식 배지(MilliporeSigma 14366C), EX-CELL® Advanced CHO Feed(MilliporeSigma 24367C), Cellvento® 4 Feed(MilliporeSigma 1.03796.0005)의 L-무수 아스파라긴(Asn) 결핍 맞춤 제제가 개발되었다(각각 Advanced -Asn, Feed -Asn 및 4 Feed -Asn). IgG1 발현 벡터로 형질감염된 안정된 선택 배양물을 펠렛화하고 선택 배지를 흡인한 다음, Advanced -Asn에서 3e5개의 생존 세포/mL를 재현탁시키고 유가식 조건에서 생산성 분석을 실시했다. 각 배양물의 생존 세포 밀도 및 생존율은 파종 후 3일째부터 시작하여 이틀에 한 번씩 수집했다. 파종 후 3일째부터 시작하여 Advanced Feed -Asn과 4 Feed -Asn의 50/50 블렌드 1.5mL를 각 배양물에 첨가했다. 각 배양물에서 글루코오스와 글루타민 수치는 5일째부터 시작하여 이틀에 한 번씩 측정했으며, 적절한 글루코오스와 글루타민 수준을 유지하기 위해 D-+-글루코오스(MilliporeSigma G8769)과 L-글루타민(MilliporeSigma G7513)을 첨가했다. 생산성은 시간 경과에 따라 모니터링했으며, 9일째부터 시작하여 배양물이 70% 생존율 미만으로 떨어질 때까지 이틀마다 유가식 역가를 기록했다. 역가는 ForteBio Octet에서 간섭계를 이용하여 결정한 다음 HPLC 단백질 A 친화성 크로마토그래피를 통해 확인했다.

[0110] ***실시예 2:***

[0111] L-무수 아스파라긴(Asn)이 없는 기저 EX-CELL® CD CHO Fusion 배지 의 맞춤 제제가 개발되었다(Fusion -Gln -Asn). CHOZN® GS$^{-/-}$ ASNS$^{-/-}$ 클론은 Fusion +Gln +Asn 또는 Fusion + Gln -Asn에서 적어도 10일 동안 배양되었다. 생존율과 생존 세포 밀도 측정은 주 2회 실시되었다. 도 8은 아스파라긴이 없는 경우 CHOZN® GS$^{-/-}$ ASNS$^{-/-}$ 세포가 성장할 수 없지만 배지에 아스파라긴을 보충하면 CHOZN® GS$^{-/-}$ ASNS$^{-/-}$ 세포 성장이 회복된다는 것

을 나타낸다.

[0112] *실시예 3:*

[0113] 안정적인 선택된 세포 집단이 실시예 1에 설명된 Asn 매개 선택 시스템을 이용하여 관심 단백질을 생산할 수 있음을 보여주기 위해, 세포를 형질감염시키고 Fusion -Asn에서 선택 압력하에 계대시켰다. ASNS/RFP 벡터를 CHOZN® GS$^{-/-}$ ASNS$^{-/-}$ 세포에 형질감염시켰다. 세포 성장 및 생존율은 선택 내내 모니터링되었다. ASNS/RFP 플라스미드로 형질감염시키고 Fusion +Gln +Asn(비선택적 배지) 또는 Fusion +Gln -Asn(Asn 선택적 배지)에서 성장시킨 세포는 선택 압력하에 회복되었다. 생존 세포 집단은 FACS로 분석되었고 평균 형광 강도(MFI)와 RFP+ 세포의 백분율이 측정되었다. Fusion +Gln +Asn에서 성장한 세포는 Fusion +Gln -Asn에서 Asn-선택을 받은 세포와 비교하여 적은 백분율의 RFP 양성 세포와 낮은 MFI를 보였다. 결과는 표 1에 요약되어 있다.

[0114] 표 1

표 1

[0115]

벡터	선택 배지	세포주	21일 차 생존율	MFI(A.U.)	RFP 양성 세포
ASNS/RFP	Fusion +Gln +Asn	클론 26 F3	98.5%	1,092	0.1%
ASNS/RFP	Fusion +Gln -Asn	클론 26 F3	96.9%	64,251	73.6%

[0116] *실시예 4:*

[0117] 안정적인 선택된 세포 집단이 실시예 1에 설명된 Asn 매개 선택 시스템을 이용하여 관심 단백질을 생산할 수 있음을 보여주기 위해, 5' 내인성 발현 제어 서열 또는 5' SV40 프로모터에 의해 구동되는 IgG 중쇄, IgG 경쇄 및 아스파라긴 합성효소(ASNS) 코딩 서열을 갖는 벡터를 개발했다(도 6&7). 이 벡터는 CHOZN® GS$^{-/-}$ ASNS$^{-/-}$ 세포주에 형질감염되었다. 대조로서, DNA가 없는 모의 형질감염이 이용되었다. 집단은 Fusion +Gln -Asn에서 선택 압력하에 계대되었다. 선택에 이용된 조건은 회복, 정률 증가 및 생산성 분석 중에도 적용되었다. 유가식 생산성 분석은 Advanced +Gln -Asn 배지에서 3e5개의 생존 세포/mL로 접종되었다. 각 배양물의 생존 세포 밀도 및 생존율은 파종 후 3일째부터 시작하여 이틀마다 수집되었다. 파종 후 3일째부터 Advanced Feed -Asn과 4 Feed -Asn의 50/50 블렌드 1.5mL를 각 배양물에 첨가했다. 글루코오스와 글루타민 수치는 5일째부터 시작하여 이틀마다 측정했으며, 적절한 글루코오스와 글루타민 수준을 유지하기 위해 D-+-글루코오스(MilliporeSigma G8769)와 L-글루타민(MilliporeSigma G7513)을 첨가했다. 내인성 발현 제어 서열(ASNS 프로모터)에 의해 구동되는 ASNS 코딩 서열로 선택된 세포는 SV40 프로모터에 의해 구동되는 ASNS 코딩 서열로 선택된 경우에 동일한 IgG를 발현하는 세포보다 ~3배 더 높은 IgG 발현 수준을 보여주었다(도 9).

[0118] *실시예 5:*

[0119] 안정적인 세포 집단이 이중 선택 조건에서 두 개의 독립적인 세포 내 형광 단백질을 생산할 수 있는지 검정하기 위해, GFP 및 GS 코딩 서열을 포함하는 벡터 하나와 RFP 및 ASNS 코딩 서열을 포함하는 두 번째 벡터를 개발했다(도 6). 이들 두 플라스미드를 CHOZN® GS$^{-/-}$ ASNS$^{-/-}$ 세포(GFP + RFP)에 공동 형질감염시켰다. 대조로서, 각 벡터를 CHOZN® GS$^{-/-}$ ASNS$^{-/-}$ 세포(각각 GFP 단독 및 RFP 단독)에 독립적으로 형질감염시켰다. 세 가지 형질감염 모두로부터의 세포는 GS-선택적 조건(Fusion -Gln), ASNS-선택적 조건(Fusion -Asn) 및 이중 대사 선택 조건(필요에 따라 아미노산이 보충된 Fusion -Gln -Asn)에서 계대시켰다. 선택에 이용된 조건은 회복, 정률 증가 및 기타 모든 분석에도 적용했다. 도 10은 GFP 벡터로 형질감염된 세포가 -Gln 조건에서 생존하고 성장할 수 있지만 배지에 Asn 보충을 필요로 한다는 것을 나타내는 선택 분석으로부터의 성장 및 생존율 데이터를 보여준다. 반면, RFP 벡터로 형질감염된 세포는 -Asn 조건에서 생존하고 성장할 수 있지만 배지에 Gln 보충을 필요로 한다. 두 벡터(GFP + RFP)로 공동 형질감염된 세포는 -Gln 배지, -Asn 배지 및 -Gln -Asn 배지(필요에 따라 아미노산 보충)에서 생존하고 성장할 수 있다. 도 11 및 12는 GFP 벡터로 형질감염되어 -Gln 배지에서 생존하고 성장하는 세포는 GFP에 대해 양성 반응을 보이고, RFP 벡터로 형질감염되어 -Asn 배지에서 생존하고 성장하는 세포는 RFP에 대해 양성 반응을 보이며, 두 벡터(GFP + RFP)로 공동 형질감염되어 -Gln -Asn 배지 또는 다양한 수준의 Gln 및/또는 Asn이 보충된 -Asn 배지에서 생존하고 성장하는 세포는 GFP와 RFP 둘 모두에 대해 양성 반

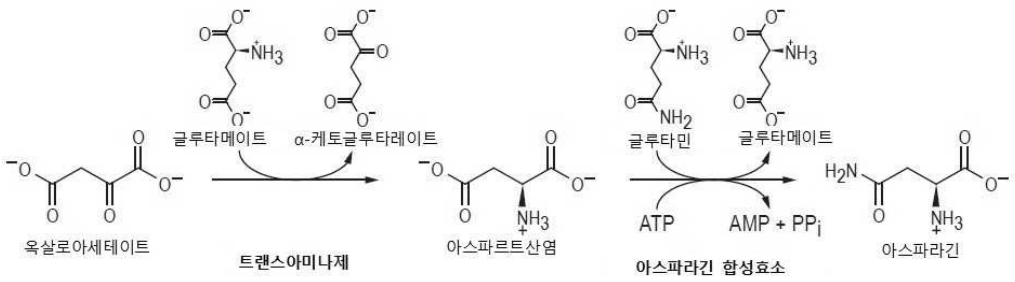
응을 보인다는 것을 나타낸다. 이 데이터는 GS + ASNS 이중 대사 선택 시스템이 항생제와 같은 선택 작용제를 배지에 첨가할 필요 없이 세포내 단백질을 인코딩하는 여러 개의 독립적인 벡터가 도입된 세포를 선택할 수 있는 독특한 기회를 제공한다는 것을 나타낸다.

[0120] ***실시예 6:***

[0121] 안정적인 세포 집단이 이중 선택 조건에서 분비 단백질을 생산할 수 있는지 검정하기 위해, IgG1을 발현하는 두 개의 벡터인 IgG 중쇄, IgG 경쇄 및 GS 코딩 서열을 포함하는 벡터 하나와 동일한 IgG 중쇄, IgG 경쇄 및 ASNS 코딩 서열을 포함하는 두 번째 벡터를 개발했다(도 6). 이 두 개의 독립적인 벡터를 CHOZN® $GS^{-/-}$ $ASNS^{-/-}$ 세포(GS + ASNS)에 공동 형질감염시켰다. 대조로서, 각 벡터를 CHOZN® $GS^{-/-}$ $ASNS^{-/-}$ 세포(GS 단독 및 ASNS 단독)에 독립적으로 형질감염시켰다. 그런 다음 세포를 Fusion -Gln(GS로만 형질감염된 세포), Fusion -Asn(ASNS로만 형질감염된 세포) 또는 Fusion -Gln -Asn(GS + ASNS로 형질감염된 세포) 또는 미량의 Gln 및/또는 Asn이 보충된 배지에서 선택 압력하에 계대시켰다. 선택에 이용된 조건은 회복, 정률 증가 및 생산성 분석 중에도 적용했다. GS 단독 선택 배양물은 14일 후에 완전히 회복되었지만, ASNS 단독 및 GS + ASNS 이중 선택 배양물은 선택 회복 프로필이 유사했으며 완전히 회복되는 데 21일이 걸렸다. 유가식 분석에서 GS 단독 세포, ASNS 단독 세포가 IgG를 생산한다(도 13). 이는 세포에서 생산된 외인성 GS 및 ASNS가 필요에 따라 Gln 및 Asn 보충과 함께, 대사 부담 증가로 인한 세포의 성장 및 증식을 둔화시키지 않으면서 분비 단백질 생산을 유지하는 데 충분함을 시사한다. 이를 통해, 추후에 항생제를 원하는 분비 단백질로부터 분리 또는 정제해야 하는 요건 또는 대규모 생물반응기에 항생제를 추가하는 데 드는 비용으로 인해, 항생제 선택 방법을 이용하여 수행하기 어려울 수 있는 이중 대사 선택 조건하에서 대규모 생산 생물반응기를 실행할 수 있는 잠재력을 제공한다. 또한 이 이중 대사 선택 시스템(GS + ASNS)은 예를 들면 이중특이적 항체 또는 다른 크고/크거나 복잡한 단백질을 발현할 때와 같이 여러 개의 대형 벡터가 세포에 도입된 세포를 보다 효율적으로 선택할 수 있는 기회를 제공한다.

도면

도면1



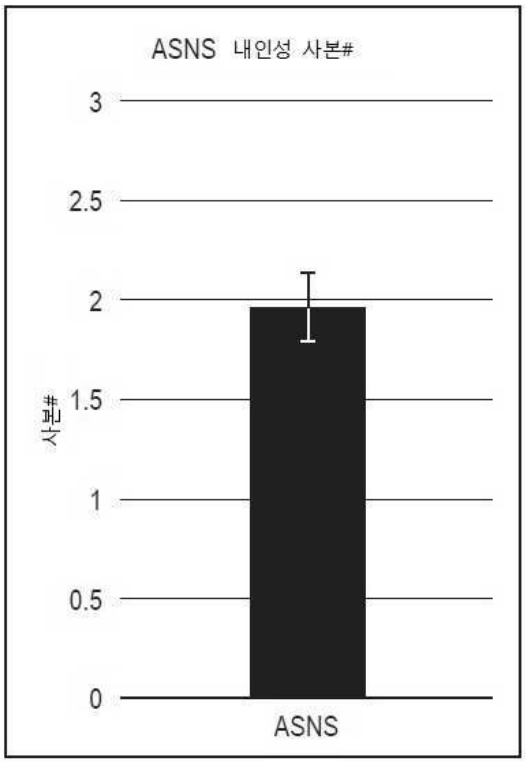
아스파라긴 생합성의 마지막 단계는 비중복 효소인 아스파라긴 합성효소(ASNS)가 필요한 단일 경로를 통해 완료된다. 기능적 ASNS 단백질이 없는 경우, 세포는 아미노산 아스파라긴의 외부 공급원이 필요하다.

도면2

ATGTGTGGCATTTGGGCCCTCTTTGGCAGCGATGACTGCCTTTCCGTGCAGTGCCTGAGTGCAATGAAGATTGCACACAGAGGG
CCAGATGCATTTCGTTTTGAGAATGTCAATGGATATACCAACTGCTGCTTTGGATTTCACCGGTTGGCCGTGGTTGACCCCCTGTT
TGGAATGCAGCCAATAAGAGTGAAGAAATACCCTTATCTGTGGCTCTGTTACAATGGTGAAATTTACAACCACAAGGCGCTACAA
CAACGCTTTGAATTCGAGTATCAGACCAATGTGGATGGTGAGATTATCCTGCATCTCTATGACAAAGGAGGTATCGAGCAAACCA
TTTGTATGTTGGATGGGGTGTTTGCATTCATCTTGCTGGACACTGCCAACAAGAAAGTTTTTCTGGGCAGAGATACCTATGGAGT
CAGGCCCTTGTTTAAAGCCATGACAGAAGATGGATTTCTGGCTGTGTGTTCAGAAGCTAAAGGGCTCGTTTCCTTAAAGCACTC
CACAACTCCCTTCTTAAAAGTGGAGCCCTTCCTTCCTGGACACTACGAAGTTTTGGATTTAAAACCAAATGGCAAAGTTGCATCT
GTGGAGATGGTGAAATACCATCACTGCAGAGATGAACCACTGCACGCCCTCTACGACAGCGTGGAGAAACTCTTCCAAGGCTTT
GAGTTAGAAACGGTGAAGAGCAATCTTCGTATCCTGTTTGACAGTGCTGTCAGGAAGCGCTTGATGACGGACAGGAGGATCGG
CTGCCTTTTATCAGGGGGCCTGGACTCGAGCTTGGTTGCCGCCTCCCTGCTGAAGCAACTCAAGGAGGCTCAAGTACAGTATCC
ACTCCAGACATTTGCAATTGGCATGGAAGACAGCCCTGATCTACTAGCCGCTAGAAAGGTGGCAAATTATATTGGAAGCGAGCA
TCACGAAGTCTTATTTAATTCTGAAGAAGGCATTCAGGCCCTGGATGAGGTCATATTTTCCTTGGAAACTTACGACATTACAACAG
TTCGAGCATCTGTAGGTATGTATCTAATTTCCAAGTATATTCGGAAGAACACAGACAGCGTGGTGATCTTCTCTGGAGAAGGGTC
AGATGAACTTACACAGGGCTACATATATTTCCACAAGGCTCCTTCTCCAGAGAAAGCAGAGGAGGAGAGTGAGAGACTGCTGA
AGGAACTCTACCTGTTTGATGTTCTCCGAGCCGACCGAACTACTGCTGCCCACGGTCTTGAACTGAGAGTCCCGTTTCTGGATCA
TCGGTTTTCCTCCTATTACTTGTCACTGCCACCAGAAATGAGAATTCCAAAAAATGGGATAGAAAAACATCTCCTTCGAGAGACG
TTTGAGGACTCCAACCTGCTACCCAAAGAGATTCTCTGGAGACCAAAAGAAGCCTTCAGTGATGGGATCACCTCAGTTAAGAAC
TCCTGGTTTAAGATTCTACAGGATTATGTTGAACATCAGGTTGATGATGAAATGATGGCAACAGCAGCCCAGAAGTTTCCCTTCA
ATACTCCCAAAACTAAAGAAGGCTATTACTACCGCCAGATCTTTGAACGCCATTACCCAGGCCGGGCTGATTGGCTGACCCATTAT
TGGATGCCCAAGTGGATCAATGCCACCGATCCTTCTGCCCGAACTCTCACCCACTATAAGTCAGCTGCCAAAGCTTAG

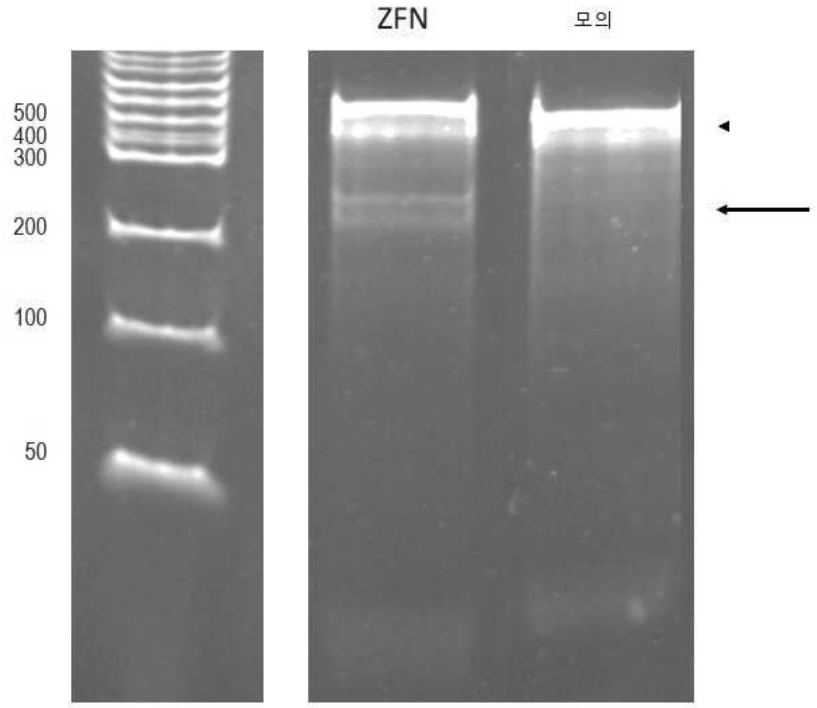
CHOZN® GS$^{-/-}$에서 ASNS의 cDNA 서열

도면3



내인성 아스파라긴 합성효소 유전자(ASNS)의 ddPCR을 통한 사본수 분석

도면4



Asn을 배지에 보충하여 ZFN 절단 활성을 평가하였다. 화살촉은 ASNS PCR 앰플리콘의 예상 크기를 표시하는 반면, 화살표는 유전자 변형이 ZFN 절단 부위에서 발생했음을 시사하는 Surveyor 부정합 수복 분석으로부터의 두 개의 띠를 표시한다.

도면5

참고 서열 : GCCTTCAGTGATGGGATCACCTCAGTTAAGAACTCCTGGTTTAAGATTCTACAGGATT

클론 11 A3 대립유전자 1: GCCTTCAGTGATGGGATCACCTCAGTTAAGA TCCTGGTTTAAGATTCTACAGGATT
클론 11 A3 대립유전자 2: GCCTTCAGTGATGGGATCACCTCAGTTAAGAACTCCTGGTTTAAGATTCTACAGGATT

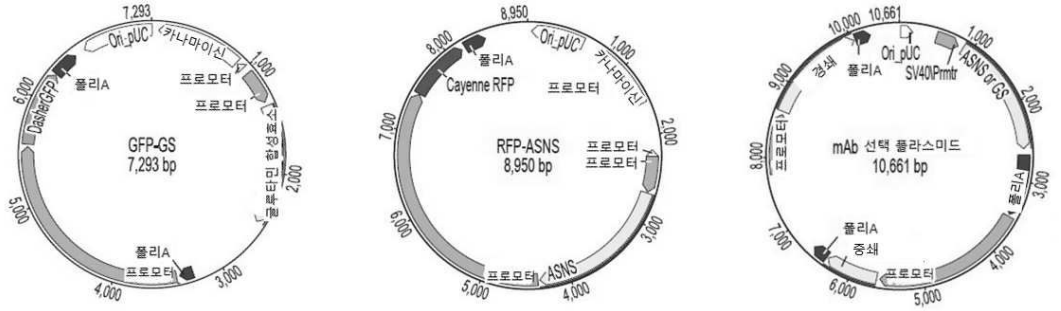
AGAA

참고 서열: GCCTTCAGTGATGGGATCACCTCAGTTAAGAACTCCTGGTTTAAGATTCTACAGGATT

클론 26 F3 대립유전자 1: GCCTTCAGTGATGGGATCACCTCAGT CCTGGTTTAAGATTCTACAGGATT
클론 26 F3 대립유전자 2: GCCTTCAGTGATGGGATCACCTCAGTTAAGA CTCCTGGTTTAAGATTCTACAGGATT

ASNS의 코딩 서열에서 유전자 변화는 2개의 독립된 클론의 앰플리콘 염기서열분석을 통해 검출되었으며 ASNS 단백질의 프레임시프트 돌연변이 및 비활성화를 유발한다.

도면6



글루타민 기반 선택 시스템을 이용한 -GFP 양성 세포의 선택, 아스파라긴 기반 선택 시스템을 이용한 -RFP 양성 세포의 선택, 그리고 mAb 중쇄, 경쇄 및 ASNS 또는 GS 코딩 서열을 포함하는 두 개의 유사한 벡터의 개발을 통한 분비된 재조합 단백질의 개발을 가능하게 하는 벡터가 설계되었다.

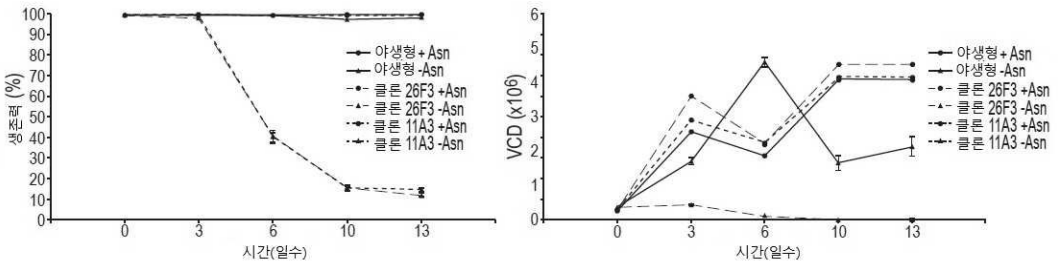
도면7

GTTACAGTAGCCCGGCTGCTCTAAGGTAAGAAGCAGTCCTCTGCTCCTTCGTGTCCCTGT
GCTGCCTCCTCTCCCGCCTCCTCTGGCCCTAGCCACCAGCGAGCAGGTAAGCGGGACCCT
GATGCTCGGGGCGGTGCGCTGTGCACGCCCGGGAGGCCGGAGGATGCTCGGTCCGCGC
CGGCACACAGGTCCCGGGCACGCGGGTACCAAACACACCGGCCGGCGCCGGACAGATG
CTGCGGTGCAGCGGGTGCCAGGGCGGGGCGGACGCGGGGCGATTGTTGCGCACCTGGG
ACGGAGATGGCCCGGGAAGCTCTCACAAGAGCGAAGTGCTTCGTGGAGGCTGGGCCGC
TCCAGACCGGAGACCACGGTGGCCTTAGTCAGGACGCCGTAAATGTTATTATTTTTACT
GTCTGACGTCTAAGCCTGGGAAAGTTCGGCGATCCGAGGGCCTTGCTTGGGACCAGCTG
GAAGCCTGCACAAGACCAGCCGCAGTTGGGCGCCCCAGGCTAGTTCTCGGGCCTGGTGG
TCGCGCAGGACCCAGGCTCTCCCTCGCTCTAGAGCGAGGCTCTTTGGGGGTGGACTGGG
GGTGAACTGTCTGGATCCCGCTTATCGAGCCCCCACTCACCTTGCTGCCCGGCCCCTCCCC
CAGCCCAGCTCCACACTTGCAAGGCCGCCGAGTACAGAAAAAGGCAAAGGCTTGCTTTTT
CTTAATAATGGGCAGCTGTTCACAGGCCTGGTTTCGGATTAATATAACGTTAAAATACAA
GGACAAGTTTTGTTTTGCTTGGCCCGGGGCCTACAGCCCTTAACAGTTAACTCTTTTCGTT
GATTATGTATAATATTGATGTAATATTGATTAGAATAAGACTTGCACAAGCCCACGGGTT
AATGATTGAGATTTAAAATAAGGAGATCCTGTGAAGTTTTGGTAGATCATCAGTAGAGT
AGAATTTCTGTTCAATAGAATTTCTGGACGGCACCTTAGCGGCGCTGTCCGCCCGGGGAG
CCACAGGATCCATTCACTTGCATGCACTGACCTCTAGAAACACTGGCTAGTCTAAACTGA
GATGCTTTACAAAGTGTAATTTTGATGATTTGAAAACCGAACTTCTATGGATTTGGTTGTG
ACCCTTAGACTTTAACGTCTGAACTATTCCTCTGGCCTGGTTTTAATAATTTAAGTGTAAAA
TACAATTAATTTTGATTATATTGTATTGATTATTTTGCTTGGGGTGTGCCATGTTAAGGTAC
ATTTACAATTCATTTCAGTACTTTCTTTTGCCTTTTTGACGGAGTTTATTAGTATATTAAAAT
CACACATATGGTTCACATTCCCTCTGGACAACACTGCTATAGAAGTTAACCATGAGATGTG
GAAAACCACAGGGACAGATAACACTGAGGAAAATGAGGTACAAGGAGGGCCTCTCCCT
GCATAGAAGACCGATTCCAATTACAAAGAAAGAGTTTGAATTTCCTTATTCCAACTAAAG
GAAGGTATTTTAAACTCTTATTTCCACTCATAAGTGGCTGGCATATGTTTCATGTAACAGA
CAATTCATTAAAGAGCCGTAAGACCTAAGTAAATGATTTTCTGATGATCACAACTGATTTT
CAAAGTGCGTTACAAATCCACTTTTCTTTCTTTTCCCCTTTTATTATTTTCCTCCTGCAATAT
AACCAGAACGCAGTTTCCCCTCCTTCTACTCCTTCCAGTTCCTCCCCACCTTCTCTTCCATCT
GGAGACACTCCCTTCCTGTCTCTCCTTAGAAAAGAACTGGCTTCTAAGAGATAACAAAAC
GCAATAAAATAAAATATAATAAGATAAAATGAAAACTGTCATATTGAAGTTGGACAACAC
AAGCCAATAGAAAATTAAGGCAGCCCCAAGAAAAAGGCGTAAGAATAGAGATCCACTCG
TCTACACATTCAAGAGTTCCACAGAACTAAACTGGAAGCTATAGAACATAGGCAGAAGAC
CTGGTGCAGACCTGTGTAGGCCCTGTGCTTGCCTCGTCAGTGTCCCTTGAGTTTGTATGA

GCATTGCTCAGTTGTTTTAGAGGGCCTGTTCTCCATCCCCTTAGTCTCCCATATTCCTTCTG
CTTCGGCTTCCTTGGGGTTCCCTGAGCTCCCATGGGAGGGATTTGATGGAGACATTGTGG
TTAAAGCTATGTGGCTAAGCCACTTCTCATTGGCATTGAGTCAAACATTGCTTAGTAACAG
CCACCCCTCTGACAGGTGTTGGTGTTGGACACCTTAATCCCAGCACTCAGGAAGCAGAGG
CAAGTGGATCTCTGTGAGTTTGAGGCCAGCCTAGTCTACAGAGCTACACAGAGAAACCCT
GTCTCGAAAAAACCAAAAAACCAAAAACAACTAAAAACCAGCCACCCCTCCAAACTCTGC
ATTTTCCTGCTGAATGCACAAACCAGTCCCACTGTAGACTATTTGGATAGCATTGTGGAAG
GAACTGCATGTCACTTGCACTTTGTCTTCAAGTTTCTTTGCTTGATGGCATTTTTTTTTTTT
TTTTTTTCCAGATGGAATAATTCGAAGGATTGTTCAGAGTGGCTGATGTGAGCCTGTGTG
TCTTTAGGGTGGTTTTCCAGATTATGTTGCCATTTCTTGCAGATGTGCATTTTAAGCAGAT
ACGGTACTATTTGCTAGTTGGAGATTCTTTATTAAACAATTTTGAGCTAGCGATATTCAAG
TGACATTTGTAGGAATTACTTGCTTCCTGGTCTACAGGGATCTAAGTGGCCCCTTCCCCAA
CGTTGCTTCATCTCTCCGTATCTCAACTATTTTACTCACTAACCCATGCAGCTTTGAGGTAC
ATATCTGAGAATATTTTTGTCATCGAGGACATTTTGATACTGAACTTTTCTGTTGTTGAGA
CAAGATCTCATGTAGCACAGGATGGCCTTGAATTCCTGATCACACTGCCTCTACCCCCACC
CCCACCCCCACCTCCTGTGCTGGGATGATGTACCACAAGACCTAGCCATAGCAAATATTTT
ATATCCTCAGTCAGCTCAAGTGCTTGTTAGCATATTAGCTATCAGATTATTGTTTTCTTATT
CTACATCACGTTTAGAGAAACCATTTAGATGTTAAGCTAGAAGTTATGACATGCTTGGTG
AGATGTATTCACACTACATAATAGTGCTTATAAGCTCCTATTTATTCCCTTTGTATTTGACC
TGCACAAAGTACAGATAAAGAAAGGGTATTTAATTGTAGAGGCTCAGGAAGAGCCTGTA
CTAACACAGAGAGCCTCCCACGGTTGGTTTTCTTTGAGATTCTCAACTGGAGAATGCTGAT
ACTGGGATCACTTCCTAGCTTGGAGCCAGCCAAGCCAGCCATTGACCTTGGGAGCAATCC
TGGGCTACAGAGACACAATGTGATGTGGCTGTTATTGGGTCTGACTCCCACCAAATCCTA
AGGTGGGAGAGATGTGGGCTTTGGCTGGATGCTAAGCTTCTGTGTCTGGTTGAATGTAA
AGCTCACTTGTATTTTTTAATATTTGTAAGCAAATTAAGTCTTCTCATTTGCCTGCCAACCC
AATGGAAAACTGCTGCAGATAGAGATGGTTTGAGTCCAACTTTTTGGAGAGACTTGTGTA
AGTTTCTGGAATCAAGGCTTGGTTACTGAATGTGAGCCCACTGTGCTTTTCTCCACAGAGT
GCCTGCAGTTCTCCTGCAGG**ATG**

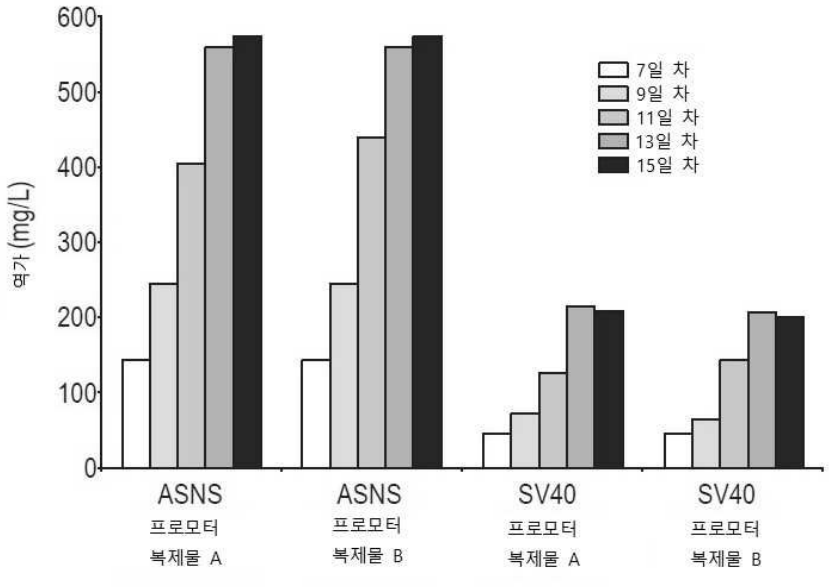
ASNS 내인성 발현 제어 서열(프로모터)

도면8



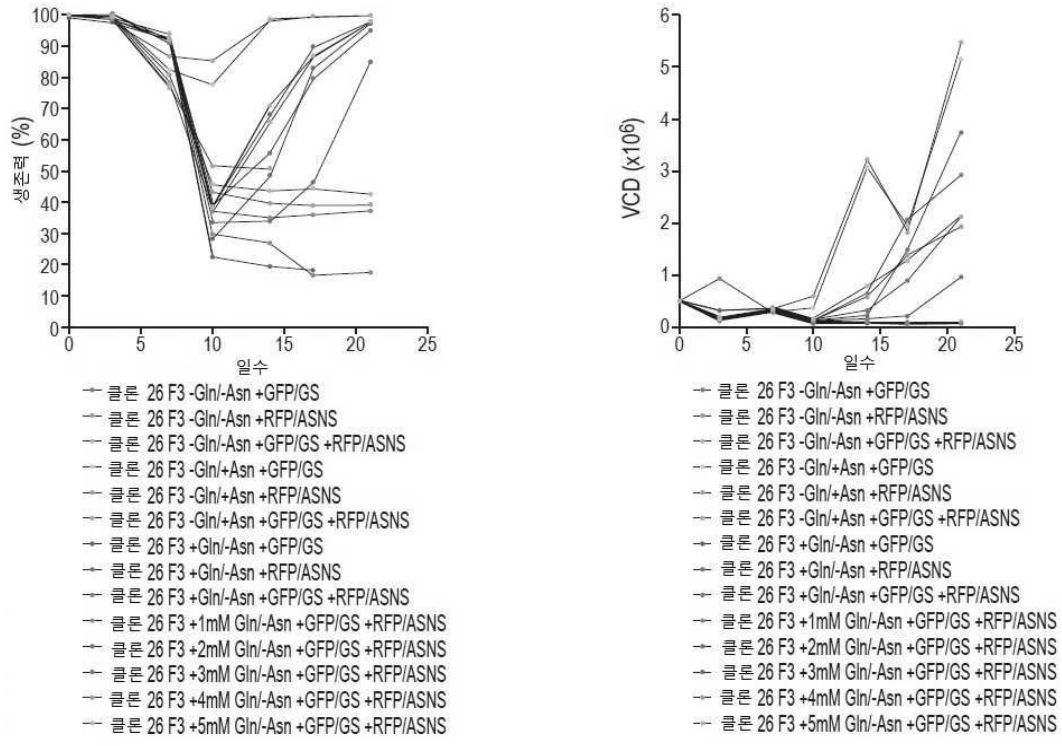
ASNS KO 클론 11 A3 및 26 F3은 배지에 Asn이 보충되지 않으면 생존하고 성장할 수 없다.

도면9



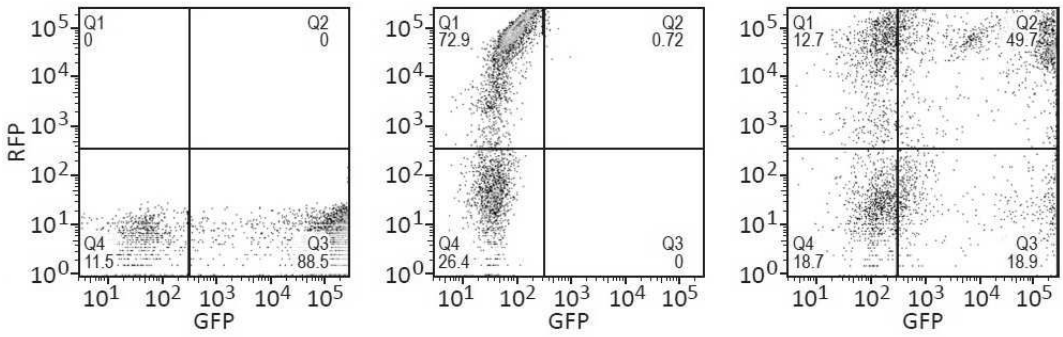
내인성 발현 제어 서열(ASNS 프로모터) 또는 SV40 프로모터에 의해 구동된 IgG+ASNS로 형질감염되며 6mM 글루타민으로 보충된 아스파라긴 결핍 배지에서 성장된, GS 및 ASNS 유전자가 유전적으로 파괴된 CHO 세포. ASNS가 SV40 프로모터와 대비하여 ASNS 프로모터에 의해 구동될 때 IgG 발현 수준이 ~3x 더 높은 것으로 밝혀졌다.

도면10



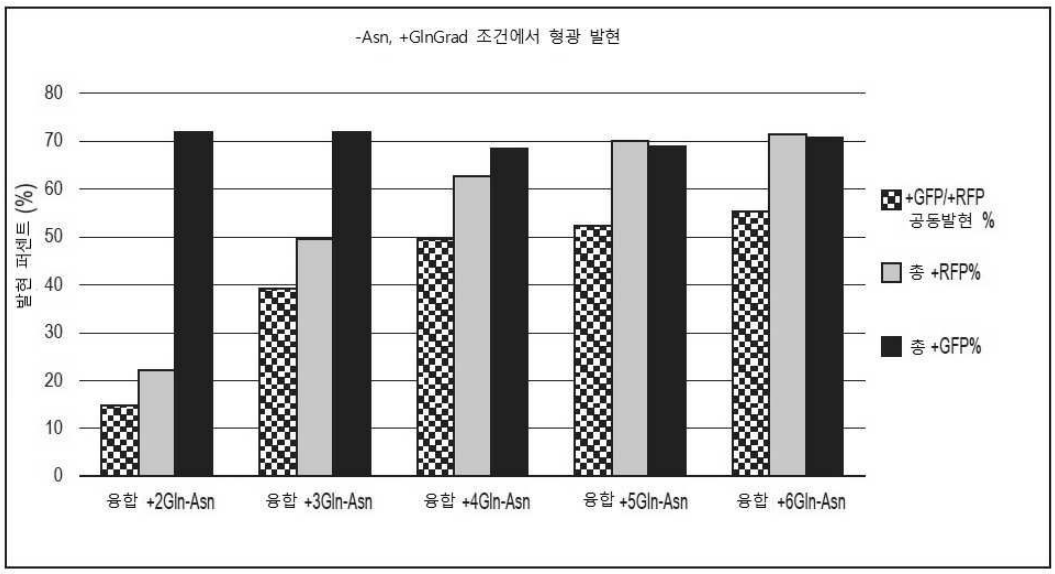
각각 GS, ASNS 또는 GS + ASNS 선택을 이용하여 GFP, RFP 또는 GFP + RFP를 발현하는 풀의 성장 및 생존력

도면11



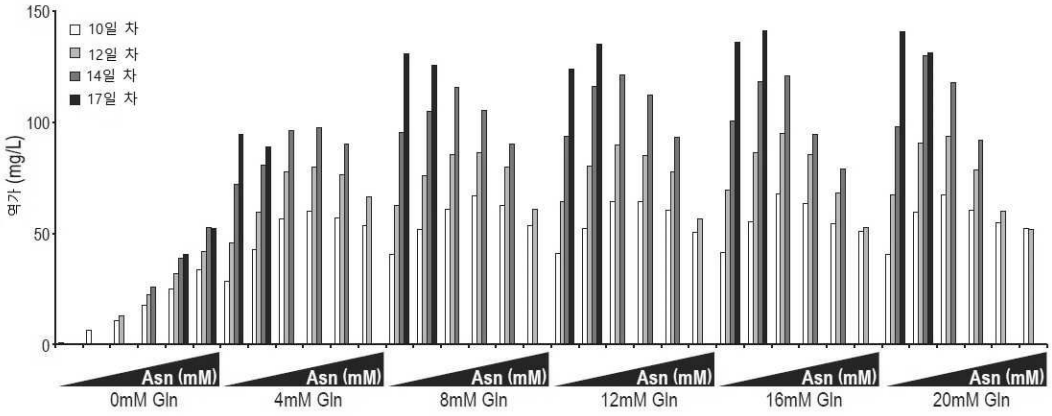
GFP+GS 발현 카세트를 포함하는 플라스미드로 형질감염된, GS 및 ASNS 유전자가 유전적으로 파괴된 CHO 세포는 글루타민 결핍 배지에서 선택되었지만 RFP를 발현하지 않는다(왼쪽 끝). RFP+ASNS 발현 카세트를 포함하는 플라스미드로 형질감염된, GS 및 ASNS 유전자가 유전적으로 파괴된 CHO 세포는 아스파라긴 결핍 배지에서 선택되었지만 GFP를 발현하지 않는다(중간). GFP+GS 및 RFP+ASNS으로 공동형질감염되며 낮은 수준의 글루타민으로 보충된 아스파라긴 결핍 배지에서 성장된, GS 및 ASNS 유전자가 유전적으로 파괴된 CHO 세포는 GFP와 RFP 둘 모두를 높은 수준으로 발현한다.

도면12



GFP+GS 및 RFP+ASNS으로 공동형질감염되며 글루타민의 구배로 보충된 아스파라긴 결핍 배지에서 성장된, GS 및 ASNS 유전자가 유전적으로 파괴된 CHO 세포는 GFP 발현의 손실이 없음을 보여준다(검은색). 총 RFP 발현(회색)은 GFP/RFP 공동발현(체크무늬)이 그러하듯, 글루타민 보충의 농도가 증가하면 급격하게 증가한다.

도면13



IgG+GS 및 IgG+ASNS으로 공동형질감염되며 글루타민 및 아스파라긴의 구배로 보충된 배지에서 성장된, GS 및 ASNS 유전자가 유전적으로 파괴된 CHO 세포.

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.