(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0144430
(43) 공개일자 2021년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) *C12N 15/69* (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 15/69 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0061782
(22) 출원일자 2020년05월22일
심사청구일자 2020년05월22일

(71) 출원인
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
박준태
인천광역시 연수구 해송로 143 송도웰카운티1단지 101동 703호
김재원
인천광역시 동구 송미로 6 송림풍림아이원아파트 110동 401호
(74) 대리인
차준용

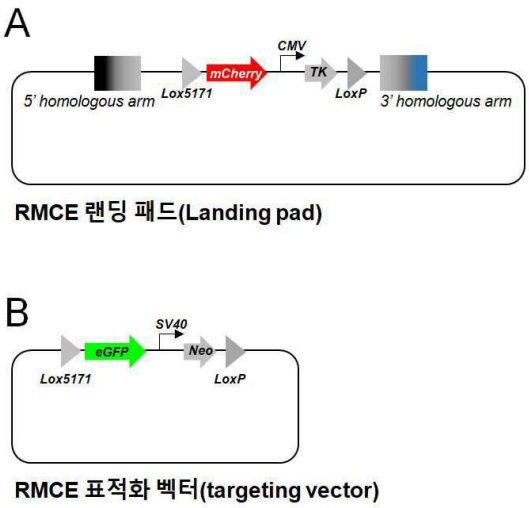
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **Fer1L4 유전자에 부위-특이적 통합된 RMCE 랜딩 패드를 포함하는 CHO 세포**

(57) 요 약

본 발명은 Site-specific integration(SSI)과 recombinase-mediated cassette exchange(RMCE)를 적용하여 재조합 단백질 생산 세포주 및 상기 세포주를 만드는 방법이다. 기존에 발현량이 높은 것으로 알려진 발현 핫-스팟(expression hot-spot)을 타겟으로 하여 SSI를 통해 RMCE 랜딩 패드(landing pad)를 집어넣고, 핫-스팟의 프로모터를 통해 발현하게 하여 안정적이고 높은 수준의 단백질 생산이 가능하게 한다. 또한 RMCE를 통해 단백질 생산 세포주의 GOI를 쉽게 교체할 수 있어 기존의 세포주가 가지는 단백질 생산량을 유지한 채로 생산하는 단백질의 종류를 변경할 수 있다. 이를 통해 재조합 단백질 생산 산업에서 세포주 개발 과정에 들어가는 시간과 비용을 크게 단축시킬 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 15/907 (2013.01)
C12N 2800/10 (2013.01)
C12N 2800/30 (2013.01)
C12N 2830/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345318195
과제번호	2018R1D1A1B07040293
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	자가포식작용 매개 대사과정 조절을 통한 노화 제어
기 여 율	1/1
과제수행기관명	인천대학교
연구기간	2018.06.01 ~ 2021.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

Fer1L4 유전자의 엑손 1에 부위-특이적 통합된 RMCE(recombinase mediated cassette exchange) 랜딩 패드를 포함하고,

상기 RMCE는 프로모터가 없는 제1목적 유전자, Fer1L4 유전자 엑손 1의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm), 2개의 재조합 표적 부위 및 프로모터를 갖는 제1항생제 내성 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Fer1L4 유전자 엑손 1의 5' 상동성 암(homologous arm)은 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고,

상기 Fer1L4 유전자 엑손 1의 3' 상동성 암(homologous arm)은 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 CHO 세포주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 프로모터가 없는 제1목적 유전자는 상기 재조합 표적 부위 사이에 존재하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포주.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 재조합 표적 부위는 *LoxP* 및 *Lox5171*인 것을 특징으로 하는 CHO 세포주.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제1목적 유전자는 Fer1L4 유전자의 프로모터를 통하여 발현되는 것을 특징으로 하는 CHO 세포주.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 RMCE는 Fer1L4 유전자 엑손 1의 5' 상동성 암(homologous arm); *Lox5171*인 재조합 표적 부위; 프로모터가 없는 제1목적 유전자; 프로모터를 갖는 제1항생제 내성 유전자; *LoxP*인 재조합 표적 부위 및 Fer1L4 유전자 엑손 1의 3' 상동성 암(homologous arm)을 순서대로 연결한 것을 특징으로 하는 CHO 세포주.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 하나의 항에 따른 CHO 세포에 RMCE 표적화 벡터와 cre 플라스미드를 형질감염시키는 단계; 및

상기 CHO 세포를 배양하는 단계를 포함하고,

상기 RMCE 표적화 벡터는 프로모터가 없는 제2목적 유전자, RMCE 랜딩 패드와 동일한 2개의 재조합 표적 부위 및 프로모터를 갖는 제2항생제 내성 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, RMCE 랜딩 패드가 통합된 세포주의 목적 유전자를 교체하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 RMCE 표적화 벡터 및 cre 플라스미드는 4:1의 비율로 형질감염되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 재조합 표적 부위는 *LoxP* 및 *Lox5171*인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

*Lox5171*인 재조합 표적 부위; 프로모터가 없는 제2목적 유전자; 프로모터를 갖는 제2항생제 내성 유전자; *LoxP*인 재조합 표적 부위를 순서대로 연결한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

RMCE(recombinase mediated cassette exchange) 랜딩 패드를 포함하는 벡터를 Fer1L4 엑손 1 최적화 Cas9(Fer1L4 exon1 optimized Cas9) 및 sgRNA(single guide RNA)를 CHO 세포에 형질감염 시키는 단계; 및

상기 CHO 세포를 배양하는 단계를 포함하고,

상기 RMCE는 프로모터가 없는 제1목적 유전자, Fer1L4 유전자 엑손 1의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm), 2개의 재조합 표적 부위 및 프로모터를 갖는 제1항생제 내성 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 목적 유전자를 Fer1L4 유전자에 부위-특이적으로 통합하는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 Fer1L4 유전자 엑손 1의 5' 상동성 암(homologous arm)은 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고,

상기 Fer1L4 유전자 엑손 1의 3' 상동성 암(homologous arm)은 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 RMCE는 Fer1L4 유전자 엑손 1의 5' 상동성 암(homologous arm); *Lox5171*인 재조합 표적 부위; 프로모터가

없는 제1목적 유전자; 프로모터를 갖는 제1항생제 내성 유전자; *LoxP*인 재조합 표적 부위 및 Fer1L4 유전자 엑손 1의 3' 상동성 암(homologous arm)을 순서대로 연결한 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 RMCE(recombinase mediated cassette exchange) 랜딩 패드는 CRISPR/Cas9으로 매개되는 상동성 재조합(homologous recombination)에 의하여 Fer1L4 유전자에 부위-특이적으로 통합되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Site-specific integration(SSI)과 recombinase-mediated cassette exchange(RMCE)를 적용하여 재조합 단백질 생산 세포주 및 상기 세포주를 만드는 방법이다. 기존에 발현량이 높은 것으로 알려진 발현 핫-스팟(expression hot-spot)을 타겟으로 하여 SSI를 통해 RMCE 랜딩 패드(landing pad)를 집어넣고, 핫-스팟의 프로모터를 통해 발현하게 하여 안정적이고 높은 수준의 단백질 생산이 가능하게 한다. 또한 RMCE를 통해 단백질 생산 세포주의 GOI를 쉽게 교체할 수 있어 기존의 세포주가 가지는 단백질 생산량을 유지한 채로 생산하는 단백질의 종류를 변경할 수 있다. 이를 통해 재조합 단백질 생산 산업에서 세포주 개발 과정에 들어가는 시간과 비용을 크게 단축시킬 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 바이오 의약품은 지난 수십 년 동안 많은 질병의 치료를 변화시킨 지배적인 성장 시장이다. 이러한 제품의 개발을 통해 증가하는 시장 수요를 충족시키려면 세포주 개발 프로세스를 개선하는 것이 중요하다. 통상적인 세포주 개발은 게놈으로의 무작위 삽입에 기초하며, 다양한 전이 유전자 삽입 및 카피 수를 갖는 클론을 생성한다. 세포 풀의 비균질성(heterogeneity)은 적절한 생산 특성을 갖는 클론을 얻기 위해 오랜 시간의 스크리닝이 필요하다. 더욱이, 삽입 부위의 정확한 제어가 없기 때문에, 선택된 클론의 단백질 생산성은 시간이 지남에 따라 감소하여 세포주 불안정성을 초래할 수 있다. 대조적으로, 관심 유전자(GOI, gene of interest)가 예정된 게놈 유전자좌에 삽입된 부위-특이적 통합(SSI, site specific integration)은보다 일관된 클론을 생성하여 세포주 개발 시간을 감소시키는 수단을 제공한다. SSI는 하나 또는 두 개의 유전자 카피에서 발생하므로 카피 삽입이 낮은 세포주는 훨씬 더 삽입된 전이 유전자 카피를 보유하는 무작위 공정에 의해 생성된 세포주만큼 생산적이지 않다. 따라서 리터당 몇 그램의 역가(titer)를 지원할 수 있는 사전 검증된 핫스팟을 찾는 것이 매우 중요하다. 이와 같이, 핫스팟에서의 SSI는 활발하고 안정적인 전이 유전자 발현을 가능하게 하는 유망한 전략으로 떠오르고 있다.

[0003] 세포주는 발현 수준 및 전이 유전자(transgene) 삽입 부위에 직접 연결된 안정성과 같은 것으로 특징된다. 특정 부위에서의 전사 활성은 염색질 상태 및 해당 접근성에 따라 달라진다. 핫스팟(hotspot)은 우수한 안정성 및 향상된 전사 활성을 부여하는 독특한 능력을 갖는 것으로 확인된 염색체 유전자좌이다. 그 중에서도 Fer1L4는 핫스팟으로 검증되어 높고 안정적인 발현이 가능하다.

[0004] 재조합효소-매개된 카세트 교환(RMCE, Recombinase mediated cassette exchange)는 Cre/Lox 또는 Flp/FRT와 같은 부위-특이적 재조합 시스템을 사용하여 단방향 방식으로 효율적인 SSI를 용이하게 한다. 그것은 단방향 방식으로 DNA 카세트 측면에 있는 2쌍의 이종 특이적 재조합 표적 부위(heterospecific recombinase target site) 사이의 이중 왕복 교차(double-reciprocal crossover)를 허용한다. 따라서, SSI에 의해 확립된 클론으로부터 새로운 클론을 재-확립함으로써 전체 세포주 개발 시간을 상당히 절약할 수 있다. 또한, 확립된 클론은 이전에 확립된 클론과 동일한 발현 수준을 보증한다. Cre/Lox를 기반으로 하는 RMCE는 예외적으로 잘 작동하여 포유류 세포에서 충실도가 높은 카세트 교환 이벤트를 보여준다. Lox5171 및 LoxP와 같은 상이한 표적 부위를 사용한 이중 왕복 교차를 통해, Cre 재조합 효소는 재조합 표적 부위가 삽입된 포유동물 세포주에서 재조합 표적 부위가 플랭킹(flanking)하는 관심유전자 (Gene of interest, GOI)의 간편한 교체를 가능하게 한다.

[0005] 유세포 분석은 세포 표현형에 기초한 분석을 용이하게 한다는 점에서 세포 생물학의 강력한 방법이다. 또한,

FACS(fluorescence-activated cell sorting) 공정을 통해 단일 세포를 분석하고 생체 외 실험을 위해 살아있는 세포를 동시에 분리할 수 있다. 형질 감염될 벡터 상의 형광 마커를 사용하여, 게놈에 벡터를 포함시키는 세포는 FACS를 통해 고순도로 풍부해질 수 있다. 또한, IRES 또는 2A 시스템을 적용하여 GOI 및 형광 마커를 동시에 발현시킴으로써, FACS를 이용하여 고효율로 GOI 발현 세포를 농축시킬 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1761709호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 기존의 단백질 생산 세포주를 만드는 방법은 Random integration을 이용했다. 외부 벡터를 세포에 형질감염(transfection)한 후, 항생제 저항성을 이용한 선택과 단일 세포 클로닝을 통해 벡터를 발현하는 세포주를 선별하여 재조합 단백질을 생산하게 한다. Random integration을 이용해 단백질 생산 세포주를 만들 경우 외부 벡터가 게놈에 삽입(integration)되는 위치에 따라 발현량이 달라진다. 이로 인해 만들어진 세포주들의 단백질 생산량 편차가 커지기 때문에 높은 발현량을 가지는 세포주를 선별하는 작업이 필요하다. 이렇게 만들어진 세포주는 넣어준 벡터가 코딩하는 특정 단백질만을 생산하기 때문에, 다른 종류의 단백질을 생산하기 위해서는 원하는 단백질의 외부 벡터를 다시 형질감염하여 세포주를 선별하는 작업을 처음부터 다시 해야 한다. 이 과정에서 많은 시간과 비용이 요구되는 문제점을 가지고 있다.

[0008] 이에 본 발명자는 미리 결정된 영역에서 유전자의 교환을 허용하는 RMCE 시스템을 확립하였다. 이러한 가능성을 해결하기 위해 RMCE 랜딩 패드를 Fer1L4에 통합하고 랜딩 패드를 타겟팅 벡터로 변환하는 방법을 시연했다. 또한 루시퍼라아제(luciferase)를 사용하여 무작위 통합 및 부위-특이적 통합의 표현 수준을 비교했다. 이 숙주로부터 제조된 세포주는 탁월한 성장 및 생산성 프로파일, 및 선택제제가 없는 상태에서 100세대 이상 동안 안정성을 나타냈다. 여기에 안정적인 발현 수준뿐만 아니라 GOI를 쉽게 교체할 수 있는 차세대 벡터 플랫폼을 구축하였다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 일 실시예에 따르면, Fer1L4 유전자의 엑손 1에 부위-특이적 통합된 RMCE(recombinase mediated cassette exchange) 랜딩 패드를 포함하고, 상기 RMCE는 프로모터가 없는 제1목적 유전자, Fer1L4 유전자 엑손 1의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm), 2개의 재조합 표적 부위 및 프로모터를 갖는 제1항생제 내성 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 CHO 세포주를 제공한다.

[0010] 상기 목적 유전자란 CHO cell의 Fer1L4의 엑손 1에 통합시켜 Fer1L4의 프로모터에 의해 안정적이고 높은 수준의 발현을 유도하고자 하는 유전자를 말하며, 통상적으로 전이 유전자(transgene)라고도 한다.

[0011] 상기 Fer1L4 유전자 엑손 1의 5' 상동성 암(homologous arm)은 서열번호 1의 염기서열로 이루어지고,

[0012] 상기 Fer1L4 유전자 엑손 1의 3' 상동성 암(homologous arm)은 서열번호 2의 염기서열로 이루어지는 것을 특징으로 한다;

[0013] [서열번호 1]

[0014] GCTCTGGGCTGACCCCACCTCTCAGGCCTCAGGCCTTCCCACCCATGACCTCCAGGCCTGCTCCCTGTGTGTTTGACTAGAGGGAAGGGATTGCTGAACCTG
CTGGGTGAGTCCAGTGAGTCATGGACAACACTGGTGGGCAGAAGGGCAAGCAGGCAGACTGAGCCACAGCACTGCGCCATGGCTCTGACCGTGTGTGTG

[0015] [서열번호 2]

[0016] CATCCATGACCGACAAGTGAAGCTCTGCTTCCGTGGTGAGATTTGCATGGATGGGGACTTTTAGAGCTGGGGGTTTCTGGATTCTTCATTCCCTCCAACTTA
AATCCTTGCCAGCTCTATAACCCGTCTCCCTTCTCCCTGGCTTCTACTTGTTTCCTTATCTCCCACCTTTAAGTTTGAGTGGGGAAGTCGGCAGTGGGT.

[0017] 상기 프로모터가 없는 제1목적 유전자는 상기 재조합 표적 부위 사이에 존재하며, 상기 재조합 표적 부위는

LoxP 및 *Lox5171*이고, 위에서 언급한 바와 같이 상기 제1목적 유전자는 Fer1L4 유전자의 프로모터를 통하여 발현된다.

[0018] 상기 *LoxP*는 서열번호 3의 염기서열로 이루어지고 *Lox5171*은 서열번호 4의 염기서열로 이루어진다;

[0019] [서열번호 3]

[0020] ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT

[0021] [서열번호 4]

[0022] ATAACTTCGTATAATGTGTACTATACGAAGTTAT.

[0023] 구체적으로, 상기 RMCE는 Fer1L4 유전자 엑손 1의 5' 상동성 암(homologous arm); *Lox5171*인 재조합 표적 부위; 프로모터가 없는 제1목적 유전자; 프로모터를 갖는 제1항생제 내성 유전자; *LoxP*인 재조합 표적 부위 및 Fer1L4 유전자 엑손 1의 3' 상동성 암(homologous arm)을 순서대로 연결될 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 실시 예에서, 상기 CHO 세포에 RMCE 표적화 벡터와 cre 플라스미드를 형질감염시키는 단계; 및 상기 CHO 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 상기 RMCE 표적화 벡터는 프로모터가 없는 제2목적 유전자, RMCE 랜딩 패드와 동일한 2개의 재조합 표적 부위 및 프로모터를 갖는 제2항생제 내성 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, RMCE 랜딩 패드가 통합된 세포주의 목적 유전자를 교체하는 방법을 제공한다.

[0025] 상기 RMCE 표적화 벡터 및 cre 플라스미드는 4:1의 비율로 CHO 세포에 형질감염되는 것을 특징으로 한다.

[0026] 상기 RMCE 표적화 벡터는 *Lox5171*인 재조합 표적 부위; 프로모터가 없는 제2목적 유전자; 프로모터를 갖는 제2항생제 내성 유전자; *LoxP*인 재조합 표적 부위를 순서대로 연결한 것을 특징으로 한다.

[0027] 본 발명의 또 다른 실시 예에서, RMCE(recombinase mediated cassette exchange) 랜딩 패드를 포함하는 벡터를 Fer1L4 엑손 1 최적화 Cas9(Fer1L4 exon1 optimized Cas9) 및 sgRNA(single guide RNA)를 CHO 세포에 형질감염시키는 단계; 및 상기 CHO 세포를 배양하는 단계를 포함하고, 상기 RMCE는 프로모터가 없는 제1목적 유전자, Fer1L4 유전자 엑손 1의 5' 및 3' 상동성 암(homologous arm), 2개의 재조합 표적 부위 및 프로모터를 갖는 제1항생제 내성 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는, 목적 유전자를 Fer1L4 유전자에 부위-특이적으로 통합하는 방법을 제공한다.

[0028] 상기 RMCE(recombinase mediated cassette exchange) 랜딩 패드는 CRISPR/Cas9으로 매개되는 상동성 재조합(homologous recombination)에 의하여 Fer1L4 유전자에 부위-특이적으로 통합되는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0029] 게놈에 여러 개의 카피가 들어갈 수 있는 Random integration과 달리, SSI는 1카피 혹은 2카피만 게놈에 통합되기 때문에 높은 발현량을 가지는 통합 부위(integration site)를 타겟으로 하는 것이 중요하다. 기존의 논문에서 CHO cell의 Fer1L4 gene이 안정적이고 높은 수준의 발현량을 가지고 있다는 것이 밝혀졌기 때문에, Fer1L4의 엑손 1을 타겟으로 하여 SSI를 통해 단백질 생산 세포주를 만들어낸다. 이때 통합되는 벡터는 RMCE 랜딩 패드로, Lox WT과 Lox Mut 사이에 GOI가 끼워져 있는 형태를 가진다. GOI는 프로모터를 가지고 있지 않기 때문에, RMCE 랜딩 패드가 Fer1L4의 엑손 1에 제대로 통합되었을 경우에만 GOI가 발현된다. 이 방법을 통해 만들어진 단백질 생산 세포주는 Fer1L4의 프로모터에 의해 안정적이고 높은 수준의 GO 발현량을 가질 뿐만 아니라, Cre/Lox 시스템을 통해 GOI를 쉽게 교체할 수 있는 세포주가 된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 RMCE 랜딩 패드 및 RMCE 표적화 벡터의 개략도를 나타낸 도면이다. (A) 랜딩 패드 벡터는 Lox5171 부위, 이어서 프로모터가 없는 mCherry 유전자, 티미딘 키나제(TK) 발현 유닛 및 LoxP 부위를 포함하고, 이 랜딩 패드는 CHO-DG44 게놈에서 Fer1L4 부위에 대한 0.2 kb의 상동성 부위가 측면에 존재한다. (B) RMCE 표적화 벡터는 Lox5171 부위에 이어서 프로모터가 없는 eGFP, SV40 프로모터-구동 네오마이신 유전자 및 LoxP 부위를 함유한다.

도 2는 CRISPR/Cas9에 의해 매개되는 RMCE 랜딩 패드의 표적화된 통합을 나타내는 도면이다. (A) RMCE LP의 표적화된 통합의 개략도를 나타내며, RMCE LP는 Fer1L4의 엑손 1에 통합되었다. 랜딩 패드가 제자리에 놓이면 mCherry는 Fer1L4의 프로모터에 의해 발현된다. (B) RMCE LP 단일 세포 클론의 형광 현미경 이미지를 나타내며,

모든 세포는 mCherry를 발현시켰다. 스케일 바는 50uM이다. (C) 및 (D)는 qRT-PCR 생성물의 개략도를 나타내며, Fer1L4 유전자 좌가 LP에 의해 표적화되지 않으면, 200 bp를 갖는 PCR 생성물이 증폭될 것이다. 그러나 Fer1L4 유전자좌가 LP에 의해 표적화될 때, 연장 시간이 5초로 설정되어 있기 때문에 3,300 bp를 갖는 PCR 생성물은 증폭되지 않을 것이다. (E) 음성 대조군과 LP 단일 세포 클론 사이의 상대적인 카피 수를 비교한 그래프로, 형질 감염되지 않은 CHO 세포를 음성 대조군으로 사용되지 않았다. 클론 중 8개는 음성 대조군과 비교하여 절반의 값을 가졌다.

도 3은 재조합 영역의 염기 서열의 확인을 나타내는 도면이다. (A) 중첩된 PCR 생성물의 개략도를 나타내며, PCR이 성공적으로 수행되었을 때, 앰플리콘은 RMCE LP에서 5' 상동성 암 이전의 게놈으로부터 mCherry까지의 서열을 함유한다. (B) 1kb DNA 래더가 있는 LP 단일 세포 클론에서 중첩된 PCR의 아가로스겔 사진으로, 클론 #16의 2차 PCR 및 3차 PCR에 의해 앰플리콘이 생성되는 것으로 나타났다. (C) 클론 #16의 PCR 앰플리콘의 후속 시퀀싱으로 LP에 의해 표적화된 Fer1L4 영역에서 PCR 앰플리콘의 서열을 참조 서열과 비교한 사진을 나타낸다.

도 4는 RMCE LP 세포주를 이용한 안정적인 세포주 생성을 나타내는 도면이다. (A) RMCE를 사용한 GOI 스와핑 개략도로 mCherry 및 HSV-TK는 GFP 및 네오마이신 내성으로 대체되었다. (B) RMCE LP 단일 세포 클론의 형광 현미경 이미지로 모든 세포는 mCherry 없이 GFP를 발현시켰다. 스케일 바는 50uM이다. (C) 1kb DNA 래더가 있는 교환된 LP 단일 세포 클론에서 PCR 산물의 PCR 및 PCR의 아가로스젤 사진으로, PCR이 성공적으로 수행되었을 때, 앰플리콘은 GOI 스왑된 LP에서 5' 상동성 암에서 GFP까지의 서열을 포함한다. 교환된 LP 클론의 PCR에 의해 앰플리콘이 생성되는 것으로 나타났다. (D) 교환된 LP 클론의 PCR 앰플리콘의 후속 시퀀싱으모, LP에 의해 표적화된 Fer1L4 영역에서 PCR 앰플리콘의 서열을 참조 서열과 비교하였다. (E) 화학적 선택 마커를 사용한 스크리닝 후의 스와핑 속도는 유세포 분석에 의해 측정되었다. LP 클론 세포의 3%를 mCherry를 GFP로 교체하였다*(**P < 0.01*, one-way ANOVA, Means ± S.D., N = 3).

도 5는 RMCE의 최적화 조건 실험에 관한 도면이다. (A) 다양한 농도의 Cre 플라스미드의 교환 속도를 유세포 분석법으로 측정하였다. 화학적 선별 마커를 사용하여 스크리닝한 후, 0.5ug의 Cre 플라스미드로 형질 감염된 LP 클론 세포에서 가장 높은 값(약 4%)이 발견되었다*(**P < 0.01*, one-way ANOVA, Means ± S.D., N = 3). (B) 화학 물질 선별 마커 및 FACS 분류를 사용한 스크리닝 후의 교환 속도를 나타내는 그래프로, LP 클론 세포의 80%를 mCherry를 GFP로 교체하였다. mCherry에서 GFP로 대체된 LP 클론 세포의 백분율은 80%로 상당히 증가하였다 *(**P < 0.01*, one-way ANOVA, Means ± S.D., N = 3).

도 6은 CRISPR/Cas9에 의해 매개되는 랜딩 패드-루시페라제의 표적화된 통합을 나타내는 도면으로, (A) 발현 수준 벡터는 Lox5171 부위, 이어서 프로모터가 없는 루시페라제 유전자, SV40 프로모터-구동 네오마이신 유전자 및 LoxP 부위를 포함한다. 이 랜딩 패드는 CHO-DG44 게놈에서 Fer1L4 부위에 대한 0.2 kb의 상동성 부위가 측면에 존재한다. (B) 제어 벡터는 CMV 프로모터 구동 루시페라제 유전자 및 SV40 프로모터 구동 네오마이신 유전자를 함유한다. (C) LP-Luci의 표적화된 통합의 개략도를 나타낸 것으로, LP-Luci는 Fer1L4의 엑손 1에 통합되었다. 랜딩 패드가 제자리에 놓이면, 루시페라제는 Fer1L4의 프로모터에 의해 발현된다.

도 7은 표적화된 통합에 의해 구축된 클론의 검증 방법을 나타낸 도면으로, (A) 및 (B)는 qRT-PCR 생성물의 개략도를 나타내고, Fer1L4 유전자좌가 LP-Luci에 의해 표적화되지 않으면, 200 bp를 갖는 PCR 생성물이 증폭될 것이다. 그러나 Fer1L4 유전자좌가 LP-Luci에 의해 표적화될 때, 연장 시간이 5초로 설정되어 있기 때문에 3,300 bp를 갖는 PCR 생성물은 증폭되지 않을 것이다. (C) 음성 대조군과 LP-Luci 단일 세포 클론 사이의 상대적 카피 수를 비교한 그래프로, 형질 감염된 CHO 세포는 음성 대조군으로 사용되지 않았다. '그룹 A' 및 '그룹 B' 클론은 음성 대조군에 비해 절반의 값을 가졌다. (D) 중첩된 PCR 생성물의 개략도를 나타낸 것으로, PCR이 성공적으로 수행되었을 때, 앰플리콘은 LP-Luci에서 5' 상동성 암 이전의 게놈으로부터 루시페라제까지의 서열을 함유한다. (E) 1kb DNA 래더가 있는 LP-Luci 단일 세포 클론에서 중첩된 PCR의 아가로스겔 사진을 나타낸 것으로 앰플리콘은 '그룹 A'와 '그룹 B' 클론의 3차 PCR에 의해 생성된 것으로 나타났다. (F) '그룹 A' 및 '그룹 B' 클론의 PCR 앰플리콘의 후속 시퀀싱을 나타낸 도면으로 LP-Luci에 의해 표적화된 Fer1L4 영역에서 PCR 앰플리콘의 서열을 참조 서열과 비교하였다.

도 8은 무작위 통합 및 사이트-특이적 통합을 비교한 것으로 (A) 단일 세포 클론의 발광 값은 점으로 표시된다. 무작위 통합으로 생성된 35개의 클론이 표시된다. 표적화된 통합에서, 81개 클론 중 2500개 이상의 값을 갖는 13개의 클론이 디스플레이되었다. (B) 임의의 통합과 표적화된 통합이 유사한 발현 수준을 가질 때 카피 수를 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0032] **실험예**

[0033] **1. 플라스미드 구축**

[0034] 플라스미드를 구축하기 위해 표준 클로닝 기술이 사용되었다. *E.coli* DH5α가 클로닝 균주로 사용되었으며, 암피실린 50μg/ml가 첨가된 LB Broth에서 배양하였다. 플라스미드 정제는 QIAfilter Plasmid Midi Kit (12243; QIAGEN, Hilden, Germany)를 사용하여 암피실린 항생제가 보충된 LB 브로스에서 밤새 37℃에서 250 rpm으로 성장한 250ml 배양물로 수행되었다. DNA 양을 DS-11 Spectrophotometer (DeNovix, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 정량하였다. 효소는 New England Biolabs (NEB, Ipswich, MA, USA)으로부터 구입하였으며, 본 발명에서 사용한 효소는 아래 [표 1]에 기재하였다.

표 1

[0035]

Enzyme	Company	Cat no.	Description
XmaI	NEB	R0180S	Used vector cloning process.
KpnI		R3142S	
HindIII		R3104S	
XbaI		R0145S	
SalI		R3138S	
XhoI		R0146S	
HpaI		R0105S	
SpeI		R3133S	

[0037] Solg™ 2x Taq PCR Smart mix 2 (STD02-M50h; solgent, Daejeon, Korea)를 PCR 증폭에 사용하였다. 프라이머로 사용된 올리고 뉴클레오티드는 Macrogen (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 소화 산물 또는 PCR 단편은 Solg™ Gel & PCR Purification System (SGP04-C200; solgent) 또는 QIAquick Gel Extraction Kit (28704; QIAGEN) 사용하여 정제하였다. 끈적한 말단 돌출부에 대해 20분 동안 실온에서 DiaStar™ Quick DNA Ligase (DQ01-K060; solgent)를 사용하여 결찰 반응을 수행한 후, 화학 적격성(chemicalic-competent) 세포(DH5α)로 변형시키고 암피실린(50μg/ml)을 포함하는 LB 아가 플레이트 상에 플레이팅 하였다. 플라스미드는 마크로젠에 의해 서열이 분석되었다.

[0039] **2. 세포 배양, CRISPR/Cas9 통합 및 LP 세포주 구축**

[0040] CHO-DG44 부착성 세포주(A1100001; Thermo Fisher Scientific, MA, USA, MA)는 25 mM 포도당, 100 U/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신과 함께 10% 소태아 혈청, 10mM 소듐 하이포잔틴 및 1.6mM 티미딘이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's 배지에서 유지되었다. 세포를 작업 부피가 30ml인 250 ml 삼각 플라스크에서 배양하였다. 세포를 150 rpm 진탕과 함께 37℃ 5% CO_2에서 가습 CO_2 인큐베이터에서 배양하고 3일마다 계대 배양하였다. 세포를 RMCE 랜딩 패드, Fer1L4 엑손 1 최적화 Cas9(Fer1L4 exon1 optimized Cas9) 및 통합 부위를 표적으로 하는 sgRNA로 형질 감염시켰다. 각 샘플마다, 제조자의 권고에 따라 SG Cell Line 4D-Nucleofector® X Kit L (V4XC-3024; Lonza, Basel, Basel-Stadt, Switzerland)을 사용하여 $2X10^6$ 세포를 2㎍의 DNA, 4㎍의 Cas9 단백질 및 1㎍의 sgRNA로 형질 감염시켰다. 형질 감염 16시간 후, 샘플을 T75 플라스크로 옮기고 37℃에서 3일 동안 배양하였다. 형질 감염된 세포를 50μM Blasticisdin (ant-bl-05; Invitrogen, Waltham, MA, USA)으로 2주 동안 선택하였다. 선택하는 동안 3-4 일마다 배지를 교체했다. 선택 후, 1개의 세포를 96 웰 플레이트에서 150㎕ 배지에 웰당 접종하고 15일 동안 배양하였다. 형광 현미경(Axiovert 200, Carl Zeiss, Oberkochen, Germeny)을 통해, 모든 세포를 mCherry를 발현하는 콜로니에 대해 스크리닝하였다.

[0042] **3. 게놈 DNA 및 cDNA의 준비**

[0043] 게놈 DNA(gDNA)는 안정한 재조합 CHO 세포주로부터 제조되었다; $2X10^6$ 세포를 수확하고 PBS로 세척하였다. 제조업자의 지시에 따라 Solg™ Genomic DNA Prep Kit(SGD41-C100; SPL)를 사용하여 gDNA를 분리하고 정제하였다. 매뉴얼에 따라 Rnasy Mini Kit(74104; QIAGEN)를 사용하여 $2X10^6$ 세포로부터 RNA를 분리하였다. 정제된 RNA를 RNAse-free water에 -80℃에서 저장하였다. Phusion RT-PCR Kit(F-546S; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 RNA를 역전사시켰다. gDNA 및 cDNA의 순도 및 농도는 DS-11 Spectrophotometer(DeNovix)로 측정하였다.

[0045] **4. 접합 PCR 및 시퀀싱**

[0046] 게놈 DNA 또는 cDNA가 주형으로 사용되었다. 제조업체의 지지에 따라 Solg™ Genomic DNA Prep Kit (SGD41-C100; SPL)를 사용하여 템플릿을 분리하고 정제했다. 랜딩 패드 밖으로 향한 프라이머는 벡터 백본에서 프라이머와 짝을 이루었다. 모든 프라이머는 Snap Gene (GSL Biotech LLC, IL, USA)을 사용하여 설계되었고 Macrogen에 의해 합성되었다. 프라이머에 대한 정보는 [표 2]에 포함되어 있다.

표 2

[0047]

프라이머 서열	명칭	설명
TCACGGGCTAGCAAGGAC	5' Nested PCR Fwd 1st (서열번호 5)	Confirm RMCE landing pad integration.
TACCCGATCCCAGCTC	5' Nested PCR Fwd 2nd (서열번호 6)	
CGACGGTATGGGAAGA	5' Nested PCR Fwd 3rd (서열번호 7)	
GAGCCGTACATGAACTGA	5' Nested PCR Rev 1st (서열번호 8)	
CCCTCGATCTCGAACT	5' Nested PCR Rev 2nd (서열번호 9)	
CGTGGCCGTTCACGGAGC	5' Nested PCR Rev 3rd (서열번호 10)	
GCACTGCGCCATGGCTCT	qRT-PCR Fer1L4 Fwd (서열번호 11)	Fer1L4 exon1 targeting in qRT-PCR
GACGGGTTATAGAGCTGG	qRT-PCR Fer1L4 Rev (서열번호 12)	
GCACCACCAACTGCTTAGC	qRT-PCR GAPDH Fwd (서열번호 13)	GAPDH targeting in qRT-PCR
AGTCTTCTGGGTGGCAGTGA	qRT-PCR GAPDH Rev (서열번호 14)	
AGACTGAGCCACAGCACTGC	Fer1L4 Fwd 1st (서열번호 15)	Confirm GOI swapping using RMCE
CGCAGCCCTCCATGGTGAAC	GFP Rev 1st (서열번호 16)	
AAGAGATACGCCCTGG	qRT-PCR Luci Fwd (서열번호 17)	Luciferase targeting in qRT-PCR
AATAACGCGCCCAACA	qRT-PCR Luci Rev (서열번호 18)	

[0049] **5. qRT-PCR**

[0050] qRT-PCR은 SYBR 방법을 이용하여 CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad)으로 수행되었다. 프라이머는 Fer1L4 Exon1의 102 bp 단편, 랜딩 패드의 162 bp 단편 및 내부 대조군으로서 제공되는 107 bp 하우스키핑 유전자 GAPDH를 증폭시키고 데이터를 정규화하도록 설계되었다. 모든 프라이머는 Snap Gene (GSL Biotech)을 사용하여 설계되었으며 Macrogen에 의해 합성되었다. 프라이머에 대한 자세한 정보는 상기 [표 2]에 포함되어 있다.

[0051] qPCR은 비템플릿 대조군 및 음성 대조군을 포함하는 20ng의 gDNA 또는 cDNA로 95℃에서 5분 동안 변성시킨 후 94℃에서 30초, 57℃에서 30초, 70℃에서 10초 40사이클을 수행하였다.

[0053] **6. 랜딩 패드 세포주에서 관심 유전자 (GOI) 교환**

[0054] LP 단일 세포주를 구축할 때와 동일한 방법으로 형질 감염을 수행하였다. 2μg의 표적화 벡터 및 2μg의 Cre 플라스미드를 랜딩 패드 세포주로 형질 감염시켰다. 형질 감염 16시간 후, 샘플을 T75 플라스크로 옮기고 37℃에서 3일 동안 배양하였다. 형질 감염된 세포를 500 μg/mL G418 (ant-gn-1; invitrogen)로 2주 동안 선택하였다. 선택하는 동안 배지는 3-4일마다 변경되었다. 선택 후, 단일 세포 클로닝을 488nm 레이저를 갖는 FACSDiva v8.0.1 소프트웨어가 장착된 BD FACSAria™ 세포 분류기에서 수행하였다. GFP 양성 세포에 대한 게이팅은 mCherry를 발현하는 랜딩 패드 세포를 사용하여 결정되었다. 분류된 세포를 96 웰 플레이트에서 150㎕ 배지에 웰당 1개의 세포를 접종하고 15일 동안 배양하였다. 형광 현미경(Axiovert 200, Carl Zeiss)을 통해, 모든 세포에서 발현 GFP 콜로니만 선별하였다.

[0056] **7. 유세포 분석에 의한 스와핑 속도 측정**

[0057] 표적화 벡터의 양을 2μg로 고정한 후, Cre 플라스미드의 양을 변화시켜 형질 감염을 수행하였다. 형질 감염 후 16시간 후, 샘플을 T75 플라스크로 옮기고 37℃에서 3일 동안 배양하였다. 형질 감염된 세포를 500 μg/mL G418 (ant-gn-1; invitrogen)로 2주 동안 선택하였다. 선택하는 동안 3-4일마다 배지를 교체했다. 선택 후, GFP를 발현하는 세포의 백분율을 Gallios flow cytometor (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)로 측정하였다.

[0059] **8. 랜덤 삽입 및 부위-특이적 통합의 비교**

[0060] CHO 세포에서 Lipofectamine™ 2000 (11668030; Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 형질 감염을 수행하였다. 요약하면, 12μL Lipofectamine™ 2000 및 도너 플라스미드는 총 부피 300 μL의 Opti-MEM 배지 무혈청에서 복합되었다. 형질 감염 실험 전날, CHO 세포 배지에서 성장한 $3x10^5$ 세포/mL 숙주 세포를 6 웰 플레이트에 접종하여 실험 당일에 사용하였다. DNA 및 Lipofectamine의 혼합물을 세포를 함유하는 각각의 웰에 적가하고 가습 CO_2 인큐베이터에서 4시간 동안 37℃ 및 5% CO_2에서 배양하였다. 4시간 후 3X 혈청 배지로 교체하였다 (세포 성장에 사용되는 배지 30mL에 FBS 6mL를 추가하였다). 형질 감염된 세포를 500 μg/mL G418 (ant-gn-1; invitrogen)로 2주 동안 선택하였다. 선택하는 동안 배지를 3-4일마다 교체하였다 선택 후, 1개의 세포를 96 웰 플레이트에서 150㎕ 배지에 웰당 접종하고 15일 동안 배양하였다. 대조군으로, 단일 콜로니를 갖는 36개의 웰을 무작위로 선택하여 6개의 웰 플레이트에 접종하였다. LP군으로는, 단일 콜로니를 갖는 81개의 웰을 무작위로 선택하여 6개의 웰 플레이트에 접종하였다. 루시퍼라제는 multimode plate reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA)에 의해 측정되었다. $1X10^5$ 세포를 15ml 튜브에 옮기고 cfg(2000rpm, 2분)를 수행하였다. 상청액을 제거한 후, PBS를 첨가하고 cfg(2000 rpm, 2분)를 수행하였다. 상청액을 제거한 후, PBS 50μl 및 1x Lysis 완충액 50 μl를 첨가하고 볼텍싱하여 펠렛을 풀어준다. 각 샘플에 40μl의 LARII를 첨가하고 각각의 준비된 샘플을 백색 96 웰 플레이트에 넣었다(PBS:용해된 세포:LARII = 1:1:1).

[0062] **9. 통계 분석**

[0063] 표준 통계 소프트웨어 패키지(SigmaPlot 12.5; Systat Software, San Jose, CA, USA)를 사용하여 통계 분석을 수행하였다. student's t-test 또는 two-way ANOVA test를 사용하여 차이가 유의한지 여부를 확인했다.

[0065] **실시예**

[0066] **1. CRISPR/Cas9에 의해 매개되는 RMCE 랜딩 패드의 통합**

[0067] 핫스팟은 안정하고 효율적인 전이 유전자(transgene) 발현을 허용하는 게놈 유전자좌이다. Fer1L4는 핫스팟으로 사용되어 목표 통합 사이트로 선택했다. RMCE(Recombinase-mediated cassette exchange)은 역유전학에서 관심 유전자(GOI)를 보유하는 표적화 벡터에 대한 기존 랜딩 패드(LP, landing pad)의 교환을 허용하는 절차이다. RMCE의 경우, LP를 Fer1L4 게놈 영역으로 통합하는 것이 먼저 수행되어야 한다. LP는 mCherry 양 측면에 Lox5171/LoxP 부위가 위치하고, mCherry 다음 CMV 프로모터-구동 티미딘 키나제(TK, thymidine kinase) 유전자가 위치하도록 설계되었다(도 1A). RMCE LP를 GOI와 교환하기 위해, 본 발명자들은 GFP 양 측면에 Lox5171/LoxP 부위가 위치하고, GFP 다음 SV40 프로모터-구동 네오마이신 내성 유전자가 위치된 표적화 벡터를 설계 하였다(도 1B). 여기서 RMCE LP는 서열번호 19의 염기 서열을 포함한다.

[0068] LP의 측면에는 5'(시작 위치 이전에 존재하는 Fer1L4에서 엑손 1의 0.2kb 영역) 및 3'(시작 위치 이후에 존재하는 Fer1L4에서 엑손 1의 0.2kb 영역) 말단이 위치한다(도 2a). CHO 세포의 Fer1L4 게놈 영역에 LP를 통합하기 위해, 본 발명자는 CRISPR/Cas9 매개된 상동성 재조합(homologous recombination)을 수행하였다(도 2A). 단일 세포 클로닝 동안, LP를 포함하지 않은 클론을 제거하기 위해 세포를 mCherry 발현에 대해 스크리닝 하였다. 이어서 mCherry가 발현된 11개의 단일 클론을 수득 하였다(도 2B). LP는 프로모터가 없기 때문에, LP가 Fer1L4 영역에 올바르게 통합되지 않으면 mCherry를 발현할 수 없다(도 2B).

[0069] 본 발명자들은 LP로 표적화된 Fer1L4 유전자의 카피 수를 검출하기 위해 qRT-PCR을 사용하여 mCherry 양성 클론을 추가로 특성화하였다. 정방향(Fwd) 프라이머는 5' 상동성 암의 이전 서열에 결합하도록 설계되었고 역방향(Rev) 프라이머는 3' 상동성 암의 이후 서열에 결합하도록 설계되었다. 따라서, Fer1L4 유전자좌가 LP에 의해 표적화되지 않을 때 200 bp를 갖는 PCR 생성물이 증폭될 것이다(도 2C). 그러나 Fer1L4 유전자좌가 LP에 의해 표적화될 때 3,300 bp를 갖는 PCR 생성물이 증폭될 것이다(도 2D). 200bp 앰플리콘만 증폭하기 위해 연장 시간을 5초로 설정했다. 그런 다음 게놈 DNA를 템플릿으로 사용하여 정량적 PCR을 수행했다. 음성 대조군으로서, 형질 감염없이 게놈 DNA를 사용하였다. 12개의 클론 중 8개는 음성 대조군과 비교하여 절반의 값을 나타냈으며, 이는 Fer1L4 게놈 영역의 단 하나의 카피 만이 LP에 의해 표적화되었음을 나타낸다(도 2E; 화살표).

[0070] 이어서 재조합 영역의 뉴클레오티드 서열을 확인하였다. LP 표적화된 영역을 증폭시키기 위해 3세트의 프라이머로 게놈 DNA에 대해 중첩된 PCR을 수행하였다(도 3A). Fwd 프라이머는 5' 상동성 암의 이전 서열에 결합하도록 설계되었고 Rev 프라이머는 mCherry의 서열에 결합하도록 설계되었다. 첫 번째 PCR 반응에서 생성된 앰플리콘은 두 번째 PCR에 대한 템플릿으로 사용되었고 두 번째 PCR 반응에서 생성된 앰플 리콘은 세 번째 PCR 반응에 대한 템플릿으로 사용되었다(도 3B). 3번의 연속적인 PCR 증폭 후, 예상된 크기에 상응하는 밴드가 #16 클론에 나타났다(도 3B; 적색 화살표). 그러나 Fer1L4 영역에서 LP 통합을 갖는 것으로 밝혀진 다른 클론(#4, #7, #9, #11)은 PCR 밴드를 나타내지 않았다. 이 결과는 정제된 게놈 DNA가 PCR 앰플리콘을 생성하기에 충분하지 않을 가능성을 나타낸다. 그러나 이 가능성을 입증하려면 추가 검증이 필요하다. 그런 다음 #16 클론에서 정제된 PCR 산물에 대한 후속 시퀀싱을 수행하고 Fer1L4 영역에서 부위-특이적 LP 통합을 확인했다(도 3C). 따라서 #16 클론은 모든 후속 실험에 사용되었다.

[0072] **2. RMCE LP 세포주를 사용하여 안정적인 세포주 생성**

[0073] Cre 재조합 효소는 2쌍의 이종(heterologous) lox 부위 사이에 이중 재조합을 허용하여, LP를 이종 Lox 부위와 교환하여 동일한 이종 lox 부위를 갖는 벡터를 표적화할 수 있게 한다. 본 발명자의 확립된 LP 세포주는 Lox5171/LoxP 부위와 mCherry를 유지함에 따라, Lox5171/LoxP 부위와 함께 GFP를 운반하기 위해 표적화 벡터를 사용하였다(도 4A). RMCE의 경우, 2㎍의 Cre 플라스미드로 2㎍의 표적화 벡터를 형질 감염시켰다. 표적화 벡터에는 프로모터가 없기 때문에, Fer1L4 게놈 영역에서 표적 벡터가 LP로 올바르게 대체되지 않으면 GFP가 발현되지 않을 것이다(도 4A). 따라서, 단일 세포 클로닝 동안 GFP를 발현하지만 mCherry를 발현하지 않는 세포를 스크리닝 하였다(도 4B).

[0074] 이어서 교환된 영역의 뉴클레오티드 서열을 확인하였다. 표적 벡터 교환 영역(targeting vector swapped region)을 충분히 증폭시키기 위해 접합 PCR을 수행하였다(도 4C). 예상된 크기에 해당하는 밴드는 GFP 양성 클론에 나타났지만, PCR 밴드는 음성 대조군에 나타나지 않았다(도 4C; 빨간색 화살표). 그런 다음 GFP 양성 클론에서 정제된 PCR 산물에 대한 후속 시퀀싱을 수행하고 Fer1L4 영역의 부위-특이적 스와핑을 확인했다(도 4D).

[0075] Cre/Lox 기반 RMCE 시스템의 성공으로 인해 RMCE 매개 스와핑 속도를 조사할 수 있었다. 스와핑 속도는 mCherry를 제외하고 GFP를 발현하는 세포의 백분율을 측정함으로써 평가되었다. 음성 대조군으로서, RMCE 이전의 LP 세포주가 사용되었다. mCherry를 제외하고 GFP를 발현하는 세포의 백분율은 0.5%였으며, 이는 LP 세포주의 작은 부분이 자가 형광을 가지고 GFP 필터에서 검출될 수 있음을 나타낸다 (도 4E). RMCE 이후 스와핑 속도는 2.95%로 크게 증가하여 Cre/Lox 기반 RMCE 시스템이 LP 세포의 mCherry를 GFP로 성공적으로 대체했음을 나타낸다.

[0077] **3. RMCE의 최적 조건**

[0078] 표적화 벡터와 Cre 플라스미드 사이의 비율은 RMCE에서 결정적인 인자(factor)인 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명자들은 표적화 벡터의 농도를 2㎍로 고정시키고 다양한 농도의 Cre 플라스미드로 공동-처리하였다. 2㎍의 Cre 플라스미드로 형질 감염된 초기 그룹과 비교하여 0.5㎍의 Cre 플라스미드로 형질 감염된 그룹에서 교환 속도가 유의하게 증가하였다(도 5A). 이러한 결과는 표적화 벡터와 Cre 플라스미드 사이의 4:1 비가 RMCE에 대한 최적 조건임을 나타낸다.

[0079] 표적화 벡터는 GOI 및 GFP의 동시 발현을 허용하기 위해 GOI-IRES-GFP로 구성될 수 있다. GFP를 발현하는 세포가 선택되면, GOI 단백질은 이들 세포로부터 쉽게 이용 가능할 것이다. 따라서, RMCE 후 GFP 양성 세포의 농축 백분율은 RMCE가 상업적인 세포주 개발에 사용될 수 있는지를 평가하기 위한 좋은 기준이 될 것이다. GFP 발현 세포를 단리하기 위해 FACS 분류를 수행한 경우, 단리된 세포의 80%가 GFP를 발현하였다(도 5B). 이 값은 RMCE가 세포주 개발에 좋은 도구가 될 수 있음을 의미한다.

[0081] **4. 무작위 통합 및 부위-특이적 통합 비교**

[0082] RMCE의 성공에는 여러 번의 계대(passages) 후에도 높은 수준으로 전이 유전자를 발현할 수 있는 게놈 유전자좌가 필요하다. Fer1L4는 핫스팟으로 알려져 있지만 Fer1L4의 정확한 발현 수준은 조사되지 않았다. 컨트롤로서, 본 발명자는 무작위 통합(random integration)에 기반한 CMV 프로모터-구동 벡터를 사용했다(도 6B). 이 벡터는 루시퍼라제 컨트롤 벡터(Luci Ct Vec)로 명명되었다. 이 벡터는 CHO 게놈에 무작위로 통합되었다. 단일 세포 클로닝 동안, Luci Ct Vec를 포함하지 않은 클론을 제거하기 위해 세포를 발광에 대해 스크리닝 하였다. 이어서 루시퍼라제가 발현된 35개의 단일 클론을 수득하였다. 발광 값은 그래프에 점으로 표시되었다(도 8A).

[0083] 루시페라제 및 SV40 구동 네오마이신 내성 유전자를 제외하고 LP와 동일한 벡터를 사용하여 Fer1L4의 발현 수준을 평가하였다(도 6A). 이 벡터는 랜딩 패드-루시페라제(LP-Luci)로 명명되었다. 이 벡터를 CHO 세포의 Fer1L4 게놈 영역에 통합시키기 위해, CRISPR/Cas9 매개된 상동성 재조합이 수행되었다(도 6C). 단일 세포 클로닝 동안, LP-Luci를 포함하지 않는 클론을 제거하기 위해 세포를 발광에 대해 스크리닝하였다. 이어서 루시퍼라제가 발현된 81개의 단일 클론을 수득하였다. 루시페라제 양성 클론을 특성화하기 위해, 발광 값에 따라 4개의 그룹을 설정함으로써 81개의 클론을 나누었다. 7000보다 큰 값을 가진 클론은 '그룹 A'로 설정되었고, 4000에서 4500까지의 값을 가진 클론은 '그룹 B'로, 2000에서 2500까지의 값을 가진 클론은 '그룹 C'로, 및 1000 내지 1500은 '그룹 D'로 설정되었다. 각각의 그룹에 대해 3개의 클론을 선택하고, LP-Luci를 표적으로 하는 Fer1L4 유전자의 카피 수를 검출하기 위해 qRT-PCR을 수행하였다. 정방향(Fwd) 프라이머는 5' 상동성 암 이전의 서열에 결합하도록 설계되었고 역방향(Rev) 프라이머는 3' 상동성 암 이후의 서열에 결합하도록 설계되었다. 따라서, Fer1L4 유전자좌가 LP에 의해 표적화되지 않을 때 200 bp를 갖는 PCR 생성물이 증폭될 것이다(도 7A). 그러나 Fer1L4 유전자좌가 LP에 의해 표적화될 때 3,300 bp를 갖는 PCR 생성물이 증폭될 것이다(도 7B). 200bp 앰플리콘만 증폭하기 위해 연장 시간을 5초로 설정했다. 그런 다음 게놈 DNA를 템플릿으로 사용하여 정량적 PCR을 수행했다. 음성 대조군으로서, 형질 감염없이 게놈 DNA를 사용하였다. '그룹 A' 및 '그룹 B' 클론은 음성 대조군에 비해 절반의 값을 나타내었으며, 이는 Fer1L4 게놈 영역의 한 카피가 LP-Luci의 표적이 되었음을 나타낸다(도 7C).

[0084] 이어서 재조합 영역의 뉴클레오티드 서열을 확인하였다. LP-Luci 표적화된 영역을 충분히 증폭시키기 위해 3개

의 프라이머 세트로 게놈 DNA에 대해 중첩된 PCR을 수행 하였다(도 7D). Fwd 프라이머는 5' 상동성 암 이전의 서열에 결합하도록 설계되었고 Rev 프라이머는 루시퍼라제 서열에 결합하도록 설계되었다. 첫 번째 PCR 반응에서 생성된 앰플리콘은 두 번째 PCR에 대한 템플릿으로 사용되었고 두 번째 PCR 반응에서 생성된 앰플리콘은 세 번째 PCR 반응에 대한 템플릿으로 사용되었다(도 7E). 3번의 연속적인 PCR 증폭 후, 예상되는 크기에 해당하는 밴드가 모든 '그룹 A' 및 '그룹 B' 클론에 나타났다(도 7E; 빨간색 화살표). 그 다음 '그룹 A' 및 '그룹 B' 클론에서 정제된 PCR 산물에 대한 후속 시퀀싱을 수행하고 Fer1L4 영역에서 사이트별 LP 통합을 확인했다(도 7F). 이러한 결과는 2500 미만의 발광 값을 갖는 클론이 Fer1L4 이외의 부위에서 무작위로 통합되어 발현될 가능성을 나타낸다. 따라서 2500 이상의 발광 값을 가진 클론은 그래프에 점으로 표시된다(도 8A). 표적화된 통합을 사용하여 구축된 클론은 무작위 통합을 사용하여 구축된 클론보다 발광 값의 변동이 적었다.

[0085] 동일한 발현 수준에서 전이 유전자의 적은 카피 수는 전이 유전자를 발현하는 프로모터가 보다 강력함을 의미한다. 무작위 통합에 의해 생성된 클론 중에서, 확인된 LP 클론과 유사한 발현 값을 갖는 클론을 선택하고 루시퍼라제의 카피 수를 측정하였다. 실험에 사용된 두 클론은 약 8000의 발현 값을 갖는다. 무작위 통합에 의해 생성된 클론(Luci Ct Vec #14)은 동일한 발현 값을 갖는 LP 클론(LP-Luci A1)보다 루시페라제 카피가 1.3배 더 많았다(도 8B). 이는 Fer1L4의 프로모터가 다른 프로모터와 비교하여 높은 수준의 발현을 가짐을 나타낸다. LP-Luci는 Fer1L4 이외의 유전자좌에 통합되어 qRT-PCR을 통한 카피 수 분석에서도 침묵이 검출될 수 있기 때문에 Fer1L4를 발현하는 능력이 우수할 것으로 보인다.

[0087] **결과 검토**

[0088] CRISPR/Cas9 매개 상동성 재조합에 의해 CHO 세포 Fer1L4 유전자에 통합되고 Fer1L4 프로모터에 의해 mCherry를 발현시켰다. 또한, mCherry는 Cre/Lox 시스템을 사용하여 랜딩 패드를 포함하는 CHO 세포에서 GFP로 성공적으로 교체되었다.

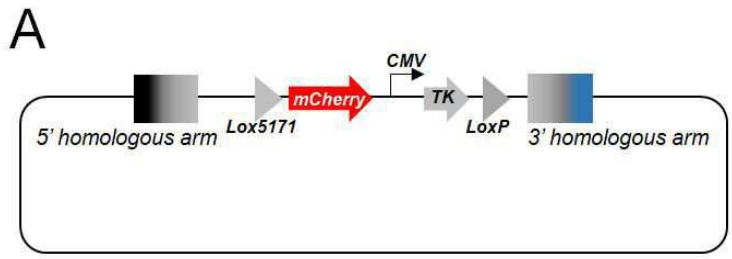
[0089] 또한, Cre/Lox 시스템이 CHO 세포에서 작동하기 위한 최적의 조건을 발견하였다. 화학적 선택 마커를 사용한 후에도 Cre/Lox 시스템을 사용한 스와핑 효율은 낮은 것으로 간주될 수 있지만 형광 마커와 FACS 분류로 극복되었다. Cre/Lox RMCE를 사용한 GOI 교환 및 FACS 분류를 사용한 고효율 선택을 통해 원하는 단백질을 생산하는 세포주를 신속하게 생산할 수 있다.

[0090] 또한, Fer1L4 유전자를 사용한 부위-특이적 및 무작위 통합의 비교는 핫스팟으로서 Fer1L4 유전자의 가치를 보여주었다. 단백질 발현 세포주의 구축을 위한 통상적인 방법은 무작위 통합을 사용한다. 그러나 표적 서열은 이 방법을 사용하여 염색질 또는 이질 염색질 영역의 불안정한 영역에 통합될 수 있으며, 충분한 단백질을 발현하는 세포주를 얻기 위해서는 염색질에 다중 GOI 카피를 삽입해야 한다. 이러한 결점은 안정적인 발현 핫스팟에 부위-특이적 통합으로 극복할 수 있다. 따라서, 새로운 효과적인 핫스팟의 발견 및 검증은 새로운 세포주 구축 방법에 중요하다. Fer1L4의 프로모터를 통해 발현된 루시퍼라제는 무작위 통합을 통해 형질 감염된 루시퍼라제보다 변이 발광성이 더 낮았다. 또한, Fer1L4의 프로모터에 의해 발현된 클론은 랜덤 통합에 의해 생성된 클론과 동등한 발현 값을 가질 때 더 적은 카피 수를 갖는다. 이러한 결과는 Fer1L4 프로모터가 핫스팟으로서 기능하기에 충분히 강력하고 이 영역이 안정한 단백질 발현 세포주를 구축하기 위한 부위-특이적 통합의 표적으로서 적합하다는 것을 나타낸다.

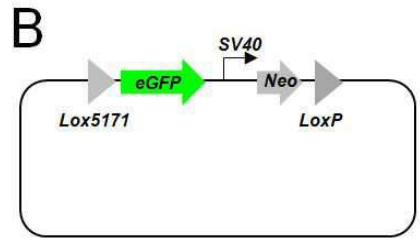
[0091] 종합하면, 본 발명자의 결과는 Cre/Lox 시스템이 CHO 세포에서 RMCE 랜딩 패드의 GOI 교환에 사용될 수 있음을 보여준다. 본 발명자는 또한 Fer1L4 유전자가 핫스팟(hot-spot)으로 부위-특이적 통합을 통해 안정적인 단백질 발현 세포주를 구축하는데 적합하다는 것을 보여 주었다. RMCE-매개 부위-특이적 통합을 사용하는 본 발명자의 벡터 플랫폼은 안정적이고 높은 발현 수준을 보여줄 뿐만 아니라, 원하는 단백질을 생성하기 위해 GOI의 간단한 대체를 허용한다. 본 발명자는 이 벡터 시스템이 바이오 의약품 생산에 유리한 도구로 사용될 수 있다고 생각한다.

도면

도면1

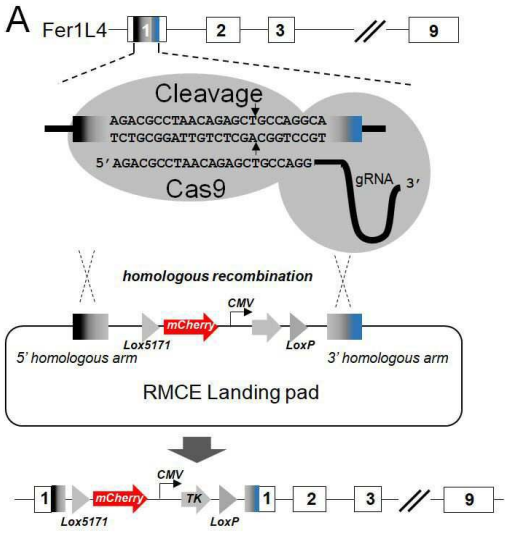


RMCE 랜딩 패드(Landing pad)

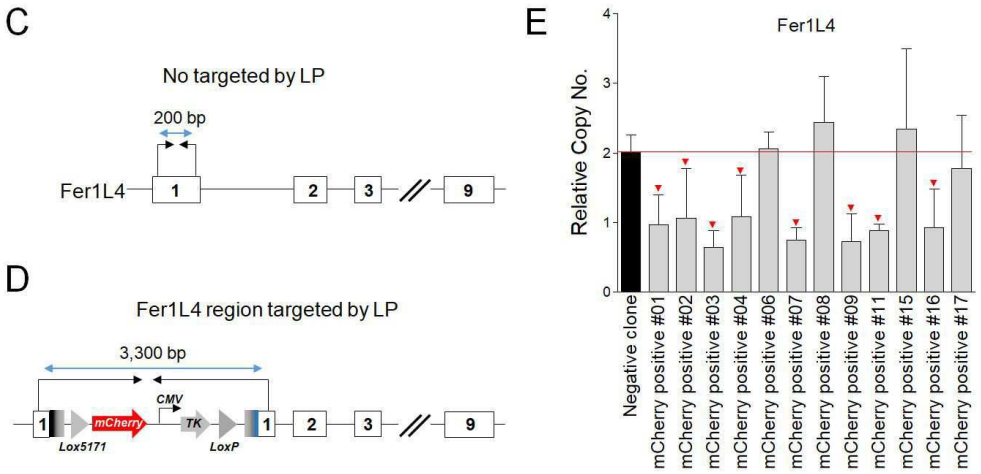


RMCE 표적화 벡터(targeting vector)

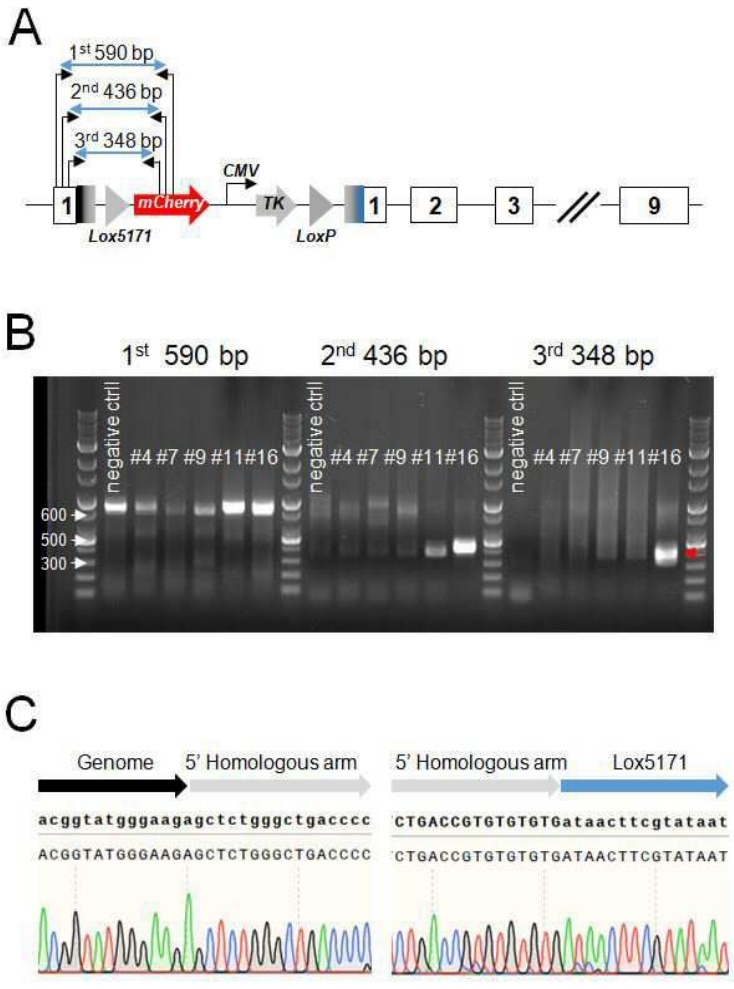
도면2ab



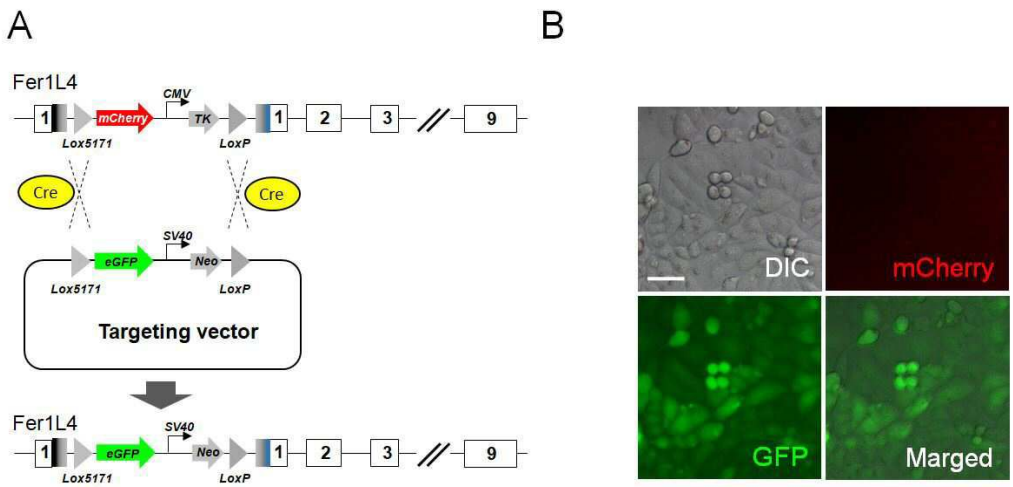
도면2cde


C
No targeted by LP
200 bp
Fer1L4
1
2
3
9
D
Fer1L4 region targeted by LP
3,300 bp
CMV
mCherry
TK
Lox5171
LoxP
E
Fer1L4
Relative Copy No.
Negative clone
mCherry positive #01
mCherry positive #02
mCherry positive #03
mCherry positive #04
mCherry positive #06
mCherry positive #07
mCherry positive #08
mCherry positive #09
mCherry positive #11
mCherry positive #15
mCherry positive #16
mCherry positive #17

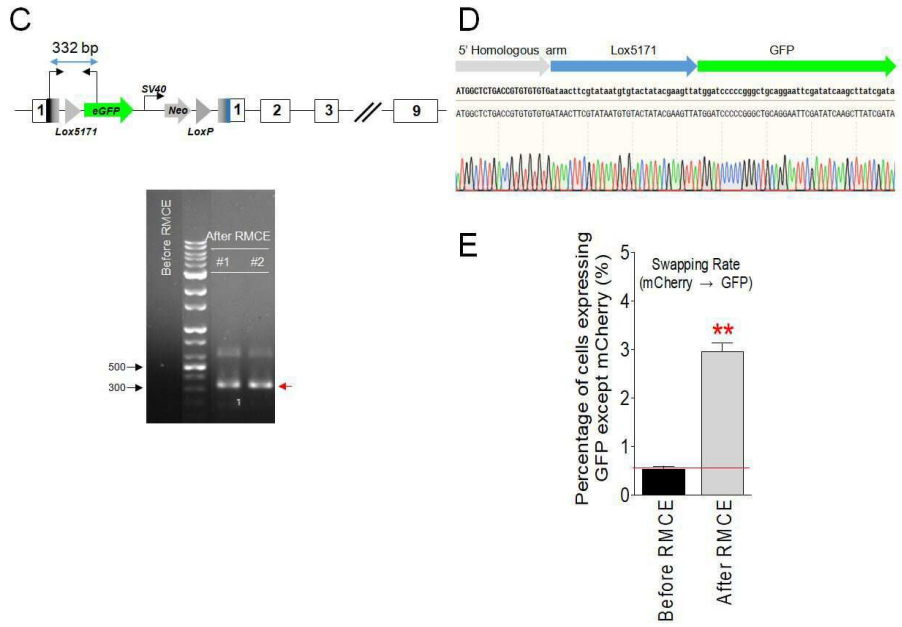
도면3


A
1st 590 bp
2nd 436 bp
3rd 348 bp
CMV
mCherry
TK
Lox5171
LoxP
B
1st 590 bp
2nd 436 bp
3rd 348 bp
negative ctrl
#4 #7 #9 #11#16
600
500
300
C
Genome
5' Homologous arm
5' Homologous arm
Lox5171
acggtatgggaagagctctgggctgacccc
CTGACCGTGTGTGTGataacttcgtataat
ACGGTATGGGAAGAGCTCTGGGCTGACCCC
CTGACCGTGTGTGTGATAACTTCGTATAAT

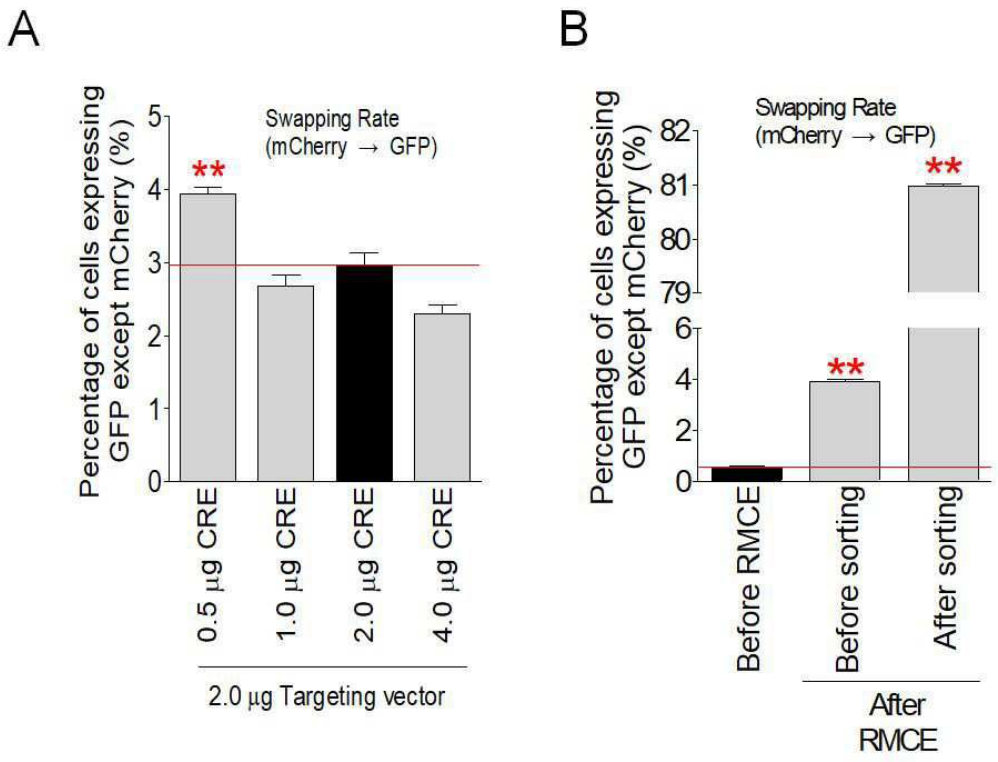
도면4ab



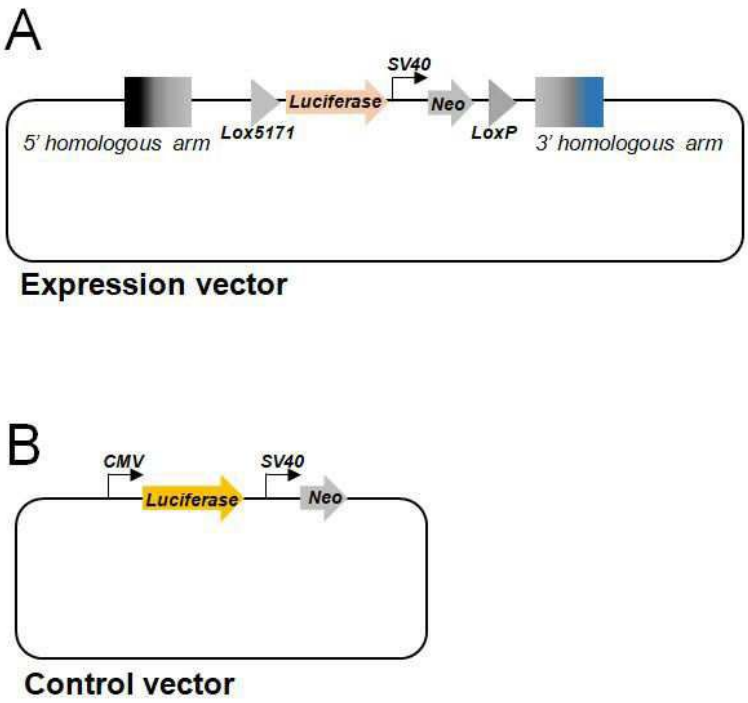
도면4cde



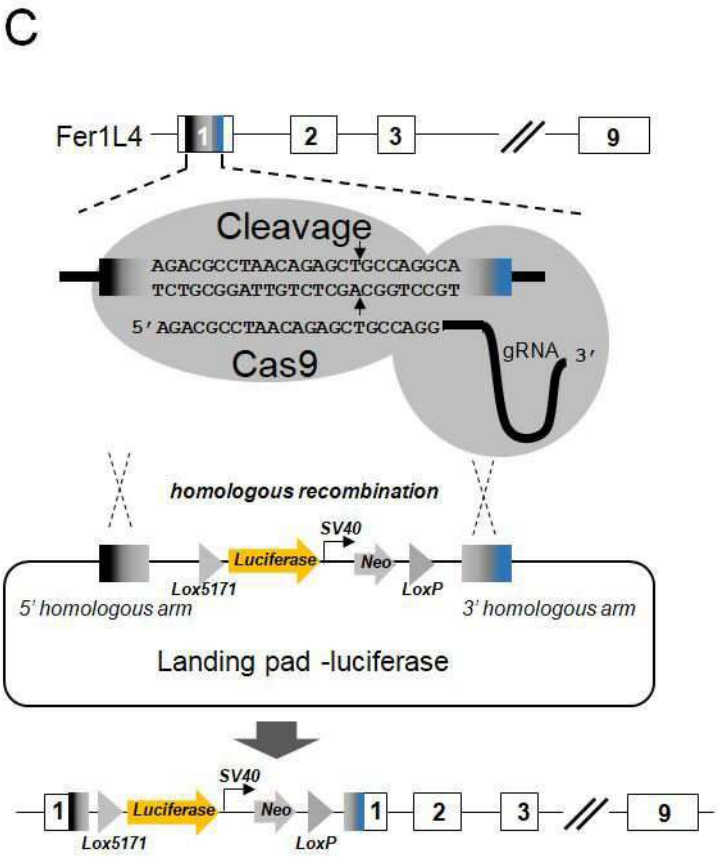
도면5


A
Swapping Rate
(mCherry → GFP)
Percentage of cells expressing GFP except mCherry (%)
**
0.5 μg CRE
1.0 μg CRE
2.0 μg CRE
4.0 μg CRE
2.0 μg Targeting vector
B
Swapping Rate
(mCherry → GFP)
Percentage of cells expressing GFP except mCherry (%)
**
**
Before RMCE
Before sorting
After sorting
After RMCE

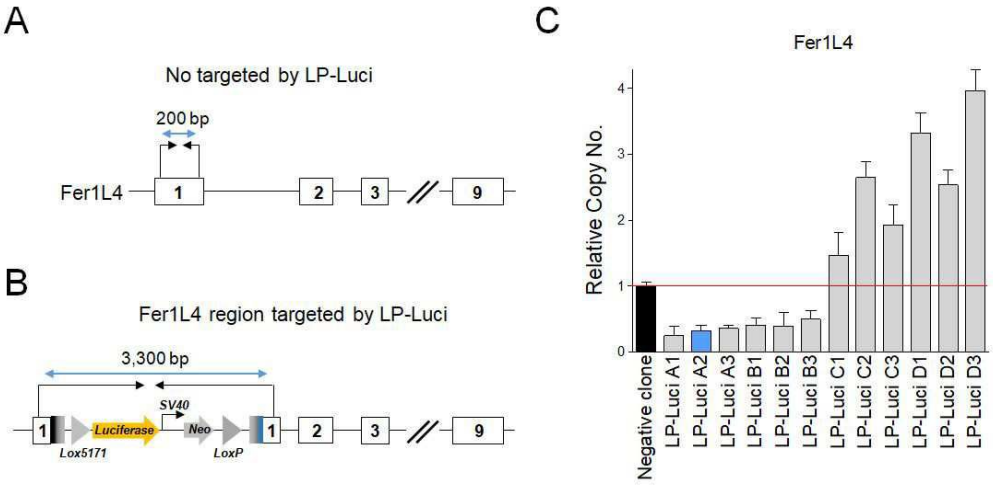
도면6ab


A
SV40
Luciferase
Neo
5' homologous arm
Lox5171
LoxP
3' homologous arm
Expression vector
B
CMV
SV40
Luciferase
Neo
Control vector

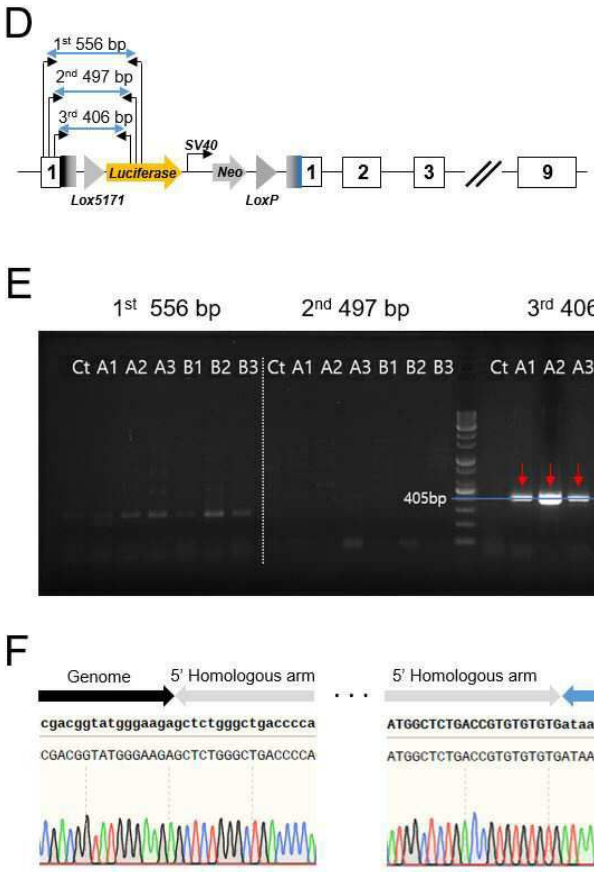
도면6c


C
Fer1L4
1
2
3
9
Cleavage
AGACGCCTAACAGAGCTGCCAGGCA
TCTGCGGATTGTCTCGACGGTCCGT
5′ AGACGCCTAACAGAGCTGCCAGG
gRNA 3′
Cas9
homologous recombination
SV40
Luciferase
Neo
Lox5171
LoxP
5′ homologous arm
3′ homologous arm
Landing pad -luciferase

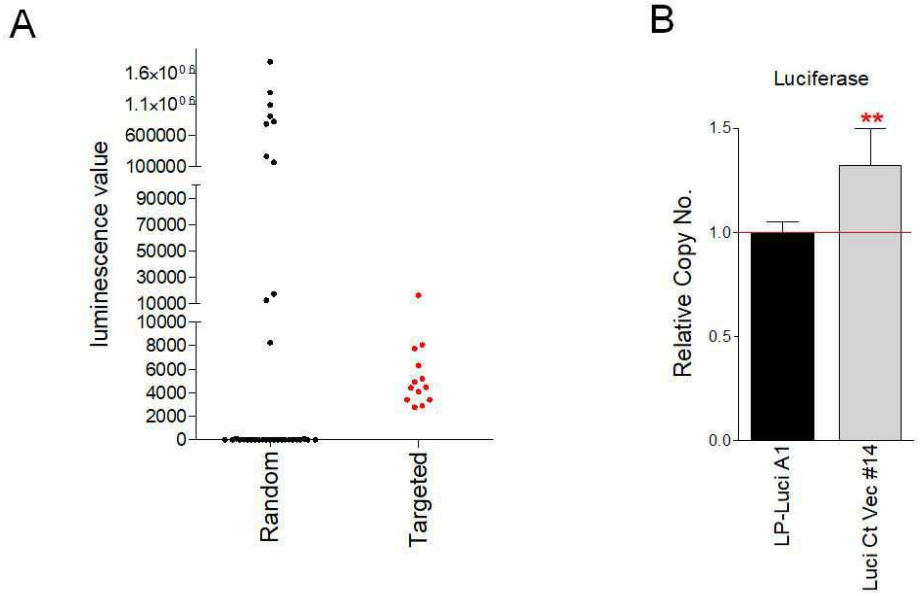
도면7abc


A
No targeted by LP-Luci
200 bp
Fer1L4
1
2
3
9
B
Fer1L4 region targeted by LP-Luci
3,300 bp
SV40
Luciferase
Neo
Lox5171
LoxP
C
Fer1L4
Relative Copy No.
0
1
2
3
4
Negative clone
LP-Luci A1
LP-Luci A2
LP-Luci A3
LP-Luci B1
LP-Luci B2
LP-Luci B3
LP-Luci C1
LP-Luci C2
LP-Luci C3
LP-Luci D1
LP-Luci D2
LP-Luci D3

도면7def



도면8ab



서 열 목 록

<110> INCHEON NATIONAL UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION

<120> CHO CELL COMPRISING SITE-SPECIFIC INTEGRATED RMCE LANDING PAD IN

FER1L4 GENE

<130> P20-0000

<160> 19

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 201

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' homologous arm

<400> 1

gctctgggct gaccccacct ctcaggcctc aggccttccc acccatgacc tccaggcctg 60

ctccctgtgt gtttgactag agggaaggga ttgctgaacc tgctgggtga gtccagtgag 120

tcatggacaa cactggtggg cagaagggca agcaggcaga ctgagccaca gcactgcgcc 180

atggctctga ccgtgtgtgt g 201

<210> 2

<211> 201

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 3' homologous arm

<400> 2

catccatgac cgacaagtga agctctgctt ccgtggtgag atttgcatgg atggggactt 60

ttagagctgg gggtttctgg attcttcatt ccctccaact taaatccttg ccagctctat 120

aacccgtctc ccttctccct ggcttctact tgtttcctta tctcccacct ttaagtttga 180

gtggggaagt cggcagtggg t 201

<210> 3

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> LoxP

<400> 3

ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat 34

<210> 4

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lox5171

<400> 4

ataacttcgt ataatgtgta ctatacgaag ttat 34

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' Nested PCR Fwd 1st

<400> 5

tcacgggcta gcaaggac 18

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' Nested PCR Fwd 2nd

<400> 6

tacccgatcc cagctc 16

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' Nested PCR Fwd 3rd

<400> 7

cgacggtatg ggaaga 16

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' Nested PCR Rev 1st

<400> 8

gagccgtaca tgaactga 18

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' Nested PCR Rev 2nd

<400> 9

ccctcgatct cgaact 16

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> 5' Nested PCR Rev 3rd

<400> 10

cgtggccgtt cacggagc 18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> qRT-PCR Fer1L4 Fwd

<400> 11

gcactgcgcc atggctct 18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> qRT-PCR Fer1L4 Rev

<400> 12

gacgggttat agagctgg 18

<210> 13

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> qRT-PCR GAPDH Fwd

<400> 13

gcaccaccaa ctgcttagc 19

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> qRT-PCR GAPDH Rev

<400> 14

agtcttctgg gtggcagtga 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Fer1L4 Fwd 1st

<400> 15

agactgagcc acagcactgc 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GFP Rev 1st

<400> 16

cgcagccctc catggtgaac 20

<210> 17

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> qRT-PCR Luci Fwd

<400> 17

aagagatacg ccctgg 16

<210> 18

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> qRT-PCR Luci Rev

<400> 18

aataacgcgc ccaaca 16

<210> 19

<211> 6463

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RMCE landing pad

<400> 19

cccccatgtt gtgcaaaaaa gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta 60

agttggccgc agtgttatca ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca 120

tgccatccgt aagatgcttt tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat 180

agtgtatgcg gcgaccgagt tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac 240

atagcagaac tttaaaagtg ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa 300

ggatcttacc gctgttgaga tccagttcga tgtaacccac tcgtgcaccc aactgatctt 360

cagcatcttt tactttcacc agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg 420

caaaaaaggg aataagggcg acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat 480

attattgaag catttatcag ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt 540

agaaaaataa acaaataggg gttccgcgca catttccccg aaaagtgcca cctaaattgt 600

aagcgttaat attttgttaa aattcgcgtt aaatttttgt taaatcagct catttttaa 660

ccaataggcc gaaatcggca aaatccctta taaatcaaaa gaatagaccg agatagggtt 720

gagtgttgtt ccagtttgga acaagagtcc actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa 780

agggcgaaaa accgtctatc agggcgatgg cccactacgt gaaccatcac cctaatcaag 840

ttttttgggg tcgaggtgcc gtaaagcact aaatcggaac cctaaaggga gcccccgatt 900

tagagcttga cggggaaagc cggcgaacgt ggcgagaaag gaagggaaga aagcgaaagg 960

agcgggcgct agggcgctgg caagtgtagc ggtcacgctg cgcgtaacca ccacacccgc 1020

cgcgcttaat gcgccgctac agggcgcgtc ccattcgcca ttcaggctgc gcaactgttg 1080

ggaagggcga tcggtgcggg cctcttcgct attacgccag ctggcgaaag ggggatgtgc 1140

tgcaaggcga ttaagttggg taacgccagg gttttcccag tcacgacgtt gtaaaacgac 1200

ggccagtgag cgcgcgtaat acgactcact atagggcgaa ttggagctac cggtgcccgg 1260

ggctctgggc tgaccccacc tctcaggcct caggccttcc cacccatgac ctccaggcct 1320

gctccctgtg tgtttgacta gagggaaggg attgctgaac ctgctgggtg agtccagtga 1380

gtcatggaca acactggtgg gcagaagggc aagcaggcag actgagccac agcactgcgc 1440

catggctctg accgtgtgtg tgataacttc gtataatgtg tactatacga agttatctcg 1500

agatggtgag caagggcgag gaggataaca tggccatcat caaggagttc atgcgcttca 1560

aggtgcacat ggagggctcc gtgaacggcc acgagttcga gatcgagggc gagggcgagg 1620

gccgccccta cgagggcacc cagaccgcca agctgaaggt gaccaagggt ggccccctgc 1680

ccttcgcctg ggacatcctg tcccctcagt tcatgtacgg ctccaaggcc tacgtgaagc 1740

accccgccga catccccgac tacttgaagc tgtccttccc cgagggcttc aagtgggagc 1800

gcgtgatgaa cttcgaggac ggcggcgtgg tgaccgtgac ccaggactcc tccctacagg 1860

acggcgagtt catctacaag gtgaagctgc gcggcaccaa cttcccctcc gacggccccg 1920

taatgcagaa gaagacaatg ggctgggagg cctcctccga gcggatgtac cccgaggacg 1980

gcgccctgaa gggcgagatc aagcagaggc tgaagctgaa ggacggcggc cactacgacg 2040

ctgaggtcaa gaccacctac aaggccaaga agcccgtgca gctgcccggc gcctacaacg 2100

tcaacatcaa gttggacatc acctcccaca acgaggacta caccatcgtg gaacagtacg 2160

aacgcgccga gggccgccac tccaccggcg gcatggacga gctgtacaag taatcataat 2220

cagccatacc acatttgtag aggttttact tgctttaaaa aacctcccac acctcccct 2280

gaacctgaaa cataaaatga atgcaattgt tgttgttaac ttgtttattg cagcttataa 2340

tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa tttcacaaat aaagcatttt tttcactgca 2400

ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa tgtatcttat ctagagacat tgattattga 2460

ctagttatta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat atggagttcc 2520

gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc gcccaacgac ccccgcccat 2580

tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat agggactttc cattgacgtc 2640

aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc 2700

caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt 2760

acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc atcgctatta 2820

ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg atagcggttt gactcacggg 2880

gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt gttttggcac caaaatcaac 2940

gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg ccccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg 3000

tacggtggga ggtctatata agcagagctc tctggctaac tagagaaccc actgcttact 3060

ggcttatcga aattaatacg actcactata gggagaccca agcttggtac cgagctcgga 3120

tccactagta acggccgcca gtgtgctgga attctgcaga taacgccacc atggcttcgt 3180

acccctgcca tcaacacgcg tctgcgttcg accaggctgc gcgttctcgc ggccatagca 3240

accgacgtac ggcgttgcgc cctcgccggc agcaagaagc cacggaagtc cgcctggagc 3300

agaaaatgcc cacgctactg cgggtttata tagacggtcc tcacgggatg gggaaaacca 3360

ccaccacgca actgctggtg gccctgggtt cgcgcgacga tatcgtctac gtacccgagc 3420

cgatgactta ctggcaggtg ctgggggctt ccgagacaat cgcgaacatc tacaccacac 3480

aacaccgcct cgaccagggt gagatatcgg ccggggacgc ggcggtggta atgacaagcg 3540

cccagataac aatgggcatg ccttatgccg tgaccgacgc cgttctggct cctcatatcg 3600

ggggggaggc tgggagctca catgccccgc ccccggccct caccctcatc ttcgaccgcc 3660

atcccatcgc cgccctcctg tgctacccgg ccgcgcgata ccttatgggc agcatgaccc 3720

cccaggccgt gctggcgttc gtggccctca tcccgccgac cttgtccggc acaaacatcg 3780

tgttgggggc ccttccggag gacagacaca tcgaccgcct ggccaaacgc cagcgccccg 3840

gcgagcggct tgacctggct atgctggccg cgattcgccg cgtttacggg ctgcttgcca 3900

atacggtgcg gtatctgcag ggcggcgggt cgtggcggga ggattgggga cagctttcgg 3960

ggacggccgt gccgccccag ggtgccgagc cccagagcaa cgcgggccca cgaccccata 4020

tcggggacac gttatttacc ctgtttcggg cccccgagtt gctggccccc aacggcgacc 4080

tgtacaacgt gtttgcctgg gccttggacg tcttggccaa acgcctccgt cccatgcacg 4140

tctttatcct ggattacgac caatcgcccg ccggctgccg ggacgccctg ctgcaactta 4200

cctccgggat ggtccagacc cacgtcacca ccccccggctc cataccgacg atctgcgacc 4260

tggcgcgcac gtttgcccgg gagatggggg aggctaaact agagggccct attctatagt 4320

gtcacctaaa tgctagagct cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat 4380

ctgttgtttg cccctccccc gtgccttcct tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc 4440

tttcctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg 4500

ggggtggggt ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agacaatagc aggcatgctg 4560

gggatgcggt gggctctatg ggtcgacata acttcgtata gcatacatta tacgaagtta 4620

tcatccatga ccgacaagtg aagctctgct tccgtggtga gatttgcatg gatggggact 4680

tttagagctg ggggtttctg gattcttcat tccctccaac ttaaatcctt gccagctcta 4740

taacccgtct cccttctccc tggcttctac ttgtttcctt atctcccacc tttaagtttg 4800

agtggggaag tcggcagtgg gtggtaccgg ccttaagggc cggtccgtgt acccagcttt 4860

tgttcccttt agtgagggtt aattgcgcgc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct 4920

gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccgggag cataaagtgt 4980

aaagcctggg gtgcctaatg agtgagctaa ctcacattaa ttgcgttgcg ctcactgccc 5040
gctttccagt cgggaaacct gtcgtgccag ctgcattaat gaatcggcca acgcgcgggg 5100
agaggcggtt tgcgtattgg gcgctcttcc gcttcctcgc tcactgactc gctgcgctcg 5160
gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg cggtaatacg gttatccaca 5220
gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag gccagcaaaa ggccaggaac 5280
cgtaaaaagg ccgcgttgct ggcgtttttc cataggctcc gccccctga cgagcatcac 5340
aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga aacccgacag gactataaag ataccaggcg 5400

tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttccga ccctgccgct taccggatac 5460
ctgtccgcct ttctcccttc gggaagcgtg gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat 5520
ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag 5580
cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat cgtcttgagt ccaacccggt aagacacgac 5640
ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggattagca gagcgaggta tgtaggcggt 5700
gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca ctagaaggac agtatttggt 5760
atctgcgctc tgctgaagcc agttaccttc ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc 5820

aaacaaacca ccgctggtag cggtggtttt tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga 5880
aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac 5940
gaaaactcac gttaagggat tttggtcatg agattatcaa aaaggatctt cacctagatc 6000
cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggtct 6060
gacagttacc aatgcttaat cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca 6120
tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaccatct 6180
ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac cggctccaga tttatcagca 6240

ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc ctgcaacttt atccgcctcc 6300
atccagtcta ttaattgttg ccgggaagct agagtaagta gttcgccagt taatagtttg 6360
cgcaacgttg ttgccattgc tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtatggct 6420
tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttacat gat 6463