



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월22일
(11) 등록번호 10-2103104
(24) 등록일자 2020년04월14일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/8509 (2013.01)
A01K 67/0276 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0065614
- (22) 출원일자 2019년06월03일
심사청구일자 2019년06월03일
- (65) 공개번호 10-2020-0021042
- (43) 공개일자 2020년02월27일
- (30) 우선권주장
62/764,905 2018년08월16일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
Platt, RJ. et al., Cell (2014) 159:440-455
(2014.10.09. 공개)*
Yum, SY. et al., BMC Genomics (2018) 19:387
(2018.05.23. 공개)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
(주)라트바이오
서울특별시 강남구 테헤란로 234, 12층(역삼동, 삼익라비빌딩)
- (72) 발명자
장구
서울특별시 관악구 관악로 1, 85동 631호
염수영
서울특별시 관악구 관악로 1, 85동 631호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 아이피에스

전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 이효진

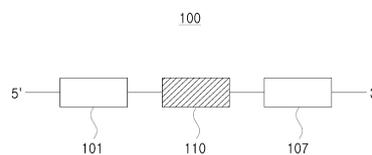
(54) 발명의 명칭 유전자 편집된 형질전환 동물 및 형질전환 배아

(57) 요약

본 명세서에 의해 게시되는 내용은 유전자 편집된 형질전환 동물 및 형질전환 배아에 관한 것이다.

본 명세서에 의해 게시되는 내용에 따른 유전자 편집된 형질전환 동물(또는 배아)은 제1 툴박스 및 타겟 사이트를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포; 및 제2 툴박스 및 변형된 사이트를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포;를 (뒷면에 계속)

대표도



포함하는 형질전환 동물(또는 배아)로, 상기 제1 툴박스 및 상기 제2 툴박스는 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하고, 상기 타겟 사이트는 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역을 포함하며 - 이 때, 상기 제1 영역은 상기 제2 영역의 5' 말단에 위치하고, 상기 제3 영역은 상기 제2 영역의 3' 말단에 위치함 - , 상기 변형된 사이트는 제4영역, 제5영역 및 제6영역을 포함하고 - 이 때, 상기 제4 영역은 상기 제5 영역의 5' 말단에 위치하고, 상기 제6 영역은 상기 제5 영역의 3' 말단에 위치함 - , 상기 제1 영역의 서열 및 상기 제4 영역의 서열은 서로 동일하고, 상기 제3 영역의 서열 및 상기 제6 영역의 서열은 서로 동일하며, 상기 제2 영역의 서열 및 상기 제5 영역의 서열은 서로 상이한 형질전환 동물(또는 배아)이다.

(52) CPC특허분류

A01K 67/0278 (2013.01)

C12N 15/102 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/907 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

A01K 2267/01 (2013.01)

A01K 2267/02 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

C12N 2800/90 (2013.01)

(72) 발명자

김경민

서울특별시 관악구 관악로 1, 85동 622호

이원유

서울특별시 관악구 관악로 1, 85동 631호

박지현

경기도 남양주시 와부읍 덕소로97번길 12. 주공
205동 301호

명세서

청구범위

청구항 1

하나 이상의 틀박스를 포함하는 게놈을 가지는 형질전환 유제류 배아로,
상기 하나 이상의 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고,
상기 하나 이상의 틀박스는 5' 말단 및 3' 말단에 ITR 서열을 포함하며,
상기 배아를 구성하는 세포들 중 적어도 하나 이상의 세포는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 벡터를 포함하고,
상기 형질전환 유제류 배아는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 지속적으로 발현하는,
형질전환 유제류 배아.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 Cas9 단백질, Cpf1 단백질 또는 이들의 돌연변이(mutant)인,
형질전환 유제류 배아.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 가이드 핵산은 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 핵산인,
형질전환 유제류 배아.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 벡터를 포함하는 세포는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 상기 가이드 핵산에 의해 게놈 내 변형된 좌위를 더 가지는,
형질전환 유제류 배아.

청구항 5

하나 이상의 틀박스를 포함하는 게놈을 가지는 형질전환 유제류 배아로,
상기 하나 이상의 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고,
상기 하나 이상의 틀박스는 5' 말단 및 3' 말단에 ITR 서열을 포함하며,
상기 형질전환 유제류 배아는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 지속적으로 발현하고,
상기 게놈은 상기 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제에 의해 변형된 좌위를 더 가지는,

형질전환 유제류 배아.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 Cas9 단백질, Cpf1 단백질 또는 이들의 돌연변이(mutant)인,
형질전환 유제류 배아.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 하나 이상의 틀박스는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하고,
이때, 상기 가이드 핵산은 상기 변형된 좌위와 연관되어 있는,
형질전환 유제류 배아.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 가이드 핵산은 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 핵산인,
형질전환 유제류 배아.

청구항 9

하나 이상의 틀박스가 포함된 계놈을 가지는 생식세포계(germline)를 가지는 형질전환 유제류 동물로,
상기 하나 이상의 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고,
상기 하나 이상의 틀박스는 5' 말단 및 3' 말단에 ITR 서열을 포함하며,
상기 형질전환 유제류 동물은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 지속적으로 발현하고,
상기 생식세포계(germline)의 계놈은 하나 이상의 유전자 좌위에 변형된 뉴클레오타이드 서열을 포함하며,
상기 변형된 뉴클레오타이드 서열은 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제에 의해 생성된 것인,
형질전환 유제류 동물.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 Cas9 단백질, Cpf1 단백질 또는 이들의 돌연변이(mutant)인,
형질전환 유제류 동물.

청구항 11

제9항에 있어서,

상기 하나 이상의 틀박스는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 더 포함하고, 이때, 상기 가이드 핵산은 상기 변형된 뉴클레오타이드 서열과 연관되어 있는, 형질전환 유제류 동물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 가이드 핵산은 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있는 핵산인, 형질전환 유제류 동물.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 변형된 뉴클레오타이드 서열은 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삭제(deletion), 삽입(insertion) 또는 치환(substitution)된 서열인, 형질전환 유제류 동물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 명세서에 의해 개시되는 내용은 유전자 편집된 형질전환 동물 및 형질전환 배아에 관한 것이다.
- [0002] 구체적으로, 본 명세서에 의해 개시되는 내용은 유전자 편집된 키메라 형질전환 동물 및 키메라 형질전환 배아에 관한 것이다.
- [0003] 보다 구체적으로, 본 명세서에 의해 개시되는 내용은 타겟 사이트에서 유전자 편집이 일어나지 않은 계놈을 가지는 제1 세포와 상기 타겟 사이트에서 유전자 편집이 일어난 계놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질전환 배아 및 형질전환 동물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 크리스퍼/카스9 을 비롯한 유전자 편집 도구를 이용한 유전자를 조작이 다양한 종의 동물 및 식물에 적용되고 있는 추세이다.
- [0006] 종래 일반적으로 행해져 온 유전자 조작은 외부로부터 세포나 개체에 유전자 편집 도구를 제공하는 방법이 이용되었으나, 외부로부터 세포나 개체에 유전자 편집 도구를 주입하는 경우 유전자 조작의 효율이 낮다는 문제점이 있다.
- [0007] 유전자 편집 도구를 암호화하는 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환 동물을 이용하면, 동물 또는 세포에서 유전자 편집 도구가 발현되어 보다 높은 유전자 조작 효율이 나타날 수 있을 것이다.
- [0008] 또한, 유전자 편집 도구를 암호화하는 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환 동물을 이용하면 다양한 유전자가 녹인되거나 녹아옴된 다수의 동물을 제작할 수 있을 것이다. 이를 통해 유전자 편집 도구를 암호화하는 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환 동물은 플랫폼 기술로 활용될 수 있을 것이다.
- [0009] 나아가, 상기 형질전환 동물이 대형 동물인 경우 소형 동물일 때와 비교해서 활용성이 보다 좋을 수 있다.
- [0010] 이에 유전자 편집 도구를 암호화하는 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 대형 동물에 대한 개발이 필요한 실정이나, 대형 동물에서의 유전자 조작은 소형 동물에 비해 기술적인 한계가 있어 느리게 진행되고있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 출원에 의해 개시되는 일 내용은 유전자 편집된 형질전환 동물에 관한 것이다.
- [0013] 본 출원에 의해 개시되는 다른 내용은 유전자 편집된 형질전환 배아에 관한 것이다.
- [0014] 본 출원에 의해 해결하고자 하는 과제는 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발현될 수 있는 형질전환 동물을 이용하여 제작된 유전자 편집된 세포, 배아 및/또는 동물을 바이오 리액터, 질환 모델 세포 또는 질환 모델 동물 등으로 활용할 수 있도록 하는 것이다.
- [0015] 본 출원에 의해 해결하고자 하는 과제는 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발현될 수 있는 형질전환 배아를 이용하여 제작된 유전자 편집된 세포, 배아 및/또는 동물을 바이오 리액터, 질환 모델 세포, 또는 질환 모델 동물 등으로 활용할 수 있도록 하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 일 양태에 따르면, 제1 틀박스 및 타겟 사이트를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포; 및 제2 틀박스 및 변형된 사이트를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포;를 포함하는 형질전환 동물로,
- [0018] 상기 제1 틀박스 및 상기 제2 틀박스는 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하고,
- [0019] 상기 타겟 사이트는 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역을 포함하며 - 이 때, 상기 제1 영역은 상기 제2 영역의 5' 말단에 위치하고, 상기 제3 영역은 상기 제2 영역의 3' 말단에 위치함 - ,
- [0020] 상기 변형된 사이트는 제4영역, 제5영역 및 제6영역을 포함하고 - 이 때, 상기 제4 영역은 상기 제5 영역의 5' 말단에 위치하고, 상기 제6 영역은 상기 제5 영역의 3' 말단에 위치함 - ,
- [0021] 상기 제1 영역의 서열 및 상기 제4 영역의 서열은 서로 동일하고,
- [0022] 상기 제3 영역의 서열 및 상기 제6 영역의 서열은 서로 동일하며,
- [0023] 상기 제2 영역의 서열 및 상기 제5 영역의 서열은 서로 상이한 형질전환 동물이 제공된다.
- [0025] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 다른 양태에 따르면, 제1 틀박스 및 타겟 사이트를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포; 및 제2 틀박스 및 변형된 사이트를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포;를 포함하는 형질전환 배아로,
- [0026] 상기 제1 틀박스 및 상기 제2 틀박스는 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함하고,
- [0027] 상기 타겟 사이트는 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역을 포함하며 - 이 때, 상기 제1 영역은 상기 제2 영역의 5' 말단에 위치하고, 상기 제3 영역은 상기 제2 영역의 3' 말단에 위치함 - ,
- [0028] 상기 변형된 사이트는 제4영역, 제5영역 및 제6영역을 포함하고 - 이 때, 상기 제4 영역은 상기 제5 영역의 5' 말단에 위치하고, 상기 제6 영역은 상기 제5 영역의 3' 말단에 위치함 - ,
- [0029] 상기 제1 영역의 서열 및 상기 제4 영역의 서열은 서로 동일하고,
- [0030] 상기 제3 영역의 서열 및 상기 제6 영역의 서열은 서로 동일하며,
- [0031] 상기 제2 영역의 서열 및 상기 제5 영역의 서열은 서로 상이한 형질전환 배아가 제공된다.
- [0033] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 일 양태에 따르면, 제1 틀박스를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포; 및 제2 틀박스를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포;를 포함하는 형질전환 동물로,
- [0034] 상기 제1 틀박스 및 상기 제2 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상을 포함하며 -이 때, 상기 타겟 사이트는 상기 동물의 엔도-폴리뉴클레오타이드 이거나, 상기 동물의 게놈상에 포함

된 엑소-폴리뉴클레오타이드로 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 포함되어 있음-

- [0035] 상기 제1 툴박스는 상기 제1 세포의 게놈의 제1 좌위에 존재하며,
- [0036] 상기 제2 툴박스는 상기 제2 세포의 게놈의 제2 좌위에 존재하고,
- [0037] 상기 제1 좌위 및 상기 제2 좌위는 상이한 형질전환 동물이 제공된다.
- [0039] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 다른 양태에 따르면, 제1 툴박스를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포; 및 제2 툴박스를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포;를 포함하는 형질전환 동물로,
- [0040] 상기 제1 툴박스 및 상기 제2 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상을 포함하며 - 이 때, 상기 타겟 사이트는 상기 동물의 엔도-폴리뉴클레오타이드 이거나, 상기 동물의 게놈상에 포함된 엑소-폴리뉴클레오타이드로 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 포함되어 있음-
- [0041] 상기 제1 툴박스의 서열 및 상기 제2 툴박스의 서열은 상이하고,
- [0042] 상기 제1 툴박스는 상기 제1 세포의 게놈의 제1 좌위에 존재하며,
- [0043] 상기 제2 툴박스는 상기 제2 세포의 게놈의 제2 좌위에 존재하고,
- [0044] 상기 제1 좌위 및 상기 제2 좌위는 동일한 형질전환 동물이 제공된다.
- [0046] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 또 다른 양태에 따르면, 제1 툴박스를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포; 및 제2 툴박스를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포;를 포함하는 형질전환 배아로,
- [0047] 상기 제1 툴박스 및 상기 제2 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상을 포함하며 -이 때, 상기 타겟 사이트는 상기 배아의 엔도-폴리뉴클레오타이드 이거나, 상기 배아의 게놈상에 포함된 엑소-폴리뉴클레오타이드로 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 포함되어 있음-
- [0048] 상기 제1 툴박스는 상기 제1 세포의 게놈의 제1 좌위에 존재하며,
- [0049] 상기 제2 툴박스는 상기 제2 세포의 게놈의 제2 좌위에 존재하고,
- [0050] 상기 제1 좌위 및 상기 제2 좌위는 상이한 형질전환 배아가 제공된다.
- [0052] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 또 다른 양태에 따르면, 제1 툴박스를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포; 및 제2 툴박스를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포;를 포함하는 형질전환 배아로,
- [0053] 상기 제1 툴박스 및 상기 제2 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상을 포함하며 -이 때, 상기 타겟 사이트는 상기 배아의 엔도-폴리뉴클레오타이드 이거나, 상기 배아의 게놈상에 포함된 엑소-폴리뉴클레오타이드로 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 포함되어 있음-
- [0054] 상기 제1 툴박스의 서열 및 상기 제2 툴박스의 서열은 상이하고,
- [0055] 상기 제1 툴박스는 상기 제1 세포의 게놈의 제1 좌위에 존재하며,
- [0056] 상기 제2 툴박스는 상기 제2 세포의 게놈의 제2 좌위에 존재하고,
- [0057] 상기 제1 좌위 및 상기 제2 좌위는 동일한 형질전환 배아가 제공된다.
- [0059] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 일 양태에 따르면, 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발견되는 형질전환 배아 제작 방법으로, 트랜스포존 유전자 및 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 수정란 또는 배아에 미세주입 하는 것 -이 때, 상기 벡터는 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터 임-; 을 포함하는 형질전환 배아 제작 방법이 제공된다.
- [0061] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 다른 양태에 따르면, 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발견되는 형질전환 배아 제작 방법으로, i) 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발견되는 형질전환 공여세포를 제작하는 것; 및
- [0062] ii) 상기 형질전환 공여세포의 핵을 탈핵 난자에 이식하는 것; 을 포함하는 형질전환 배아 제작 방법이 제공된다.

- [0064] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 또 다른 양태에 따르면, 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발현되는 형질전환 동물 제작 방법으로, i) 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발현되는 형질전환 배아를 제작하는 것; 및 ii) 상기 형질전환 배아를 대리모의 자궁에 이식하는 것;을 포함하는 형질전환 동물 제작 방법이 제공된다.
- [0066] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 일 양태에 따르면, 계놈에 존재하는 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 배아 제작 방법으로,
- [0067] 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 계놈을 가지는 수정란 또는 배아에 상기 타겟 사이트에 결합할 수 있는 가이드 핵산을 제공하는 것 - 이 때, 상기 가이드 핵산은 RNA 형태이거나, 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터에 포함된 형태임-; 을 포함하는 유전자 편집된 계놈을 가지는 배아 제작 방법이 제공된다.
- [0069] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 다른 양태에 따르면, 계놈에 존재하는 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 배아 제작 방법으로,
- [0070] i) 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 상기 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 형질전환 공여세포를 제작하는 것; 및 ii) 상기 형질전환 공여세포의 핵을 탈핵 난자에 이식하는 것;을 포함하는 유전자 편집된 계놈을 가지는 배아 제작 방법이 제공된다.
- [0072] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 또 다른 양태에 따르면, 계놈에 존재하는 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 동물 제작 방법으로,
- [0073] i) 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 상기 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 배아를 제작하는 것; 및 ii) 상기 배아를 대리모에 이식하는 것; 을 포함하는 유전자 편집된 계놈을 가지는 동물 제작 방법이 제공된다.
- [0075] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 또 다른 양태에 따르면, 계놈에 존재하는 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 배아 제작 방법으로,
- [0076] 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에 발현 조절 요소를 포함하는 계놈을 가지는 수정란 또는 배아에 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및 조건 중 하나 이상을 제공하는 것; 을 포함하는 유전자 편집된 계놈을 가지는 배아 제작 방법이 제공된다.
- [0078] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 또 다른 양태에 따르면, 계놈에 존재하는 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 배아 제작 방법으로,
- [0079] i) 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에 발현 조절 요소를 포함하며, 상기 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 형질전환 공여세포를 제작하는 것; 및 ii) 상기 형질전환 공여세포의 핵을 탈핵 난자에 이식하는 것; 을 포함하는 유전자 편집된 계놈을 가지는 배아 제작 방법이 제공된다.
- [0081] 본 출원에 의해 개시되는 기술의 또 다른 양태에 따르면, 계놈에 존재하는 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 제작 방법으로,
- [0082] i) 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에 발현 조절 요소를 포함하며, 상기 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 배아를 제작하는 것; ii) 상기 배아를 대리모에 이식하는 것; 을 포함하는 유전자 편집된 계놈을 가지는 동물 제작 방법이 제공된다.

발명의 효과

[0084] 본 명세서에 의해 개시되는 기술에 따르면, 다음과 같은 효과가 발생한다.

[0085] 본 명세서에 의해 개시되는 일 내용에 따르면, 타겟 사이트에서 유전자 편집된 형질전환 동물이 제공될 수 있다. 구체적으로, 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발현될 수 있으며 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 키메릭 형질전환 동물이 제공될 수 있다. 상기 유전자 편집된 계놈을 가지는 동물은 바이오 리액터 또는 질환 모델 동물로 활용될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

[0086] 본 명세서에 의해 개시되는 다른 내용에 따르면, 타겟 사이트에서 유전자 편집된 형질전환 배아가 제공될 수 있다. 구체적으로, 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발현될 수 있으며 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 키메릭 형질전환 배아가 제공될 수 있다. 상기 유전자 편집된 계놈을 가지는 배아에서 원하는 단백질이 생성될 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.

도면의 간단한 설명

- [0088] 도 1은 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스를 나타낸다.
- 도 2는 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 몇몇 예를 나타낸다.
- 도 3은 세포 내에 존재하는 계놈으로부터 형성된 염색체를 나타낸다.
- 도 4는 틀박스가 염색체 상에 삽입될 수 있는 몇몇 형태를 나타낸다.
- 도 5는 틀박스가 삽입된 계놈을 가지는 체세포 및 생식세포를 나타낸다.
- 도 6은 틀박스가 삽입된 계놈을 가지는 1세포기 수정란 및 상기 1세포기 수정란으로부터 분열된 2세포기 배아, 4세포기 배아, 8세포기 배아 및 16세포기 배아를 나타낸다.
- 도 7은 일부 세포의 계놈에만 틀박스가 삽입된 2세포기 배아, 4세포기 배아, 8세포기 배아, 16세포기 배아를 나타낸다.
- 도 8은 발현 조절 요소를 포함하지 않으면서 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 틀박스와 상기 틀박스가 삽입된 계놈 내에서 특정 타겟 사이트가 잘린 형태를 나타낸다.
- 도 9는 발현 조절 요소를 포함하는 틀박스의 몇몇 예를 나타낸다.
- 도 10은 발현 조절 요소의 몇몇 예를 나타낸다.
- 도 11은 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 틀박스의 몇몇 예를 나타낸다.
- 도 12는 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 틀박스 내에서 유전자 편집되는 하나의 과정을 나타낸다.
- 도 13은 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 틀박스 내에서 유전자 편집되는 하나의 과정을 나타낸다.
- 도 14는 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 틀박스 내에서 유전자 편집되는 하나의 과정을 나타낸다.
- 도 15는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 링커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 도너 폴리뉴클레오타이드로 낙인되고, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 낙인된 세포 또는 상기 세포를 포함하는 형질 전환 동물로부터 목적 단백질이 생산되는 과정을 나타낸다.
- 도 16은 표면 틀박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포를 선별하는 일 방법을 나타낸다.
- 도 17은 표면 틀박스에서 유전자 편집이 일어난 세포를 선별하는 일 방법을 나타낸다.
- 도 18은 자살 틀박스가 삽입된 계놈, 자살 틀박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포, 자살 틀박스에서 유전자 편집이 일어난 형태, 및 자살 틀박스에서 유전자 편집이 일어난 세포를 나타낸다.
- 도 19는 SRY 낙아웃 틀박스가 삽입된 계놈 및 SRY 낙아웃 틀박스가 삽입된 계놈에서 SRY 유전자가 낙아웃된 계놈의 형태를 나타낸다.
- 도 20은 XY 염색체 구분 틀박스가 삽입된 계놈 및 상기 XY 염색체 구분 틀박스에 의해 XX 염색체를 가지는 배아

와 XY 염색체를 가지는 배아가 구분되는 과정을 나타낸다.

도 21은 유도 프로모터 및 조직 특이적 프로모터에 의해 트랜스포사아제의 발현이 조절될 수 있는 제거 툴박스의 일 예를 나타낸다.

도 22는 유도 프로모터 및 조직 특이적 프로모터에 의해 트랜스포사아제의 발현이 조절될 수 있는 제거 툴박스의 일 예를 나타낸다.

도 23은 유도 프로모터 및 조직 특이적 프로모터에 의해 리컴비나아제의 발현이 조절될 수 있는 제거 툴박스의 일 예를 나타낸다.

도 24는 녹색 형광 단백질 유전자가 포함된 벡터의 일부 및 적색 형광 단백질이 포함된 벡터의 일부를 나타낸다.

도 25는 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 공여세포에서의 형광 단백질 발현을 나타낸다.

도 26은 복제 배아에서 녹색 형광 단백질 유전자 또는 적색 형광 단백질 유전자의 mRNA 발현 여부를 보여주는 RT-PCR, 및 복제 배아의 계놈에 녹색 형광 단백질 유전자 또는 적색 형광 단백질 유전자가 삽입된 것을 확인해주는 DNA PCR 결과를 나타낸다.

도 27은 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 복제 배아에서 형광 단백질의 발현을 나타낸다.

도 28은 형광 단백질 유전자를 포함하는 몇몇 벡터의 일부 구성을 나타낸다.

도 29는 황색 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환 소 및 상기 형질전환소에서 황색 형광 단백질의 발현을 확인한 결과를 낸다.

도 30은 녹색 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환소에서 녹색 형광 단백질의 발현을 확인한 결과를 낸다.

도 31은 발현 조절 요소, 녹색 형광 단백질 유전자 및 적색 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환 소 및 상기 형질전환 소에 발현 조절 요소에 영향을 주는 물질을 처리한 경우 적색 형광 단백질의 발현을 확인한 결과를 나타낸다.

도 32는 발현 조절 요소, 녹색 형광 단백질 유전자 및 적색 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환소에서 녹색 형광 단백질 유전자의 삽입과 녹색 형광 단백질 유전자의 전사를 확인한 DNA PCR 및 PT-PCR 결과를 나타내며, 발현 조절 요소에 영향을 주는 물질 처리에 따라 녹색 형광 단백질 유전자가 제거되고 적색 형광 단백질 유전자만 존재하는 것을 확인해주는 DNA PCR 결과를 나타낸다.

도 33은 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 자손 소 및 자손 소의 일차 세포에서 형광 단백질 발현을 나타낸다.

도 34는 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 자손 소의 계놈 내 형광 단백질 유전자의 존재를 확인한 DNA PCR 분석 결과를 나타낸다.

도 35는 계놈 상에 삽입된 녹색 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스의 개수에 따른 형광 단백질 발현 정도 차이를 나타낸다.

도 36은 녹색 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 소의 유즙에서 녹색 형광 단백질의 발현을 확인한 시각적 결과 및 ELISA 결과를 나타낸다.

도 37은 세포의 계놈에 삽입된 녹색 형광 단백질 유전자를 꺼아웃 시키기 위한 sgRNA 발현 벡터 및 Cas9 발현 벡터를 나타낸다.

도 38은 녹색 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 소의 섬유아세포에 sgRNA 발현 벡터 및 Cas9 발현 벡터의 트랜스펙션 후 녹색 형광 단백질이 발현되지 않는 시각적 결과와 녹색 형광 단백질 유전자의 인델을 확인한 결과를 나타낸다

도 39는 녹색 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 일차 세포에 녹색 형광 단백질 유전자를 표적으로 하는 gRNA, Cas9, 및 도너 DNA(퓨로마이신 저항성 유전자)가 트랜스펙션 된 경우, 도너 DNA가

닉인된 것을 보여주는 결과를 나타낸다.

도 40 은 녹색 형광 단백질을 타겟하는 sgRNA 발현벡터, 크리스퍼/카스9 발현벡터 및 도너 DNA(퓨로마이신 저항성 유전자) 발현벡터가 트랜스펙션 된 일차 세포에서 녹색 형광 단백질이 발현되지 않는 것을 나타낸다

도 41은 도너 폴리뉴클레오타이드가 소의 일차세포의 게놈에 존재하는 녹색 형광 단백질 유전자를 표적으로 하여 닉인 되는 과정을 도시한다.

도 42는 녹색 형광 단백질 유전자가 삽입된 게놈을 가지는 소의 일차 세포에서 녹색 형광 단백질 유전자를 표적으로 하여 적색 형광 단백질 유전자가 닉인된 후 적색 형광 단백질이 발현되는 것을 나타낸다.

도 43은 spCas9 유전자를 포함하는 툴박스가 포함된 벡터, spCas9 유전자 포함된 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 형질전환 배아 및 형질전환 소를 나타낸다.

도 44는 spCas9 유전자 포함된 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 형질전환 소의 일차 세포에서 적색 형광 단백질의 발현을 보여주는 시각적 결과, 상기 형질전환 소의 게놈에 spCas9 유전자의 삽입을 보여주는 DNA PCR 결과, 및 상기 형질전환 소의 게놈에 삽입된 spCas9 유전자의 발현을 보여주는 RT-PCR 결과를 나타낸다.

도 45는 Cas9 유전자가 삽입된 게놈을 가지는 소를 이용한 표적 유전자를 닉아웃 시키는 과정을 도시한다.

도 46은 spCas9 유전자가 삽입된 게놈을 가지는 소를 이용한 PRNP 유전자, Beta-lactoglobulin(BLG) 유전자, Retinoblastoma 1(Rb1) 유전자, Nanog 유전자, P53 유전자 및 beta-casein(BCN) 유전자의 닉아웃 결과를 나타낸다.

도 47은 spCas9 유전자가 삽입된 게놈을 가지는 소의 생식세포를 이용해 제작된 배반포에 PRNP 유전자를 표적으로 하는 가이드 핵산을 주입한 후, PRNP 유전자의 닉아웃을 확인한 전기 영동 결과 및 서열 분석 결과를 나타낸다.

도 48은 spCas9 유전자가 삽입된 게놈을 가지는 소들의 자연교배에 의해 얻어진 자손 소의 일차세포에서 적색 형광 단백질이 발현되는 것과 DNA PCR을 통해 상기 자손 소의 게놈에 spCas9 유전자 및 Fat1 유전자가 삽입된 것을 나타낸다.

도 49는 spCas9 유전자가 삽입된 게놈을 가지는 형질전환 소의 일차 세포에 PRNP 유전자를 표적으로 하는 sgRNA가 트랜스펙션 된 후, PRNP 유전자의 인델을 확인한 전기 영동 결과를 나타낸다.

도 50은 HDR을 위한 도너 폴리뉴클레오타이드 벡터의 일부 및 HITI 를 위한 도너 폴리뉴클레오타이드 벡터의 일부를 도시한다.

도 51은 HITI에 의한 mcherry 유전자의 닉인을 확인한 결과를 나타낸다.

도 52는 HDR에 의한 mcherry 유전자의 닉인을 확인한 결과를 나타낸다.

도 53은 체세포 핵이식을 통해 제작된 mcherry 유전자가 닉인된 배아 및 상기 배아에서 mcherry 발현을 나타낸다.

도 54는 spCas9 및 sgRNA를 발현 시키기 위한 최종 발현 벡터의 일부를 도시한다.

도 55는 spCas9 유전자 및 sgRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 형질 전환 소의 일차세포에서 적색 형광 단백질의 발현과 상기 형질 전환 소의 섬유아세포에서 베타-락토글로불린 유전자의 인델을 확인한 fPCR 결과를 나타낸다.

도 56은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현이 조절될 수 있는 벡터의 일부를 나타낸다.

도 57은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현이 조절될 수 있는 세포에 Cre 리컴비나아제의 처리 유무에 따른 타겟 유전자의 인델 여부를 DNA PCR로 확인한 결과를 나타낸다.

도 58은 HDR을 위한 도너 벡터의 서열이며, 전체 서열 중 강조된 부분은 상기 제1 상동 염기서열과 상기 제2 상동 염기서열을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[용어 정리]

[0089]

- [0090] **형질 전환 (transformation, genetic modification)**
- [0091] 본 출원의 용어 '형질 전환'은 세포 내 동물 게놈(animal genome)이 포함하고 있는 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)를 인위적으로 변형하는 것을 의미한다. 상기 변형은 세포 내 동물 게놈(animal genome)이 포함하는 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)의 일부를 제거하는 것, 일부를 치환하는 것, 및 동물 게놈(animal genome)에 뉴클레오타이드(nucleotide)나 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)를 삽입하는 것을 포함한다.
- [0092] 본 출원의 용어 '형질 전환'은 세포 내에서 발현될 수 있는 단백질 또는 RNA를 추가, 변경, 또는 제거하는 것을 포함한다.
- [0094] **위치-특이적 형질 전환 (site-specific transformation)**
- [0095] 본 출원의 용어 '위치 특이적 형질 전환 (site-specific transformation)'은 세포 내 동물 게놈(animal genome) 상에서 특정한 위치에 발생하는 형질 전환을 의미한다. 상기 특정한 위치는 동물 게놈(animal genome) 상의 염기 서열로 결정될 수 있다. 예를 들어, RNA-가이드 엔도뉴클레아제(RNA-guided endonuclease)는 동물 게놈(animal genome) 상에서 가이드 핵산(guide nucleic acid)의 일부와 상보적으로 결합할 수 있는 동물 게놈(animal genome) 상의 염기 서열을 인식하여 위치-특이적 형질 전환(site-specific transformation)을 일으킬 수 있다.
- [0097] **형질 전환 세포 (transformed cell, transgenic cell)**
- [0098] 본 출원의 용어 '형질 전환 세포'는 세포 내 동물 게놈(animal genome) 중 형질 전환된 부분을 포함하고 있는 세포를 의미한다.
- [0099] 세포 내 동물 게놈(animal genome) 중 형질 전환된 부분을 포함하는 제1 세포는 세포 분열을 할 수 있다. 상기 제1 세포의 세포 분열을 통해 얻은 제2 세포의 동물 게놈(animal genome)은 상기 제1 세포의 형질 전환된 부분과 동일한 염기 서열을 가지는 부분을 포함할 수 있다. 본 출원의 용어 '형질 전환 세포'는 상기 제1 세포 및 제2 세포를 포함한다.
- [0101] **형질 전환 동물 (transformed animal, transgenic animal)**
- [0102] 본 출원의 용어 '형질 전환 동물'은 적어도 하나의 형질 전환 세포를 포함하고 있는 동물을 의미한다. 동물 F0는 제1 형질 전환 세포를 포함할 수 있다. 상기 동물 F0는 자손 F1을 생산할 수 있다. 상기 F1 및 F1 이하 자손이 포함하는 하나 이상의 세포는 상기 제1 형질 전환 세포 내 동물 게놈(animal genome) 중 형질 전환된 부분과 동일한 염기 서열을 가지는 부분을 포함하는 동물 게놈(animal genome)을 포함할 수 있다. 본 출원의 용어 '형질 전환 동물'은 상기 F0, F1, 및 F1 이하 자손을 포함한다.
- [0103] 동물 F1의 생산 과정 중 또는 동물 F1이 생산된 이후 형질 전환을 위한 직접적인 인위적 조작이 가해지지 않은 경우에도, 동물 F1이 형질 전환 세포를 포함하고 있는 경우라면, 형질 전환 동물이라고 할 수 있다.
- [0104] 동물 F0에 형질 전환을 위해 직접적인 인위적 조작이 가해진 뒤, 동물 F0로부터 F1이 얻어진 경우, F1은 형질 전환 동물이라고 할 수 있다.
- [0106] **엔도-폴리뉴클레오타이드(endo-polynucleotide)**
- [0107] 본 출원의 용어 '엔도-폴리뉴클레오타이드'는 형질 전환이 발생하지 않은 세포 내 동물 게놈(animal genome)이 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다.
- [0108] 형질 전환이 발생하지 않은 제1 세포는 세포 분열을 할 수 있다. 상기 제1 세포의 세포 분열을 통해 얻은 제2 세포는 형질 전환 세포일 수 있다. 상기 제2 세포는 상기 제1 세포가 포함하는 엔도-폴리뉴클레오타이드와 동일한 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 출원의 용어 '엔도-폴리뉴클레오타이드'는 상기 제2 세포가 포함하고 있는 폴리뉴클레오타이드 중 제1 세포의 엔도-폴리뉴클레오타이드(endo-polynucleotide)와 동일한 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0110] **엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)**
- [0111] 본 출원의 용어 '엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)'는 세포에 도입(introduce)되는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. 상기 세포는 형질 전환 세포일 수 있다. 또는 형질 전환 세포가 아닐 수 있다. 상기 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)는 세포 내 동물 게놈(animal genome)에 삽입되거나 세포 내 동물 게놈(animal genome)과 독립적으로 존재할 수 있다.

- [0112] 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)가 도입된 제1 세포는 세포 분열을 할 수 있다. 상기 제1 세포의 세포 분열을 통해 얻은 제2 세포는 상기 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)와 동일한 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 출원의 용어 '엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)'는 상기 제2 세포가 포함하고 있는 폴리뉴클레오타이드 중 제1 세포의 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)와 동일한 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0113] 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)가 도입된 세포를 포함하는 동물(F0)은 자손(F1)을 생산할 수 있다. 상기 F1 및 F1 이하 자손은 상기 F0의 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)와 동일한 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 세포를 포함할 수 있다. 본 출원의 용어 '엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)'는 상기 F1 및 F1 이하 자손의 세포가 포함하고 있는 폴리뉴클레오타이드 중 F0의 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)와 동일한 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0115] **삽입(insertion)**
- [0116] 본 출원에서 용어 '삽입(insertion)'은 '뉴클레오타이드 삽입(nucleotide insertion)' 및 '폴리뉴클레오타이드 삽입(polynucleotide insertion)'을 포함한다. 본 출원에서 용어 '뉴클레오타이드 삽입(nucleotide insertion)'은 핵산(nucleic acid)의 중간, 5' 말단 또는 3' 말단에 뉴클레오타이드(nucleotide)를 더하는 것을 의미한다. 본 출원에서 용어 '폴리뉴클레오타이드 삽입(polynucleotide insertion)'은 핵산(nucleic acid)의 중간, 5' 말단 또는 3' 말단에 폴리뉴클레오타이드를 더하는 것을 의미한다.
- [0118] **제거(deletion)**
- [0119] 본 출원에서 용어 '제거(deletion)'는 '뉴클레오타이드 제거(nucleotide deletion)' 및 '폴리뉴클레오타이드 제거(polynucleotide deletion)'를 포함한다. 본 출원에서 용어 '뉴클레오타이드 제거(nucleotide deletion)'는 핵산(nucleic acid)에 포함된 뉴클레오타이드(nucleotide)를 제거하는 것을 의미한다. 본 출원에서 용어 '폴리뉴클레오타이드 제거(polynucleotide deletion)'는 핵산(nucleic acid)에 포함된 폴리뉴클레오타이드를 제거하는 것을 의미한다.
- [0121] **치환(substitution)**
- [0122] 본 출원에서 용어 '치환(substitution)'은 '뉴클레오타이드 치환(nucleotide substitution)' 및 '폴리뉴클레오타이드 치환(polynucleotide substitution)'을 포함한다. 본 출원에서 용어 '뉴클레오타이드 치환(nucleotide substitution)'은 핵산(nucleic acid)에 포함된 뉴클레오타이드(nucleotide)를 다른 뉴클레오타이드(nucleotide)로 바꾸는 것을 의미한다. 본 출원에서 용어 '폴리뉴클레오타이드 치환(polynucleotide substitution)'은 핵산(nucleic acid)에 포함된 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)를 다른 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)로 바꾸는 것을 의미한다.
- [0124] **넉인(knockin)**
- [0125] 본 출원의 용어 '넉인'은 유전자를 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드를 세포 내 동물 게놈(animal genome) 상에 삽입(insertion) 또는 치환(substitution) 하는 것을 의미한다.
- [0126] 예를 들어, 인간 알부민(human albumin) 유전자를 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)를 세포 내 비-인간 동물 게놈(non-human animal genome) 상에 삽입(insertion) 할 수 있다. 이 경우, 상기 비-인간 동물 게놈(non-human animal genome)을 포함하는 세포는 인간 알부민(human albumin)을 발현할 수 있게 된다. 이것을 인간 알부민 유전자(human albumin gene) 넉인(knockin) 이라고 할 수 있다.
- [0128] **넉아웃(knockout)**
- [0129] 본 출원의 용어 '넉아웃(knockout)'은 세포 내 동물 게놈(animal genome) 상에 존재하는 유전자가 기능(function)할 수 없게 하는 것을 의미한다. 세포 내 동물 게놈(animal genome) 상에서 유전자가 위치하는 폴리뉴클레오타이드를 형질 전환하여 해당 유전자를 넉아웃(knockout) 할 수 있다.
- [0130] 예를 들어, 인간 알부민 유전자(human albumin gene)를 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)를 세포 내 비-인간 동물 게놈(non-human animal genome) 상에 존재하는 비-인간 알부민 유전자(non-human albumin gene)의 엑손에 해당하는 염기 서열에 삽입(insertion)할 수 있다. 이 경우, 상기 세포는 인간 알부민(human albumin)을 발현할 수 없게 된다. 이것을 비-인간 알부민 유전자(non-human albumin gene) 넉아웃(knockout)이라고 할 수 있다.

- [0131] 다른 예로, 세포 내 비-인간 동물 게놈(non-human animal genome) 상에 존재하는 비-인간 알부민 유전자(non-human albumin gene)의 엑손 일부분을 타겟 사이트(target site)하는 인위적 뉴클레아제를 이용하여 상기 엑손 일부분을 제거(deletion) 할 수 있다. 이 경우, 상기 세포는 비-인간 알부민(non-human albumin)을 발현할 수 없게 된다. 이것을 비-인간 알부민 유전자(non-human albumin gene) 녹아웃(knockout)이라고 할 수 있다.
- [0133] **인위적 뉴클레아제(engineered nuclease)**
- [0134] 본 출원의 용어 '인위적 뉴클레아제(engineered nuclease)'는 동물 게놈(animal genome) 에 위치-특이적 형질 전환 (site-specific transfoemation) 을 할 수 있는 단백질 또는 단백질을 포함하는 복합체(complex)를 의미한다. 상기 단백질은 자연계에서 발견되는 변형되지 않은 단백질(non-modified protein) 또는 변형된 단백질(modified/engineered protein)일 수 있다.
- [0135] 본 출원의 인위적 뉴클레아제(engineered nuclease)는 징크 핑거 뉴클레아제(Zinc Finger Nuclease; ZFN), 탈렌(Transcription Activator-Like Effector Nuclease; TALEN), 및 크리스퍼/엔자임 시스템(CRISPR/enzyme system)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0137] **타겟 사이트(target site)**
- [0138] 인위적 뉴클레아제의 타겟 사이트(target site)는 핵산(nucleic acid)에서 인위적 뉴클레아제의 일 구성 요소가 인식할 수 있는 영역을 의미할 수 있다.
- [0139] 예를 들어, 크리스퍼/엔자임 시스템(CRISPR/enzyme system)의 타겟 사이트는 핵산(nucleic acid) 상에서 가이드 핵산(guide nucleic acid)의 일부 영역과 동일하거나 상보적으로 결합할 수 있는 하나 이상의 염기 서열일 수 있다.
- [0140] 본 출원의 용어 '동일한 염기서열'의 한 예로, 우라실(Uracil; U)과 티민(Thymine; T)의 관계가 포함될 수 있다. 본 출원의 용어 '상보적으로 결합할 수 있는 염기서열'의 한 예로, 우라실(Uracil; U)과 아데닌(Adeinie; A)의 관계가 포함될 수 있다.
- [0142] 타겟 사이트(target site)는 게놈 상에 존재하는 엔도-폴리뉴클레오타이드일 수 있다.
- [0143] 타겟 사이트(target site)는 게놈에 삽입된 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)일 수 있다.
- [0146] **크리스퍼/엔자임 시스템(CRISPR/enzyme system)**
- [0147] 크리스퍼/엔자임 시스템(CRISPR/enzyme system)은 세포 내 동물 게놈(animal genome) 상의 타겟 사이트 또는 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)의 타겟 사이트와 상호작용하여 타겟 사이트의 일 부분을 자를 수 있는 단백질을 포함하는 복합체를 의미한다.
- [0148] 크리스퍼/엔자임 시스템(CRISPR/enzyme system)은 가이드 핵산(guide nucleic acid) 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제(RNA-guided endonuclease)를 포함할 수 있다.
- [0150] **가이드 핵산(guide nucleic acid)**
- [0151] 본 출원의 용어 '가이드 핵산'은 세포 내 동물 게놈(animal genome)의 타겟 사이트 또는 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)의 타겟 사이트와 결합할 수 있는 핵산(nucleic acid)을 의미한다. 본 출원의 용어 '가이드 핵산'은 단일 가닥 핵산 (single chain guide nucleic acid) 및 두 가닥 이상의 핵산(nucleic acid)으로 구성된 가이드 핵산(guide nucleic acid)을 포함한다.
- [0152] 단일 가닥 가이드 핵산(single chain guide nucleic acid)은 gRNA를 포함할 수 있다. gRNA는 프로토스페이스 도메인(protospacer domain), 제1 상보적 도메인(제1 complementary domain), 제2 상보적 도메인(제2 complementary domain), 근접 도메인(proximal domain) 또는 꼬리 도메인(tail domain) 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0153] 프로토스페이스 도메인(protospacer domain)은 동물 게놈(animal genome)의 타겟 사이트 일부 또는 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)의 타겟 사이트 일부와 상보적인 결합을 할 수 있는 염기 서열을 포함하는 도메인이다.
- [0154] 제1 상보적 도메인(제1 complementary domain) 및 제2 상보적 도메인(제2 complementary domain)은 서로 상보적 결합을 하여 RNA-가이드 엔도뉴클레아제(RNA-guided endonuclease)와 상호작용할 수 있는 도메인이다. 제2

상보적 도메인(제2 complementary domain)은 제1 상보적 도메인(제1 complementary domain)의 하류(downstream)에 위치할 수 있다.

[0155] 근접 도메인(Proximal domain)은 제2 상보적 도메인(제2 complementary domain)의 하류(downstream)에 위치할 수 있다.

[0156] 꼬리 도메인(Tail domain)은 gRNA의 3' 말단에 위치할 수 있다.

[0157] 두 가닥 이상의 핵산(nucleic acid)으로 구성된 가이드 핵산은 듀얼(dual) gRNA를 포함할 수 있다. 듀얼(dual) gRNA는 crRNA 및 tracrRNA를 포함할 수 있다. crRNA는 프로토스페이스 도메인(protospace domain) 및 제1 상보적 도메인(제2 complementary domain)을 포함할 수 있다. tracrRNA는 제2 상보적 도메인(제2 complementary domain), 근접 도메인(proximal domain), 및 꼬리 도메인(tail domain)을 포함할 수 있다.

[0159] **RNA-가이드 엔도뉴클레아제(RNA-guided endonuclease)**

[0160] 본 출원의 용어 'RNA-가이드 엔도뉴클레아제'는 폴리뉴클레오타이드와 상호작용할 수 있는 도메인 및 폴리뉴클레오타이드의 중간을 절단할 수 있는 도메인을 포함하는 폴리펩타이드(polypeptide) 또는 단백질이다.

[0161] RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 SpCas9, CjCas9, StCas9, SaCas9, NmCas9, Cpf1 단백질, 및 이들의 돌연변이(mutant)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0162] RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 변형된/엔지니어링된(modified/engineered) 목적에 따라 dead Cas9, Cas9 nickase, eSpCas9, 및 SpCas9-HF1을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0163] 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 핵산(nucleic acid)과 상호작용하여 이중 가닥을 자를 수 있다. 또는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 상호작용하여 이중 가닥 중 한 가닥을 자를 수 있다. 또는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 핵산(nucleic acid)과 상호작용을 하나 핵산(nucleic acid)을 자르지 않을 수 있다.

[0164] 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 핵산(nucleic acid)과 상호작용하여 이중 가닥을 자르거나 한 가닥을 자르는 경우, 잘린 부위에 뉴클레오타이드(nucleotide) 또는 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide) 삽입(insertion)이 발생할 수 있다. 또는, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 핵산(nucleic acid)과 상호작용하여 이중 가닥을 자르거나 한 가닥을 자르는 경우, 잘린 부위에서 뉴클레오타이드(nucleotide) 또는 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide) 제거(deletion)가 발생할 수 있다.

[0166] **크리스퍼/엔자임 시스템(CRISPR/enzyme system)의 타겟 사이트**

[0167] 세포 내 동물 게놈(animal genome)의 타겟 사이트 또는 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)의 타겟 사이트는 PAM (protospacer-adjacent motif) 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접한 염기 서열일 수 있다.

[0168] 상기 PAM 서열은 NGG, NNGRRT, NNAGAAW, NNNNGATT, NNNVRYAC, 및 TTN을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 N는 A, T, U, G, 또는 C 중 어느 하나일 수 있다. 상기 V는 A, C, 또는 G 중 어느 하나일 수 있다. 상기 W는 A 또는 T 중 어느 하나일 수 있다. 상기 Y는 C 또는 T 중 어느 하나일 수 있다.

[0169] 상기 PAM 서열은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, SpCas9 또는 그 돌연변이(mutant)는 PAM 서열이 NGG일 수 있다. 예를 들어, SaCas9 또는 그 돌연변이(mutant)는 PAM 서열이 NNGRRT일 수 있다. 예를 들어, StCas9 또는 그 돌연변이(mutant)는 PAM 서열이 NNAGAAW일 수 있다. 예를 들어, NmCas9 또는 그 돌연변이(mutant)는 PAM 서열이 NNNGATT일 수 있다. 예를 들어, CjCas9 또는 그 돌연변이(mutant)는 PAM 서열이 NNNVRYAC일 수 있다. 예를 들어, Cpf1 및 그 돌연변이(mutant)는 PAM 서열이 TTN일 수 있다.

[0171] **트랜스포존 시스템(transposon system)**

[0172] **트랜스포존(transposon)**

[0173] 본 출원의 용어 '트랜스포존(transposon)'은 세포 내 동물 게놈 상에서 위치를 바꿀 수 있는 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)이다. 또한, 본 출원의 용어 '트랜스포존(transposon)'은 세포 내에 존재하는 핵산 및 동물 게놈 사이에서 위치를 바꿀 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 의미한다. (The term 'transposon' refers to a polynucleotide which can be translocated within an animal genome in a cell. The term 'transposon' also refers to a polynucleotide which can be translocated between a nucleic acid and an animal genome in a cell.)

[0174] 상기 트랜스포존(transposon)은 Class I transposon (retrotransposon) 및 Class II transposon (DNA

transposon)으로 나눌 수 있다.

- [0175] Class I transposon은 세포 내에서 핵산(nucleic acid) 또는 동물 게놈(animal genome) 상의 트랜스포존 DNA(transposon DNA)로부터 RNA가 전사된 뒤, 상기 RNA로부터 역전사된 DNA가 동물 게놈(animal genome) 상의 다른 위치에 삽입되는 방식으로 작동한다.
- [0176] Class II transposon은 세포 내에서 핵산(nucleic acid) 또는 동물 게놈(animal genome) 상의 트랜스포존 DNA(transposon DNA)를 잘라낸 뒤, 상기 잘라낸 트랜스포존 DNA(transposon DNA)가 동물 게놈(animal genome) 상의 다른 위치에 삽입되는 방식으로 작동한다.
- [0177] 상기 Class II transposon은 5' 말단의 제1 폴리뉴클레오타이드, 3' 말단의 제2 폴리뉴클레오타이드, 및 제3 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 제1 폴리뉴클레오타이드 및 제2 폴리뉴클레오타이드는 말단 역위 반복 (inverted terminal repeat; 이하, ITR) 서열을 포함할 수 있다. 상기 제3 폴리뉴클레오타이드는 제1 폴리뉴클레오타이드 및 제2 폴리뉴클레오타이드 사이에 위치할 수 있다. 상기 제3 폴리뉴클레오타이드는 엑소-폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 제3 폴리뉴클레오타이드는 프랜즈포사아제(transposase)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0178] 이하에서 특별한 언급이 없는 한, 용어 '트랜스포존(transposon)'은 Class II 트랜스포존(Class II transposon)인 경우를 상정하나, 용어 '트랜스포존(transposon)'이 Class I 트랜스포존(Class I transposon)으로 해석되어도 기술적으로 문제가 없는 경우에는 Class II 트랜스포존(Class II transposon)으로 한정하여 해석될 필요는 없을 것이다.
- [0180] **트랜즈포사아제(transposase)**
- [0181] 본 출원의 용어 '트랜즈포사아제'는 세포 내에서 핵산(nucleic acid) 또는 동물 게놈(animal genome) 상에 위치한 Class II 트랜스포존(Class II transposon) 양 말단에 위치한 ITR 서열과 상호작용하여 Class II 트랜스포존(Class II transposon)을 잘라내거나, Class II 트랜스포존 (Class II transposon)을 동물 게놈(animal genome) 상에 삽입할 수 있는 단백질(protein)을 의미한다.
- [0182] 상기 트랜즈포사아제(transposase)는 hobo/Ac/Tam, P element, Sleeping Beauty (SB), Frog Prince, Hsmar1, Hsmar2, piggyBac (PB), Tol2, 및 이들의 돌연변이(mutant)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0183] 상기 트랜즈포사아제(transposase)는 세포 내에서 핵산(nucleic acid) 또는 동물 게놈(animal genome) 상에 존재하는 트랜스포존(transposon)을 잘라낼 수 있다.
- [0184] 상기 트랜즈포사아제(transposase)는 동물 게놈(animal genome) 상에 Class II 트랜스포존 (Class II transposon)을 삽입할 수 있다.
- [0185] 상기 트랜즈포사아제(transposase)가 동물 게놈(animal genome) 상에 Class II 트랜스포존 (Class II transposon)을 삽입하는 위치는 동물 게놈(animal genome) 상의 염기 서열과 관계가 없을 수 있다.
- [0186] 상기 트랜즈포사아제(transposase)가 동물 게놈(animal genome) 상에 Class II 트랜스포존 (Class II transposon)을 삽입하는 위치는 상기 트랜즈포사아제(transposase)가 인식할 수 있는 동물 게놈(animal genome) 상의 특정 염기 서열에 따라 결정될 수 있다. 예를 들어, Sleeping Beauty의 경우 동물 게놈(animal genome) 상의 TA 서열을 인식하여 트랜스포존(transposon)을 삽입할 수 있다. 또한 piggyBac은 동물 게놈 (animal genome) 상의 TTAA 서열을 인식하여 트랜스포존(transposon)을 삽입할 수 있다.
- [0187] 상기 트랜즈포사아제(transposase) 및 Class II 트랜스포존 (Class II transposon)은 세포 내의 동물 게놈 (animal genome)에 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)를 삽입(insertion) 하기 위한 용도로 사용될 수 있다. 예를 들어, piggyBac transposase 및 piggyBac과 상호작용할 수 있는 ITR 서열을 5'말단과 3'말단에 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)를 세포에 제공(delivery) 하여 세포 내 동물 게놈 (animal genome) 에 상기 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)를 삽입할 수 있다.
- [0188] 이 경우, 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)가 삽입될 위치를 미리 결정하거나 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)가 삽입될 위치에 따라 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)의 염기 서열을 변경할 필요가 없다.
- [0189] 또한, 세포 내 동물 게놈(animal genome)에 삽입될 수 있는 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)의 개수에 제한이 없다. 따라서 세포 내 동물 게놈(animal genome)에 목적 단백질을 암호화하는 엑소-폴리뉴클레오

타이드(exo-polynucleotide)를 복수 개 삽입하여 상기 세포의 목적 단백질의 발현량을 증가시킬 수 있다.

[0190] 또한, 트랜스포사아제(transposase)에 의해 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)가 삽입되는 위치는 세포의 유전자 발현을 방해하지 않는 위치일 수 있다. 예를 들어, piggyBac transposase의 경우, 동물 게놈(animal genome)의 인트론, 5' UTR, 또는 3' UTR 위치에 트랜스포존(transposon)을 삽입할 수 있다.

[0192] **위치-특이적 재조합(site-specific recombination)**

[0193] 본 출원의 용어 '위치-특이적 재조합(site-specific recombination)'은 핵산(nucleic acid) 또는 동물 게놈(animal genome) 상에서 동일하거나 동일성 있는 두 개의 염기 서열이 한 쌍을 이루어 한 쌍의 염기 서열 간에 상호 교환이 일어나는 현상을 의미한다. 이 경우, 상기 상호 교환이 일어나는 염기 서열을 리컴비나아제 인식 사이트(recombinase recognition site; RRS)라고 한다. 또한, 상기 한 쌍의 RRS와 상호작용하여 위치-특이적 재조합(site-specific recombination)을 촉진하는 단백질(protein)을 위치-특이적 리컴비나아제(site-specific recombinase; SSR)라고 한다.

[0195] **리컴비나아제 인식 사이트(recombinase recognition site)**

[0196] 본 출원의 리컴비나아제 인식 사이트(recombinase recognition site; RRS)는 loxp, rox, FRT, attP, attB, 및 이들의 돌연변이(mutant)를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 loxp mutant는 loxp66, loxp71, loxp72, loxp2722, loxp5171, 및 loxpm2를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 rox 돌연변이(mutant)는 rox4R, rox6R, 및 rox2N를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 FRT 돌연변이(mutant)는 F3, F5, F10, F11, F12, F13, F14, F15, 및 F16를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0197] 상기 RRS는 두 개가 한 쌍이 되어 SSR과 상호작용을 할 수 있다. 상기 loxp 또는 loxp 돌연변이(mutant)는 서로 동일한 두 개의 RRS가 한 쌍이 될 수 있다. 상기 rox 또는 rox 돌연변이(mutant)는 서로 동일한 두 개의 RRS가 한 쌍이 될 수 있다. 상기 FRT 또는 FRT 돌연변이(mutant)는 서로 동일한 두 개의 RRS가 한 쌍이 될 수 있다. 상기 attP는 attB와 한 쌍이 될 수 있다.

[0199] **위치-특이적 리컴비나아제(site-specific recombinase)**

[0200] 본 출원의 위치-특이적 리컴비나아제(site-specific recombinase; SSR) 또는 리컴비나아제(recombinase)는 Cre, Dre, Flp, KD, B2, B3, lambda, HK022, HP1, gamma delta, ParA, Tn3, Hin, Gin, Pin, phiC31, Bxb1, R4, 또는 이들의 돌연변이(mutant)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0201] 상기 SSR은 한 쌍의 RRS와 상호작용을 할 수 있다. Cre 또는 Cre 돌연변이(mutant)는 loxp 또는 loxp 돌연변이(mutant)와 특이적으로 상호작용을 할 수 있다. Dre 또는 Dre 돌연변이(mutant)는 rox 또는 rox 돌연변이(mutant)와 특이적으로 상호작용을 할 수 있다. Flp 또는 Flp 돌연변이(mutant)는 FRT 또는 FRT 돌연변이(mutant)와 특이적으로 상호작용을 할 수 있다. PhiC31 또는 phiC31 돌연변이(mutant)는 attP 및 attB와 특이적으로 상호작용을 할 수 있다.

[0203] **위치-특이적 재조합(Site-specific recombination) 종류**

[0204] 본 출원의 위치-특이적 재조합(site-specific recombination)은 삽입(insertion), 제거(deletion), 역위(inversion), 및 교체(exchange)를 포함할 수 있다.

[0205] 상기 위치-특이적 재조합(site-specific recombination)은 가역적이거나 비가역적이다.

[0207] **삽입(insertion)**

[0208] 한 쌍의 RRS 중 하나는 제1 핵산(nucleic acid)에 위치하고 다른 하나는 제2 핵산(nucleic acid)에 위치하고 있는 경우, 상기 한 쌍의 RRS에 특이적인 SSR과의 상호작용을 통해 상기 제1 핵산(nucleic acid)에 상기 제2 핵산(nucleic acid)의 삽입(insertion) 일어날 수 있다.

[0209] 상기 삽입(insertion)이 가역적인 경우, 상기 제2 핵산(nucleic acid)은 SSR과의 상호작용을 통해 제거(deletion) 될 수 있다.

[0211] **제거(deletion)**

[0212] 한 쌍의 RRS가 하나의 핵산(nucleic acid)에 같은 방향으로 위치하고 있는 경우, 상기 한 쌍의 RRS에 특이적인 SSR과의 상호작용을 통해 상기 한 쌍의 RRS 사이에 위치하는 폴리뉴클레오타이드 제거(deletion)가 일어날 수

있다.

[0213] 상기 제거(deletion)가 가역적인 경우, 한 쌍의 RRS 사이에 위치하는 폴리뉴클레오타이드 삽입(insertion)이 일어날 수 있다.

[0215] **역위(inversion)**

[0216] 한 쌍의 RRS가 하나의 핵산(nucleic acid)에 반대 방향으로 위치하고 있는 경우, 상기 한 쌍의 RRS에 특이적인 SSR과의 상호작용을 통해 상기 한 쌍의 RRS 사이에 위치하고 있는 폴리뉴클레오타이드의 역위(inversion)가 일어날 수 있다.

[0217] 상기 역위(inversion)가 가역적인 경우, 상기 한 쌍의 RRS 사이에 위치하고 있는 폴리뉴클레오타이드의 역위(inversion)가 다시 일어날 수 있다.

[0219] **교체(exchange)**

[0220] RRS A 및 RRS B가 한 쌍을 이루고 RRS C 및 RRS D가 한 쌍을 이루는 경우, 상기 RRS A 및 RRS C은 제1 핵산(nucleic acid)에 위치하고, 상기 RRS B 및 RRS D는 제2 핵산(nucleic acid)에 위치할 수 있다. 상기 제1 핵산(nucleic acid)에서 RRS C은 RRS A보다 하류(downstream)에 위치하고, 상기 제2 핵산(nucleic acid)에서 RRS D는 RRS B보다 하류(downstream)에 위치할 수 있다 이 경우 첫 번째 쌍의 RRS에 특이적인 SSR과의 상호작용 및 두 번째 쌍의 RRS와 쌍을 이루는 SSR과의 상호작용이 발생할 수 있다. RRS A 및 RRS C 사이에 위치한 폴리뉴클레오타이드와 RRS B 및 RRS D 사이에 위치한 폴리뉴클레오타이드의 교체(exchange)가 일어날 수 있다.

[0221] 상기 교체(exchange)가 가역적인 경우, 상기 RRS A 및 RRS C 사이에 위치한 폴리뉴클레오타이드와 상기 RRS B 및 RRS D 사이에 위치한 폴리뉴클레오타이드의 교체(exchange)가 다시 일어날 수 있다.

[0223] **마커 유전자(marker gene)**

[0224] 본 출원의 용어 '마커 유전자(marker gene)'는 의도하는 형질 전환이 이루어진 세포를 선별하기 위해 세포 내 동물 게놈(animal genome)상에 삽입하는 유전자를 의미한다. 마커 유전자(marker gene)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)를 세포에 도입한 뒤, 상기 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)가 동물 게놈(animal genome)에 삽입(insertion)된 경우, 상기 마커 유전자(marker gene)가 세포 내에서 발현되어 세포를 선별하는데 도움을 줄 수 있다.

[0225] 상기 마커 유전자(marker gene)는 항생제 저항성 유전자(antibiotic resistance gene), 항원 유전자(antigen gene), 루시페라아제 유전자(luciferase gene), 베타-갈락토시다아제 유전자(beta-galactosidase gene), 형광 단백질 유전자(fluorescent protein gene), 표면 단백질 유전자(surface marker gene), 및 자살 유전자(suicide gene)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0226]

[0227] **항생제 저항성 유전자(antibiotic resistance gene)**

[0228] 상기 마커 유전자(marker gene)가 항생제 저항성 유전자(antibiotic resistance gene)인 경우, 항생 물질(antibiotic compound)을 함께 배양하여 세포 선별(cell selection)을 할 수 있다. 상기 항생 물질(antibiotic compound)은 암피실린(ampicillin), 클로로암페니콜(chloroamphenicol), 테트라사이클린(tetracycline), 및 카나마이신(kanamycin)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0230] **항원 유전자(antigen gene)**

[0231] 상기 마커 유전자(marker gene)가 항원(antigen)을 암호화하는 유전자 또는 항원(antigen)으로 작용할 수 있는 뉴클레오타이드(nucleotide)를 포함한 유전자인 경우, 상기 항원(antigen)에 특이적으로 상호작용 할 수 있는 항체(antibody)를 함께 배양하여 세포 선별(cell selection)을 할 수 있다. 상기 항원(antigen)은 표면 항원(surface antigen)을 포함할 수 있다. 상기 표면 항원(surface antigen)은 CD 분자(CD molecule)를 포함할 수 있다. 상기 항체(antibody)는 마그네틱 입자(magnetic particle) 또는 형광 물질(fluorophore)과 상호작용 할 수 있다.

[0233] **루시페라아제 유전자(luciferase gene)**

[0234] 상기 마커 유전자(marker gene)가 루시페라아제 유전자(luciferase gene)인 경우, 루시페린(luciferin)을 함께

배양하여 세포 선별(cell selection)을 할 수 있다.

[0236] **베타-갈락토시다아제 유전자(beta-galactosidase gene)**

[0237] 상기 마커 유전자(marker gene)가 베타-갈락토시다아제 유전자(beta-galactosidase gene)인 경우, X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-d-galactopyranoside)을 함께 배양하여 세포 선별(cell selection)을 할 수 있다.

[0239] **형광 단백질 유전자(fluorescent protein gene)**

[0240] 상기 마커 유전자(marker gene)가 형광 단백질 유전자인 경우, 형광 신호(fluorescence signal)를 측정하여 세포 선별(cell selection)을 할 수 있다. 상기 형광 단백질(fluorescent protein)은 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein; 이하 GFP), 황색 형광 단백질(yellow fluorescent protein; 이하 YFP), 및 적색 형광 단백질(red fluorescent protein; 이하 RFP)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0242] **자살 유전자(suicide gene)**

[0243] 상기 마커 유전자(marker gene)가 자살 유전자(suicide gene)인 경우, 상기 자살 유전자(suicide gene)와 짝을 이루는 프로드러그(prodrug)를 함께 배양하여 세포 선별(cell selection) 할 수 있다. 상기 자살 유전자(suicide gene)는 티미딘 키나아제 유전자(thymidine kinase gene), 시토신 데아미나아제 유전자(cytosine deaminase gene), 시토크롬 P450 유전자(cytochrome P450 gene), 니트로환원효소 유전자(nitroreductase gene), 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라아제 유전자(purine nucleoside phosphorylase gene), 및 카복시펩티다아제 G2 유전자(carboxypeptidase G2 gene)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 프로드러그(produrg)는 아시클로버(acyclovir), 강시클로버(ganciclovir), 5-플루오로시토신(5-fluorocytosine), 사이클로포스파미드(cyclophosphamide), 이포스파마이드(ifosfamide), 5-[아지리딘-1-일]-2,4-다이니트로벤즈아미이드(5-[aziridin-1-yl]-2,4-dinitrobenzamide)(CB1954), 6-메틸퓨린-2-데옥시리보사이드(6-methylpurine-2-deoxyriboside)(MeP-dR), 아라비노푸라노실-2-플루오로아데닌 모노포스페이트(arabinofuranosyl-2-fluoroadenine monophosphate)(F-araA), 및 N,N-[(2-클로로에틸)(2-메실옥시에틸)아미노벤조산](N,N-[(2-chloroethyl)(2-mesyloxyethyl)amino]benzoic acid)(CMDA)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0245] **발현 조절 요소**

[0246] 본 출원의 용어 '발현 조절 요소'는 전사 조절 요소, 전사 후 가공 조절 요소, 번역 조절 요소, 및 번역 후 변형 조절 요소를 포함한다.

[0248] **전사 조절 요소**

[0249] 본 출원의 용어 '전사 조절 요소'는 RNA 또는 폴리펩타이드(polypeptide)를 암호화하고 있는 폴리뉴클레오타이드로부터 mRNA의 합성을 개시하거나, 촉진하거나, 억제하거나, 종료할 수 있는 물질 또는 염기 서열을 의미한다.

[0250] 상기 전사 조절 요소는 인핸서(enhancer), 사일런서(silencer), 리프레서(repressor), 활성제(activator), 억제제(inhibitor), 프로모터, 전사 종결 코돈, 및 loxp-전사 종결 코돈-loxp (이하 LTL)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 전사 종결 코돈은 poly T 서열 및 AATAAA 서열을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0252] **전사 후 가공 조절 요소**

[0253] 본 출원의 용어 '전사 후 가공 조절 요소'는 폴리뉴클레오타이드로부터 합성된 mRNA의 구조에 변형을 일으킬 수 있는 화학 물질(chemical compound), 폴리뉴클레오타이드, 또는 효소를 의미한다.

[0254] 상기 전사 후 가공 조절 요소는 5' 캡핑(5' capping), 3' 절단(3'cleavage), 3' 폴리아데닐화(3'polyadenylation), 또는 스플라이싱(splicing)을 일으킬 수 있는 화학 물질(chemical compound), 폴리뉴클레오타이드, 또는 효소를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0256] **번역 조절 요소**

[0257] 본 출원의 용어 '번역 조절 요소'는 mRNA로부터 폴리펩타이드(polypeptide)의 합성을 개시하거나, 촉진하거나, 억제하거나, 종료할 수 있는 물질 또는 염기 서열을 의미한다.

[0258] 상기 번역 조절 요소는 3' 비번역 부위(3' untranslated region; 이하 3' UTR), 5' 비번역 부위(5' untranslated region; 이하 5' UTR), 엑손,인트론, 개시코돈, 종결 코돈, 코작 서열, IRES, 2A 펩타이드

(peptide)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, loxp-stop codon-loxp (이하 LSL)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0260] **번역 후 변형 조절 요소**

[0261] 본 출원의 용어 '번역 후 변형 조절 요소'는 mRNA로부터 합성된 폴리펩타이드(polypeptide)의 구조에 변형을 일으킬 수 있는 화학 물질(chemical compound), 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide), 또는 효소(enzyme)를 의미한다.

[0262] 상기 번역 후 변형 조절 요소는 상기 폴리뉴클레오타이드로부터 전사 및 번역된 폴리펩타이드의 당화, 접힘, 유비퀴틴화(ubiquitination), 수모화(sumoylation), 아세틸화(acetylation), 또는 인산화(phosphorylation)를 일으킬 수 있는 화학 물질(chemical compound) 또는 효소(enzyme)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0264] **프로모터 (promoter)**

[0265] 본 출원의 '프로모터'는 핵산 상에서 RNA 폴리머라아제(polymerase)와 상호작용하여 전사를 개시하도록 하는 핵산 서열(nucleic acid sequence)이다. 본 출원의 '프로모터'는 구성 발현 프로모터(constitutive promoter), 조직 특이적 프로모터(tissue-specific promoter), 및 유도 프로모터(inducible promoter)를 포함한다.

[0267] **구성 발현 프로모터 (constitutive promoter)**

[0268] 본 출원의 '구성 발현 프로모터(constitutive promoter)'는 세포 내의 환경 변화와 관계 없이 전사를 개시하도록 하는 프로모터를 의미한다. 상기 구성 발현 프로모터(constitutive promoter)는 CMV 프로모터(CMV promoter), CAG 프로모터(CAG promoter), 및 U6 프로모터(U6 promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0270] **조직 특이적 프로모터 (tissue-specific promoter)**

[0271] 본 출원의 '조직 특이적 프로모터(tissue-specific promoter)'는 동물(animal)의 특정 조직(tissue)에서만 전사를 개시할 수 있는 프로모터를 의미한다. 상기 조직 특이적 프로모터(tissue-specific promoter)는 유선 조직 또는 생식 기관 특이적인 프로모터를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0272] 유선 조직에 특이적인 프로모터는 알파-카제인 프로모터(alpha-casein promoter), 베타-카제인 프로모터(beta-casein promoter), 카파-카제인 프로모터(kappa-casein promoter), 뮤-카제인 프로모터(mu-casein promoter), 및 베타-락토글로불린 프로모터(beta-lactoglobulin promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0273] 생식 기관 특이적인 프로모터는 난소-특이적 프로모터(ovarian-specific promoter) 및 정소-특이적 프로모터(testis-specific promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0275] **유도 프로모터(inducible promoter)**

[0276] 본 출원의 '유도 프로모터(inducible promoter)'는 세포 내의 환경 변화 또는 외부 환경 변화에 따라 전사를 개시하도록 하는 프로모터를 의미한다. 상기 유도 프로모터(inducible promoter)는 화학적 유도 프로모터(chemically inducible promoter), 온도 유도 프로모터(temperature inducible promoter), 및 빛 유도 프로모터(light inducible promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0277] 상기 화학적 유도 프로모터(chemically inducible promoter)는 항생-유도 프로모터(antibiotic-inducible promoter), 알코올-유도 프로모터(alcohol-inducible promoter), 스테로이드-유도 프로모터(steroid-inducible promoter), 및 금속-유도 프로모터(metal-inducible promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 항생-유도 프로모터(antibiotic-inducible promoter)는 Tet-on 프로모터(Tet-on promoter), 및 Tet-off 프로모터(Tet-off promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 스테로이드-유도 프로모터(steroid-inducible promoter)는 에스트로겐-유도 프로모터(estrogen-inducible promoter)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 금속-유도 프로모터(metal-inducible promoter)는 구리-유도 프로모터(copper-inducible promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0278] 상기 온도 유도 프로모터(temperature inducible promoter)는 고온 충격-유도 프로모터(heat shock-inducible promoter) 및 저온-충격 유도 프로모터(cold shock-inducible promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 고온 충격-유도 프로모터(heat shock-promoter)는 Hsp 프로모터(Hsp promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0280] **전달(delivery)**
- [0281] 본 출원의 용어 '전달'은 생명체의 기관, 조직, 세포, 또는 세포 내 소기관에 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)를 도입하는 것을 의미할 수 있다.
- [0282] 또한, 본 출원의 용어 '전달'은 생명체의 기관, 조직, 세포, 또는 세포 내 소기관에 폴리펩타이드 또는 단백질을 도입하는 것을 의미할 수 있다.
- [0283] 본 출원에서 용어 '전달'은 용어 '제공'과 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0285] **비-바이러스성 전달(non-viral delivery)**
- [0286] 상기 전달(delivery)은 비-바이러스성 전달(non-viral delivery)을 포함할 수 있다.
- [0287] 상기 비-바이러스성 전달(non-viral delivery)은 naked 핵산 벡터(naked nucleic acid vector)를 이용할 수 있다. 상기 naked 핵산 벡터(naked nucleic acid vector)는 환형 핵산 벡터(circular nucleic acid vector) 및 선형 핵산 벡터(linear nucleic acid vector)를 포함할 수 있다. 상기 환형 핵산 벡터(circular nucleic acid vector)는 플라스미드 벡터(plasmid vector)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0288] 상기 비-바이러스성 전달(non-viral delivery)은 비-바이러스성 벡터(non-viral vector)를 이용할 수 있다. 상기 비-바이러스성 벡터(non-viral vector)는 인공 염색체(tificial chromosome), 리포솜(liposome), 폴리머(polymer), 지질-고분자 혼성체(lipid-polymer hybrid), 무기 나노입자(inorganic nanoparticle), 및 유기 나노입자(organic nanoparticle)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0289] 상기 비-바이러스성 전달(non-viral delivery)은 미세 주입(microinjection), 유전자 총(gene gun), 전기 천공법(electroporation), 소노포레이션(sonoporation), 포토포레이션(photoporation), 마그네토펙션(magnetofection), 및 하이드로포레이션(hydroporation)을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0291] **바이러스성 전달(viral delivery)**
- [0292] 상기 유전자 전달(delivery)은 바이러스성 전달(viral delivery)을 포함할 수 있다.
- [0293] 상기 바이러스성 전달(viral delivery)은 RNA-기반 바이러스성 벡터(RNA-based viral vector)를 이용할 수 있다. 상기 RNA-기반 바이러스성 벡터(RNA-based viral vector)는 온코레트로바이러스 벡터(Oncoretroviral vector), 렌티 바이러스 벡터(Lentiviral vector), 및 인간 포말 바이러스 벡터(Human foamy viral vector)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0294] 상기 바이러스성 전달(viral delivery)은 DNA-기반 바이러스성 벡터(DNA-based viral vector)를 이용할 수 있다. 상기 DNA-기반 바이러스성 벡터(DNA-based viral vector)는 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated virus), 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr virus), 단순헤르페스바이러스(Herpes simplex virus), 및 수두바이러스(Poxvirus)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0295] 바이러스성 전달(viral delivery)의 경우, 큰 사이즈(large size) 유전자의 전달 효율이 좋다는 장점이 존재한다.
- [0297] **미세주입(microinjection)**
- [0298] 본 출원에서 용어 '미세주입(microinjection)'은 생명체의 기관, 조직, 세포, 또는 세포 내 소기관에 물질을 주사하는 것을 의미한다. 상기 물질은 화학 물질(chemical compound), 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide), 또는 폴리펩타이드(polypeptide)를 포함할 수 있다.
- [0299] 본 출원에서 용어 '미세주입(microinjection)'은 생식세포 미세주입(gamete microinjection), 접합체 미세주입(zygote microinjection), 배아 미세주입(embryo microinjection), 및 체세포 미세주입(somatic cell microinjection)을 포함할 수 있다.
- [0300] 본 출원의 용어 '생식세포 미세주입(gamete microinjection)'은 생식세포(gamete)에 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 물질을 미세주입(microinjection) 하는 것을 의미한다. 본 출원의 용어 '생식세포 미세주입(gamete microinjection)'은 생식세포(gamete)에 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 물질을 미세주입(microinjection) 한 뒤 수정 단계, 분화 단계 등을 거쳐 형질 전환 동물을 얻는 기술을 포함한다.
- [0301] 본 출원의 용어 '접합체 미세주입(zygote microinjection)'은 접합체(zygote)에 폴리뉴클레오타이드를 포함하는

물질을 미세주입(microinjection) 하는 것을 의미한다. 본 출원의 용어 '접합체 미세주입(zygote microinjection)'은 접합체(zygote)에 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 물질을 미세주입(microinjection) 한 뒤 분화 단계 등을 거쳐 형질 전환 동물을 얻는 기술을 포함한다.

[0302] 본 출원의 용어 '배아 미세주입(embryo microinjection)'은 배아(embryo)에 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 물질을 미세주입(microinjection) 하는 것을 의미한다. 본 출원의 용어 '배아 미세주입(embryo microinjection)'은 배아(embryo)에 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 물질을 미세주입(microinjection) 한 뒤 분화 단계 등을 거쳐 형질 전환 동물을 얻는 기술을 포함한다.

[0303] 본 출원의 '체세포 미세주입(somatic cell microinjection)'은 체세포(somatic cell)에 폴리뉴클레오타이드를 포함한 물질을 미세주입(microinjection) 하는 것을 의미한다.

[0305] **핵 이식(nuclear transfer)**

[0306] 본 출원의 용어 '핵 이식(nuclear transfer)'은 난자(oocyte)로부터 핵(nucleus)을 제거한 뒤 상기 난자(oocyte)에 다른 세포로부터 얻은 공여 핵(donor nucleus)을 도입하는 것을 의미한다. 본 출원의 용어 '체세포 핵 이식(somatic cell nuclear transfer; SCNT)'은 상기 공여 핵(donor nucleus)을 포함하는 세포가 체세포(somatic cell)인 경우의 핵 이식(nuclear transfer)을 의미한다.

[0307] 본 출원의 용어 '핵 이식(nuclear transfer)'은 동물의 난자(oocyte)로부터 핵(nucleus)을 제거한 뒤, 동물 세포로부터 얻은 공여 핵(donor nucleus)을 도입하는 단계, 리프로그래밍(reprogramming) 단계, 분화 단계, 및 대리모 이식 단계를 거쳐 공여 핵(donor nucleus)을 포함하는 동물 세포와 동일한 유전 정보를 포함하는 동물을 얻는 기술을 포함한다. 본 출원의 용어 '체세포 핵 이식(somatic cell nuclear transfer; SCNT)'은 상기 공여 핵(donor nucleus)을 포함하는 동물 세포가 체세포(somatic cell)인 경우, 앞서 언급한 단계를 거쳐 상기 체세포(somatic cell)와 동일한 유전 정보를 포함하는 동물을 얻는 기술을 포함한다.

[0308] 상기 공여 핵(donor nucleus)을 포함하는 세포에 전달을 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 예를 들어, 체세포 미세주입(somatic cell microinjection) 한 뒤 체세포 핵 이식(SCNT)을 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다.

[0310] **동물**

[0311] 본 출원의 동물 (animal)은 비-인간 동물(non-human animal)을 포함할 수 있다.

[0312] 상기 동물은 포유류 (mammal)를 포함할 수 있다.

[0313] 상기 포유류는 유제류 (ungulate)를 포함할 수 있다.

[0314] 상기 유제류는 기제류 (perissodactyl)를 포함할 수 있다. 상기 기제류는 말을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0315] 상기 유제류는 우제류 (artiodactyl)를 포함할 수 있다. 상기 유제류는 돼지, 사슴, 소, 양, 염소를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0316] 상기 포유류는 설치류 (rodent)를 포함할 수 있다. 상기 설치류는 마우스 및 랫을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0317] 상기 포유류는 토끼목 (lagomorph)을 포함할 수 있다. 상기 토끼목은 rabbit 및 hare를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0319] **바이오리액터(bioreactor)**

[0320] 본 출원의 '바이오리액터(bioreactor)'는 생명체 내에서 발생하는 생물적 반응 또는 화학적 반응을 일으킬 수 있는 생물을 의미한다.

[0321] 상기 생물은 세포, 세포주, 및 동물을 포함할 수 있다. 상기 생물은 형질 전환 세포, 형질 전환 세포주, 및 형질 전환 동물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 바이오리액터는 형질 전환 쥐일 수 있다. 또는, 바이오리액터는 형질 전환 래트일 수 있다. 또는, 바이오리액터는 형질 전환 소일 수 있다.

[0322] 상기 바이오리액터는 목적 물질을 생산하는데 사용될 수 있다. 상기 목적 물질은 목적 단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 바이오리액터가 인간 알부민 유전자가 녹인(knockin)된 형질 전환 소인 경우, 형질 전환 소는

인간 알부민을 생산하는데 사용될 수 있다.

- [0325] **[PART I] 툴박스(Toolbox)**
- [0326] **1. 툴박스(Toolbox)의 정의**
- [0327] 본 출원의 용어 'Toolbox' 또는 '툴박스'는 세포 내 동물 게놈(animal genome)에 삽입되어 있거나 삽입될 수 있는 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)를 의미한다. 상기 툴박스(Toolbox)가 삽입될 수 있는 세포는 형질 전환 세포일 수 있다. 또는 형질 전환 세포가 아닐 수 있다.
- [0328] 본 출원의 용어 '툴박스'는 세포 내 동물 게놈의 형질 전환을 하기 위한 엑소-폴리뉴클레오타이드(exo-polynucleotide)를 의미할 수 있다. 예를 들어, 툴박스(Toolbox)는 세포 내 동물 게놈에 목적 단백질을 인코딩하고 있는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 다른 예로는, 툴박스(Toolbox)는 세포 내 동물 게놈의 위치-특이적(site-specific) 형질 전환을 할 수 있는 인위적 뉴클레아제의 일 구성요소 또는 인위적 뉴클레아제의 일 구성요소를 인코딩하고 있는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 다른 예로는, 툴박스(Toolbox)는 트랜스포존(transposon)을 포함할 수 있다.
- [0330] **2. 툴박스(Toolbox)의 구성 요소**
- [0331] 툴박스(Toolbox)는 5' 말단의 제1 말단 영역, 3' 말단의 제2 말단 영역, 및 제1 말단 영역과 제2 말단 영역 사이에 위치하는 코어 영역을 포함할 수 있다.
- [0332] 상기 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역은 적어도 하나의 편집 가능한 구성요소(editing enabling component)를 포함할 수 있다. 상기 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역은 동일한 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역은 서로 다른 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0333] 상기 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역에는 ITR 서열이 포함될 수 있으며, 상기 코어 영역에는 상기 ITR 서열 사이에 존재하는 폴리뉴클레오타이드가 포함될 수 있다.
- [0334] 상기 코어 영역은 편집 가능한 구성요소(editing enabling component)를 포함할 수 있다.
- [0335] 상기 코어 영역은 단백질(protein) 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0336] 상기 코어 영역은 비-기능적 펩타이드(non-functional peptide)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0337] 상기 코어 영역은 인위적 인트론(artificial intron)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0338] 상기 코어 영역은 비-기능적 RNA(non-functional RNA)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0339] 상기 코어 영역은 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0340] 상기 코어 영역은 번역되지 않는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0341] 상기 코어 영역은 발현 조절 요소를 포함할 수 있다.
- [0342] 상기 코어 영역은 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0344] **2-1. 편집 가능한 구성요소(editing enabling component)**
- [0345] **2-1-1. 리컴비나아제 인식 사이트(recombinase recognition site)**
- [0346] 툴박스는 RRS를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 RRS는 loxp, rox, FRT, attP, attB, 및 이들의 돌연변이를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 loxp 돌연변이는 loxp66, loxp71, loxp72, loxp2722, loxp5171, 및 loxpm2를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 rox 돌연변이는 rox4R, rox6R, 및 rox2N를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 FRT 돌연변이는 F3, F5, F10, F11, F12, F13, F14, F15, 및 F16를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0348] **2-1-2. 말단 역위 반복 (inverted terminal repeat; ITR) 서열**
- [0349] 툴박스는 ITR 서열을 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 ITR 서열은 hobo/Ac/Tam, P element, Sleeping Beauty (SB), Frog Prince, Hsmar1, Hsmar2, piggyBac (PB), Tol2, 또는 이들의 돌연변이와 상호작용 할 수 있다.
- [0351] **2-1-3. 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트**

- [0352] 틀박스는 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트는 크리스퍼/엔자임 시스템(CRISPR/enzyme system)의 타겟 사이트를 포함할 수 있다. 상기 타겟 사이트는 PAM 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접한 염기 서열일 수 있다.
- [0353] 틀박스는 한 쪽 말단 영역에 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트의 일부를 포함할 수 있다. 상기 틀박스는 다른 쪽 말단 영역에 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트의 다른 일부 및 PAM 서열을 포함할 수 있다.
- [0355] **2-2. 단백질이나 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(Polynucleotide encoding protein or RNA)**
- [0356] **2-2-1. 목적 단백질(target protein)**
- [0357] 틀박스는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 목적 단백질의 종류는 본 출원에서 개시되는 형질 전환 기술의 대상이 되는 세포 또는 동물에서 생성될 수 있는 한, 제한되지 않는다.
- [0358] 상기 목적 단백질은 인위적 뉴클레아제의 일 구성요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 탈렌(TALEN), RNA-가이드 엔도뉴클레아제(RNA-guided endonuclease), 또는 이들의 변형된/엔지니어링된 형태(modified/engineered form)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0359] 상기 목적 단백질은 비인간 동물 유래 단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비-인간 알부민(non-human albumin), 비-인간 인터류킨(non-human interleukin), 비-인간 인슐린(non-human insulin), 비-인간 에리트로포이에틴(non-human erythropoietin), 비-인간 항체(non-human antibody), 비-인간 오메가3(non-human omega3) 또는 이들의 변형된/엔지니어링된 형태(modified/engineered form)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0360] 상기 목적 단백질은 인간 유래 단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 인간 알부민(human albumin), 인간 인터류킨(human interleukin), 인간 인슐린(human insulin), 인간 에리트로포이에틴(human erythropoietin), 인간 감마 사슬(human gamma chain), 인간 델타 사슬(human delta chain), 인간 알파 사슬(human alpha chain), 인간 뮤 사슬(human mu chain), 인간 엡실론 사슬(human epsilon chain), 인간 카파 사슬(human kappa chain), 인간 람다사슬(human lambda chain), 또는 이들의 변형된/엔지니어링된 형태(modified/engineered form)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0362] **2-2-2. 마커 유전자(marker gene)**
- [0363] 틀박스는 마커 유전자(marker gene)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 마커 유전자는 항생제 저항성 유전자(antibiotic resistance gene), 항원 유전자(antigen gene), 루시페라아제 유전자(luciferase gene), 베타-갈락토시다아제 유전자(beta-galactosidase gene), 형광 단백질 유전자, 및 자살 유전자(suicide gene)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0365] **2-2-3. 위치-특이적 리컴비나아제(site-specific recombinase)**
- [0366] 틀박스는 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 SSR은 Cre, Dre, FIp, KD, B2, B3, lambda, HK022, HP1, gamma delta, ParA, Tn3, Hin, Gin, Pin, phiC31, Bxb1, R4, 또는 이들의 돌연변이를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0368] **2-2-4. 트랜스포사아제**
- [0369] 틀박스는 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 트랜스포사아제는 hobo/Ac/Tam, P element, Sleeping Beauty (SB), Frog Prince, Hsmar1, Hsmar2, piggyBac (PB), Tol2, 및 이들의 돌연변이를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0371] **2-2-5. 엔도뉴클레아제(endonuclease)**
- [0372] 틀박스는 엔도뉴클레아제(endonuclease)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 엔도뉴클레아제(endonuclease)는 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 탈렌(TALEN), 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0373] 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제(RNA-guided endonuclease)는 Cas9 또는 Cas9 돌연변이를 포함할 수 있다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 Cpf1 또는 Cpf1 돌연변이를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0375] **2-2-6. 가이드 핵산(guide nucleic acid)**

- [0376] 툴박스는 crRNA, tracrRNA, 또는 gRNA 중 어느 하나 이상을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다.
- [0378] **2-3. 비-기능적 폴리펩타이드(non-functional polypeptide)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드**
- [0379] 툴박스는 비-기능적 폴리펩타이드(non-functional polypeptide)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다.
- [0380] 상기 비-기능적 폴리펩타이드(non-functional polypeptide)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 일부, 마커 유전자의 일부, 위치-특이적 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 일부, 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 일부, 및 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 일부를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0381] 상기 비-기능적 폴리펩타이드(non-functional polypeptide)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 종결 코돈을 포함할 수 있다.
- [0382] 상기 비-기능적 폴리펩타이드(non-functional polypeptide)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 LSL을 포함할 수 있다.
- [0383] 상기 비-기능적 폴리펩타이드(non-functional polypeptide)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 2A 펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0384] 상기 비-기능적 폴리펩타이드(non-functional polypeptide)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 IRES를 포함할 수 있다.
- [0386] **2-4. 비번역 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(Polynucleotide encoding untranslated RNA)**
- [0387] 툴박스는 번역되지 않는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다.
- [0388] 상기 번역되지 않는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 가이드 핵산을 포함할 수 있다.
- [0389] 상기 번역되지 않는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 AATAAA 서열을 포함할 수 있다.
- [0390] 상기 번역되지 않는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 poly T를 포함할 수 있다.
- [0391] 상기 번역되지 않는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 개시코돈을 포함하지 않을 수 있다.
- [0392] 상기 번역되지 않는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 코작 서열을 포함하지 않을 수 있다.
- [0394] **2-5. 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드(Untranscribed polynucleotide)**
- [0395] 툴박스는 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다.
- [0396] 상기 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드는 프로모터일 수 있다.
- [0397] 상기 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드의 염기 서열은 세포 내 동물 게놈 상에 존재하지 않는 염기 서열일 수 있다. 이 경우, 인위적 뉴클레아제를 이용하여 세포 내 동물 게놈과는 상호작용 하지 않으면서 상기 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드를 타겟 사이트로 하는 위치-특이적 형질 전환 가능하다.
- [0398] 상기 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드의 염기 서열은 세포가 정상적으로 발현할 수 있는 단백질 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 일부 염기 서열과 동일할 수 있다. 이 경우, 상기 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드의 상류(upstream)에 프로모터가 위치하지 않을 수 있다.
- [0399] 상기 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드는 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트로 활용할 수 있다. 예를 들어, 세포 내 동물 게놈에 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 툴박스가 삽입된 경우, 상기 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드의 일부와 동일하거나 상보적으로 결합할 수 있는 gRNA 및 Cas9을 세포 내로 도입하여 상기 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드 상에 위치-특이적 형질 전환을 일으킬 수 있다.
- [0401] **2-6. 인위적 인트론(artificial intron)**
- [0402] 툴박스는 인위적 인트론(artificial intron)을 하나 이상 포함할 수 있다.
- [0403] 상기 인위적 인트론(artificial intron)은 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 함께 또는 단독으로 툴박스 내에 포함될 수 있다.

- [0404] 상기 인위적 인트론(artificial intron)은 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 유닛(단위) 내에 위치할 수 있다.
- [0405] 상기 인위적 인트론(artificial intron)은 5' 말단에 절단 주개 사이트(splice donor site) 및 3' 말단에 절단 받개 사이트(splice acceptor site)를 포함할 수 있다.
- [0406] 상기 인위적 인트론(artificial intron)의 절단 주개 사이트(splice donor site) 및 절단 받개 사이트(splice acceptor site) 사이에 RRS 를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다.
- [0407] 상기 인위적 인트론(artificial intron)은 종결 코돈을 포함할 수 있다.
- [0408] 상기 인위적 인트론(artificial intron)은 인헨서를 포함할 수 있다.
- [0409] 상기 인위적 인트론(artificial intron)은 스플라이싱(splicing)에 의해 제거될 수 있다.
- [0410] 상기 인위적 인트론(artificial intron)은 a) 목적 유전자 자체의 천연 인트론으로부터 유래 되거나 뉴클레오타이드의 치환, 결실 및/또는 삽입에 의해 변형 된 것, c) 상이한 목적 유전자로부터의 천연 인트론, d) 상이한 인트론으로부터 유래 된 것, e) 목적 유전자 및/또는 상이한 유전자의 하나 이상의 천연 인트론 서열로부터 유도된 상이한 인트론 서열로 구성된 키메라 인트론, f) 신규한 합성 된 합성 효소 인트론 또는 g) 상기의 임의의 조합에서 선택될 수 있다.
- [0411] 상기 인위적 인트론(artificial intron)은 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 발현을 증가 또는 감소시킬 수 있다.
- [0412] 상기 인위적 인트론(artificial intron)은 게놈 내 폴리뉴클레오타이드의 발현을 증가 또는 감소 시킬 수 있다.
- [0414] **2-7. 발현 조절 요소**
- [0415] 툴박스는 발현 조절 요소를 하나 이상 포함할 수 있다.
- [0416] 상기 발현 조절 요소는 전사 조절 요소를 포함할 수 있다. 상기 전사 조절 요소는 앞서 제시한 바와 같다.
- [0417] 상기 발현 조절 요소는 전사 후 가공 조절 요소를 포함할 수 있다. 상기 발현 조절 요소는 앞서 제시한 바와 같다.
- [0418] 상기 발현 조절 요소는 번역 조절 요소를 포함할 수 있다. 상기 번역 조절 요소는 앞서 제시한 바와 같다.
- [0419] 상기 발현 조절 요소는 번역 후 변형 조절 요소를 포함할 수 있다. 상기 번역 후 변형 조절 요소는 앞서 제시한 바와 같다.
- [0421] **2-8. 프로모터 (promoter)**
- [0422] 툴박스는 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0423] 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 구성 발현 프로모터는 앞서 제시한 바와 같다.
- [0424] 상기 프로모터는 조직 특이적 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 조직 특이적 프로모터는 앞서 제시한 바와 같다.
- [0425] 상기 프로모터는 유도 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 유도 프로모터는 앞서 제시한 바와 같다.
- [0427] **2-9. 툴박스의 구성(Construction of toolbox)**
- [0428] **2-9-1. ITR 서열-리컴비나아제 인식 사이트 또는 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트-ITR 서열**
- [0429] 툴박스의 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역은 ITR 서열을 포함할 수 있다. 상기 툴박스의 코어 영역은 적어도 하나의 리컴비나아제 인식 사이트를 포함할 수 있다.
- [0430] 툴박스는 세포 내 동물 게놈의 유전자 발현에 치명적인 영향을 주지 않으면서 엑소-폴리뉴클레오타이드를 삽입 또는 교환할 수 있는 위치를 제공할 수 있다.
- [0432] **2-9-2. ITR 서열-인위적 뉴클레아제 타겟 사이트-ITR 서열**
- [0433] 툴박스의 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역은 ITR 서열을 포함할 수 있다. 상기 툴박스의 코어 영역은 적어도 하나의 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트를 포함할 수 있다.

- [0434] 툭박스는 세포 내 동물 계놈의 유전자 발현에 치명적인 영향을 주지 않으면서 엑소-폴리뉴클레오타이드를 삽입 또는 교환할 수 있는 위치를 제공할 수 있다.
- [0436] **2-9-3. ITR 서열-인위적 뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드-리컴비나아제 인식 사이트-ITR 서열**
- [0437] 툭박스의 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역은 ITR 서열을 포함할 수 있다. 툭박스의 코어 영역은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 툭박스의 코어 영역은 적어도 하나의 리컴비나아제 인식 사이트를 포함할 수 있다.
- [0438] 상기 적어도 하나의 리컴비나아제 인식 사이트를 이용해 툭박스 내에 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입될 수 있다. 상기 리컴비나아제 인식 사이트를 이용해, 위치-특이적 형질 전환이 발생할 타겟 사이트가 변경될 수 있다.
- [0439] 상기 적어도 하나의 리컴비나아제 인식 사이트는 리컴비나아제 인식 사이트 1 (RRS 1) 및 리컴비나아제 인식 사이트 2 (RRS 2)를 포함할 수 있다. 상기 리컴비나아제 인식 사이트 1 (RRS 1)은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 상류(upstream)에 위치하고, 리컴비나아제 인식 사이트 2 (RRS 2)는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 하류(downstream)에 위치할 수 있다. 상기 리컴비나아제 인식 사이트 1 (RRS 1) 및 리컴비나아제 인식 사이트 2 (RRS 2)를 이용해 툭박스 내 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 다른 엑소-폴리뉴클레오타이드와 교환할 수 있다.
- [0441] **2-9-4. ITR 서열-RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드-가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드-리컴비나아제 인식 사이트-발현 조절 요소-ITR 서열**
- [0442] 툭박스의 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역은 ITR 서열을 포함할 수 있다. 툭박스의 코어 영역은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 툭박스의 코어 영역은 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 툭박스의 코어 영역은 적어도 하나의 리컴비나아제 인식 사이트를 포함할 수 있다. 상기 툭박스의 코어 영역은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현을 조절하는 요소 또는 가이드 핵산의 발현을 조절하는 요소 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0443] 상기 적어도 하나의 리컴비나아제 인식 사이트는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 상류(upstream) 또는 하류(downstream)에 위치할 수 있다. 상기 적어도 하나의 리컴비나아제 인식 사이트를 이용하여 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하는 요소를 삽입하거나 제거할 수 있다.
- [0444] 상기 적어도 하나의 리컴비나아제 인식 사이트는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 상류(upstream) 또는 하류(downstream)에 위치할 수 있다. 상기 적어도 하나의 리컴비나아제 인식 사이트를 이용하여 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 발현을 조절하는 요소를 삽입하거나 제거할 수 있다.
- [0445] 상기 적어도 하나의 리컴비나아제 인식 사이트는 리컴비나아제 인식 사이트 1 (RRS 1) 및 리컴비나아제 인식 사이트 2 (RRS 2)를 포함할 수 있다. 상기 리컴비나아제 인식 사이트 1 (RRS 1)은 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 상류(upstream)에 위치하고, 리컴비나아제 인식 사이트 2 (RRS 2)는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 하류(downstream)에 위치할 수 있다. 상기 리컴비나아제 인식 사이트 1(RRS 1) 및 리컴비나아제 인식 사이트 2 (RRS 2)를 이용해 툭박스 내 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제거할 수 있다.
- [0447] **2-9-5. ITR 서열-마커 유전자 -ITR 서열**
- [0448] 툭박스의 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역은 ITR 서열을 포함할 수 있다. 툭박스의 코어 영역은 적어도 하나의 마커 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 마커 유전자는 자살 유전자를 포함할 수 있다.
- [0449] 상기 마커 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 위치-특이적 형질 전환을 통해 마커 유전자를 꺼아웃 할 수 있다.
- [0451] **2-9-6. 리컴비나아제 인식 사이트-트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드-리컴비나아제 인식 사이트**
- [0452] 툭박스의 제1 말단 영역은 리컴비나아제 인식 사이트 1 (RRS 1)을 포함할 수 있다. 툭박스의 제2 말단 영역은 상기 리컴비나아제 인식 사이트 1 (RRS 1)과 한 쌍을 이루는 리컴비나아제 인식 사이트 2 (RRS 2)를 포함할 수 있다. 툭박스의 코어 영역은 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 트랜즈

포사아제는 제거-전용 트랜스포사아제 (excision-only transposase)를 포함할 수 있다.

[0453] 상기 툴박스를 이용해 세포 내 동물 게놈 상에 포함된 트랜스포존이 제거될 수 있다.

[0455] **2-9-7. 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트-ITR 서열- 엑소-폴리뉴클레오타이드 -ITR 서열 -인위적 뉴클레아제 타겟 사이트**

[0456] 툴박스의 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역은 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트를 포함할 수 있다. 툴박스의 코어 영역은 제1 ITR 서열, 제2 ITR 서열, 및 엑소-폴리뉴클레오타이드 를 포함할 수 있다. 상기 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 위치할 수 있다.

[0457] 상기 툴박스를 이용해 세포 내 동물 게놈 상에 위치-특이적 형질 전환을 하면서 엑소-폴리뉴클레오타이드를 삽입할 수 있다. 그리고 세포 내 동물 게놈 상에 위치-특이적 형질 전환을 유지하면서 엑소-폴리뉴클레오타이드만을 트랜스포사아제로 제거할 수 있다.

[0459] **3. 툴박스(Toolbox)의 기능**

[0460] 툴박스는 세포 내 동물 게놈의 형질 전환을 하는 데 필요한 단백질 또는 핵산(nucleic acid)을 발현시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 툴박스는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 툴박스를 포함하는 동물 게놈 상의 일부 염기 서열을 타겟 사이트로 하는 gRNA를 세포에 도입하는 경우, 세포 내에서 발현된 Cas9과 복합체를 형성하여 상기 동물 게놈 상의 타겟 사이트에 위치-특이적 형질 전환을 일으킬 수 있다.

[0461] 툴박스는 세포 내 동물 게놈 상에 유전자를 녹인 하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 툴박스는 인간 인터류킨 (human interleukin)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 툴박스는 세포 내 소의 게놈 (bovine genome) 상에 삽입되어 세포가 인간 인터류킨(human interleukin)을 발현하도록 할 수 있다.

[0462] 툴박스는 세포 내 동물 게놈 상에 존재하는 유전자를 녹아웃(knockout) 하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 툴박스는 세포 내 소의 게놈(bovine genome) 상에 소의 알부민(bovine albumin)의 엑손을 암호화하고 있는 폴리뉴클레오타이드의 중간에 삽입되어 세포가 소의 알부민(bovine albumin)을 발현하는 것을 방해할 수 있다.

[0463] 툴박스는 세포 내 동물 게놈 상에 형질 전환 가능한 장소를 제공할 수 있다. 예를 들어, 툴박스는 인위적 뉴클레아제의 타겟 사이트가 될 수 있는 염기 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 툴박스는 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 세포 내 소의 게놈(bovine genome)이 상기 툴박스를 포함하는 경우, 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 일부 염기 서열을 타겟 사이트로 하는 gRNA 및 Cas9을 세포 내에 도입하여 툴박스 외부의 염기 서열이 아닌 툴박스 내부의 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 일부 염기 서열에 위치-특이적 형질 전환을 일으킬 수 있다.

[0465] **[Part II] 툴박스 삽입(Toolbox insertion)**

[0466] **1. 툴박스 전달 벡터(Toolbox delivery vector)**

[0467] 툴박스를 세포 내 동물 게놈에 삽입하기 위해 툴박스를 전달 할 수 있다. 상기 툴박스를 포함하는 핵산 전달 벡터(nucleic acid delivery vector)는 naked 핵산 벡터(naked nucleic acid vector), 비-바이러스성 벡터(non-viral vector), 또는 바이러스성 벡터(viral vector) 일 수 있다.

[0469] **2. 툴박스 삽입 방법**

[0470] **2-1. 상동 재조합 (Homologous recombination) 이용**

[0471] 툴박스의 제1 말단 영역의 5' 말단에는 제1 상동 염기서열 (homology arm)이 위치할 수 있다. 툴박스의 제2 말단 영역의 3' 말단에는 제2 상동 염기서열 (homology arm)이 위치할 수 있다. 상기 제1 상동 염기서열 (homology arm)은 세포 내 동물 게놈의 일부와 동일한 염기 서열을 가질 수 있다. 상기 제2 상동 염기서열 (homology arm)은 세포 내 동물 게놈의 일부와 동일한 염기 서열을 가질 수 있다.

[0472] 상기 제1 상동 염기서열 (homology arm) 및 상기 제2 상동 염기서열 (homology arm)은 세포 내 게놈의 일부와 상호작용할 수 있다. 상기 상호작용을 통해 툴박스가 게놈에 삽입될 수 있다.

[0474] **2-2. 위치-특이적 재조합 (Site-specific recombination) 이용**

[0475] 툴박스의 제1 말단 영역은 RRS 1을 포함할 수 있다. 상기 툴박스의 제2 말단 영역은 RRS 2를 포함할 수 있다.

[0476] 상기 툴박스를 세포에 도입하기 위해 적어도 하나의 리컴비나아제가 제공될 수 있다. 상기 리컴비나아제는 RRS

1과 상호작용할 수 있는 제1 리컴비나아제를 포함할 수 있다. 상기 리컴비나아제는 RRS 2와 상호작용할 수 있는 제2 리컴비나아제를 포함할 수 있다. 상기 제1 리컴비나아제 및 제2 리컴비나아제는 서로 동일할 수 있다. 예를 들어, RRS 1은 loxp이고 RRS2는 loxp 변이체(mutant)인 경우, 제1 리컴비나아제 및 제2 리컴비나아제는 Cre일 수 있다.

[0477] 상기 적어도 하나의 리컴비나아제를 세포 내로 도입하기 위해 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 naked 핵산 벡터(naked nucleic acid vector), 비-바이러스성 벡터(non-viral vector), 바이러스성 벡터(viral vector), 또는 리컴비나아제 폴리펩타이드(recombinase polypeptide)가 사용될 수 있다.

[0478] 상기 툴박스를 세포에 도입하기 위해 상기 툴박스를 포함하는 핵산(nucleic acid)과 상기 적어도 하나의 리컴비나아제가 별개의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 툴박스를 포함하는 핵산(nucleic acid)은 DNA 플라스미드 벡터로 전달 되고, 리컴비나아제는 리컴비나아제 폴리펩타이드로 전달 될 수 있다.

[0479] 상기 툴박스를 세포에 도입하기 위해 상기 툴박스를 포함하는 핵산(nucleic acid)과 상기 적어도 하나의 리컴비나아제를 하나의 전달 벡터(delivery vector)로 제공할 수 있다. 예를 들어, 툴박스를 포함하는 핵산(nucleic acid) 및 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 하나의 DNA 플라스미드 벡터로 제공될 수 있다.

[0481] **2-3. 트랜스포존 시스템 (Transposon system) 이용**

[0482] 툴박스의 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역은 ITR 서열을 포함할 수 있다.

[0483] 상기 툴박스를 세포에 도입하기 위해 트랜스포사아제가 제공될 수 있다. 상기 트랜스포사아제는 상기 ITR 서열과 상호작용 할 수 있다.

[0484] 상기 트랜스포사아제를 세포 내에 도입하기 위해 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 naked 핵산 벡터 (naked nucleic acid vector), 비-바이러스성 벡터 (non-viral vector), 바이러스성 벡터 (viral vector), 또는 트랜스포사아제 폴리펩타이드(transposase polypeptide)가 사용될 수 있다.

[0485] 상기 툴박스를 포함하는 핵산(nucleic acid)과 상기 트랜스포사아제는 별개의 형태로 세포에 도입될 수 있다. 예를 들어, 툴박스를 포함하는 핵산(nucleic acid)은 DAN 플라스미드 벡터로 전달 되고, 트랜스포사아제는 폴리펩타이드로 전달 (delivery) 될 수 있다.

[0486] 상기 툴박스를 포함하는 핵산(nucleic acid)과 상기 트랜스포사아제는 별개의 벡터로 세포에 도입될 수 있다. 예를 들어, 툴박스를 포함하는 핵산(nucleic acid)은 DNA 플라스미드 벡터로 전달 되고, 트랜스포사아제는 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 별개의 DNA 플라스미드 벡터로 전달 될 수 있다.

[0487] 상기 툴박스를 포함하는 핵산(nucleic acid)과 상기 트랜스포사아제는 하나의 벡터로 세포에 도입될 수 있다. 예를 들어, 툴박스를 포함하는 핵산(nucleic acid) 및 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 하나의 DNA 플라스미드 벡터로 전달 될 수 있다.

[0489] **2-4. 인위적 뉴클레아제 이용**

[0490] **2-4-1. Homology Directed Repair (HDR) 이용**

[0491] 툴박스의 제1 말단 영역의 5' 말단에 제1 상동 염기서열 (homology arm)이 위치할 수 있다. 툴박스의 제2 말단 영역의 3' 말단에 제2 상동 염기서열 (homology arm)이 위치할 수 있다. 상기 제1 상동 염기서열 (homology arm)은 세포 내 동물 게놈의 일부와 동일한 염기 서열을 가질 수 있다. 상기 제2 상동 염기서열 (homology arm)은 세포 내 동물 게놈의 일부와 동일한 염기 서열을 가질 수 있다.

[0492] 상기 툴박스를 세포에 도입하기 위해 상기 툴박스를 포함하는 핵산 전달 벡터(nucleic acid delivery vector) 중 어느 하나가 사용될 수 있다.

[0493] 상기 툴박스를 세포에 도입하기 위해 인위적 뉴클레아제가 제공될 수 있다. 상기 인위적 뉴클레아제는 동물 게놈 상에 존재하는 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트에 특이적으로 작용할 수 있다. 상기 동물 게놈 상에 존재하는 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트는 상기 제1 상동 염기서열 (homology arm)과 동일하거나 상보적인 염기 서열 상에 위치하거나, 상기 제2 상동 염기서열 (homology arm)과 동일하거나 상보적인 염기 서열 상에 위치하거나, 상기 제1 상동 염기서열 (homology arm)과 동일하거나 상보적인 염기 서열 및 제2 상동 염기서열 (homology arm)과 동일하거나 상보적인 염기 서열 사이에 위치할 수 있다.

[0494] 상기 적어도 하나의 인위적 뉴클레아제는 인위적 뉴클레아제의 각 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를

포함하는 naked 핵산 벡터 (naked nucleic acid vector), 비-바이러스성 벡터 (non-viral vector), 바이러스성 벡터 (viral vector), 인위적 뉴클레아제 단백질, 인위적 뉴클레아제 단백질을 포함하는 복합체 (complex), 또는 이들의 조합 중 어느 하나로 제공될 수 있다.

[0495] 예를 들어, Cas9 단백질 및 gRNA를 포함하는 복합체가 제공될 수 있다. 다른 예로는, Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 naked 핵산 벡터 (naked nucleic acid vector)가 제공될 수 있다.

[0496] 상기 툴박스를 세포에 도입하기 위해 상기 툴박스를 포함하는 핵산(nucleic acid)과 상기 적어도 하나의 인위적 뉴클레아제가 별개의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 툴박스를 포함하는 핵산(nucleic acid)은 DNA 플라스미드 벡터로 제공되고, 인위적 뉴클레아제는 Cas9 단백질 및 gRNA를 포함하는 복합체로 제공될 수 있다. 다른 예로는, 툴박스를 포함하는 핵산은 DNA 플라스미드 벡터로 제공되고, 인위적 뉴클레아제는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 naked 핵산 벡터 (naked nucleic acid vector) 로 제공될 수 있다.

[0497] 상기 툴박스를 세포에 도입하기 위해 상기 툴박스를 포함하는 핵산과 상기 인위적 뉴클레아제가 하나의 벡터로 제공될 수 있다. 예를 들어, 툴박스를 포함하는 핵산, Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 gRNA를 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 하나의 DNA 플라스미드 벡터로 제공될 수 있다.

[0499] **2-4-2. Homology-Independent Target Integration (HITI) 이용**

[0500] Toolbox의 제1 말단 영역은 제1 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트를 포함할 수 있다. 상기 toolbox의 제2 말단 영역은 제2 인위적 뉴클레아제 타겟 사이트를 포함할 수 있다. 상기 제1 인위적 뉴클레아제 target site과 제2 인위적 뉴클레아제 target site는 서로 동일한 염기 서열을 포함할 수 있다.

[0501] 상기 toolbox를 세포에 도입하기 위해 적어도 하나의 인위적 뉴클레아제가 제공될 수 있다. 상기 인위적 뉴클레아제는 상기 제1 인위적 뉴클레아제 target site에 특이적으로 작용할 수 있는 제1 인위적 뉴클레아제를 포함할 수 있다. 상기 인위적 뉴클레아제는 상기 제2 인위적 뉴클레아제 target site에 특이적으로 작용할 수 있는 제2 인위적 뉴클레아제를 포함할 수 있다. 상기 제1 인위적 뉴클레아제 및 제2 인위적 뉴클레아제는 서로 동일할 수 있다.

[0502] 상기 적어도 하나의 인위적 뉴클레아제는 인위적 뉴클레아제의 각 구성요소를 암호화하는 polynucleotide를 포함하는 naked nucleic acid vector, non-viral vector, viral vector, 인위적 뉴클레아제 단백질, 인위적 뉴클레아제 단백질을 포함하는 복합체 (complex), 또는 이들의 조합 중 어느 하나로 제공될 수 있다.

[0503] 상기 툴박스를 세포에 도입하기 위해 상기 툴박스를 포함하는 핵산과 상기 적어도 하나의 인위적 뉴클레아제가 별개의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 툴박스를 포함하는 핵산은 DNA 플라스미드 벡터로 제공되고, 인위적 뉴클레아제는 Cas9 단백질 및 gRNA를 포함하는 복합체로 제공될 수 있다. 다른 예로는, 툴박스를 포함하는 핵산은 DNA 플라스미드 벡터로 제공되고, 인위적 뉴클레아제는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 naked 핵산 벡터 (naked nucleic acid vector)로 제공될 수 있다.

[0504] 상기 툴박스를 세포에 도입하기 위해 상기 툴박스를 포함하는 핵산과 상기 적어도 하나의 인위적 뉴클레아제가 하나의 벡터로 제공될 수 있다. 예를 들어, 툴박스를 포함하는 핵산, Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 gRNA를 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 하나의 DNA 플라스미드 벡터로 제공될 수 있다.

[0506] **3. 툴박스 삽입 좌위**

[0507] **3-1. 단일 툴박스 삽입**

세포 내 동물 게놈은 하나의 툴박스를 포함할 수 있다.

[0509] 상기 하나의 툴박스는 동물 게놈의 상염색체 중 어느 하나에 포함될 수 있다.

[0510] 상기 툴박스는 동물 게놈의 성염색체 중 어느 하나에 포함될 수 있다. 상기 툴박스는 동물 게놈의 X 염색체에 포함될 수 있다. 상기 툴박스는 동물 게놈의 Y 염색체에 포함될 수 있다.

[0512] **3-2. 복수 툴박스 삽입**

[0513] 세포 내 동물 게놈은 두 개 이상의 툴박스를 포함할 수 있다.

[0514] 상기 두 개 이상의 툴박스는 모두 서로 동일할 수 있다. (All of the two or more toolboxes may be identical

to each other.)

- [0515] 상기 두 개 이상의 툴박스 중 하나는 나머지들 중 하나와 다를 수 있다.
- [0516] (One of the two or more toolboxes may be different from one of the rest.)
- [0517] 툴박스가 다르다는 것은 툴박스의 서열이 상이한 것을 의미할 수 있다.
- [0518] 예를 들어, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제1 툴박스과 타겟 사이트에 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제2 툴박스는 서로 다른 툴박스로 볼 수 있다.
- [0520] 상기 두 개 이상의 폴리뉴클레오타이드는 모두 하나의 염색체에 포함될 수 있다. 상기 염색체는 상염색체 또는 성염색체일 수 있다.
- [0521] 상기 두 개 이상의 툴박스는 적어도 제1 툴박스 및 제2 툴박스를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 제1 툴박스는 제1 염색체에 위치할 수 있고, 상기 제2 툴박스는 상기 제1 염색체와 상이한 제2 염색체에 위치할 수 있다.
- [0522] 상기 제1 염색체는 상염색체일 수 있다.
- [0523] 상기 제1 염색체는 성염색체일 수 있다.
- [0524] 상기 제2 염색체는 상염색체일 수 있다.
- [0525] 상기 제2 염색체는 성염색체일 수 있다.

[0527] **3-3. 삽입 좌위 특징**

- [0528] 툴박스는 트랜스포사아제와 상호작용할 수 있는 염기 서열 사이에 위치할 수 있다. 상기 트랜스포사아제와 상호작용할 수 있는 염기 서열은 TA 및 TTAA를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0530] 툴박스는 세포 내 동물 게놈 상에서 단백질 또는 RNA 발현에 관여할 수 있는 폴리뉴클레오타이드 상에 위치할 수 있다.
- [0531] 예를 들어, 단백질 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 단백질 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 프로모터, 5' UTR, 인트론, 엑손, 및 3' UTR 중 어느 하나에 위치할 수 있다. 상기 툴박스는 세포 내 동물 게놈 상에서 단백질을 또는 RNA를 녹아웃 할 수도 있다. 예를 들어, 툴박스가 소의 게놈(bovine genome)의 베타-락토글로불린 유전자 (beta-lactoglobulin gene)의 엑손에 위치한 경우, 상기 소의 게놈 (bovine genome)을 포함하는 세포가 베타-락토글로불린 (beta-lactoglobulin)을 발현하는 것을 방해할 수 있다.
- [0533] 툴박스는 세포 내 동물 게놈 상에서 단백질을 또는 RNA를 발현하는 데 관여하지 않는 폴리뉴클레오타이드 상에 위치할 수 있다.
- [0534] 또한, 툴박스는 세포 내 동물 게놈 상의 세이프 하버(safe harbor) 내에 위치할 수 있다.
- [0535] 상기 동물 게놈이 쥐의 게놈(mouse genome)인 경우, 상기 쥐의 게놈(mouse genome)의 세이프 하버(safe harbor)는 이미 잘 알려진 바 있는 rosa26 좌위(locus)를 포함할 수 있다.
- [0536] 상기 동물 게놈이 소의 게놈(bovine genome)인 경우, 상기 소의 게놈(bovine genome)의 세이프 하버 (safe harbor)는 이미 잘 알려진 바 있는 소의 게놈 (bovine genome) 상의 위치를 포함할 수 있다. 상기 소의 게놈 (bovine genome)의 세이프 하버(safe harbor)는 하기 표 1의 좌위(locus)를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 좌위(locus)는 소의 염색체(bovine chromosome) 상에서 하기 표 1에 기재된 5' 말단에 가장 가까이 있는 유전자 (5' 유전자) 및 3' 말단에 가장 가까이 있는 유전자 (3' 유전자) 사이에 위치할 수 있다.

표 1

소의 게놈 염색체	좌위 번호	5'유전자	3'유전자
1	1-1	MIS184	HUNK
	1-2	ENSBTAG00000025847.3	ENSBTAG00000011051.5
2	2-1	SLC38A11	COBLL1

[0538]

3	3-1	GBP5	GBP4
	3-2	PEX19	PEA15
	3-3	PDE4B	OB-R
	3-4	PDE4B	LEPR
4	4-1	GNAT3	PHTF2
	4-2	TSGA13	MKLN1
	4-3	NPVF	C7orf31
	4-4	ENSBTAG0000001198.5	ENSBTAG00000046257.1
5	5-1	ATXN7L3B	CAPS2
	5-2	TMEM5	AVPR1A
	5-3	XRCC6BP1	CTDSP2
	5-4	MPST	KCTD17
6	6-1	DKK2	GIMD1
	6-2	PLAC8	COQ2
	6-3	LCORL	SLIT2
7	7-1	ERAP2	LNPEP
	7-2	C7H5orf30	NUDT12
9	9-1	STXBP5	SAMD5
10	10-1	ALDH6A1	VSX2
11	11-1	PTP	LRRTM4
	11-2	PSMD13	-
12	12-1	ENSBTAG00000010680.5	U2
14	14-1	CSMD3	CSMD3
15	15-1	SMAP	INSC
17	17-1	ORAI1	RNF34
18	18-1	HSD17B2	CDH13
21	21-1	TRPM1	APBA2
22	22-1	bta-mir-2370	DENND6A
25	25-1	AUTS2	ENSBTAG00000047342
26	26-1	MKI67	EBF3
	26-2	EMX2	RAB11FIP2
X	X-1	WWC3	DDX3Y
	X-2	ARAF	SYN1
	X-3	PBDC1	MAGEE2

[0539] 툴박스가 세포 내 동물 게놈 상에서 단백질 또는 RNA를 발현하는 데 관여하지 않는 폴리뉴클레오타이드 상에 위치하거나, 세포 내 동물 게놈 상에서 세이프 하버(safe harbor) 내에 위치하는 경우, 상기 툴박스는 추가적인 형질 전환을 할 수 있는 인위적 세이프 하버 (artificial safe harbor)로 활용할 수 있다. 예를 들어, 소의 게놈의 세이프 하버(safe harbor)에 위치한 툴박스가 loxp를 포함하는 경우, 상기 loxp를 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드 및 Cre 리컴비나아제를 전달 하여 세포 내 게놈의 단백질 또는 RNA 발현에 영향을 미치지 않고 상기 툴박스 내에 엑소-폴리뉴클레오타이드를 삽입 할 수 있다.

[0541] **4. 툴박스가 삽입된 형질 전환 세포**

[0542] **4-1. 단일 세포**

[0543] **4-1-1. 배수성 (ploidy)**

[0544] 적어도 하나의 툴박스를 포함하는 형질 전환 세포는 이배체 세포일 수 있다. 상기 이배체 세포는 줄기세포 (stem cell), 체세포 (somatic cell), 난원줄기세포, 난원세포 (oogonium), 제1 난모세포 (primary oocyte), 정원 줄기세포, 정원세포 (spermatogonium), 제1 정모세포 (primary spermatocyte) 및 수정란 (zygote)을 포함할 수 있다.

[0546] 적어도 하나의 툴박스를 포함하는 형질 전환 세포는 반수체 세포일 수 있다. 상기 반수체 세포는 제2 난모세포 (secondary oocyte), 난자 (ovum), 제2 정모세포 (secondary spermatocyte), 및 정자 (sperm)를 포함할 수 있다.

[0548] **4-1-2. 접합성 (zygosity)**

- [0549] 형질 전환 세포는 적어도 한 쌍의 상동 염색체를 포함할 수 있다. 상기 적어도 한 쌍의 상동 염색체는 상동 염색체 관계에 있는 제1 염색체 및 제2 염색체를 포함할 수 있다.
- [0551] 두 개 이상의 틀박스를 포함하는 형질 전환 세포는 동형접합자(homozygote)일 수 있다.
- [0552] 상기 동형접합자(homozygote)인 형질 전환 세포에서, 제1 염색체 및 제2 염색체가 포함하는 틀박스의 종류, 개수, 및 위치가 모두 동일할 수 있다.
- [0553] 상기 동형접합자(homozygote)인 형질 전환 세포에서, 제1 염색체 및 제2 염색체가 포함하는 틀박스의 종류 및 개수가 동일할 수 있다.
- [0554] 상기 동형접합자(homozygote)인 형질 전환 세포에서, 제1 염색체 및 제2 염색체가 포함하는 틀박스의 종류가 동일할 수 있다.
- [0555] 또는 상기 동형접합자(homozygote)인 형질 전환 세포에서, 제1 염색체 및 제2 염색체는 둘 다 틀박스를 포함하지 않을 수 있다.
- [0557] 두 개 이상의 틀박스를 포함하는 형질 전환 세포는 이형접합체(heterozygote) 일 수 있다.
- [0558] 상기 이형접합체(heterozygote)인 형질 전환 세포에서, 제1 염색체는 틀박스를 포함하지 않고, 제2 염색체는 적어도 하나의 틀박스를 포함할 수 있다.
- [0559] 또는 상기 이형접합체(heterozygote)인 형질 전환 세포에서, 제1 염색체가 포함하는 틀박스와 동일한 틀박스를 제2 염색체가 포함하지 않을 수 있다.
- [0561] **4-2. 세포 콜로니**
- [0562] 적어도 하나의 틀박스를 포함하는 형질 전환 세포는 세포 콜로니를 형성할 수 있다. 상기 세포 콜로니는 단일 세포로부터 배양된 세포 집단일 수 있다.
- [0564] **4-2-1. 상동성(homologous) 세포 콜로니**
- [0565] 상동성(homologous) 세포 콜로니가 포함하는 각 세포는 하나의 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 각 세포가 가지는 하나의 틀박스는 모두 동일할 수 있다. 상기 각 세포는 모두 동일한 위치에 상기 하나의 틀박스가 위치할 수 있다.
- [0566] 상동성(homologous) 세포 콜로니가 포함하는 각 세포는 두 개 이상의 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 두 개 이상의 틀박스는 제 n 틀박스를 포함할 수 있다. ($n \geq 1$, n is integer) 상기 각 세포에서 상기 제 n 틀박스의 종류 및 위치가 모두 동일할 수 있다.
- [0567] 상기 두 개 이상의 틀박스는 서로 동일할 수 있다. 또는, 상기 두 개 이상의 틀박스 중 하나는 나머지 틀박스 중 하나와 다를 수 있다.
- [0568] 이하에서, 특별한 언급이 없는 한, "제1 세포에 포함되어 있는 틀박스와 제2 세포에 포함되어 있는 틀박스가 서로 동일하다"라고 표현하였을 때, 제1 세포에 포함되어 있는 틀박스의 개수, 종류 및 위치가 제2 세포에 포함되어 있는 틀박스의 개수, 종류 및 위치와 완전히 일치하는 것을 의미한다.
- [0570] **4-2-2. 키메릭(chimeric) 세포 콜로니**
- [0571] 키메릭(chimeric) 세포 콜로니는 상동성(homologous) 세포 콜로니 외의 세포 콜로니를 의미한다.
- [0572] 키메릭(chimeric) 세포 콜로니는 틀박스가 포함되지 않는 계놈을 가지는 세포 및 적어도 하나의 틀박스가 포함된 계놈을 가지는 세포를 함께 포함할 수 있다.
- [0573] 키메릭(chimeric) 세포 콜로니는 적어도 하나의 틀박스가 포함된 계놈을 가지는 제1 세포 및 제2 세포를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 제1 세포의 계놈에 포함된 틀박스와 상기 제2 세포의 계놈에 포함된 틀박스의 종류, 틀박스의 개수 및 틀박스의 좌위 중 적어도 하나 이상은 서로 동일하지 않다.
- [0574] 예를 들어, 제1 세포의 계놈에 제1 틀박스가 포함되어 있고 제2 세포의 계놈에 동일한 종류의 제1 틀박스가 포함되어 있는 세포 콜로니의 경우, i) 상기 제1 세포의 계놈에 포함된 상기 제1 틀박스의 개수와 상기 제2 세포의 계놈에 포함된 상기 제1 틀박스의 개수가 다르거나, ii) 상기 제1 세포의 계놈에 포함된 상기 제1 틀박스의 좌위와 상기 제2 세포의 계놈에 포함된 상기 제1 틀박스의 좌위가 다른 경우 상기 세포 콜로니는 키메릭 세포

콜로니 일 수 있다.

[0575] 다른 예를 들어, 제1 세포의 게놈에 제1 툴박스가 포함되어 있고 제2 세포의 게놈에 다른 종류의 제2 툴박스가 포함되어 있는 세포 콜로니의 경우, i) 상기 제1 세포의 게놈에 포함된 상기 제1 툴박스의 개수와 상기 제2 세포의 게놈에 포함된 상기 제2 툴박스의 개수가 동일하고, ii) 상기 제1 세포의 게놈에 포함된 상기 제1 툴박스의 좌위와 상기 제2 세포의 게놈에 포함된 상기 제2 툴박스의 좌위가 모두 동일한 경우에도 상기 세포 콜로니는 키메릭 세포 콜로니 일 수 있다.

[0576] 또한, , 제1 세포의 게놈에 제1 툴박스가 포함되어 있고 제2 세포의 게놈에 다른 종류의 제2 툴박스가 포함되어 있는 세포 콜로니의 경우, i) 상기 제1 세포의 게놈에 포함된 상기 제1 툴박스의 개수와 상기 제2 세포의 게놈에 포함된 상기 제2 툴박스의 개수가 다르거나, ii) 상기 제1 세포의 게놈에 포함된 상기 제1 툴박스의 좌위와 상기 제2 세포의 게놈에 포함된 상기 제2 툴박스의 좌위가 다른 경우 상기 세포 콜로니는 키메릭 세포 콜로니 일 수 있다.

[0578] 본 출원의 용어 '좌위'는 툴박스를 기준으로 5' 말단에 가장 가까이 있는 내인성 유전자(endogenous gene) 및 3' 말단에 가장 가까이 있는 내인성 유전자(endogenous gene) 중 어느 하나 이상에 의해 특정될 수 있다.

[0580] 본 출원의 용어 '툴박스의 좌위'는 툴박스를 기준으로 5' 말단에 가장 가까이 있는 내인성 유전자(endogenous gene) 및 3' 말단에 가장 가까이 있는 내인성 유전자(endogenous gene) 중 어느 하나 이상에 의해 특정될 수 있다.

[0581] 즉, 상기 제1 툴박스의 5' 말단에 가장 가까이 있는 내인성 유전자와 상기 제2 툴박스의 5' 말단에 가장 가까이 있는 내인성 유전자가 다른 경우 상기 제1 툴박스 및 상기 제2 툴박스의 좌위가 다르다. 또한, 상기 제1 툴박스의 3' 말단에 가장 가까이 있는 내인성 유전자와 상기 제2 툴박스의 3' 말단에 가장 가까이 있는 내인성 유전자가 다른 경우 상기 제1 툴박스 및 상기 제2 툴박스의 좌위가 다르다.

[0583] **5. 툴박스가 삽입된 형질 전환 세포 선별**

[0584] **5-1. 항생제 저항성 유전자 (antibiotic resistance gene) 이용한 형질 전환 세포 선별**

[0585] 툴박스의 코어 영역은 항생제 저항성 유전자 (antibiotic resistance gene) 를 포함할 수 있다. 상기 툴박스를 포함하는 동물 세포는 항생제를 처리하였을 때 생존할 수 있다. 따라서 상기 툴박스를 포함하는 동물 세포는 상기 툴박스를 포함하지 않는 동물 세포(animal cell)와 분리 될 수 있다.

[0587] **5-2. 항원-항체 반응 이용한 형질 전환 세포 선별**

[0588] 툴박스의 코어 영역은 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 항원으로 작용할 수 있는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 툴박스를 포함하는 동물 세포는 상기 항원에 특이적인 항체와 상호작용을 할 수 있다. 따라서 상기 툴박스를 포함하는 동물 세포는 상기 툴박스를 포함하지 않는 동물 세포와 구별 될 수 있다.

[0590] **5-3. 형광 단백질(fluorescent protein)을 이용한 형질 전환 세포 선별**

[0591] 툴박스의 코어 영역은 형광 단백질(fluorescent protein)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 툴박스를 포함하는 동물 세포는 형광 신호(fluorescence signal)를 측정할 수 있다. 따라서 상기 툴박스를 포함하는 동물 세포는 상기 툴박스를 포함하지 않는 동물 세포와 구별 될 수 있다.

[0593] **5-4. 표면 마커 유전자(Surface marker gene)를 이용한 형질 전환 세포 선별**

[0594] 툴박스의 코어 영역은 표면 마커(surface marker)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 툴박스를 포함하는 동물 세포는 상기 표면 마커(surface marker)에 특이적인 항체와 상호작용을 할 수 있다. 상기 항체는 자성 입자(magnetic particle) 또는 형광단(fluorophore)과 상호작용을 할 수 있다. 따라서 상기 툴박스를 포함하는 동물 세포는 상기 툴박스를 포함하지 않는 동물 세포와 자성(magnetic property) 또는 형광 신호(fluorescence signal)를 통하여 구별 될 수 있다.

[0596] **6. 툴박스가 삽입된 형질 전환 동물**

[0597] **6-1. 툴박스가 삽입된 형질 전환 동물 개체**

[0598] 형질 전환 동물은 적어도 하나의 툴박스를 포함하는 형질 전환 세포를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0600] **6-1-1. 상동성(homologous)**

- [0601] 상동성(Homologous) 형질 전환 동물이 포함하는 각 세포는 각각 하나의 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 각 세포가 가지는 하나의 틀박스는 모두 동일할 수 있다. 상기 각 세포는 모두 동일한 염색체에 상기 하나의 틀박스가 위치할 수 있다.
- [0602] 상동성(Homologous) 형질 전환 동물이 포함하는 각 세포는 두 개 이상의 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 두 개 이상의 틀박스는 제 n 틀박스를 포함할 수 있다. ($n \geq 1$, n is integer) 상기 각 세포에서 상기 제 n 틀박스가 위치하는 염색체가 모두 동일할 수 있다.
- [0603] 상기 두 개 이상의 틀박스는 서로 동일할 수 있다. 또는 상기 두 개 이상의 틀박스 중 하나는 나머지 틀박스 중 하나와 다를 수 있다.
- [0604] 상기 상동성(homologous) 형질 전환 동물은 동형접합자(homozygote)인 형질 전환 세포를 포함할 수 있다.
- [0605] 상기 상동성(homologous) 형질 전환 동물은 이형접합체(heterozygote)인 형질 전환 세포를 포함할 수 있다.
- [0607] **6-1-2. 키메릭(chimeric)**
- [0608] 키메릭(chimeric) 형질 전환 동물은 상동성(homologous) 형질 전환 동물 외의 형질 전환 동물을 의미한다.
- [0609] 상기 키메릭(chimeric) 형질 전환 동물은 동형접합자(homozygote) 형질 전환 세포를 포함할 수 있다.
- [0610] 상기 키메릭(chimeric) 형질 전환 동물은 이형접합체(heterozygote) 형질 전환 세포를 포함할 수 있다.
- [0611] 키메릭(chimeric) 형질 전환 동물은 틀박스가 포함되지 않는 계놈을 가지는 세포 및 적어도 하나의 틀박스가 포함된 계놈을 가지는 세포를 함께 포함할 수 있다.
- [0612] 키메릭(chimeric) 형질 전환 동물은 적어도 하나의 틀박스가 포함된 계놈을 가지는 제1 세포 및 제2 세포를 포함할 수 있다. 이 때, 키메릭(chimeric) 형질 전환 동물에서 상기 제1 세포의 계놈에 포함된 틀박스와 상기 제2 세포의 계놈에 포함된 틀박스의 종류, 틀박스의 개수 및 틀박스의 좌위 중 적어도 하나 이상은 서로 동일하지 않다.
- [0613] 예를 들어, 제1 틀박스를 포함하는 계놈을 가지는 제1 세포 및 상기 제1 틀박스를 포함하는 계놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질 전환 동물의 경우, i) 상기 제1 세포의 계놈에 포함된 상기 제1 틀박스의 개수와 상기 제2 세포의 계놈에 포함된 상기 제1 틀박스의 개수가 다르거나, ii) 상기 제1 세포의 계놈에 포함된 상기 제1 틀박스의 좌위와 상기 제2 세포의 계놈에 포함된 상기 제1 틀박스의 좌위 중 적어도 하나 이상이 다른 경우 상기 형질 전환 동물은 키메릭 형질 전환 동물 일 수 있다.
- [0614] 다른 예를 들어, 제1 틀박스를 포함하는 계놈을 가지는 제1 세포 및 상기 제1 틀박스와 다른 종류의 제2 틀박스를 포함하는 계놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질 전환 동물의 경우, i) 상기 제1 세포의 계놈에 포함된 상기 제1 틀박스의 개수와 상기 제2 세포의 계놈에 포함된 상기 제2 틀박스의 개수가 동일하고, ii) 상기 제1 세포의 계놈에 포함된 상기 제1 틀박스의 좌위와 상기 제2 세포의 계놈에 포함된 상기 제2 틀박스의 좌위가 모두 동일한 경우에도 상기 형질 전환 동물은 키메릭 형질 전환 동물 일 수 있다.
- [0615] 또한, 제1 틀박스를 포함하는 계놈을 가지는 제1 세포 및 상기 제1 틀박스와 다른 종류의 제2 틀박스를 포함하는 계놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질 전환 동물의 경우, i) 상기 제1 세포의 계놈에 포함된 상기 제1 틀박스의 개수와 상기 제2 세포의 계놈에 포함된 상기 제2 틀박스의 개수가 다르거나, ii) 상기 제1 세포의 계놈에 포함된 상기 제1 틀박스의 좌위와 상기 제2 세포의 계놈에 포함된 상기 제2 틀박스의 좌위 중 적어도 하나 이상이 다른 경우 상기 형질 전환 동물은 키메릭 형질 전환 동물 일 수 있다.
- [0617] **6-2. 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물 개체 제작 방법**
- [0618] 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물을 제작하는 방법은 동물 세포로부터 제작하는 방법, 동물의 조직 또는 기관에 틀박스의 전달을 통해 제작하는 방법, 및 형질 전환 동물의 교배를 포함한다. 동물 세포로부터 제작하는 방법은 야생형 동물 세포로부터 제작하는 방법 및 형질 전환 동물 세포로부터 제작하는 방법을 포함한다.
- [0619] 상기 방법 중 어느 하나로 생산된 형질 전환 동물은 키메릭 형질 전환 동물 또는 상동성 형질 전환 동물 중 어느 하나일 수 있다.
- [0621] **6-2-1. 동물 세포로부터 제작하는 방법**
- [0622] 야생형 동물 세포에 틀박스를 전달하는 과정을 포함하여 형질 전환 동물을 제작할 수 있다.

- [0623] 예를 들어, 야생형 체세포(somatic cell)에 폴리뉴클레오타이드를 체세포 미세주입(somatic cell microinjection) 한 뒤 체세포 핵 이식(somatic cell transfer; 이하, SCNT)를 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 상동성 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0624] 예를 들어, 야생형 생식세포(gamete)에 생식세포 미세주입(gamete microinjection)을 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메라 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0625] 예를 들어, 야생형 접합체에 접합체 미세주입(zygote microinjection)을 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메라 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0626] 예를 들어, 야생형 배아에 배아 미세주입(embryo microinjection)을 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메라 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0628] 형질 전환 동물 세포를 이용하여 형질 전환 동물을 제작할 수 있다.
- [0629] 예를 들어, 형질 전환 체세포를 이용하여 SCNT를 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 상동성 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0630] 예를 들어, 형질 전환 체세포에 체세포 미세주입(somatic cell microinjection) 한 뒤 SCNT를 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 상동성 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0631] 예를 들어, 형질 전환 생식세포에 생식세포 미세주입(gamete microinjection)을 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메라 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0632] 예를 들어, 형질 전환 접합체에 접합체 미세주입(zygote microinjection)을 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메라 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0633] 예를 들어, 형질 전환 배아에 배아 미세주입(embryo microinjection)을 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메라 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0635] **6-2-2. 동물의 조직 또는 기관에 툴박스 전달(toolbox delivery)을 통해 제작하는 방법**
- [0636] 동물의 조직 또는 기관에 툴박스 전달을 통해 상기 동물을 형질 전환 동물로 만들 수 있다.
- [0637] 예를 들어, 동물의 유선 조직에 미세주입을 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메라 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0638] 예를 들어, 동물의 생식 기관에 미세주입을 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물의 생식세포로부터 얻은 자손도 형질 전환 동물일 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메라 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0640] **6-2-3. 형질 전환 동물의 교배**
- [0641] 형질 전환 동물과 야생형 동물의 교배를 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다.
- [0642] 또는, 제1 형질 전환 동물과 제2 형질 전환 동물의 교배를 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다.
- [0643] 상기 제2 형질 전환 동물은 제1 형질 전환 동물의 자손 또는 혈연 관계 (blood-related)일 수 있다. 또는 상기 제2 형질 전환 동물은 제1 형질 전환 동물과 혈연 관계가 아닐 수 있다.
- [0644] 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 제1 형질 전환 동물의 동물 계통이 포함하는 툴박스 중 일부와 동일한 툴박스를 동일한 위치에 포함할 수 있다.
- [0645] 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 제2 형질 전환 동물의 동물 계통이 포함하는 툴박스 중 일부와 동일한 툴박스를 동일한 위치에 포함할 수 있다.
- [0646] 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 상동성 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0647] 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 동형접합체인 형질 전환 세포를 포함할 수 있다. 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 이형접합체인 형질 전환 세포를 포함할 수 있다.
- [0649] **7. 툴박스 삽입된 형질 전환 동물의 이용**
- [0650] **7-1. 품종 개량 동물**

- [0651] 툼박스가 삽입된 형질 전환 동물은 품종 개량 동물로 이용될 수 있다. 상기 품종 개량 동물은 베타-락토글로불린(beta-lactoglobulin)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 녹아웃 한 소 및 오메가3 (omega3)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 녹아웃한 소를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0653] **7-2. 질환 모델 동물**
- [0654] 툼박스가 삽입된 형질 전환 동물은 질환 모델 동물로 이용될 수 있다. 상기 질환 모델 동물은 종양 억제 단백질(tumor suppressor protein)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 녹아웃 한 소를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0656] **7-3. 질병 저항성 동물**
- [0657] 툼박스가 삽입된 형질 전환 동물은 질병 저항성 동물로 이용될 수 있다. 상기 질병 저항성 동물은 프리온 단백질(prion protein)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 녹아웃 한 소를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0659] **7-4. 부산물 이용**
- [0660] 툼박스가 삽입된 형질 전환 동물의 장기, 고기, 가죽, 털, 및 체액이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0662] **7-5. 바이오리액터**
- [0663] 툼박스가 삽입된 형질 전환 동물은 바이오리액터로 이용될 수 있다. 상기 형질 전환 동물의 체액을 수득할 수 있다. 상기 체액은 유즙, 혈액, 또는 뇨를 포함할 수 있다. 상기 형질 전환 동물의 체액으로부터 생체분자(biomolecule)를 수득할 수 있다. 상기 생체분자(biomolecule)는 단백질을 포함할 수 있다. 상기 단백질은 목적 단백질을 포함할 수 있다.
- [0665] **[Part III] 툼박스 내의 RRS를 이용한 형질 전환**
- [0666] **1. 툼박스 내 RRS 삽입 구조**
- [0667] 형질 전환 세포는 동물 게놈 상에 적어도 하나의 툼박스를 포함할 수 있다. 상기 툼박스 중 어느 하나는 적어도 하나의 RRS를 포함할 수 있다.
- [0669] **1-1. 하나의 RRS를 포함하는 경우**
- [0670] 툼박스는 하나의 RRS를 포함할 수 있다.
- [0671] 예를 들어, 툼박스의 제1 말단 영역은 하나의 RRS를 포함할 수 있다. 다른 예로, 툼박스의 제2 말단 영역은 하나의 RRS를 포함할 수 있다. 다른 예로, 툼박스의 코어 영역은 하나의 RRS를 포함할 수 있다.
- [0673] **1-2. 둘 이상의 RRS를 포함하는 경우**
- [0674] 툼박스는 둘 이상의 RRS를 포함할 수 있다. 상기 둘 이상의 RRS는 RRS 1 및 RRS 2를 포함할 수 있다. 상기 RRS 1은 툼박스의 제1 말단 영역, 제2 말단 영역, 및 코어 영역 중 어느 하나에 위치할 수 있다. 상기 RRS 2는 툼박스의 제1 말단 영역, 제2 말단 영역, 및 코어 영역 중 어느 하나에 위치할 수 있다.
- [0675] 예를 들어, RRS 1 및 RRS 2는 모두 코어 영역에 위치할 수 있다. 다른 예로, RRS 1은 제1 말단 영역에 위치하고, RRS 2는 제2 말단 영역에 위치할 수 있다.
- [0676] 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 동일할 수 있다. 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 같은 방향으로 위치할 수 있다. 또는, 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 반대 방향으로 위치할 수 있다.
- [0677] 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 다를 수 있다. 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 같은 방향으로 위치할 수 있다. 또는, 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 반대 방향으로 위치할 수 있다.
- [0678] 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 다를 수 있다. 상기 RRS 1과 특이적으로 상호작용할 수 있는 SSR 1과 상기 RRS 2와 특이적으로 상호작용할 수 있는 SSR 2는 서로 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0679] 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 다를 수 있다. 상기 RRS 1 및 RRS 2는 한 쌍을 이루어 상호교환이 일어날 수 있다. 또는, 상기 RRS 1 및 RRS 2는 한 쌍을 이루지 않아 상호교환이 일어날 수 없다.
- [0681] **2. 툼박스 내 RRS를 이용하기 위한 SSR**

- [0682] **2-1. 동물 계놈 으로부터 제공되는 SSR**
- [0683] 세포 내 동물 계놈은 상기 툴박스에 포함된 RRS 중 어느 하나에 특이적인 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 RRS를 포함하는 툴박스 내에 포함될 수 있다. 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 다른 toolbox 내에 포함될 수 있다.
- [0685] **2-2. 동물 계놈 외로부터 제공되는 SSR**
- [0686] 상기 툴박스에 포함된 RRS 중 어느 하나와 상호작용할 수 있는 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 세포 내 동물 계놈 상에 존재하지 않는 경우, 상기 SSR을 제공할 수 있다. 상기 SSR을 제공하는 형태는 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 naked 핵산 벡터 (naked nucleic acid vector), 비-바이러스성 벡터 (non-viral vector), 바이러스성 벡터 (viral vector), 또는 리컴비나아제 폴리펩타이드(recombinase polypeptide) 일 수 있다.
- [0688] **3. 툴박스 내 RRS를 이용한 위치-특이적 재조합**
- [0689] **3-1. RRS를 이용한 폴리뉴클레오타이드 삽입**
- [0690] 툴박스는 적어도 하나의 RRS를 포함할 수 있다.
- [0691] 상기 툴박스를 포함하는 세포에 상기 툴박스에 포함된 RRS 중 어느 하나와 한 쌍인 RRS를 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드를 제공할 수 있다.
- [0692] 이 경우 상기 한 쌍의 RRS에 특이적인 SSR과의 상호작용을 통해 상기 툴박스에 상기 엑소-폴리뉴클레오타이드의 삽입이 일어날 수 있다.
- [0694] **3-2. RRS를 이용한 폴리뉴클레오타이드의 제거**
- [0695] 툴박스는 둘 이상의 RRS를 포함할 수 있다. 상기 둘 이상의 RRS는 RRS 1 및 RRS 2를 포함할 수 있다.
- [0696] 상기 RRS 1 및 RRS 2는 한 쌍을 이루고, 같은 방향으로 위치할 수 있다. 예를 들어, 상기 툴박스의 코어 영역에는 두 개의 loxp가 같은 방향으로 위치할 수 있다.
- [0697] 이 경우, 상기 한 쌍의 RRS에 특이적인 SSR과의 상호작용을 통해 상기 한 쌍의 RRS 사이에 위치한 폴리뉴클레오타이드의 제거가 일어날 수 있다. 예를 들어, 상기 툴박스의 코어 영역이 두 개의 loxp 사이에 gRNA를 암호화하는 polynucleotide를 포함하고 있는 경우, Cre 리컴비나아제를 제공하여 상기 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 툴박스로부터 제거할 수 있다.
- [0699] **3-3. RRS를 이용한 폴리뉴클레오타이드의 역위(inversion)**
- [0700] 툴박스는 둘 이상의 RRS를 포함할 수 있다. 상기 둘 이상의 RRS는 RRS 1 및 RRS 2를 포함할 수 있다.
- [0701] 상기 RRS 1 및 RRS 2는 한 쌍을 이루고, 반대 방향으로 위치할 수 있다.
- [0702] 이 경우, 상기 한 쌍의 RRS에 특이적인 SSR과의 상호작용을 통해 상기 한 쌍의 RRS 사이에 위치한 폴리뉴클레오타이드의 역위가 일어날 수 있다.
- [0704] **3-4. RRS를 이용한 폴리뉴클레오타이드의 교체**
- [0705] 툴박스는 둘 이상의 RRS를 포함할 수 있다. 상기 둘 이상의 RRS는 RRS 1 및 RRS 2를 포함할 수 있다.
- [0706] 상기 RRS A 및 RRS C는 한 쌍을 이루지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 툴박스의 코어 영역은 loxp (RRS A) 및 loxp2722 (RRS C)를 포함할 수 있다. 상기 loxp는 loxp2722의 상류에 위치할 수 있다.
- [0707] 상기 툴박스를 포함하는 세포에 RRS A와 한 쌍을 이루는 RRS B 및 RRS C와 한 쌍을 이루는 RRS D를 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드를 제공할 수 있다. 예를 들어, 상기 엑소-폴리뉴클레오타이드는 loxp (RRS B) 및 loxp2722 (RRS D)를 포함할 수 있다. 상기 loxp는 loxp2722의 상류에 위치할 수 있다.
- [0708] 이 경우, RRS A 및 RRS B에 특이적인 SSR과의 상호작용 및 RRS C 및 RRS D에 특이적인 SSR과의 상호작용이 발생할 수 있다. 그리고 RRS A 및 RRS C 사이에 위치한 폴리뉴클레오타이드와 RRS B 및 RRS D 사이에 위치한 폴리뉴클레오타이드의 교체가 일어날 수 있다.
- [0709] 예를 들어, 상기 툴박스의 loxp 및 loxp2722 사이에 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드가 위치하고, 상기 엑소-

폴리뉴클레오타이드의 loxp 및 loxp2722 사이에 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 위치하는 경우, Cre 리컴비나아제를 제공하여 툴박스 내에 위치한 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드와 엑소-폴리뉴클레오타이드의 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 교체 할 수 있다.

[0711] **3-5. 하나의 툴박스 내에 존재하는 2 이상의 RRS를 이용한 위치-특이적 재조합**

[0712] 툴박스는 둘 이상의 RRS를 포함할 수 있다. 상기 둘 이상의 RRS는 RRS 1 및 RRS 2를 포함할 수 있다.

[0713] 상기 RRS 1 및 RRS 2는 한 쌍을 이루지 않을 수 있다. 예를 들어, 상기 툴박스의 코어 영역은 loxp (RRS A) 및 loxp2722 (RRS C)를 포함할 수 있다. 상기 loxp는 loxp2722의 상류에 위치할 수 있다.

[0714] 상기 툴박스를 포함하는 세포에 RRS A와 한 쌍을 이루는 RRS B를 포함하는 제1 엑소-폴리뉴클레오타이드 및 RRS C와 한 쌍을 이루는 RRS D를 포함하는 제2 엑소-폴리뉴클레오타이드가 제공될 수 있다.

[0715] 예를 들어, 상기 제1 엑소-폴리뉴클레오타이드는 loxp (RRS B)를 포함할 수 있으며, 상기 제2 엑소-폴리뉴클레오타이드는 loxp2722 (RRS D)를 포함할 수 있다.

[0716] 이 경우, RRS A 및 RRS B에 특이적인 SSR과의 상호작용 및 RRS C 및 RRS D에 특이적인 SSR과의 상호작용이 발생할 수 있다. 그리고 RRS A 위치에 상기 제1 엑소-폴리뉴클레오타이드가 삽입되고, RRS C 위치에 상기 제2 엑소-폴리뉴클레오타이드가 삽입될 수 있다. 즉, 둘 이상의 RRS를 포함하는 툴박스를 포함하는 동물 계놈을 가지는 세포에는 두 종류 이상의 엑소-폴리뉴클레오타이드가 모두 삽입될 수 있다.

[0717] 전술한 바와 같이 상기 툴박스에 두 종류 이상의 엑소-폴리뉴클레오타이드는 각각 원하는 때 삽입 될 수 있을 뿐만 아니라, 툴박스에 이미 존재하고 있는 두 종류 이상의 엑소-폴리뉴클레오타이드가 제거 또는 교체 될 수 있다.

[0718] 일 예로, 상기 툴박스는 loxp, loxp mutant, rox 및 attP를 포함할 수 있다.

[0719] 예를 들어, 상기 툴박스를 포함하는 세포에 상기 박가스에 포함된 rox와 한 쌍인 rox 변이체와 Cas9으로 구성된 제1 엑소-폴리뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 이 경우 상기 rox 및 rox 변이체에 특이적인 Dre와의 상호작용을 통해 상기 툴박스에 상기 제1 엑소-폴리뉴클레오타이드의 삽입이 일어날 수 있다.

[0720] 다른 예를 들어, 상기 툴박스를 포함하는 세포에 상기 툴박스에 포함된 rox와 한 쌍인 rox 변이체와 Cas9으로 구성된 제1 엑소-폴리뉴클레오타이드 및 상기 툴박스에 포함된 attP와 한 쌍인 attB와 gRNA로 구성된 제2 엑소-폴리뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 이 경우 상기 rox 및 rox 변이체에 특이적인 Dre와의 상호작용 및 상기 attP 및 attB에 특이적인 PhiC31 와의 상호작용을 통해 상기 툴박스에 상기 제1 엑소-폴리뉴클레오타이드 및 제2 엑소-폴리뉴클레오타이드의 삽입이 일어날 수 있다. 이 때, 상기 툴박스를 포함하는 세포에서 Cas9 및 gRNA가 동시에 발현될 수 있어서, Cas9 또는 gRNA가 별도로 전달되지 않아도 CRISPR/enzyme 시스템이 작동될 수 있다.

[0721] 또 다른 예를 들어, 상기 툴박스를 포함하는 세포에 상기 툴박스에 포함된 rox와 한 쌍인 rox 변이체와 Cas9으로 구성된 제1 엑소-폴리뉴클레오타이드 및 상기 툴박스에 포함된 loxp 및 loxp 변이체와 한 쌍인 loxp 또는 loxp mutant 사이에 존재하는 제2 엑소-폴리뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 이 경우 상기 rox 및 rox 변이체에 특이적인 Dre와의 상호작용 및 상기 loxp 및 loxp 변이체에 특이적인 Cre와의 상호작용을 통해 상기 툴박스에 상기 제1 엑소-폴리뉴클레오타이드의 삽입이 일어나고 상기 제2 엑소-폴리뉴클레오타이드의 교체가 일어날 수 있다.

[0723] **3-6. 다수의 툴박스 중 원하는 툴박스에서 위치-특이적 재조합**

[0724] 전술한 바와 같이, 동일한 동물 계놈 상에 존재하는 어느 하나의 툴박스에 포함되어 있는 RRS가 다른 툴박스에 포함된 RRS와 다른 서열을 가지는 경우, 원하는 좌위에 위치하는 툴박스에서 위치-특이적 재조합이 일어날 수 있다.

[0725] 예를 들어, RRS1을 포함하는 제1 툴박스 및 RRS2를 포함하는 제2 툴박스가 포함된 동물 계놈을 가지는 형질전환 세포에 상기 RRS1과 한 쌍인 RRS1 또는 RRS1 변이체를 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 이 경우, 상기 RRS1 또는 RRS1 변이체와 특이적인 SSR1과의 상호작용을 통해, 상기 제1 툴박스에 상기 엑소-폴리뉴클레오타이드의 삽입이 일어날 수 있다.

[0726] 다른 예를 들어, RRS1 및 RRS2를 포함하는 제1 툴박스 및 RRS1 및 RRS3를 포함하는 제2 툴박스가 포함된 동물

계놈을 가지는 형질전환 세포에 상기 RRS1과 한 쌍을 이루는 RRS1 또는 RRS1 변이체 및 RRS2와 한 쌍을 이루는 RRS2 또는 RRS2 변이체 사이에 위치하는 엑소-폴리뉴클레오타이드가 제공될 수 있다. 이 경우 상기 RRS1 또는 RRS1 변이체와 특이적인 SSR1과의 상호작용 및 상기 RRS2 또는 RRS2 변이체와 특이적인 SSR2와의 상호작용을 통해, 제1 툴박스의 RRS1 및 RRS2 사이에 위치한 폴리뉴클레오타이드와 RRS1 또는 RRS1 변이체 및 RRS2 또는 RRS2 변이체 사이에 위치한 엑소-폴리뉴클레오타이드의 교체가 일어날 수 있다.

[0727] 또 다른 예를 들어, 2개 이상의 RRS1을 포함하는 제1 툴박스 및 RRS2를 포함하는 제2 툴박스가 포함된 동물 계놈을 가지는 형질전환 세포에 상기 RRS1과 한 쌍을 이루는 RRS1 또는 RRS1 변이체를 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드가 제공될 수 있다.

[0728] 이 경우, 상기 RRS1 또는 RRS1 변이체는 상기 RRS1 또는 RRS1 변이체와 특이적인 SSR1과 상호작용 할 수 있다. 그리고 제1 툴박스 내 2개의 RRS1 사이에 위치한 폴리뉴클레오타이드가 제거 된 후, 상기 제1 툴박스에 RRS1 또는 RRS1 변이체를 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드의 삽입이 일어날 수 있다.

[0730] **4. 편집된 툴박스 형질 전환 세포**

[0731] 형질 전환 세포는 적어도 하나의 툴박스를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 툴박스 중 어느 하나는 적어도 하나의 RRS를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 RRS를 이용해 위치-특이적 재조합을 통한 형질 전환이 가능하다.

[0732] 상기 형질 전환 세포는 편집된 툴박스를 포함할 수 있다. 편집된 툴박스는 상기 위치-특이적 재조합이 발생한 툴박스를 의미한다.

[0734] **4-1. 단일 세포**

[0735] **4-1-1. 배수성 (ploidy)**

[0736] 적어도 하나의 편집된 툴박스를 포함하는 형질 전환 세포는 이배체 세포일 수 있다. 상기 이배체 세포는 앞서 언급한 바와 같다.

[0737] 적어도 하나의 편집된 툴박스를 포함하는 형질 전환 세포는 반수체 세포일 수 있다. 상기 반수체 세포는 앞서 언급한 바와 같다.

[0739] **4-1-2. 접합성 (zygosity)**

[0740] 두 개 이상의 편집된 툴박스를 포함하는 형질 전환 세포는 동형접합자(homozygote)일 수 있다.

[0741] 두 개 이상의 편집된 툴박스를 포함하는 형질 전환 세포는 이형접합체(heterozygote)일 수 있다.

[0743] **4-2. 세포 콜로니**

[0744] 적어도 하나의 편집된 툴박스를 포함하는 형질 전환 세포는 세포 콜로니를 형성할 수 있다.

[0745] **4-2-1. 상동성(homologous) 세포 콜로니**

[0746] 상동성 세포 콜로니는 각 세포가 포함하는 툴박스가 서로 동일하고, 각 세포가 포함하는 편집된 툴박스도 서로 동일하다.

[0748] **4-2-2. 키메라(chimeric) 세포 콜로니**

[0749] 키메라 세포 콜로니는 상동성 세포 콜로니 외의 세포 콜로니를 의미한다.

[0751] **5. 편집된 툴박스가 삽입된 형질 전환 세포 선별**

[0752] **5-1. 형광 단백질을 이용한 형질 전환 세포 선별**

[0753] 편집된 툴박스는 형광 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0754] 예를 들어, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스에 위치-특이적 재조합을 이용하여 형광 단백질을 암호화하는 엑소-폴리뉴클레오타이드가 삽입 될 수 있다.

[0755] 따라서 상기 편집된 툴박스를 포함하는 동물 세포는 상기 편집된 툴박스를 포함하지 않는 동물 세포와 구별될 수 있다.

- [0757] **5-2. 항생제 저항성 유전자 (antibiotic resistance gene)를 이용한 형질 전환 세포 선별**
- [0758] 편집된 틀박스는 항생제 저항성 유전자를 포함할 수 있다. 동물 계능은 상기 편집된 틀박스를 포함할 수 있다.
- [0759] 예를 들어, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 틀박스에 위치-특이적 재조합을 이용하여 항생제 저항성 유전자를 암호화하는 엑소-폴리뉴클레오타이드가 삽입 될 수 있다.
- [0760] 상기 편집된 틀박스를 포함하는 동물 세포는 항생제를 처리하였을 때 생존할 수 있다. 따라서 상기 편집된 틀박스를 포함하는 동물 세포는 상기 편집된 틀박스를 포함하지 않는 동물 세포와 분리될 수 있다.
- [0762] **5-3. 항원-항체 반응을 이용한 형질 전환 세포 선별**
- [0763] 편집된 틀박스는 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 항원으로 작용할 수 있는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 동물 세포는 상기 편집된 틀박스를 포함할 수 있다.
- [0764] 예를 들어, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 틀박스에 위치-특이적 재조합을 이용하여 항원으로 작용할 수 있는 뉴클레오타이드를 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드가 삽입 될 수 있다.
- [0765] 상기 편집된 틀박스를 포함하는 동물 세포는 상기 항원에 특이적인 항체와 상호작용을 할 수 있다. 따라서 편집된 틀박스를 포함하는 동물 세포는 상기 편집된 틀박스를 포함하지 않는 동물 세포와 구별될 수 있다.
- [0767] **5-4. 표면 마커 유전자(surface marker gene)를 이용한 형질 전환 세포 선별**
- [0768] 편집된 틀박스는 표면 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 동물 세포는 상기 편집된 틀박스를 포함할 수 있다.
- [0769] 예를 들어, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 틀박스에 위치-특이적 재조합을 이용하여 표면 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입 될 수 있다.
- [0770] 상기 편집된 틀박스를 포함하는 동물 세포는 상기 표면 마커에 특이적인 항체와 상호작용을 할 수 있다. 상기 항체는 자성 입자(magnetic particle) 또는 형광단(fluorophore)과 상호작용을 할 수 있다. 따라서 상기 편집된 틀박스를 포함하는 동물 세포는 상기 편집된 틀박스를 포함하지 않는 동물 세포와 자성(magnetic property) 또는 형광 신호(fluorescence signal)를 통하여 구별될 수 있다.
- [0772] **5-5. 자살 유전자를 이용한 형질 전환 세포 선별**
- [0773] 틀박스는 자살 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 편집된 틀박스는 상기 자살 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지 않을 수 있다.
- [0774] 예를 들어, 틀박스의 코어 영역은 loxp, suicide gene, 및 loxp 변이체를 순서대로 포함할 수 있다. 이 경우, 5' 말단에 loxp를 포함하고 3' 말단에 loxp 변이체를 포함하는 엑소-폴리뉴클레오타이드를 위치-특이적 재조합을 통해 상기 자살 유전자와 교체 할 수 있다.
- [0775] 상기 편집된 틀박스를 포함하는 동물 세포는 자살 유전자를 포함하지 않아 프로드러그 (prodrug)를 제공하여도 세포 사멸(apoptosis)이 발생하지 않는다. 따라서 상기 편집된 틀박스를 포함하는 동물 세포는 상기 편집된 틀박스를 포함하지 않는 동물 세포와 구별될 수 있다.
- [0777] **6. 편집된 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물**
- [0778] **6-1. 편집된 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물 개체**
- [0779] **6-1-1. 상동성**
- [0780] 상동성 형질 전환 동물이 포함하는 각 세포는 적어도 하나의 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 틀박스는 적어도 하나의 편집된 틀박스를 포함할 수 있다.
- [0782] **6-1-2. 키메라**
- [0783] 키메라 형질 전환 동물은 상동성 형질 전환 동물 외의 형질 전환 동물을 의미한다.
- [0785] **6-2. 편집된 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물 제작 방법**
- [0786] 편집된 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물을 제작하는 방법은 동물 세포로부터 제작하는 방법, 동물의 조직 또는 기관에 엑소-폴리뉴클레오타이드 전달이나 SSR 도입을 통해 제작하는 방법, 및 형질 전환 동물의 교배를 포함한

다. 동물 세포로부터 제작하는 방법은 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스가 삽입된 형질 전환 동물 세포로부터 제작하는 방법을 포함한다.

[0787] 상기 방법 중 어느 하나로 생산된 형질 전환 동물은 키메릭 형질 전환 동물 또는 상동성 형질 전환 동물 중 어느 하나일 수 있다.

[0789] **6-2-1. 동물 세포로부터 제작하는 방법**

[0790] 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스가 삽입된 형질 전환 동물 세포로부터 편집된 툴박스가 삽입된 형질 전환 동물을 제작할 수 있다.

[0791] 예를 들어, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스가 삽입된 체세포에 SSR을 도입한 뒤 SCNT를 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 다른 예로는, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스가 삽입된 체세포에 SSR 및 적어도 하나의 RRS를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 체세포 미세주입 (somatic cell microinjection) 한 뒤 SCNT를 통해 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 상동성 형질 전환 동물일 수 있다.

[0792] 예를 들어, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스가 삽입된 생식세포에 SSR을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 생식세포 미세주입 (gamete microinjection)하여 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 다른 예로는, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스가 삽입된 생식세포에 SSR을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 및 적어도 하나의 RRS를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 생식세포 미세주입 (gamete microinjection) 하여 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메릭 형질 전환 동물일 수 있다.

[0793] 예를 들어, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스가 삽입된 접합체에 SSR을 도입하여 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 다른 예로는, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스가 삽입된 접합체에 SSR을 처리하면서 적어도 하나의 RRS를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 접합체 미세주입 (zygote microinjection) 하여 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메릭 형질 전환 동물일 수 있다.

[0794] 예를 들어, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스가 삽입된 배아에 SSR을 도입하여 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 다른 예로는, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스가 삽입된 배아에 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 적어도 하나의 RRS를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 배아 미세주입 (embryo microinjection) 하여 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메릭 형질 전환 동물일 수 있다.

[0796] **6-2-2. 동물의 조직 또는 기관에 엑소-폴리뉴클레오타이드 전달 또는 SSR 도입을 통해 제작하는 방법**

[0797] 동물의 조직 또는 기관은 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스가 삽입된 세포를 포함할 수 있다. 상기 동물의 조직 또는 기관에 SSR을 도입하거나 엑소-폴리뉴클레오타이드의 전달에 의해 편집된 툴박스를 포함하는 형질 전환 동물을 제작될 수 있다.

[0798] 예를 들어, 상기 동물의 유선 조직에 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 적어도 하나의 RRS를 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 미세주입하여 편집된 툴박스를 포함하는 형질 전환 동물이 제작될 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메릭 형질 전환 동물일 수 있다.

[0799] 예를 들어, 상기 동물의 생식 기관에 SSR을 미세주입하여 편집된 툴박스가 삽입된 형질 전환 동물이 제작될 수 있다. 상기 형질 전환 동물의 생식세포로부터 얻은 자손도 형질 전환 동물일 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메릭 형질 전환 동물일 수 있다.

[0801] **6-2-3. 형질 전환 동물의 교배**

[0802] 제1 형질 전환 동물과 제2 형질 전환 동물의 교배를 통해 형질 전환 동물이 제작될 수 있다.

[0803] 예를 들어, 적어도 하나의 RRS를 포함하는 툴박스가 삽입된 제1 형질 전환 동물과 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 툴박스가 삽입된 제2 형질 전환 동물의 교배를 통해 편집된 툴박스를 포함하는 형질 전환 동물이 제작될 수 있다.

[0804] 상기 제2 형질 전환 동물은 제1 형질 전환 동물의 자손 또는 혈연 관계 (blood-related)일 수 있다. 또는 상기 제2 형질 전환 동물은 제1 형질 전환 동물과 혈연 관계가 아닐 수 있다.

[0805] 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 제1 형질 전환 동물의 동물 게놈이 포함하는 툴박스 중 일부와 동일한 툴박스를 동일한 위치에 포함할 수 있다.

[0806] 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 제2 형질 전환 동물의 동물 게놈이 포함하는 툴박스 중 일부와 동일한

틀박스를 동일한 위치에 포함할 수 있다.

- [0807] 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 상동성 형질 전환 동물일 수 있다.
- [0808] 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 동형접합자인 형질 전환 세포를 포함할 수 있다. 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 이형접합체인 형질 전환 세포를 포함할 수 있다.
- [0810] **7. 편집된 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물의 이용**
- [0811] **7-1. 품종 개량 동물**
- [0812] 편집된 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물은 품종 개량 동물로 이용될 수 있다.
- [0814] **7-2. 질환 모델 동물**
- [0815] 편집된 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물은 질환 모델 동물로 이용될 수 있다.
- [0817] **7-3. 질병 저항성 동물**
- [0818] 편집된 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물은 질병 저항성 동물로 이용될 수 있다.
- [0819] **7-4. 부산물 이용**
- [0820] 편집된 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물의 장기, 고기, 가죽, 털, 및 체액이 이용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0822] **7-5. 바이오리액터**
- [0823] 편집된 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물은 바이오리액터로 이용될 수 있다.
- [0825] **[Part IV] 크리스퍼/엔자임 시스템 (CRISPR/enzyme system) 구성 요소(component)를 이용한 형질 전환**
- [0826] **1. 틀박스를 포함하는 세포 내로 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 가이드 핵산 도입**
- [0827] 틀박스를 포함하는 세포 내 동물 게놈 상에 위치-특이적 형질 전환을 위하여 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 가이드 핵산을 도입할 수 있다.
- [0828] 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 Cas9을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 가이드 핵산은 gRNA를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0830] **1-1. 별개 형태로 도입**
- [0831] 틀박스를 포함하는 세포 내에 상기 Cas9 및 gRNA를 별개 형태로 도입할 수 있다.
- [0832] 상기 Cas9을 제공하는 형태는 DNA 플라스미드, DNA 선형 단편 (DNA linear fragment), RNA 선형 단편 (RNA linear fragment), 및 단백질을 포함할 수 있다. 상기 RNA 선형 단편 (RNA linear fragment)은 Cas9의 mRNA를 포함할 수 있다.
- [0833] 상기 gRNA를 제공하는 형태는 DNA 플라스미드, DNA 선형 단편 (DNA linear fragment), 및 RNA 선형 단편 (RNA linear fragment)을 포함할 수 있다.
- [0834] 상기 Cas9 및 gRNA를 함께 제공하는 형태는 리보 핵산 단백질 (ribonucleoprotein;RNP)을 포함할 수 있다.
- [0836] **1-2. 하나의 전달 벡터(delivery vector)**
- [0837] 틀박스를 포함하는 세포 내에 Cas9 및 gRNA는 하나의 전달 벡터로 제공될 수 있다.
- [0838] 상기 Cas9 및 gRNA를 제공하는 형태는 하나의 DNA 선형 단편 (DNA linear fragment), 및 RNA 선형 단편 (RNA linear fragment)을 포함할 수 있다.
- [0840] **2. 틀박스 내 크리스퍼/엔자임 시스템 구성 요소**
- [0841] 세포 내 동물 게놈이 포함하는 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 가이드 핵산 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0842] 위치-특이적 형질 전환이 발생할 세포는 크리스퍼/엔자임 시스템의 구성요소 일부 또는 전부를 발현할 수 있어 간편하게 위치-특이적 형질 전환이 수행될 수 있다.

[0844] **2-1. 틀박스 내 RNA-가이드 엔도뉴클레아제**

[0845] 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 Cas9 또는 Cas9 mutant를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0847] **2-1-1. Cas9 및 프로모터 조합**

[0848] 틀박스는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0849] 상기 틀박스는 상기 Cas9의 전사를 개시할 수 있는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터(constitutive promoter), 조직 특이적 프로모터(tissue-specific promoter), 또는 유도 프로모터(inducible promoter) 중 어느 하나일 수 있다.

[0851] **2-1-2. Cas9, promoter 및 RRS 조합**

[0852] 틀박스는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 틀박스는 상기 Cas9의 전사를 개시할 수 있는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 틀박스는 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0853] 상기 틀박스는 상기 Cas9의 전사를 개시할 수 있는 프로모터의 5' 말단에 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0854] 상기 틀박스는 상기 Cas9의 전사를 개시할 수 있는 프로모터와 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0855] 상기 틀박스는 상기 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 RRS를 포함할 수 있다.

[0856] 상기 틀박스는 상기 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에 RRS를 하나 이상 포함하고, 상기 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 5' 말단의 RRS 중 어느 하나 및 상기 3' 말단의 RRS 중 어느 하나는 동일한 SSR과 상호작용 할 수 있다. 이 경우, 상기 5' 말단의 RRS 중 어느 하나 및 상기 3' 말단의 RRS 중 어느 하나가 서로 동일할 수 있다.

[0858] **2-2. 틀박스 내 가이드 핵산**

[0859] 틀박스는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다. 상기 가이드 핵산은 gRNA를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0861] **2-2-1. gRNA 및 프로모터 조합**

[0862] 틀박스는 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0863] 상기 틀박스는 gRNA의 전사를 개시할 수 있는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도 프로모터 중 어느 하나일 수 있다. 상기 gRNA의 전사를 개시할 수 있는 구성 발현 프로모터는 U6 프로모터를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0865] **2-2-2. gRNA, 프로모터, 및 RRS 조합**

[0866] 틀박스는 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 틀박스는 gRNA의 전사를 개시할 수 있는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 틀박스는 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0867] 상기 틀박스는 상기 gRNA의 전사를 개시할 수 있는 프로모터의 5' 말단에 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0868] 상기 틀박스는 상기 gRNA의 전사를 개시할 수 있는 프로모터와 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0869] 상기 틀박스는 상기 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 RRS를 포함할 수 있다.

[0870] 상기 틀박스는 상기 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에 RRS를 하나 이상 포함하고, 상기 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 5' 말단의 RRS 중 어느 하나 및 상기 3' 말단의 RRS 중 어느 하나는 동일한 SSR과 상호작용 할 수 있다. 이 경우, 상기 5' 말단의 RRS 중 어느 하나 및 상기 3' 말단의 RRS 중 어느 하나가 서로 동일할 수 있다.

[0872] **2-3. 틀박스 내 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 가이드 핵산**

[0873] 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함하고 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 Cas9을 포함

할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 가이드 핵산은 gRNA를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0875] **2-3-1. Cas9, gRNA, 및 프로모터 조합**

[0876] 툴박스는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0877] 상기 툴박스는 상기 Cas9의 전사를 개시할 수 있는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도 프로모터 중 어느 하나일 수 있다.

[0878] 상기 툴박스는 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0879] 상기 툴박스는 gRNA의 전사를 개시할 수 있는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도 프로모터 중 어느 하나일 수 있다. 상기 gRNA의 전사를 개시할 수 있는 구성 발현 프로모터는 U6 프로모터를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0881] **2-3-2. Cas9, gRNA, 프로모터, 및 RRS 조합**

[0882] 툴박스는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 툴박스는 상기 Cas9의 전사를 개시할 수 있는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 툴박스는 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 툴박스는 gRNA의 전사를 개시할 수 있는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 툴박스는 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0883] 상기 툴박스는 상기 Cas9의 전사를 개시할 수 있는 프로모터의 5' 말단에 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0884] 상기 툴박스는 상기 Cas9의 전사를 개시할 수 있는 프로모터와 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0885] 상기 툴박스는 상기 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 RRS를 포함할 수 있다.

[0886] 상기 툴박스는 상기 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에 RRS를 하나 이상 포함하고, 상기 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 5' 말단의 RRS 중 어느 하나 및 상기 3' 말단의 RRS 중 어느 하나는 동일한 SSR과 상호작용 할 수 있다. 이 경우, 상기 5' 말단의 RRS 중 어느 하나 및 상기 3' 말단의 RRS 중 어느 하나가 서로 동일할 수 있다.

[0887] 상기 툴박스는 상기 gRNA의 전사를 개시할 수 있는 프로모터의 5' 말단에 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0888] 상기 툴박스는 상기 gRNA의 전사를 개시할 수 있는 프로모터와 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다.

[0889] 상기 툴박스는 상기 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 RRS를 포함할 수 있다.

[0890] 상기 툴박스는 상기 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에 RRS를 하나 이상 포함하고, 상기 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 RRS를 하나 이상 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 5' 말단의 RRS 중 어느 하나 및 상기 3' 말단의 RRS 중 어느 하나는 동일한 SSR과 상호작용 할 수 있다. 이 경우, 상기 5' 말단의 RRS 중 어느 하나 및 상기 3' 말단의 RRS 중 어느 하나가 서로 동일할 수 있다.

[0892] **3. 크리스퍼/엔자임 시스템 작동 조절**

[0893] **3-1. RNA-가이드 엔도뉴클레아제 발현 조절**

[0894] 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 Cas9을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0896] **3-1-1. 프로모터를 이용한 Cas9 전사 조절**

[0897] 툴박스는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0898] 상기 툴박스는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 개시하는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 조직-특이적 프로모터 또는 유도 프로모터를 포함할 수 있다.

[0899] 상기 프로모터가 조직-특이적 프로모터인 경우, 상기 툴박스에 포함된 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 툴박스가 특정 조직 세포에 포함되어 있는 경우에 전사 개시될 수 있다.

[0900] 상기 조직-특이적 프로모터가 유선 조직 특이적 프로모터인 경우, 상기 툴박스에 포함된 Cas9을 암호화하는 폴

리뉴클레오타이드는 상기 틀박스가 유전 조직 세포에 포함되어 있는 경우에 전사 개시될 수 있다. 상기 유전 조직 특이적 프로모터는 알파-카제인 프로모터 (alpha-casein promoter), 베타-카제인 프로모터(beta-casein promoter), 카파-카제인 프로모터(kappa-casein promoter), 뮤-카제인 프로모터(mu-casein promoter), 및 베타-락토글로불린 프로모터(beta-lactoglobulin promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0901] 상기 조직-특이적 프로모터가 생식 기관 특이적 프로모터인 경우, 상기 틀박스에 포함된 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 틀박스가 생식세포에 포함되어 있는 경우에 전사 개시될 수 있다. 상기 생식 기관 특이적 프로모터는 난소-특이적 프로모터(ovarian-specific promoter) 및 정소-특이적 프로모터(testis-specific promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0902] Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 개시하는 프로모터가 조직-특이적 프로모터인 경우, 상기 틀박스를 포함하는 형질 전환 동물 내에서 위치-특이적 형질 전환이 일어나는 장소를 제한할 수 있다. 또한, 상기 형질 전환 동물의 다른 조직에서 불필요한 위치-특이적 형질 전환이 발생하는 것을 방지할 수 있다.

[0903] 상기 프로모터가 유도 프로모터인 경우, 특정 조건이 충족되는 경우에 전사 개시할 수 있다. 상기 유도 프로모터는 화학적인 유도 프로모터(chemically inducible promoter), 온도 유도 프로모터(temperature inducible promoter), 및 빛 유도 프로모터(light inducible promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0904] 화학적인 유도 프로모터(chemically inducible promoter)는 특정 화합물(chemical compound)이 존재하는 경우 전사를 개시할 수 있다. 상기 화학적인 유도 프로모터(chemically inducible promoter)는 항생제-유도 프로모터(antibiotic-inducible promoter), 알코올-유도 프로모터(alcohol-inducible promoter), 스테로이드-유도 프로모터(steroid-inducible promoter), 및 금속-유도 프로모터(metal-inducible promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 항생제-유도 프로모터(antibiotic-inducible promoter)는 Tet-on 프로모터(Tet-on promoter), 및 Tet-off 프로모터(Tet-off promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 스테로이드-유도 프로모터(steroid-inducible promoter)는 에스트로겐-유도 프로모터(estrogen-inducible promoter)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 금속-유도 프로모터(metal-inducible promoter)는 구리-유도 프로모터(copper-inducible promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0905] 온도 유도 프로모터(Temperature inducible promoter)는 온도 조건을 만족하는 경우 전사를 개시할 수 있다. 상기 온도 유도 프로모터(temperature inducible promoter)는 열 충격-유도 프로모터(heat shock-inducible promoter) 및 냉각 충격-유도 프로모터(cold shock-inducible promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 열 충격-유도 프로모터(heat shock-inducible promoter)는 Hsp 프로모터(Hsp promoter)를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0906] 빛 유도 프로모터(Light inducible promoter)는 빛의 과장 조건을 만족하는 경우 전사를 개시할 수 있다.

[0907] Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 개시하는 프로모터가 유도 프로모터인 경우, 상기 틀박스를 포함하는 형질 전환 세포 또는 동물 내에서 위치-특이적 형질 전환이 발생하는 시기를 조절할 수 있다.

[0909] **3-1-2. RRS를 이용한 프로모터 삽입**

[0910] 틀박스는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0911] 상기 틀박스는 RRS를 상기 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에 포함할 수 있다.

[0912] 핵산(Nucleic acid)은 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 핵산(Nucleic acid)은 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 한 쪽 말단 또는 양 말단에 RRS를 포함할 수 있다. 상기 RRS는 상기 틀박스에 포함된 RRS와 한 쌍을 이룰 수 있다.

[0913] 상기 틀박스에 상기 핵산(nucleic acid) 및 상기 RRS와 상호작용 할 수 있는 SSR을 제공할 수 있다. 상기 틀박스에 상기 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입이 일어날 수 있다. 이 경우, Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입 전에는 전사 개시되지 않다가, 삽입 후에는 전사 개시될 수 있다.

[0915] **3-1-3. 전사 종결 코돈을 이용한 Cas9 전사 조절**

[0916] 틀박스는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [0917] 상기 틀박스는 Cas9을 암호화하는 polynucleotide의 전사를 개시하는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 constitutive promoter, tissue-specific promoter, 또는 inducible promoter일 수 있다.
- [0918] 상기 틀박스는 RRS 1, 전사 종결 코돈, 및 RRS 2를 포함할 수 있다. 상기 RRS 1, 전사 종결 코돈, 및 RRS2는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 개시하는 프로모터 사이에 순서대로 위치할 수 있다. 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 동일할 수 있다. 상기 RRS 1 및 RRS 2는 loxp 를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0919] 상기 틀박스에 상기 RRS 1 및 RRS 2와 상호작용 할 수 있는 SSR을 제공할 수 있다. 상기 SSR은 Cre를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 틀박스에 RRS 1 및 RRS 2 사이에 위치한 전사 종결 코돈을 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 제거가 일어날 수 있다. 이 경우, Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로부터 전사된 mRNA는 전사 종결 코돈의 제거 전에 전사되지 않다가 전사 종결 코돈의 제거 후에는 전사될 수 있다.
- [0921] **3-1-4. 종결 코돈을 이용한 Cas9 번역 조절**
- [0922] 틀박스는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0923] 상기 틀박스는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 개시하는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도 프로모터 일 수 있다.
- [0924] 상기 틀박스는 RRS 1, 종결 코돈, 및 RRS 2를 포함할 수 있다. 상기 RRS 1, 종결 코돈, 및 RRS2는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 개시하는 프로모터 사이에 순서대로 위치할 수 있다. 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 동일할 수 있다. 상기 RRS 1 및 RRS 2는 loxp 를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0925] 상기 틀박스에 상기 RRS 1 및 RRS 2와 상호작용 할 수 있는 SSR을 제공할 수 있다. 상기 SSR은 Cre 리컴비나아제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 틀박스에 RRS 1 및 RRS 2 사이에 위치한 종결 코돈을 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 제거가 일어날 수 있다. 이 경우, Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로부터 전사된 mRNA는 종결 코돈 제거 전에 번역되지 않다가 종결 코돈 제거 후에는 번역될 수 있다.
- [0927] **3-2. 가이드 핵산 발현 조절**
- [0928] 틀박스는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다. 상기 가이드 핵산은 gRNA를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0930] **3-2-1. RRS 이용한 프로모터 삽입**
- [0931] 틀박스는 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0932] 상기 틀박스는 RRS를 상기 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에 포함할 수 있다.
- [0933] 핵산(nucleic acid)은 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 구성 발현 프로모터는 U6 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 핵산(nucleic acid)은 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 한 쪽 말단 또는 양 말단에 RRS를 포함할 수 있다. 상기 RRS는 상기 틀박스에 포함된 RRS와 한 쌍을 이룰 수 있다.
- [0934] 상기 틀박스에 상기 핵산(nucleic acid) 및 상기 RRS와 상호작용 할 수 있는 SSR을 제공할 수 있다. 상기 틀박스에 상기 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입이 일어날 수 있다. 이 경우, gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 프로모터 삽입 전에는 전사 개시되지 않다가, 삽입 후에는 전사 개시될 수 있다.
- [0936] **3-2-2. gRNA 전사 조절**
- [0937] 틀박스는 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0938] 상기 틀박스는 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 개시하는 프로모터를 포함할 수 있다. 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도 프로모터 일 수 있다. 상기 구성 발현 프로모터는 U6 프로모터를 포함할 수 있다.
- [0939] 상기 틀박스는 RRS 1, 전사 종결 코돈, 및 RRS 2를 포함할 수 있다. 상기 전사 종결 코돈은 poly T 서열을 포함할 수 있다. 상기 전사 종결 코돈은 AATAAA 서열을 포함할 수 있다. 상기 RRS 1, 전사 종결 코돈, 및 RRS2는 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 개시하는 프로

모터 사이에 순서대로 위치할 수 있다. 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 동일할 수 있다. 상기 RRS 1 및 RRS 2는 loxp 를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0940] 상기 틀박스에 상기 RRS 1 및 RRS 2와 상호작용 할 수 있는 SSR을 제공할 수 있다. 상기 SSR은 Cre 리컴비나아제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 틀박스에 RRS 1 및 RRS 2 사이에 위치한 전사 종결 코돈을 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 제거가 일어날 수 있다.

[0941] 이 경우, gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 전사 종결 코돈의 제거 전에는 발현되지 않다가, 전사 종결 코돈의 제거 후에는 발현될 수 있다.

[0943] **4. 크리스퍼/엔자임 시스템의 타겟 사이트**

[0944] 세포 내 동물 게놈은 적어도 하나의 틀박스를 포함할 수 있다.

[0945] 상기 적어도 하나의 틀박스는 제1 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 제1 틀박스는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0946] 또는, 상기 제1 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하나 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지 않을 수 있다. 이 경우, 가이드 핵산 또는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 별도의 전달 벡터로 세포 내에 도입할 수 있다.

[0947] 상기 가이드 핵산은 프로토스페이스어 도메인(protospacer domain)을 포함할 수 있다. 상기 프로토스페이스어 도메인(protospacer domain)은 세포 내 동물 게놈 또는 엑소-폴리뉴클레오타이드 상에 위치하는 타겟 사이트와 동일하거나 상보적으로 결합할 수 있는 염기 서열을 포함할 수 있다.

[0948] 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 Cas9을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 가이드 핵산은 gRNA를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0950] **4-1. 동물 게놈**

[0951] 상기 세포 내 동물 게놈은 gRNA의 타겟 사이트를 포함할 수 있다. 상기 타겟 사이트는 PAM 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접한 염기 서열일 수 있다. 상기 PAM 서열은 NGG를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0953] 상기 타겟 사이트는 상기 세포 내 동물 게놈 상에서 폴리펩타이드 또는 RNA 발현에 관여할 수 있는 폴리뉴클레오타이드 상에 위치할 수 있다.

[0954] 상기 타겟 사이트는 세포 내 동물 게놈 상에서 폴리펩타이드 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 프로모터, 5' UTR, 엑손, 인트론, 및 3' UTR 중 어느 하나에 위치할 수 있다.

[0955] 이 경우, 크리스퍼/엔자임 시스템을 통해 상기 세포 내 폴리펩타이드 또는 RNA 발현 정도에 영향을 미칠 수 있다.

[0957] 상기 타겟 사이트는 상기 세포 내 동물 게놈의 세이프 하버 내에 위치할 수 있다.

[0958] 상기 동물 게놈이 쥐 게놈(mouse genome)인 경우, 상기 쥐 게놈(mouse genome)의 세이프 하버는 이미 잘 알려진 바 있는 rosa26 좌위를 포함할 수 있다.

[0959] 상기 동물 게놈이 소 게놈(bovine genome)인 경우, 상기 소 게놈(bovine genome)의 세이프 하버는 상기 표 1의 좌위를 포함할 수 있으나, 이에 한정하지 않는다.

[0960] 이 경우, 크리스퍼/엔자임 시스템을 통해 상기 세포 및 상기 세포를 포함하는 형질 전환 동물에 치명적인 영향을 주지 않는 위치-특이적 형질 전환이 가능하다.

[0962] **4-2. 엑소-폴리뉴클레오타이드**

[0963] 상기 동물 게놈이 포함하는 적어도 하나의 틀박스는 타겟 틀박스를 포함할 수 있다.

[0964] 본 출원의 용어 "타겟 틀박스"는 인위적 뉴클레아제의 일 구성 요소가 인식할 수 있는 타겟 사이트를 일 구성으로 포함하는 틀박스를 의미할 수 있다.

[0966] 상기 타겟 틀박스는 gRNA의 타겟 사이트를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 타겟 사이트는 PAM 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접한 염기 서열일 수 있다. 상기 PAM 서열은 NGG를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0967] 상기 타겟 툴박스는 상기 제1 툴박스와 동일한 툴박스일 수 있다.
- [0968] 상기 타겟 툴박스는 상기 제1 툴박스와 상이한 툴박스일 수 있다.
- [0970] 상기 타겟 사이트는 상기 타겟 툴박스 내에서 폴리펩타이드 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 프로모터, 5' UTR, 엑손, 인트론, 및 3' UTR 중 어느 하나에 위치할 수 있다.
- [0971] 상기 폴리펩타이드는 목적 단백질의 일부분을 포함할 수 있다. 이 경우, 크리스퍼/엔자임 시스템을 통해 상기 타겟 툴박스를 포함하는 세포 및 상기 세포를 포함하는 형질 전환 동물의 목적 단백질 발현 정도에 영향을 미칠 수 있다.
- [0972] 상기 폴리펩타이드는 마커 유전자에 의해 발현되는 폴리펩타이드를 포함할 수 있다. 이 경우, 크리스퍼/엔자임 시스템을 통해 마커 유전자를 녹아웃하여 형질 전환 세포 선별에 활용할 수 있다. 예를 들어, 세포 내 동물 게놈이 포함하는 타겟 툴박스가 티미딘 키나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 경우, 티미딘 키나아제의 엑손 중 일부분을 타겟 사이트로 하는 크리스퍼/엔자임 시스템에 의한 위치-특이적 형질 전환을 통해 티미딘 키나아제를 녹아웃 할 수 있다. 상기 타겟 툴박스를 포함하는 세포에 강시클로버의 처리를 통해 위치-특이적 형질 전환이 발생한 세포를 선별할 수 있다.
- [0973] 상기 폴리펩타이드는 리컴비나아제의 일부를 포함할 수 있다. 이 경우, 크리스퍼/엔자임 시스템을 통해 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 녹아웃 하여 세포 내 위치-특이적 재조합을 저해할 수 있다.
- [0974] 상기 폴리펩타이드는 트랜스포사아제를 포함할 수 있다. 이 경우, 크리스퍼/엔자임 시스템을 통해 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 녹아웃 하여 세포 내 트랜스포존 삽입(transposon insertion) 또는 세포 내 트랜스포존 제거(transposon deletion)를 저해할 수 있다.
- [0975] 상기 폴리펩타이드는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 일부를 포함할 수 있다. 이 경우, 크리스퍼/엔자임 시스템을 통해 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 녹아웃 되어 세포 내 위치-특이적 형질 전환이 방해할 수 있다. 예를 들어, 세포 내 동물 게놈이 포함하는 타겟 툴박스가 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 경우, Cas9의 엑손 중 일부분을 타겟 사이트로 하는 크리스퍼/엔자임 시스템에 의한 위치-특이적 형질 전환을 통해 Cas9을 녹아웃 할 수 있다. 상기 타겟 툴박스를 포함하는 세포는 타겟 툴박스 내에 위치-특이적 형질 전환을 하는 동시에 세포 내 Cas9 발현을 감소시켜 타겟 사이트가 아닌 다른 곳에서 위치-특이적 형질 전환 (off-target activity)이 발생하는 것을 방지할 수 있다.
- [0976] 상기 RNA는 가이드 핵산의 일부를 포함할 수 있다. 이 경우, 크리스퍼/엔자임 시스템을 통해 가이드 핵산을 녹아웃 하여 세포 내 위치-특이적 형질 전환을 방해할 수 있다. 예를 들어, 세포 내 동물 게놈이 포함하는 툴박스가 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 경우, gRNA의 프로토스페이스 도메인(protospacer domain)을 타겟 사이트로 하는 크리스퍼/엔자임 시스템에 의한 위치-특이적 형질 전환을 통해 gRNA가 녹아웃 될 수 있다. 상기 타겟 툴박스를 포함하는 세포는 타겟 툴박스 내에 위치-특이적 형질 전환을 하는 동시에 세포 내 gRNA 발현을 감소시켜 타겟 사이트가 아닌 다른 곳에서 위치-특이적 형질 전환 (off-target activity)이 발생하는 것을 방지할 수 있다. 또한, 상기 타겟 툴박스를 포함하는 세포가 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 발현할 수 있는 경우, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현에 영향을 주지 않으면서 off-target activity를 방지할 수 있다.
- [0978] 상기 타겟 사이트는 타겟 툴박스 내에서 비-기능적 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 상에 위치할 수 있다. 또는 상기 타겟 사이트는 타겟 툴박스 내에서 번역되지 않는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 상에 위치할 수 있다. 또는 상기 타겟 사이트는 타겟 툴박스 내에서 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드 상에 위치할 수 있다.
- [0979] 세포 내 동물 게놈이 동일한 타겟 툴박스를 둘 이상 포함하는 경우, 하나의 크리스퍼/엔자임 시스템을 통해 복수의 동일한 위치-특이적 형질 전환이 가능하다. 예를 들어, 세포 내 소의 게놈이 포함하는 타겟 툴박스가 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고 있는 경우, 상기 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드의 일부를 타겟 사이트로 하는 크리스퍼/엔자임 시스템을 통해 omega 3를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 위치-특이적으로 삽입 될 수 있다. 상기 소의 게놈이 상기 타겟 툴박스를 두 개 이상 포함하고 있는 경우, 오메가3 를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 각각의 타겟 툴박스에 삽입 될 수 있어, 오메가3 발현량이 높은 세포 또는 형질 전환 소를 제작할 수 있다.
- [0980] 세포 내 동물 게놈이 서로 다른 타겟 툴박스를 둘 이상 포함하는 경우, 가이드 핵산을 달리하는 크리스퍼/엔자

임 시스템을 통해 복수의 상이한 위치-특이적 형질 전환이 가능하다. 예를 들어, 세포 내 소의 게놈은 제1 타겟 틀박스 및 제2 타겟 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 제1 타겟 틀박스는 제1 타겟 사이트를 포함하고, 상기 제2 타겟 틀박스는 제2 타겟 사이트를 포함할 수 있다. 상기 제1 타겟 사이트와 제2 타겟 사이트의 염기 서열은 서로 다를 수 있다. 상기 제1 타겟 사이트와 동일하거나 상보적으로 결합할 수 있는 제1 gRNA를 포함하는 크리스퍼/엔자임 시스템을 통해 상기 제1 틀박스에 인간 중쇄(human heavy chain)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 넣을 수 있다. 상기 제2 타겟 사이트와 동일하거나 상보적으로 결합할 수 있는 제2 gRNA를 포함하는 크리스퍼/엔자임 시스템을 통해 상기 제2 틀박스에 인간 경쇄(human light chain)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 넣을 수 있다. 상기 제1 타겟 틀박스 및 제2 타겟 틀박스를 모두 포함하는 세포 또는 형질 전환 소는 인간 중쇄(human heavy chain) 및 인간 경쇄(human light chain)를 모두 발현하여 인간 항체(human antibody)를 생산할 수 있다.

[0982] 5. 크리스퍼/엔자임 시스템을 이용한 위치-특이적 형질 전환

[0983] 세포 내 동물 게놈은 적어도 하나의 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 틀박스는 제1 틀박스, 제2 틀박스, 및 제3 틀박스 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다.

[0984] 상기 제1 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 틀박스를 포함하는 세포에 가이드 핵산 또는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 전달하여 크리스퍼/엔자임 시스템에 의한 위치-특이적 형질 전환 가능하다.

[0985] 상기 제2 틀박스는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 틀박스를 포함하는 세포에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 도입하거나 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 전달하여 상기 세포 내에 크리스퍼/엔자임 시스템을 통한 위치-특이적 형질 전환 가능하다.

[0986] 상기 제3 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함하고, 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 세포 내에 크리스퍼/엔자임 시스템을 통한 위치-특이적 형질 전환 가능하다.

[0987] 상기 적어도 하나의 틀박스를 포함하는 세포 내 동물 게놈은 상기 가이드 핵산의 타겟 사이트를 포함할 수 있다. 상기 타겟 사이트는 PAM 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접한 염기 서열일 수 있다.

[0988] 상기 적어도 하나의 틀박스는 타겟 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 타겟 틀박스는 상기 가이드 핵산의 타겟 사이트를 포함할 수 있다. 상기 타겟 사이트는 PAM 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접한 염기 서열일 수 있다. 상기 타겟 틀박스는 상기 제1 틀박스와 동일한 틀박스일 수 있다. 또는 상기 타겟 틀박스는 상기 제1 틀박스와 상이한 틀박스일 수 있다.

[0989] 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 Cas9을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 가이드 핵산은 gRNA를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0991] 5-1. 비-상동성 말단 결합 (non-homologous end joining; NHEJ)

[0992] DNA 이중 가닥이 모두 잘린 경우, 즉, 두 가닥 파손(double strand break)이 발생한 경우, DNA 리가아제(ligase)에 의해 다시 이중 가닥이 결합하는 것을 비-상동성 말단 결합(NHEJ) 이라고 한다.

[0993] 세포 내 동물 게놈은 상기 제1 틀박스, 제2 틀박스, 제3 틀박스 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. Cas9은 상기 세포에서 발현되거나, 상기 세포 내로 전달 될 수 있다. gRNA는 상기 세포에서 발현되거나, 상기 세포 내로 전달 될 수 있다.

[0994] 상기 gRNA는 상기 세포 내 동물 게놈 또는 타겟 틀박스의 타겟 사이트와 상보적으로 결합할 수 있다. 상기 Cas9은 상기 gRNA와 상호작용하여 타겟 사이트에 두 가닥 파손(double strand break)이 발생할 수 있다.

[0995] 이 경우, 비-상동성 말단 결합(NHEJ) 과정 중에 뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 삽입이 일어날 수 있다. 또는, 비-상동성 말단 결합(NHEJ) 과정 중에 뉴클레오타이드 또는 폴리뉴클레오타이드 제거가 일어날 수 있다. 상기 삽입 또는 제거로 인해 타겟 사이트의 염기 서열에 변형이 생길 수 있다.

[0997] 5-2. 상동성 재조합

[0998] 세포 내 동물 게놈은 상기 제1 틀박스, 제2 틀박스, 제3 틀박스 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. Cas9은

상기 세포에서 발현되거나, 상기 세포 내로 전달 될 수 있다. gRNA는 상기 세포에서 발현되거나, 상기 세포 내로 전달 될 수 있다.

[0999] 상기 세포 내에 도너 폴리뉴클레오타이드(donor polynucleotide), 또는 도너(donor)가 전달 될 수 있다. 상기 도너의 5' 말단에는 제1 상동 염기서열(homology arm)이 위치할 수 있다. 상기 도너의 3' 말단에는 제2 상동 염기서열(homology arm)이 위치할 수 있다.

[1000] 상기 제1 상동 염기서열(homology arm)은 세포 내 동물 게놈의 일부와 동일한 염기 서열을 가지고, 상기 제2 상동 염기서열(homology arm)은 세포 내 동물 게놈의 일부와 동일한 염기 서열을 가질 수 있다. 이 경우, 도너 폴리뉴클레오타이드(donor polynucleotide)는 세포 내 동물 게놈 상에서 제1 상동 염기서열(homology arm)과 동일한 염기 서열 및 제2 상동 염기서열(homology arm)과 동일한 염기 서열 사이에 삽입 될 수 있다.

[1001] 또는, 상기 제1 상동 염기서열(homology arm)은 세포 내 타겟 툴박스의 일부와 동일한 염기 서열을 가지고, 상기 제2 상동 염기서열(homology arm)은 세포 내 타겟 툴박스의 일부와 동일한 염기 서열을 가질 수 있다. 이 경우, 도너는 세포 내 타겟 툴박스 상에서 제1 상동 염기서열(homology arm)과 동일한 염기 서열 및 제2 상동 염기서열(homology arm)과 동일한 염기 서열 사이에 삽입 될 수 있다.

[1002] 상기 도너는 툴박스를 포함할 수 있다.

[1004] **5-3. Homology-Independent Target Integration (HITI)**

[1005] 세포 내 동물 게놈은 상기 제1 툴박스, 제2 툴박스, 제3 툴박스 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. Cas9은 상기 세포에서 발현되거나, 상기 세포 내로 전달 될 수 있다. gRNA는 상기 세포에서 발현되거나, 상기 세포 내로 전달 될 수 있다.

[1006] 상기 세포 내에 도너가 전달 될 수 있다.

[1007] 상기 도너의 5' 말단 및 3' 말단에는 상기 세포 내 동물 게놈 상에 위치하는 타겟 사이트와 동일한 염기 서열을 가지는 타겟 사이트가 위치할 수 있다. 이 경우, 상기 세포 내 동물 게놈 상에 위치한 타겟 사이트, 도너의 5' 말단의 타겟 사이트, 및 3' 말단의 타겟 사이트에 크리스퍼/엔자임 시스템에 의해 두 가닥 파손(double strand break)이 발생할 수 있다. 비-상동성 말단 결합(NHEJ)을 통해 상기 동물 게놈의 두 가닥 파손(double strand break) 사이에 도너가 삽입될 수 있다.

[1008] 또는, 상기 도너의 5' 말단 및 3' 말단에는 세포 내 타겟 툴박스 내에 위치하는 타겟 사이트와 동일한 염기 서열을 가지는 타겟 사이트가 위치할 수 있다. 이 경우, 상기 세포 내 타겟 툴박스 상에 위치한 타겟 사이트, 도너의 5' 말단의 타겟 사이트, 및 3' 말단의 타겟 사이트에 크리스퍼/엔자임 시스템에 의해 두 가닥 파손(double strand break)이 발생할 수 있다. 비-상동성 말단 결합(NHEJ)를 통해 상기 타겟 툴박스의 두 가닥 파손(double strand break) 사이에 도너가 삽입될 수 있다.

[1009] 상기 도너는 툴박스를 포함할 수 있다.

[1011] **5-4. 넉인 (knockin)**

[1012] 세포 내 동물 게놈은 상기 제1 툴박스, 제2 툴박스, 제3 툴박스 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다. Cas9은 상기 세포에서 발현되거나, 상기 세포 내로 전달 될 수 있다. gRNA는 상기 세포에서 발현되거나, 상기 세포 내로 전달 될 수 있다.

[1013] 상기 세포 내에 도너 폴리뉴클레오타이드가 전달 될 수 있다. 이 경우, 상기 도너는 상동 재조합을 통해 세포 내 동물 게놈 또는 타겟 툴박스 내부에 삽입 될 수 있다. 또는, 상기 도너는 HITI를 통해 세포 내 동물 게놈 또는 타겟 툴박스 내부에 삽입 될 수 있다.

[1014] 예를 들어, 세포 내 동물 게놈 상의 타겟 사이트 또는 타겟 툴박스 내부의 타겟 사이트에 존재하는 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거되며 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 추가될 수 있다.

[1015] 다른 예를 들어, 세포 내 동물 게놈 상의 타겟 사이트 또는 타겟 툴박스 내부의 타겟 사이트에 존재하는 서열에 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 추가될 수 있다.

[1016] 상기 도너가 단백질 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 경우, 상기 도너가 삽입 된 세포는 단백질 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 넉인되어 상기 단백질 또는 RNA를 발현할 수 있다.

- [1018] **5-5. 녀아웃(knockout)**
- [1019] 세포 내 동물 게놈은 상기 제1 툴박스, 제2 툴박스, 제3 툴박스 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. Cas9은 상기 세포에서 발현되거나, 상기 세포 내로 전달 될 수 있다. gRNA는 상기 세포에서 발현되거나, 상기 세포 내로 전달 될 수 있다.
- [1020] 상기 세포 내에 도너 폴리뉴클레오타이드가 전달 될 수 있다. 이 경우, 상기 도너는 상동성 재조합을 통해 세포 내 동물 게놈 상의 타겟 사이트 또는 타겟 툴박스 내부의 타겟 사이트에 삽입 될 수 있다. 또는, 상기 도너는 HITI를 통해 세포 내 동물 게놈 상의 타겟 사이트 또는 타겟 툴박스 내부의 타겟 사이트에 삽입 될 수 있다.
- [1021] 상기 세포 내에 도너 폴리뉴클레오타이드가 전달 되지 않을 수 있다. 이 경우, 세포 내 동물 게놈 상의 타겟 사이트 또는 타겟 툴박스 내부의 타겟 사이트에 뉴클레오타이드 삽입, 폴리뉴클레오타이드 삽입, 뉴클레오타이드 제거, 또는 폴리뉴클레오타이드 제거가 발생할 수 있다.
- [1022] 예를 들어, 세포 내 동물 게놈 상의 타겟 사이트 또는 타겟 툴박스 내부의 타겟 사이트에 존재하는 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거(deletion)될 수 있다.
- [1023] 다른 예를 들어, 세포 내 동물 게놈 상의 타겟 사이트 또는 타겟 툴박스 내부의 타겟 사이트에 존재하는 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거(deletion)되고 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 삽입(insertion)될 수 있다.
- [1024] 상기 동물 게놈 상의 타겟 사이트 또는 타겟 툴박스 내부의 타겟 사이트가 단백질 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 상에 위치하는 경우, 상기 단백질 또는 RNA가 녀아웃되어 발현량이 감소할 수 있다.
- [1026] **6. 크리스퍼/엔자임 시스템에 의한 위치-특이적 형질 전환 세포**
- [1027] 형질 전환 세포의 동물 게놈은 적어도 하나의 툴박스를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 툴박스는 제1 툴박스, 제2 툴박스, 및 제3 툴박스 중 적어도 어느 하나를 포함할 수 있다. 상기 제1 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다. 상기 제2 툴박스는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다. 상기 제3 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함하고, 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다.
- [1028] 위치-특이적 형질 전환 세포는 상기 세포 내 동물 게놈 상의 타겟 사이트에 위치-특이적 형질 전환이 발생한 세포를 포함할 수 있다.
- [1029] 위치-특이적 형질 전환 세포는 상기 세포 내 타겟 툴박스 내부의 타겟 사이트에 위치-특이적 형질 전환이 발생한 세포를 포함할 수 있다.
- [1031] **6-1. 단일 세포**
- [1032] **6-1-1. 배수성 (ploidy)**
- [1033] 위치-특이적 형질 전환 세포는 이배체 세포일 수 있다. 상기 이배체 세포는 앞서 언급한 바와 같다.
- [1034] 위치-특이적 형질 전환 세포는 반수체 세포일 수 있다. 상기 반수체 세포는 앞서 언급한 바와 같다.
- [1036] **6-1-2. 접합성 (zygosity)**
- [1037] 위치-특이적 형질 전환 세포는 적어도 한 쌍의 상동 염색체를 포함할 수 있다. 상기 적어도 한 쌍의 상동 염색체는 상동 염색체 관계에 있는 제1 염색체 및 제2 염색체를 포함할 수 있다.
- [1039] 위치-특이적 형질 전환 세포는 동형접합자(homozygote)일 수 있다.
- [1040] 상기 동형접합자(homozygote)인 위치-특이적 형질 전환 세포에서, 제1 염색체 및 제2 염색체가 포함하는 위치-특이적 형질 전환의 종류, 개수, 및 위치가 모두 동일할 수 있다.
- [1041] 상기 동형접합자(homozygote)인 위치-특이적 형질 전환 세포에서, 제1 염색체 및 제2 염색체가 포함하는 위치-특이적 형질 전환의 종류 및 개수가 동일할 수 있다.
- [1042] 상기 동형접합자(homozygote)인 위치-특이적 형질 전환 세포에서, 제1 염색체 및 제2 염색체가 포함하는 위치-특이적 형질 전환의 종류가 동일할 수 있다.

- [1043] 상기 동형접합자(homozygote)인 위치-특이적 형질 전환 세포에서, 제1 염색체 및 제2 염색체가 포함하는 틀박스 및 위치-특이적 형질 전환의 종류, 개수, 및 위치가 모두 동일할 수 있다.
- [1044] 상기 동형접합자(homozygote)인 위치-특이적 형질 전환 세포에서, 제1 염색체 및 제2 염색체가 포함하는 틀박스 및 위치-특이적 형질 전환의 종류 및 개수가 동일할 수 있다.
- [1045] 상기 동형접합자(homozygote)인 위치-특이적 형질 전환 세포에서, 제1 염색체 및 제2 염색체가 포함하는 틀박스 및 위치-특이적 형질 전환의 종류가 동일할 수 있다.
- [1046] 또는 상기 동형접합자(homozygote)인 형질 전환 세포에서 제1 염색체 및 제2 염색체는 둘 다 틀박스를 포함하지 않고, 둘 다 위치-특이적 형질 전환을 포함하지 않을 수 있다.
- [1048] 위치-특이적 형질 전환 세포는 이형접합체(heterozygote)일 수 있다.
- [1049] 상기 이형접합체(heterozygote)인 형질 전환 세포에서, 제1 염색체는 틀박스를 포함하지 않고, 제2 염색체는 적어도 하나의 틀박스를 포함할 수 있다.
- [1050] 상기 이형접합체(heterozygote)인 형질 전환 세포에서, 제1 염색체는 위치-특이적 형질 전환을 포함하지 않고, 제2 염색체는 적어도 하나의 위치-특이적 형질 전환을 포함할 수 있다.
- [1051] 상기 이형접합체(heterozygote)인 형질 전환 세포에서, 제1 염색체가 포함하는 틀박스와 동일한 틀박스를 제2 염색체가 포함하지 않을 수 있다.
- [1052] 상기 이형접합체(heterozygote)인 형질 전환 세포에서, 제1 염색체가 포함하는 위치-특이적 형질 전환을 제2 염색체가 포함하지 않을 수 있다.
- [1054] **6-2. 세포 콜로니**
- [1055] 위치-특이적 형질 전환 세포는 세포 콜로니를 형성할 수 있다.
- [1057] **6-2-1. 상동성 세포 콜로니**
- [1058] 상동성 세포 콜로니는 각 세포가 포함하는 틀박스가 서로 동일하고, 각 세포가 포함하는 위치-특이적 형질 전환의 종류, 개수, 및 위치가 동일하다.
- [1060] **6-2-2. 키메릭 세포 콜로니**
- [1061] 키메릭 세포 콜로니는 상동성 세포 콜로니 외의 세포 콜로니를 의미한다.
- [1062] 예를 들어, 키메릭 세포 콜로니는 크리스퍼/엔자임 시스템에 의해 제1 타겟 사이트에서 위치-특이적 형질 전환된 게놈을 가지는 제1 세포 및 크리스퍼/엔자임 시스템에 의해 제1 타겟 사이트에서 위치-특이적 형질 전환된 게놈을 가지지 않는 제2 세포를 함께 포함할 수 있다.
- [1064] **7. 크리스퍼/엔자임 시스템을 이용한 위치-특이적 형질 전환 세포 선별**
- [1065] **7-1. 형광 단백질을 이용한 형질 전환 세포 선별**
- [1066] 형질 전환 세포는 적어도 하나의 타겟 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 형질 전환 세포는 적어도 하나의 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 틀박스 중 어느 하나는 형광 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 타겟 틀박스 일 수 있다. 예를 들어, 상기 형질 전환 세포 내에 형광 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 엑손을 타겟 사이트로 하는 위치-특이적 형질 전환을 통해 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입 될 수 있다.
- [1067] 상기 위치-특이적 형질 전환 세포는 위치-특이적 형질 전환이 발생하지 않은 세포와 형광 신호(fluorescence signal) 차이가 있을 수 있다. 따라서 위치-특이적 형질 전환 세포가 구별될 수 있다.
- [1069] 위치-특이적 형질 전환 세포는 형광 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 적어도 하나의 타겟 틀박스를 포함하는 형질 전환 세포에 위치-특이적 형질 전환을 통해 형광 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 도너를 삽입 할 수 있다. 상기 도너는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [1070] 상기 위치-특이적 형질 전환 세포는 형광 단백질이 발현하여 형광 신호를 측정할 수 있다. 따라서 상기 위치-특이적 형질 전환 세포는 상기 위치-특이적 형질 전환이 발생하지 않은 동물 세포와 구별될 수 있다.

[1072] **7-2. 항생제 저항성 유전자를 이용한 형질 전환 세포 선별**

[1073] 위치-특이적 형질 전환 세포는 항생제 저항성 유전자를 포함할 수 있다.

[1074] 예를 들어, 적어도 하나의 타겟 틀박스를 포함하는 형질 전환 세포에 위치-특이적 형질 전환을 통해 항생제 저항성 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 도너를 삽입 할 수 있다. 상기 도너는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[1075] 상기 위치-특이적 형질 전환 세포는 항생제 저항성 유전자가 발현되어 항생 물질(antibiotic compound)을 처리 하여도 생존할 수 있다. 따라서 상기 위치-특이적 형질 전환 세포는 상기 위치-특이적 형질 전환이 발생하지 않은 동물 세포와 분리될 수 있다.

[1077] **7-3. 항원-항체 반응을 이용한 형질 전환 세포 선별**

[1078] 형질 전환 세포는 적어도 하나의 타겟 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 형질 전환 세포는 적어도 하나의 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 틀박스 중 어느 하나는 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 항원으로 작용할 수 있는 뉴클레오타이드를 포함하는 타겟 틀박스일 수 있다. 예를 들어, 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 타겟 틀박스를 포함하는 형질 전환 세포 내에 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 엑손을 타겟 사이트로 하는 위치-특이적 형질 전환을 통해 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입 될 수 있다.

[1079] 상기 위치-특이적 형질 전환 세포는 위치-특이적 형질 전환이 발생하지 않은 세포와 항원의 발현 정도에 차이가 있을 수 있다. 따라서 항원-항체 반응을 통해 위치-특이적 형질 전환 세포가 구별될 수 있다.

[1081] 위치-특이적 형질 전환 세포는 항원을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 항원으로 작용할 수 있는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 동물 계능 상에 타겟 사이트를 포함하는 형질 전환 세포에 위치-특이적 형질 전환을 통해 항원으로 작용할 수 있는 뉴클레오타이드를 포함하는 도너를 삽입 할 수 있다. 상기 도너는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[1082] 상기 위치-특이적 형질 전환 세포에 삽입된 항원으로 작용할 수 있는 뉴클레오타이드는 특이적인 항체와 상호작용을 할 수 있다. 따라서 상기 위치-특이적 형질 전환 세포는 상기 위치-특이적 형질 전환이 발생하지 않은 동물 세포와 구별될 수 있다.

[1084] **7-4. 표면 마커 유전자를 이용한 형질 전환 세포 선별**

[1085] 형질 전환 세포는 적어도 하나의 타겟 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 형질 전환 세포는 적어도 하나의 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 틀박스 중 어느 하나는 표면 마커 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 타겟 틀박스일 수 있다. 예를 들어, 상기 형질 전환 세포 내에 표면 마커 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 엑손을 타겟 사이트로 하는 위치-특이적 형질 전환을 통해 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입 될 수 있다.

[1086] 상기 위치-특이적 형질 전환 세포는 위치-특이적 형질 전환이 발생하지 않은 세포와 표면 마커가 표면에 발현되는 양이 다를 수 있다. 상기 표면 마커는 특이적인 항체와 상호작용을 할 수 있다. 상기 항체는 자성 입자(magnetic particle) 또는 형광단(fluorophore)과 상호작용을 할 수 있다. 따라서 상기 위치-특이적 형질 전환 세포와 위치-특이적 형질 전환이 발생하지 않은 세포는 자성(magnetic property) 또는 형광 신호(fluorescence signal)를 통하여 구별될 수 있다.

[1088] 위치-특이적 형질 전환 세포는 표면 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 적어도 하나의 타겟 틀박스를 포함하는 형질 전환 세포에 위치-특이적 형질 전환을 통해 표면 마커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 도너를 삽입 할 수 있다. 상기 도너는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[1089] 상기 위치-특이적 형질 전환 세포는 상기 표면 마커를 세포 표면에 발현할 수 있다. 상기 표면 마커는 특이적인 항체와 상호작용을 할 수 있다. 상기 항체는 자성 입자 또는 형광단과 상호작용을 할 수 있다. 따라서 상기 위치-특이적 형질 전환 세포는 상기 위치-특이적 형질 전환이 발생하지 않은 세포와 자성 또는 형광 신호를 통하여 구별될 수 있다.

[1091] **7-5. 자살 유전자를 이용한 형질 전환 세포 선별**

- [1092] 형질 전환 세포는 동물 계능 상에 또는 틀박스 내에 자살 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 위치-특이적 형질 전환을 통해 상기 자살 유전자가 녹아내려진 위치-특이적 형질 전환 세포를 제작할 수 있다.
- [1093] 예를 들어, 형질 전환 세포가 티미딘 키나아제(thymidine kinase)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스를 포함하는 경우, 상기 티미딘 키나아제(thymidine kinase)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 엑손의 일부 염기 서열을 타겟 사이트로 하는 위치-특이적 형질 전환을 통해 도너를 삽입 할 수 있다.
- [1094] 상기 위치-특이적 형질 전환 세포는 자살 유전자가 녹아내려져 프로드러그를 처리하여도 세포 사멸(apoptosis)이 발생하지 않는다. 따라서 상기 위치-특이적 형질 전환 세포는 상기 위치-특이적 형질 전환이 발생하지 않은 동물 세포와 구별될 수 있다.
- [1096] **8. 크리스퍼/엔자임 시스템을 이용한 위치-특이적 형질 전환 동물**
- [1097] **8-1. 크리스퍼/엔자임 시스템을 이용한 위치-특이적 형질 전환 동물 개체**
- [1098] **8-1-1. 상동성**
- [1099] 상동성 위치-특이적(Homologous site-specific) 형질 전환 동물이 포함하는 각 세포는 적어도 하나의 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 틀박스는 제1 틀박스, 제2 틀박스, 및 제3 틀박스 중 적어도 하나를 포함할 수 있다. 상기 제1 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다. 상기 제2 틀박스는 가이드 핵산을 암호화하는 리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다. 상기 제3 틀박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함하고, 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 적어도 하나 포함할 수 있다.
- [1100] 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 Cas9을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 가이드 핵산은 gRNA를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [1101] 상동성 위치-특이적(Homologous site-specific) 형질 전환 동물이 포함하는 각 세포는 동물 계능 상의 타겟 사이트에 적어도 하나의 위치-특이적 형질 전환을 포함할 수 있다.
- [1102] 상동성 위치-특이적(Homologous site-specific) 형질 전환 동물이 포함하는 각 세포는 틀박스 내부의 타겟 사이트에 적어도 하나의 위치-특이적 형질 전환을 포함할 수 있다.
- [1104] **8-1-2. 키메라**
- [1105] 키메라 위치-특이적(Chimeric site-specific) 형질 전환 동물은 상동성 형질 전환 동물 외의 형질 전환 동물을 의미한다.
- [1106] 예를 들어, 키메라 위치-특이적(Chimeric site-specific) 형질 전환 동물은 크리스퍼/엔자임 시스템에 의해 제1 타겟 사이트에서 위치-특이적 형질 전환 된 계능을 가지는 제1 세포 및 크리스퍼/엔자임 시스템에 의해 제1 타겟 사이트에서 위치-특이적 형질 전환 된 계능을 가지지 않는 제2 세포를 함께 포함할 수 있다.
- [1108] **8-2. 크리스퍼/엔자임 시스템을 이용한 위치-특이적 형질 전환 동물 제작 방법**
- [1109] 위치-특이적 형질 전환 동물을 제작하는 방법은 동물 세포로부터 제작하는 방법, 동물의 조직 또는 기관에 엑소-폴리뉴클레오타이드 전달을 통해 제작하는 방법, 및 형질 전환 동물의 교배를 포함한다. 동물 세포로부터 제작하는 방법은 적어도 하나의 틀박스가 삽입된 형질 전환 동물 세포로부터 제작하는 방법을 포함한다.
- [1110] 상기 방법 중 어느 하나로 제작된 형질 전환 동물은 키메라 형질 전환 동물 또는 상동성 형질 전환 동물 중 어느 하나일 수 있다.
- [1112] **8-2-1. 동물 세포로부터 제작하는 방법**
- [1113] 적어도 하나의 틀박스를 포함하는 형질 전환 세포로부터 위치-특이적 형질 전환 동물을 제작할 수 있다.
- [1114] 예를 들어, 제1 틀박스가 삽입된 체세포에 gRNA를 체세포 미세주입하여 상기 체세포의 동물 계능 상에 또는 타겟 틀박스 내부에 존재하는 타겟 사이트에 위치-특이적 형질 전환 후 SCNT를 통해 위치-특이적 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 위치-특이적 형질 전환 동물은 상동성 위치-특이적(homologous site-specific) 형질 전환 동물일 수 있다.
- [1115] 예를 들어, 제3 틀박스를 포함하는 생식세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 생식세포 미세주입(gamete

microinjection)하여 상기 생식세포의 동물 계능 상에 또는 타겟 틀박스 내부에 존재하는 타겟 사이트에 도너가 삽입 된 위치-특이적 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 위치-특이적 형질 전환 동물은 키메라 위치-특이적(chimeric site-specific) 형질 전환 동물일 수 있다.

[1116] 예를 들어, 제2 틀박스를 포함하는 접합체에 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 접합체 미세주입(zygote microinjection)하여 상기 접합체의 동물 계능 상에 또는 타겟 틀박스 내부에 존재하는 타겟 사이트에 NHEJ가 발생한 위치-특이적 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 위치-특이적 형질 전환 동물은 키메라 위치-특이적(chimeric site-specific) 형질 전환 동물일 수 있다.

[1117] 예를 들어, 타겟 틀박스를 포함하는 배아에 Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 배아 미세주입(embryo microinjection) 하여 상기 타겟 틀박스 내부에 존재하는 타겟 사이트에 NHEJ를 발생시켜 위치-특이적 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 위치-특이적 형질 전환 동물은 키메라 위치-특이적(chimeric site-specific) 형질 전환 동물일 수 있다.

[1119] **8-2-2. 동물의 조직 또는 기관에 엑소-폴리뉴클레오타이드 전달을 통해 제작하는 방법**

[1120] 동물의 조직 또는 기관은 적어도 하나의 틀박스를 포함하는 세포를 포함할 수 있다. 상기 동물의 조직 또는 기관에 Cas9, gRNA, 또는 도너 폴리뉴클레오타이드를 도입하여 위치-특이적 형질 전환 동물을 제작할 수 있다.

[1121] 예를 들어, 상기 동물의 유선 조직이 제1 틀박스가 삽입된 세포를 포함하는 경우, 동물 계능 상에 유선 조직에 특이적으로 발현하는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 일부 염기 서열을 타겟 사이트로 하는 gRNA를 상기 유선 조직에 미세주입 하여 상기 단백질이 녹아내려진 위치-특이적 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 위치-특이적 형질 전환 동물은 키메라 형질 전환 동물일 수 있다.

[1122] 예를 들어, 상기 동물의 유선 조직이 타겟 틀박스가 삽입된 세포를 포함하는 경우, Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, gRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 도너 폴리뉴클레오타이드를 유선 조직에 미세주입 하여 타겟 틀박스에 도너가 삽입된 위치-특이적 형질 전환 동물을 제작할 수 있다. 상기 위치-특이적 형질 전환 동물은 키메라 형질 전환 동물일 수 있다.

[1123] 예를 들어, 상기 동물의 생식 기관이 제2 틀박스가 삽입된 세포를 포함하는 경우, Cas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 동물의 생식 기관에 미세주입하여 생식 기관이 포함하는 세포의 동물 계능 상에 또는 타겟 틀박스 내부에 존재하는 타겟 사이트에 위치-특이적 형질 전환을 일으킬 수 있다. 상기 위치-특이적 형질 전환 동물의 생식세포로부터 얻은 자손도 위치-특이적 형질 전환 동물일 수 있다. 상기 형질 전환 동물은 키메라 형질 전환 동물일 수 있다.

[1125] **8-2-3. 형질 전환 동물의 교배를 통해 제작하는 방법**

[1126] 제1 형질 전환 동물과 제2 형질 전환 동물의 교배를 통해 위치-특이적 형질 전환 동물이 제작될 수 있다.

[1127] 예를 들어, 제1 틀박스를 포함하는 제1 형질 전환 동물과 제2 틀박스를 포함하는 제2 형질 전환 동물의 교배를 통해 동물 계능 상에 또는 타겟 틀박스 내부에 존재하는 타겟 사이트에 위치-특이적 형질 전환이 발생한 자손이 제작될 수 있다.

[1128] 상기 제2 형질 전환 동물은 제1 형질 전환 동물의 자손 또는 혈연 관계 (blood-related)일 수 있다. 또는 상기 제2 형질 전환 동물은 제1 형질 전환 동물과 혈연 관계가 아닐 수 있다.

[1129] 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 제1 형질 전환 동물의 동물 계능이 포함하는 틀박스 중 일부와 동일한 틀박스를 동일한 위치에 포함할 수 있다.

[1130] 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 제2 형질 전환 동물의 동물 계능이 포함하는 틀박스 중 일부와 동일한 틀박스를 동일한 위치에 포함할 수 있다.

[1131] 상기 교배를 통해 얻은 위치-특이적 형질 전환 동물은 상동성 형질 전환 동물일 수 있다.

[1132] 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 동형접합자(homozygote) 형질 전환 세포를 포함할 수 있다. 상기 교배를 통해 얻은 형질 전환 동물은 이형접합체(heterozygote) 형질 전환 세포를 포함할 수 있다.

[1134] **9. 크리스퍼/엔자임 시스템을 이용한 위치-특이적 형질 전환 동물의 이용**

[1135] **9-1. 품종 개량 동물**

- [1136] 상기 위치-특이적 형질 전환 동물은 품종 개량 동물로 이용할 수 있다.
- [1138] **9-2. 질환 모델 동물**
- [1139] 상기 위치-특이적 형질 전환 동물은 질환 모델 동물로 이용할 수 있다.
- [1141] **9-3. 질병 저항성 동물**
- [1142] 상기 위치-특이적 형질 전환 동물은 질병 저항성 동물로 이용할 수 있다.
- [1144] **9-4. 부산물 이용**
- [1145] 상기 위치-특이적 형질 전환 동물의 장기, 고기, 가죽, 털, 및 체액을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [1147] **9-5. 바이오리액터**
- [1148] 상기 위치-특이적 형질 전환 동물은 바이오리액터로 이용할 수 있다.
- [1150] **[PART V] 툴박스 제거(Toolbox excision)**
- [1151] **1. 트랜스포사아제에 의한 툴박스 제거**
- [1152] 세포 내 동물 게놈은 적어도 하나의 툴박스를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 툴박스 중 트랜스포존 툴박스는 제1 말단 영역 및 제2 말단 영역에 ITR 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [1154] **1-1. 동물 게놈 내 트랜스포사아제 이용**
- [1155] **1-1-1. 툴박스 제거 위한 구성(construction)**
- [1156] 상기 동물 게놈은 상기 ITR 폴리뉴클레오타이드와 상호작용할 수 있는 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다. 상기 트랜스포사아제는 제거-전용 트랜스포사아제 (excision-only transposase)를 포함할 수 있다.
- [1157] 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 트랜스포존 툴박스 내에 위치할 수 있다.
- [1158] 본 출원의 용어 "트랜스포존 툴박스"는 트랜스포존을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 일 구성으로 포함하는 툴박스를 의미할 수 있다.
- [1160] 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 트랜스포존 툴박스가 아닌 다른 툴박스 내에 위치할 수 있다.
- [1161] 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 툴박스 외부에 위치할 수 있다.
- [1162] 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 상류에는 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절하는 프로모터가 위치할 수 있다. 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도 프로모터 중 어느 하나일 수 있다.
- [1163] 상기 트랜스포사아제의 전사를 조절하는 프로모터와 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 사이에는 LSL이 위치할 수 있다.
- [1165] **1-1-2. 툴박스 제거 기작**
- [1166] 상기 세포에서 발현된 트랜스포사아제는 상기 세포 내에 존재하는 트랜스포존 툴박스를 동물 게놈으로부터 제거할 수 있다.
- [1167] 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절하는 프로모터가 조직-특이적 프로모터인 경우, 상기 동물 게놈을 포함하는 형질 전환 동물의 특정 조직에서 트랜스포사아제가 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 트랜스포존 툴박스의 ITR 폴리뉴클레오타이드와 상호작용을 통해 특정 조직이 포함하는 세포 내 동물 게놈 상의 트랜스포존 툴박스를 제거할 수 있다.
- [1168] 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절하는 프로모터가 유도 프로모터인 경우, 특정 조건을 만족해야 트랜스포사아제가 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 트랜스포존 툴박스의 ITR 폴리뉴클레오타이드와 상호작용을 통해 특정 조건을 만족하는 세포 내 동물 게놈 상의 트랜스포존 툴박스를 제거할 수 있다.

- [1169] 상기 트랜스포사아제 전사를 조절하는 프로모터와 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 사이에 LSL이 위치하는 경우, Cre 리컴비나아제를 세포 내에 도입하여 위치-특이적 재조합을 통해 상기 LSL에 존재하는 종결 코돈을 제거 해야 트랜스포사아제가 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 트랜스포존 틀박스의 ITR 폴리뉴클레오타이드와의 상호작용을 통해 Cre 리컴비나아제를 포함하는 세포 내 동물 계놈 상의 트랜스포존 틀박스를 제거할 수 있다.
- [1171] **1-2. 동물 계놈 외부의 트랜스포사아제 이용**
- [1172] **1-2-1. 틀박스 제거 위한 구성**
- [1173] 상기 동물 계놈은 상기 ITR 폴리뉴클레오타이드와 상호작용할 수 있는 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지 않을 수 있다.
- [1174] 이 경우 상기 세포 내로 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 전달 할 수 있다. 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 상류에는 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절하는 프로모터가 위치할 수 있다. 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도 프로모터 중 어느 하나일 수 있다. 상기 트랜스포사아제의 전사를 조절하는 프로모터와 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에는 LSL이 위치할 수 있다.
- [1175] 또는 상기 세포 내로 트랜스포사아제 자체를 도입할 수 있다.
- [1176] 상기 트랜스포사아제는 제거-전용 트랜스포사아제 (excision-only transposase)를 포함할 수 있다.
- [1178] **1-2-2. 틀박스 제거 기작**
- [1179] 상기 세포 내로 도입된 트랜스포사아제는 상기 세포 내에 존재하는 트랜스포존 틀박스를 동물 계놈으로부터 제거할 수 있다.
- [1180] 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절하는 프로모터가 조직-특이적 프로모터인 경우, 상기 동물 계놈을 포함하는 형질 전환 동물의 특정 조직 세포에 도입된 트랜스포사아제가 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 트랜스포존 틀박스의 ITR 폴리뉴클레오타이드와 상호작용을 통해 상기 트랜스포사아제가 도입된 세포 내 동물 계놈 상의 트랜스포존 틀박스를 제거할 수 있다.
- [1181] 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절하는 프로모터가 유도 프로모터인 경우, 특정 조건을 만족해야 세포 내로 도입된 트랜스포사아제가 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 트랜스포존 틀박스의 ITR 폴리뉴클레오타이드와 상호작용을 통해 특정 조건을 만족하는 세포 내 동물 계놈 상의 트랜스포존 틀박스를 제거할 수 있다.
- [1182] 상기 트랜스포사아제 전사를 조절하는 프로모터와 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 사이에 LSL이 위치하는 경우, Cre 리컴비나아제를 함께 도입하여 위치-특이적 재조합을 통해 상기 LSL에 존재하는 종결 코돈을 제거 해야 트랜스포사아제가 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 트랜스포존 틀박스의 ITR 폴리뉴클레오타이드와의 상호작용을 통해 Cre 리컴비나아제를 포함하는 세포 내 동물 계놈 상의 트랜스포존 틀박스를 제거할 수 있다.
- [1184] **2. 위치-특이적 리컴비나아제에 의한 틀박스 제거**
- [1185] 세포 내 동물 계놈은 적어도 하나의 틀박스를 포함할 수 있다. 상기 적어도 하나의 틀박스 중 RRS 틀박스의 제1 말단 영역은 RRS 1을 포함하고, 제2 말단 영역은 RRS 2를 포함할 수 있다.
- [1186] 본 출원의 용어 "RRS 틀박스"는 RRS를 일 구성으로 포함하는 틀박스를 의미할 수 있다.
- [1188] 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 동일하거나 서로 다를 수 있다.
- [1189] 상기 RRS 1 및 RRS 2는 서로 한 쌍일 수 있다.
- [1190] 상기 RRS 1와 상호작용 할 수 있는 SSR 1 및 상기 RRS 2와 상호작용 할 수 있는 SSR 2는 서로 동일한 SSR일 수 있다.
- [1192] **2-1. 동물의 계놈 내 위치-특이적 리컴비나아제 이용**
- [1193] **2-1-1. 틀박스 제거 위한 구성**

- [1194] 상기 세포 내 동물의 게놈은 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 하나 이상 포함할 수 있다.
- [1195] 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 SSR 틀박스 내에 위치할 수 있다.
- [1196] 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 SSR 틀박스가 아닌 다른 틀박스 내에 위치할 수 있다.
- [1197] 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 틀박스 외부에 위치할 수 있다.
- [1198] 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 상류에는 상기 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절하는 프로모터가 위치할 수 있다. 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도 프로모터 중 어느 하나일 수 있다. 상기 SSR의 전사를 조절하는 프로모터와 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에는 LSL이 위치할 수 있다.
- [1200] **2-1-2. 틀박스 제거 기작**
- [1201] 상기 세포에서 발현된 SSR은 RRS 1 및 RRS 2와의 상호작용을 통해 상기 RRS 틀박스를 동물 게놈으로부터 제거할 수 있다.
- [1202] 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절하는 프로모터가 조직-특이적 프로모터인 경우, 상기 동물 게놈을 포함하는 형질 전환 동물의 특정 조직에서 SSR이 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 RRS 틀박스 양 말단의 RRS 1 및 RRS 2와 상호작용을 통해 특정 조직이 포함하는 세포 내 동물 게놈 상의 RRS 틀박스를 제거할 수 있다.
- [1203] 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절하는 프로모터가 유도 프로모터인 경우, 특정 조건을 만족해야 SSR이 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 RRS 틀박스 양 말단의 RRS 1 및 RRS 2와 상호작용을 통해 특정 조건을 만족하는 세포 내 동물 게놈 상의 RRS 틀박스를 제거할 수 있다.
- [1204] 상기 SSR 전사를 조절하는 프로모터와 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 LSL이 위치하는 경우, Cre 리컴비나아제를 세포 내에 도입하여 위치-특이적 재조합을 통해 상기 LSL에 존재하는 종결 코돈을 제거 해야 SSR이 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 RRS 틀박스 양 말단의 RRS 1 및 RRS 2와 상호작용을 통해 Cre 리컴비나아제를 포함하는 세포 내 동물 게놈 상의 RRS 틀박스를 제거할 수 있다.
- [1206] **2-2. 동물 게놈 외부의 위치-특이적 리컴비나아제 이용**
- [1207] **2-2-1. 틀박스 제거 위한 구성**
- [1208] 상기 동물 게놈은 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지 않을 수 있다.
- [1209] 이 경우, 상기 세포 내로 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 전달 할 수 있다. 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 상류에는 상기 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절하는 프로모터가 위치할 수 있다. 상기 프로모터는 구성 발현 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 유도 프로모터 중 어느 하나일 수 있다. 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 상류에는 LSL이 위치할 수 있다.
- [1210] 또는 상기 세포 내로 SSR 자체를 도입할 수 있다.
- [1212] **2-2-2. 틀박스 제거 기작**
- [1213] 상기 세포 내로 도입된 SSR은 RRS 1 및 RRS 2와의 상호작용을 통해 상기 RRS 틀박스를 동물 게놈으로부터 제거할 수 있다.
- [1214] 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절하는 프로모터가 조직-특이적 프로모터인 경우, 상기 동물 게놈을 포함하는 형질 전환 동물의 특정 조직 세포에 도입된 SSR이 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 RRS 틀박스 양 말단의 RRS 1 및 RRS 2와 상호작용을 통해 상기 SSR이 도입된 세포 내 동물 게놈 상의 RRS 틀박스를 제거할 수 있다.
- [1215] 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 조절하는 프로모터가 유도 프로모터인 경우, 특정 조건을 만족해야 세포 내로 도입된 SSR이 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 RRS 틀박스 양 말단의 RRS 1 및 RRS 2와 상호작용을 통해 특정 조건을 만족하는 세포 내 동물 게놈 상의 RRS 틀박스를 제거할 수 있다.
- [1216] 상기 SSR 전사를 조절하는 프로모터와 상기 SSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 사이에 LSL이 위치하는 경우, Cre 리컴비나아제를 함께 도입하여 위치-특이적 재조합을 통해 상기 LSL에 존재하는 종결 코돈을 제거 해야 SSR이 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 RRS 틀박스 양 말단의 RRS 1 및 RRS 2와 상호작용을 통해 Cre 리컴비나아

제를 포함하는 세포 내 동물 게놈 상의 RRS 틀박스를 제거할 수 있다.

- [1218] 이하에서는, 본 출원에 의해 개시되는 내용에 따른 구체적인 실시예들에 대해서 설명하기로 한다.
- [1220] **[RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 가이드 핵산 중 하나 이상을 포함하는 틀박스]**
- [1221] **1. 틀박스의 구성**
- [1222] 본 출원의 몇몇 실시예에 의해 개시되는 틀박스는 제1 ITR 서열, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상 및 제2 ITR 서열을 포함할 수 있다.
- [1223] 상기 제1 ITR 서열, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열에 대한 설명은 전술한 바 있으므로 자세한 설명은 생략하기로 한다.
- [1224] 도 1을 참조하여, 상기 틀박스의 구성을 구체적으로 설명하기로 한다.
- [1225] 상기 틀박스(100)는 제1 ITR 서열(101) 및 제2 ITR 서열(107) 사이에 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(110)를 포함할 수 있다.
- [1226] 도 2는 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(110)의 다양한 예를 도시한다.
- [1227] 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(110)에는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(102)와 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(104) 중 하나 이상이 포함될 수 있다.
- [1228] 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 인위적 뉴클레아제 복합체를 구성하는 Cas9 단백질 또는 Cpf1 단백질일 수 있고, 상기 가이드 핵산은 인위적 뉴클레아제 복합체를 구성하는 gRNA 일 수 있다.
- [1229] 또한, 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(110)에는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및/또는 가이드 핵산을 발현시키기 위한 프로모터(106)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 더 포함될 수 있다.
- [1231] 상기 틀박스(100)에는 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 가 더 포함될 수 있다.
- [1232] 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 의 종류 및 개수는 하나 이상일 수 있다.
- [1233] 상기 틀박스(100) 내에서 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 가 존재할 수 있는 위치는 다양할 수 있다. 예를 들어, 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 는 도 2에 표시된 1 내지 24 중 어느 하나 이상에 위치할 수 있다.
- [1235] 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 의 종류, 개수 및/또는 위치는 상기 틀박스의 구성 변경을 고려해서 설계될 수 있다.
- [1236] 상기 구성 변경은 틀박스에 포함되어 있는 폴리뉴클레오타이드가 교체(exchange)되거나 제거(deletion)되는 것을 포함할 수 있으며, 틀박스에 포함되어 있지 않은 폴리뉴클레오타이드가 상기 틀박스에 삽입(insertion)되는 것을 포함할 수 있다.
- [1237] 도 2를 이용하여, 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 를 포함하는 틀박스의 구성에 따라 틀박스의 구성이 변경되는 몇몇 예를 아래에 설명하였다.
- [1238] 예를 들어, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(102)를 기준으로 5'방향 및 3'방향에 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 가 포함되는 것으로 설계된 틀박스의 경우, 위치-특이적 재조합을 통해 틀박스에 포함되어 있는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 다른 종류의 폴리뉴클레오타이드로 교체될 수 있다. 구체적으로, 도 2 의 4 및 5 위치에 다른 종류의 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 가 포함된 경우, 위치-특이적 재조합을 통해 틀박스에 포함되어 있는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 다른 종류의 폴리뉴클레오타이드로 교체될 수 있다.
- [1239] 다른 예를 들어, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(102)를 기준으로 5'방향 및 3'방향에 한 쌍을 이룰 수 있는 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 가 포함되는 것으로 설계된 틀박스의 경우, 위치-특이적 재조합을 통해 틀박스에 포함되어 있는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 제거될 수 있다. 구체적으로, 도 2의 4 및 5 위치에 loxp를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 경우, 위치-특이적 재조합을 통해 틀박스에 포함되어 있는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가

제거될 수 있다.

- [1240] 또 다른 예를 들어, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(102)를 기준으로 5'방향 및/또는 3' 방향에 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)가 포함되는 것으로 설계된 툴박스의 경우, 위치-특이적 재조합을 통해 툴박스에 포함되어 있지 않은 폴리뉴클레오타이드가 상기 툴박스에 삽입될 수 있다. 구체적으로, 도 2의 5 위치에 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)가 포함된 경우, 위치-특이적 재조합을 통해 툴박스에 포함되어 있지 않은 폴리뉴클레오타이드가 상기 툴박스에 삽입될 수 있다.
- [1242] 또한, 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)의 종류, 개수 및/또는 위치는 상기 툴박스를 구성하는 폴리뉴클레오타이드가 암호화하는 RNA 또는 단백질의 발현 조절을 고려해서 설계될 수 있다.
- [1243] 도 2를 이용하여, 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 포함하는 툴박스의 구성에 따라 RNA 또는 단백질의 발현이 조절되는 몇몇 예를 아래에 설명하였다.
- [1244] 상기 툴박스를 구성하는 폴리뉴클레오타이드가 암호화하는 RNA 또는 단백질의 발현 조절은, 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용해서 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 추후에 삽입되는 것을 포함할 수 있다.
- [1245] 예를 들어, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5'방향에 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)가 포함된 경우, 위치-특이적 재조합을 통해 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역을 위한 프로모터를 삽입하여 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현 조절이 가능하다.
- [1246] 구체적으로, 도 2의 17에 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)가 포함된 경우, 위치-특이적 재조합을 통해 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역을 위한 프로모터를 삽입하여 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현 조절이 가능하다.
- [1247] 상기 툴박스를 구성하는 폴리뉴클레오타이드가 암호화하는 RNA 또는 단백질의 발현 조절은, 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용해서 상기 툴박스에 이미 존재하고 있는 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 의한 발현을 일시적으로 중단시키는 것을 포함할 수 있다.
- [1248] 예를 들어, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(102)와 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역을 위한 프로모터(106) 사이에 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드-종결 코돈-제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드-전사 종결 코돈-제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(이하, RSR1) 또는 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드-전사 종결 코돈-제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(이하, RTR1)가 포함된 경우, 위치-특이적 재조합을 통해 상기 RSR1 및/또는 RTR1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 제거되기 전에는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 발현될 수 없으며, 결과적으로 인위적 뉴클레아제 복합체가 형성될 수 없다.
- [1249] 구체적으로, 도 2의 21에 상기 RSR1 또는 RTR1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 경우, 위치-특이적 재조합을 통해 상기 RSR1 및/또는 RTR1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 제거되기 전에는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 발현될 수 없으며, 결과적으로 인위적 뉴클레아제 복합체가 형성될 수 없다.
- [1251] 진술한 바와 같이, 툴박스는 다양한 구성일 수 있으며, 툴박스의 구성에 따라 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포 또는 동물에서 나타날 수 있는 효과도 다양할 수 있다.
- [1252] 이하에서는 상기 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포 및 수정란에 대해 설명한다.
- [1254] **2. 툴박스가 삽입된 계놈을 포함하는 세포 및 수정란**
- [1255] **2-1. 툴박스가 삽입된 계놈을 포함하는 세포 및 수정란의 구성**
- [1256] **2-1-1. 툴박스가 삽입된 계놈 또는 염색체**
- [1257] 본 출원에 의해 제공되는 툴박스는 세포의 계놈에 삽입될 수 있다.
- [1258] 상기 툴박스가 계놈에 삽입될 수 있는 위치는 랜덤(random) 할 수 있다.
- [1259] 상기 계놈에 삽입될 수 있는 툴박스의 개수는 하나일 수 있다.
- [1260] 상기 계놈에 삽입될 수 있는 툴박스의 개수는 두 개 이상일 수 있다.
- [1261] 상기 계놈에 삽입될 수 있는 툴박스의 종류는 하나 이상일 수 있다.

- [1262] 예를 들어, 상기 게놈에 제1 톨박스 및 제2 톨박스가 삽입될 수 있다. 상기 제1 톨박스의 서열은 상기 제2 톨박스의 서열과 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1264] 상기 세포가 진핵 세포인 경우, 본 출원에 의해 제공되는 톨박스는 염색체(chromosome)에 삽입될 수 있다.
- [1265] 상기 톨박스가 염색체에 삽입될 수 있는 위치는 랜덤 할 수 있다.
- [1266] 상기 염색체에 삽입될 수 있는 톨박스의 개수는 하나 일 수 있다.
- [1267] 상기 염색체에 삽입될 수 있는 톨박스의 개수는 두 개 이상일 수 있다.
- [1268] 상기 염색체에 삽입될 수 있는 톨박스의 종류는 하나 이상일 수 있다.
- [1269] 예를 들어, 상기 염색체에는 제1 톨박스 및 제2 톨박스가 삽입될 수 있다. 이 경우, 상기 제1 톨박스의 서열은 상기 제2 톨박스의 서열과 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1271] 이하에서는 한 종류의 톨박스가 염색체에 삽입되어있는 경우를 상정하여, 톨박스가 염색체 상에 삽입되는 위치에 대해 자세히 설명한다.
- [1272] 설명의 편의를 위하여, 이하에서는 하나의 세포 내에 존재하는 게놈으로부터 형성된 염색체가 4개인 경우를 상정하여 설명한다. 도 3은 하나의 세포 내에 존재하는 게놈으로부터 형성된 4개의 염색체를 도시한다.
- [1273] 도 3에 도시된 제1 염색체(210) 및 제2 염색체(220)는 상동 염색체(homologous chromosomes)의 관계에 있으며, 제3 염색체(230) 및 제4 염색체(240)도 상동염색체의 관계에 있다.
- [1274] 상기 제1 염색체(210)는 제1 염색분체(chromatid)(CT1) 및 제2 염색분체(chromatid)(CT2)로 구성되고, 상기 제2 염색체(220)는 제3 염색분체(chromatid)(CT3) 및 제4 염색분체(chromatid)(CT4)로 구성되어 있다. 또한, 상기 제3 염색체(230)는 제5 염색분체(chromatid)(CT5) 및 제6 염색분체(chromatid)(CT6)로 구성되고, 상기 제4 염색체(240)는 제7 염색분체(chromatid)(CT7) 및 제8 염색분체(chromatid)(CT8)로 구성되어 있다.
- [1275] 도 4는 톨박스(100)가 제1 염색분체 내지 제8 염색분체(CT1 내지 CT8) 중 어느 하나 이상에 삽입된 것을 나타내는 몇몇 실시예를 도시한다.
- [1276] 상기 톨박스(100)는 제1 염색분체 내지 제8 염색분체 (CT1 내지 CT8) 중 어느 하나에만 삽입될 수 있다.
- [1277] 상기 톨박스(100)는 제1 염색분체 내지 제8 염색분체 (CT1 내지 CT8) 중 둘 이상에 삽입될 수 있다.
- [1278] 예를 들어, 상기 톨박스(100)는 세포의 염색체 중 하나의 염색분체(CT1)에만 삽입될 수 있다 (도 4의 (a) 참고).
- [1279] 다른 예를 들어, 상기 톨박스(100)는 세포의 염색체 중 제1 염색체(210)의 제1 염색분체(CT1) 및 제2 염색분체(CT2)에 삽입될 수 있다 (도 4의 (b) 참고).
- [1280] 또 다른 예를 들어, 상기 톨박스(100)는 세포의 염색체 중 제1 염색체 (210)의 제1 염색분체(CT1) 및 제2 염색체(220)의 제1 염색분체(CT3) 에 삽입될 수 있다 (도 4의 (c) 참고). 이 경우, 상기 제1 염색체(210)와 상기 제2 염색체(220)는 상동 염색체 관계 일 수 있다.
- [1281] 또 다른 예를 들어, 상기 톨박스(100)는 세포의 염색체 중 제1 염색체(210)의 제1 염색분체(CT1) 및 제2 염색체(230)의 제1 염색분체(CT5) 에 삽입될 수 있다 (도 4의 (d) 참고). 이 경우, 상기 제1 염색체(210)와 상기 제2 염색체(230)는 상동 염색체 관계가 아닐 수 있다.
- [1283] **2-1-2. 톨박스가 삽입된 게놈 또는 염색체를 가지는 세포의 종류**
- [1284] 톨박스는 체세포, 생식세포 또는 줄기세포의 게놈 및/또는 염색체상에 삽입될 수 있다.
- [1285] 설명의 편의를 위해, 이하에서는 체세포, 생식세포 또는 줄기세포의 게놈 및/또는 염색체상에 삽입된 톨박스는 한 종류이며, 전술한 톨박스(100)인 것으로 상정하여 설명한다.
- [1286] 도 5는 상기 톨박스(100)가 삽입된 게놈을 가지는 체세포(301) 및 생식세포를 도시한다. 상기 생식세포는 난자(303) 및 정자(305)일 수 있다.
- [1287] 상기 톨박스(100)가 삽입된 게놈 및/또는 염색체는 상기 체세포의 핵(302), 난자의 핵(304), 및 정자의 핵(306) 내부에 포함되어 있을 수 있다.

- [1288] 상기 세포의 게놈에 삽입된 툴박스(100)는 각 세포의 발현 메커니즘에 따라 전사 및/또는 번역될 수 있다. 이 경우, 상기 세포의 게놈에 이미 존재하고 있던 엔도-폴리뉴클레오타이드의 발현은 영향을 받지 않을 수 있다.
- [1290] **2-1-3. 툴박스가 삽입된 게놈을 포함하는 수정란**
- [1291] 툴박스는 수정란 또는 배아의 게놈 또는 염색체상에 삽입될 수 있다.
- [1292] 본 명세서에 의해 제공되는 일 구현예에 따르면, 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 포함된 RNA-가이드 엔도 뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 게놈을 가지는 형질전환 수정란 또는 형질전환 배아가 제공될 수 있다. 구체적으로, 상기 배아는 우제류의 배아일 수 있다.
- [1293] 또한, 상기 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 상기 수정란 또는 배아의 게놈에 존재하는 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 더 포함되어 있는 형질전환 수정란 또는 배아가 제공될 수 있다. 이때, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에는 발현 조절 요소가 포함될 수 있다.
- [1294] 도 6은 툴박스(100)가 삽입된 게놈을 가지는 수정란 및 툴박스(100)가 삽입된 수정란의 세포 분열에 의한 2세포기 배아, 4세포기 배아, 8세포기 배아, 및 16세포기 배아를 나타낸다.
- [1295] 상기 툴박스(100)가 수정란의 게놈에 삽입되기 시작한 시기가 1세포기 수정란인 경우, 상기 툴박스(100)가 삽입된 1세포기 수정란(401)은 상동성(homologous) 일 수 있다 (도 6 참조).
- [1296] 툴박스(100)가 삽입된 게놈을 가지는 1세포기 수정란(401)이 분열하면, 툴박스(100)가 삽입된 게놈을 가지는 세포들로 구성된 2세포기 배아(403), 4세포기 배아(405), 8세포기 배아(407), 16세포기 배아(409), 상실배, 포배(배반포) 또는 낭배가 될 수 있다.
- [1297] 다만, 상기 2^n 세포기 배아의 게놈에 삽입된 툴박스(100)의 개수 및 위치는 상기 2^{n+1} 세포기 배아의 게놈에 삽입된 툴박스(100)의 개수 및 위치와 서로 상이할 수 있다(n 은 0 이상의 자연수). 또한 상기 2^{n+1} 세포기 배아를 구성하는 각각의 2^{n+1} 개의 세포의 게놈에 삽입된 툴박스(100)의 위치와 개수는 서로 다를 수 있다.
- [1298] 왜냐하면, 1세포기 수정란(401)의 핵 내에 삽입된 툴박스의 위치와 개수는 2세포기 배아(403)에서도 유지될 수 있으나, 상기 2세포기 배아(403)의 상태에서도 전술한 바와 같은 제1 플라스미드 벡터와 트랜스포사아제 및 2세포기 배아(403)의 게놈들 사이의 상호작용에 의해 툴박스가 추가적으로 더 삽입될 수 있기 때문이다. 뿐만 아니라, 상기 2세포기 배아(403)의 게놈들과 트랜스포사아제의 상호작용으로 게놈 상에 이미 삽입된 툴박스(100) 중 일부가 제거될 수 있기 때문이다.
- [1299] 즉, 본 명세서에 의해 제공되는 일 구현예에 따르면, 제1 툴박스를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포 및 제2 툴박스를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질전환 배아로, 상기 제1 툴박스는 제1 좌위에 존재하고 상기 제2 툴박스는 제2 좌위에 존재하며, 상기 제1 좌위 및 상기 제2 좌위는 상이한 형질전환 배아가 제공될 수 있다. 상기 제1 툴박스 및 상기 제2 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레오타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 타겟 사이트는 상기 배아의 엔도-폴리뉴클레오타이드 이거나, 상기 배아의 게놈상에 포함된 엑소-폴리뉴클레오타이드로 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 포함되어 있을 수 있다. 이 때, 상기 제1 툴박스의 서열 및 상기 제2 툴박스의 서열은 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1300] 본 명세서에 의해 제공되는 다른 구현예에 따르면, 제1 툴박스를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포 및 제2 툴박스를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질전환 배아로, 상기 제1 툴박스는 제1 좌위에 존재하고 상기 제2 툴박스는 제2 좌위에 존재하며, 상기 제1 좌위 및 상기 제2 좌위는 동일한 형질전환 배아가 제공될 수 있다. 상기 제1 툴박스 및 상기 제2 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레오타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 타겟 사이트는 상기 배아의 엔도-폴리뉴클레오타이드 이거나, 상기 배아의 게놈상에 포함된 엑소-폴리뉴클레오타이드로 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 포함되어 있을 수 있다. 이 때, 상기 제1 툴박스의 서열 및 상기 제2 툴박스의 서열은 상이하다.
- [1301] 예를 들어, 상기 제1 세포의 게놈은 상기 제1 툴박스의 서열과 동일한 제3 툴박스를 더 포함할 수 있다.

- [1302] 다른 예를 들어, 상기 제2 세포의 게놈은 상기 제2 툴박스의 서열과 동일한 제4 툴박스를 더 포함할 수 있다.
- [1303] 상기 형질전환 배아는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지 않는 게놈을 가지는 제3 세포를 더 포함할 수 있다.
- [1305] 도 7은 일부 세포의 게놈에만 툴박스(100)가 삽입된 2세포기 배아, 4세포기 배아, 8세포기 배아 및 16세포기 배아를 나타낸다. 도 7에 도시된 제1 핵(501)은 툴박스(100)가 삽입된 게놈을 가지는 핵이며, 제2 핵(503)은 툴박스(100)가 삽입되지 않은 게놈을 가지는 핵을 나타낸다.
- [1306] 툴박스(100)가 게놈에 삽입되기 시작한 시기가 2^m 세포기 배아인 경우, 상기 툴박스(100)는 2^m 세포기 이후 배아를 구성하는 세포들 중 일부 세포의 게놈에만 삽입될 수 있다 (m은 1 이상의 자연수). 이 경우에도 툴박스가 배아를 구성하는 모든 세포의 게놈에 삽입될 수 있으나, 이에 대해서는 전술한 내용으로 설명될 수 있기 때문에 이하에서는 배아를 구성하는 세포들 중 일부 세포의 게놈에만 툴박스가 삽입된 경우를 상정하여 설명한다.
- [1307] 예를 들어, 툴박스(100)가 상기 수정란 게놈에 삽입되기 시작한 시기가 2세포기 배아인 경우, 상기 툴박스(100)는 2세포기 배아(411)를 구성하는 세포 중 제1 세포(511)의 게놈에만 삽입될 수 있다.
- [1308] 툴박스(100)가 하나의 세포의 게놈에만 삽입된 2세포기 배아(411)가 분열하면, 일부 세포의 게놈에만 툴박스가 삽입된 4세포기 배아(413), 8세포기 배아(415), 16세포기 배아(417), 상실배, 포배 또는 낭배가 될 수 있다.
- [1309] 즉, 본 명세서에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 툴박스를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포 및 툴박스를 포함하지 않는 게놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 키메릭 형질전환 배아가 제공될 수 있다.
- [1310] 구체적으로, 제1 툴박스 및 타겟 사이트를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포 및 상기 타겟 사이트를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질전환 배아가 제공될 수 있다.
- [1311] 상기 제1 툴박스는 제1 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 결합할 수 있는 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상을 포함하고, 상기 제2 세포의 게놈은 제2 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지 않을 수 있다. 또한, 상기 제1 툴박스의 5' 말단 및 3' 말단에는 ITR 서열이 더 포함될 수 있다.
- [1312] 이 때, 상기 제1 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열과 상기 제2 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열은 동일하거나 상이할 수 있고, 상기 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열과 상기 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열은 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1313] 상기 타겟 사이트는 엔도-폴리뉴클레오타이드일 수 있다.
- [1314] 구체적으로, 상기 타겟 사이트는 상기 형질전환 배아의 게놈 상에 존재하는 18bp 내지 25bp의 염기서열일 수 있다.
- [1315] 상기 타겟 사이트는 엑소-폴리뉴클레오타이드일 수 있다.
- [1316] 예를 들어, 상기 타겟 사이트는 PAM 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접한 서열이고, 상기 타겟 사이트 및 상기 PAM 서열은 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 포함되어있을 수 있다.
- [1317] 다만, 이 경우에도 전술한 것과 동일한 이유로 상기 2^m 세포기 배아의 게놈에 삽입된 툴박스(100)의 개수 및 위치는 상기 2^{m+1} 세포기 배아의 게놈에 삽입된 툴박스(100)의 개수 및 위치와 서로 상이할 수 있다. 또한, 상기 2^{m+1} 세포기 배아를 구성하는 2^{m+1} 개의 세포의 게놈에 삽입된 툴박스(100)의 위치와 개수는 서로 다를 수 있다.
- [1319] 상기 툴박스(100)가 게놈에 삽입되기 시작한 시기가 2^m 세포기 배아인 경우, 2^m 세포기 이후 배아를 구성하는 세포의 게놈마다 상기 툴박스(100)가 다른 좌위에 삽입될 수 있다. (m은 1 이상의 자연수).
- [1321] **2-2. 툴박스가 삽입된 게놈을 포함하는 세포 및/또는 수정란의 생산 방법**
- [1322] 이하에서는 툴박스(100)가 삽입된 게놈을 가지는 세포를 제작하기 위한 몇몇 방법을 설명한다. 설명의 편의를 위하여, 게놈에 삽입될 수 있는 툴박스의 종류가 1개인 경우를 상정하여 설명한다.

- [1324] 툭박스(100)가 삽입된 계놈을 가지는 세포를 제작하기 위한 일 방법은, 상기 툭박스(100)를 상기 세포 내에 전달하는 것을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 툭박스(100)는 트랜스포존(transposon) 유전자 및 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [1325] 상기 툭박스(100)가 세포 내로 전달되는 방법은 다양할 수 있다.
- [1326] 예를 들어, 상기 툭박스를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것에 의해 상기 툭박스가 상기 세포 내에 전달될 수 있다. 상기 툭박스를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것은 상기 툭박스를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 플라스미드 벡터에 포함시켜 상기 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 툭박스를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것은 상기 툭박스를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 바이러스성 벡터에 포함시켜 상기 세포 내로 형질 도입하는 것을 포함할 수 있다.
- [1327] 툭박스(100)가 삽입된 계놈을 가지는 세포를 제작하기 위한 일 방법은, 트랜스포사아제를 상기 세포 내에 전달하는 것을 포함할 수 있다.
- [1328] 상기 트랜스포사아제가 상기 세포 내로 전달되는 방법은 다양할 수 있다.
- [1329] 예를 들어, 상기 트랜스포사아제를 단백질 또는 폴리펩타이드 형태로 세포 내에 도입하는 것에 의해 상기 트랜스포사아제가 상기 세포 내에 전달될 수 있다.
- [1330] 다른 예를 들어, 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것에 의해 상기 트랜스포사아제가 상기 세포 내에 전달될 수 있다.
- [1331] 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것은 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 플라스미드 벡터에 포함시켜 상기 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것은 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 바이러스성 벡터에 포함시켜 상기 세포 내로 형질 도입하는 것을 포함할 수 있다.
- [1332] 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 툭박스를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 벡터에 함께 포함되어 세포 내로 전달될 수 있다. 또한, 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 툭박스를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 벡터와 상이한 벡터에 포함되어 세포 내로 전달될 수 있다. 이 때, 상기 벡터는 비-바이러스성 벡터 또는 바이러스성 벡터 일 수 있다.
- [1333] 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 플라스미드 벡터에 포함되어 상기 세포 내로 도입되는 경우, 상기 플라스미드가 핵 내부로 이동하고 핵에서 전사를 통해 트랜스포사아제를 암호화하는 mRNA가 생산될 수 있다. 생산된 mRNA는 세포질로 이동하여, 세포질에서 리보솜 및 tRNA와 상호작용을 할 수 있고, 상호작용을 통해 세포질 내에서 상기 트랜스포사아제가 발현될 수 있다. 전술한 메커니즘에 의해 발현된 트랜스포사아제는 핵 내부로 유입될 수 있다.
- [1335] 이하에서는, 세포 내로 전달된 상기 툭박스와 트랜스포사아제에 의해 상기 툭박스가 상기 세포의 계놈에 삽입되는 메커니즘을 설명한다.
- [1336] 전술한 방법에 의해 상기 세포 내로 전달된 상기 트랜스포사아제 및 툭박스(100)는 상기 세포의 세포질 내로 유입될 수 있다. 세포질에 유입된 상기 툭박스(100) 및 상기 트랜스포사아제는 핵공(nuclear pore)을 통해 핵 내부로 이동할 수 있다.
- [1337] 핵 내부에서, 상기 트랜스포사아제는 상기 툭박스(100)의 구성인 제1 ITR 서열(101) 및 제2 ITR 서열(107)과 상호작용할 수 있으며, 상호작용에 의해 상기 툭박스(100)가 상기 계놈으로 삽입될 수 있다. 상기 툭박스(100)의 구성은 도 1을 참고한다.
- [1338] 만약, 상기 툭박스(100)가 플라스미드 벡터에 포함되어 상기 세포 내로 전달된 경우라면, 상기 툭박스(100)는 상기 플라스미드 벡터로부터 제거될 수 있으며, 제거된 상기 툭박스(100)가 상기 세포의 계놈에 삽입될 수 있다.
- [1339] 상기 세포는 분리된 세포(isolated cell) 또는 동물의 기관 또는 조직에 포함되어 있는 비분리된 세포(non-isolated cell)일 수 있다.

- [1340] 상기 툴박스(100)가 삽입된 계놈을 가지는 비분리된 세포(non-isolated cell)를 제작하기 위한 일 방법은, 상기 툴박스(100) 및 상기 트랜스포사아제를 개체의 조직 또는 기관에 직접 주사(injection)하는 방법으로 전달하는 것을 포함할 수 있다.
- [1341] 이 경우에도, 분리된 세포(isolated cell)의 계놈에 툴박스(100)가 삽입되는 메커니즘과 유사하게, 상기 툴박스(100)가 상기 비분리된 세포의 계놈에 삽입될 수 있다.
- [1342] 상기 조직 또는 기관이 생식 조직 또는 생식 기관인 경우, 형질 전환된 생식세포를 지속적으로 얻을 수 있는 장점이 있다.
- [1344] 이하에서는 툴박스(100)가 삽입된 계놈을 가지는 수정란 및/또는 배아를 제작하기 위한 몇몇 방법을 설명한다. 전술한 바와 같이, 설명의 편의를 위하여 수정란의 계놈에 삽입될 수 있는 툴박스의 종류가 1개인 경우를 상정하여 설명한다.
- [1345] 상기 툴박스(100)가 삽입된 계놈을 가지는 수정란 및/또는 배아를 제작하기 위한 일 방법은, 상기 툴박스(100)를 상기 수정란 및/또는 배아에 미세주입 하는 것을 포함할 수 있다.
- [1346] 상기 툴박스(100)가 삽입된 계놈을 가지는 수정란 및/또는 배아를 제작하기 위한 일 방법은, 트랜스포사아제를 상기 수정란 및/또는 배아에 미세주입 하는 것을 포함할 수 있다.
- [1347] 상기 툴박스 및 상기 트랜스포사아제가 상기 세포 내로 전달되는 방법은 전술한 바 있어, 구체적인 설명은 생략한다.
- [1349] 본 명세서에 의해 제공되는 형질전환 배아를 제작하기 위한 일 구현 방법은, 트랜스포존 유전자 및 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 수정란 또는 배아에 미세주입 하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 트랜스포존 유전자와 상호작용 할 수 있는 트랜스포사아제를 수정란 또는 배아에 미세주입 하는 것을 포함할 수 있다.
- [1350] 상기 트랜스포사아제는 단백질, 폴리펩타이드, 또는 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 형태일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터에 포함된 것일 수 있다. 나아가, 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 트랜스포존 유전자 및 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 하나의 벡터에 포함되어 수정란 또는 배아에 미세주입 될 수 있다.
- [1351] 상기 방법에 의해 제작될 수 있는 형질전환 배아의 일 형태는 제1 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 제1 좌위에 포함된 계놈을 가지는 제1 세포 및 제2 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 상기 제1 좌위와 상이한 제2 좌위에 포함된 계놈을 가지는 제2 세포를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 제1 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 상기 제2 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열은 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1352] 상기 방법에 의해 제작될 수 있는 형질전환 배아의 다른 형태는 제1 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 제1 좌위에 포함된 계놈을 가지는 제1 세포 및 제2 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 상기 제1 좌위에 포함된 계놈을 가지는 제2 세포를 포함할 수 있다. 이 때, 상기 제1 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 상기 제2 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열은 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1354] 상기 툴박스(100)가 삽입된 계놈을 가지는 수정란 및/또는 배아를 제작하기 위한 일 방법은, 상기 툴박스(100)가 삽입되어 있는 계놈을 가지는 체세포를 이용해 체세포 핵 이식(SCNT) 하는 것을 포함할 수 있다.
- [1355] 본 명세서에 의해 제공되는 형질전환 배아를 제작하기 위한 일 구현 방법은, 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발현되는 형질전환 공여세포를 제작하는 것과 상기 형질전환 공여세포의 핵을 탈핵 난자에 이식하는 것을 포함할 수 있다.
- [1356] 상기 형질전환 공여세포를 제작하는 것은 트랜스포존 유전자 및 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터로 세포를 형질전환 하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 형질전환 공여세포를 제작하는 것은 상기 트랜스포존 유전자와 상호작용할 수 있는 트랜스포사아제로 상기 세포를 형질전환 하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [1357] 상기 트랜스포사아제는 단백질, 폴리펩타이드, 또는 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 형

태일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터에 포함된 것일 수 있다. 나아가, 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 트랜스포존 유전자 및 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 하나의 벡터에 포함되어 수정란 또는 배아에 미세주입 될 수 있다.

[1359] 상기 툴박스(100)가 상기 수정란을 구성하는 세포의 계놈에 삽입되는 메커니즘은 분리된 세포의 계놈에 툴박스(100)가 삽입되는 메커니즘과 유사하다.

[1362] **3. 툴박스가 삽입된 계놈을 포함하는 형질전환 동물**

[1363] **3-1. 툴박스가 삽입된 계놈을 포함하는 형질전환 동물**

[1364] 본 명세서에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 툴박스가 삽입된 계놈을 포함하는 형질전환 동물이 제공될 수 있다.

[1365] 본 명세서에 의해 제공되는 일 구현예에 따르면, 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 포함된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 계놈을 가지는 형질전환 동물이 제공될 수 있다. 구체적으로, 상기 동물은 우체류일 수 있다.

[1366] 또한, 상기 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 상기 동물에 존재하는 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 더 포함되어 있는 형질전환 동물이 제공될 수 있다. 이때, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에는 발현 조절 요소가 포함될 수 있다.

[1367] 본 출원에서 있어서, 툴박스가 삽입된 계놈을 포함하는 형질전환 동물이라 함은, 상기 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포를 적어도 하나 이상 가지는 동물을 의미한다. 상기 형질전환은 일시적인 형질전환과 영구적인 형질전환을 모두 포함할 수 있다.

[1368] 아울러, 이하에서는 상기 형질전환 동물이 가지고 있는 세포들 중 상기 툴박스가 삽입된 세포를 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'라 하고, 상기 툴박스가 삽입되지 않은 세포를 '비(非)툴박스 세포(non-Toolbox engineered cell)'라 한다.

[1369] 다만, 본 출원에 있어서, '비툴박스 세포(non-Toolbox engineered cell)'라는 의미는 상기 툴박스가 삽입되지 않은 상태의 계놈을 가지는 세포를 의미하는 것일 뿐, 다른 목적을 위하여 유전적으로 계놈이 조작된 세포를 의미하는 용어로 이해되어서는 안될 것이다. 즉, 상기 툴박스가 삽입되어 있지는 않지만, 다른 유전적 조작이 된 계놈을 가지는 세포도 본 출원에서 말하는 '비툴박스 세포(non-Toolbox engineered cell)'일 수 있다.

[1370] 툴박스가 삽입된 형질전환 동물은 키메라 동물이거나 상동성 동물일 수 있다.

[1371] 예를 들어, 상기 키메라 동물은 상기 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'에 더하여 상기 '비툴박스 세포(non-Toolbox engineered cell)'를 함께 가지고 있는 동물을 의미하는 것 일 수 있다.

[1372] 즉, 본 명세서에 의해 제공되는 몇몇 구현예에 따르면, 툴박스를 포함하는 계놈을 가지는 제1 세포 및 툴박스를 포함하지 않는 계놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 키메라 형질전환 동물이 제공될 수 있다.

[1373] 구체적으로, 제1 툴박스 및 타겟 사이트를 포함하는 계놈을 가지는 제1 세포 및 상기 타겟 사이트를 포함하는 계놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질전환 동물이 제공될 수 있다.

[1374] 상기 제1 툴박스는 제1 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 결합할 수 있는 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상을 포함하고, 상기 제2 세포의 계놈은 제2 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지 않을 수 있다. 또한, 상기 제1 툴박스의 5' 말단 및 3' 말단에는 ITR 서열이 더 포함될 수 있다.

[1375] 이 때, 상기 제1 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열과 상기 제2 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열은 동일하거나 상이할 수 있고, 상기 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열과 상기 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열은 동일하거나 상이할 수 있다.

[1376] 상기 타겟 사이트는 엔도-폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

- [1377] 구체적으로, 상기 타겟 사이트는 상기 형질전환 동물의 게놈 상에 존재하는 18bp 내지 25bp의 염기서열일 수 있다.
- [1378] 상기 타겟 사이트는 엑소-폴리뉴클레오타이드일 수 있다.
- [1379] 예를 들어, 상기 타겟 사이트는 PAM 서열의 5' 말단 또는 3' 말단에 인접한 서열이고, 상기 타겟 사이트 및 상기 PAM 서열은 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 포함되어있을 수 있다.
- [1380] 다른 예를 들어, 상기 키메라 동물은 상기 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'만 가지고 있으나 상기 동물을 구성하는 각 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'의 게놈에 툭박스가 삽입되어 있는 좌위가 상이한 동물을 의미하는 것 일 수 있다.
- [1382] 즉, 본 명세서에 의해 제공되는 일 구현예에 따르면, 제1 툭박스를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포 및 제2 툭박스를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질전환 동물로, 상기 제1 툭박스는 제1 좌위에 존재하고 상기 제2 툭박스는 제2 좌위에 존재하며, 상기 제1 좌위 및 상기 제2 좌위는 상이한 형질전환 동물이 제공될 수 있다. 상기 제1 툭박스 및 상기 제2 툭박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레오타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 타겟 사이트는 상기 동물의 엔도-폴리뉴클레오타이드 이거나, 상기 동물의 게놈상에 포함된 엑소-폴리뉴클레오타이드로 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 포함되어 있을 수 있다. 이 때, 상기 제1 툭박스의 서열 및 상기 제2 툭박스의 서열은 동일하거나 상이 할 수 있다.
- [1383] 본 명세서에 의해 제공되는 다른 구현예에 따르면, 제1 툭박스를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포 및 제2 툭박스를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질전환 동물로, 상기 제1 툭박스는 제1 좌위에 존재하고 상기 제2 툭박스는 제2 좌위에 존재하며, 상기 제1 좌위 및 상기 제2 좌위는 동일한 형질전환 동물이 제공될 수 있다. 상기 제1 툭박스 및 상기 제2 툭박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레오타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 타겟 사이트는 상기 동물의 엔도-폴리뉴클레오타이드 이거나, 상기 동물의 게놈상에 포함된 엑소-폴리뉴클레오타이드로 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 포함되어 있을 수 있다. 이 때, 상기 제1 툭박스의 서열 및 상기 제2 툭박스의 서열은 상이하다.
- [1384] 예를 들어, 상기 제1 세포의 게놈은 상기 제1 툭박스의 서열과 동일한 제3 툭박스를 더 포함할 수 있다.
- [1385] 다른 예를 들어, 상기 제2 세포의 게놈은 상기 제2 툭박스의 서열과 동일한 제4 툭박스를 더 포함할 수 있다.
- [1386] 상기 형질전환 동물은 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지 않는 게놈을 가지는 제3 세포를 더 포함할 수 있다.
- [1388] 상기 상동성 동물은 상기 동물을 구성하는 각 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'의 게놈에 툭박스 삽입되어 있는 좌위가 동일한 동물을 의미할 수 있다.
- [1390] 본 출원에 의해 개시되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 툭박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포를 포함하는 동물로부터 상기 툭박스가 삽입된 게놈을 가지는 생식세포 또는 수정란(및/또는 배아)가 얻어질 수 있으며, 상기 생식 세포는 정자 또는 난자일 수 있다.
- [1391] 본 출원에 의해 개시되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 툭박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포를 포함하는 동물로부터 상기 툭박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포를 포함하는 자손이 생산될 수 있다.
- [1392] 본 출원에 의해 개시되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 툭박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포를 포함하는 동물 게놈에서 추가적인 유전자 편집(gene editing)이 일어날 수 있다.
- [1394] **3-2. 툭박스가 삽입된 게놈을 포함하는 형질전환 동물 제작 방법**
- [1395] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 의한 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'를 포함하는 동물을 생산하는 일 방법은, 툭박스가 삽입된 게놈을 가지는 수정란 또는 배아를 대리모의 자궁에 이식하는 것을 포함할 수 있다. 상기 수정란 또는 배아가 대리모의 자궁에 이식된 후, 임신 기간을 거쳐 상기 툭박스가 삽입된 게놈을 가지는 동물이 생산될 수 있다.
- [1396] 상기 툭박스가 삽입된 게놈을 가지는 수정란 또는 배아를 생산하기 위한 일 방법은, 상기 툭박스 및/또는 트랜스포사아제를 미세주입(MI)하는 것을 포함할 수 있다.

- [1397] 상기 미세주입(MI)에 의해 생산된 수정란 및/또는 배아는 키메릭 이거나 상동성 일 수 있다. 또한, 상기 수정란 및/또는 배아를 대리모의 자궁에 이식하여 얻은 동물은 키메릭이거나 상동성일 수 있다.
- [1398] 상기 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 수정란 또는 배아를 생산하기 위한 다른 방법은, 체세포 핵이식(SCNT)하는 것을 포함할 수 있다.
- [1399] 상기 체세포 핵이식에는, 도 5의 툴박스(100)가 삽입된 계놈을 가지는 체세포(301)의 핵을 탈핵 난자(enucleated oocyte)에 이식하는 것을 포함할 수 있다. 상기 체세포 핵이식(SCNT)에 의해 생산된 수정란 또는 배아를 대리모의 자궁에 착상시켜 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'를 포함하는 동물을 생산할 수 있다.
- [1400] 상기 체세포 핵이식(SCNT)에 의해 얻어진 수정란 및/또는 배아는 상동성 일 수 있다. 또한, 수정란 및/또는 배아를 이용해 생산된 동물도 상동성 일 수 있다. 이 경우 상기 체세포 핵이식(SCNT)에 의해 생산된 상동성 인 수정란, 배아 및/또는 동물 계놈은 상기 체세포(301)의 계놈과 동일한 서열을 가질 수 있다.
- [1401] 상기 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 수정란 또는 배아를 생산하기 위한 또 다른 방법은, 툴박스(100)가 삽입된 계놈을 가지는 난자(303)와 정자(305)를 체외수정 시키거나, 상기 난자(303) 또는 정자(305)를 야생형(WT) 정자 또는 난자와 체외수정 시키는 방법을 포함할 수 있다.
- [1402] 상기 체외수정에 의해 생산된 수정란 및/또는 배아는 키메릭 이거나 상동성 일 수 있다. 또한, 상기 수정란 및/또는 배아를 대리모의 자궁에 착상시켜 얻은 동물은 키메릭 이거나 상동성 일 수 있다.
- [1403] 보다 구체적으로, 본 명세서에 의해 제공되는 형질전환 동물을 제작하기 위한 일 구현 방법은 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발현되는 형질전환 배아를 제작하는 것과 상기 형질전환 배아를 대리모의 자궁에 이식하는 것을 포함할 수 있다.
- [1404] 상기 형질전환 배아를 제작하는 일 구현 방법은 트랜스포존 유전자 및 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 수정란 또는 배아에 미세주입하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 형질전환 배아를 제작하는 것은 상기 트랜스포존 유전자와 상호작용할 수 있는 트랜스포사아제를 상기 수정란 또는 배아에 미세주입 하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [1405] 상기 형질전환 배아를 제작하는 다른 구현 방법은 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발현되는 형질전환 공여세포를 제작하는 것과 상기 형질전환 공여세포의 핵을 상기 동물의 탈핵 난자에 이식하는 것을 포함할 수 있다.
- [1406] 상기 형질전환 공여세포를 제작하는 것은 트랜스포존 유전자 및 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터로 세포를 형질전환 하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 형질전환 공여세포를 제작하는 것은 상기 트랜스포존 유전자와 상호작용할 수 있는 트랜스포사아제로 상기 세포를 형질전환 하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [1407] 상기 트랜스포사아제는 단백질, 폴리펩타이드, 또는 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 형태일 수 있다. 상기 폴리뉴클레오타이드는 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터에 포함된 것일 수 있다. 나아가, 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 트랜스포존 유전자 및 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 하나의 벡터에 포함된 형태일 수 있다.
- [1409] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 의한 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'를 포함하는 동물을 생산하는 일 방법은, 상기 툴박스 및 트랜스포사아제를 동물의 조직에 주사(injection)하는 것을 포함할 수 있다. 이 경우, 주사(injection)된 상기 조직의 일부 세포만 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'가 될 수 있다. 진술한 조직에 주사(injection)하는 방법을 통해 생산된 동물은 키메릭 동물일 수 있다.
- [1411] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 의한 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'를 포함하는 동물을 생산하는 일 방법은, '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'를 포함하는 정소를 가지는 수컷 또는 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'를 포함하는 난소를 가지는 암컷을 자연교배 시키는 것을 포함할 수 있다.
- [1412] 예를 들어, 상기 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)' 를 포함하는 정소를 가지는 수컷과 상기 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'를 포함하는 난소를 가지는 암컷을 자연교배 시키는 것을 포함할 수 있다.
- [1413] 다른 예를 들어, 상기 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'를 포함하는 정소를 가지는 수컷과 야생형(WT) 암컷을 자연교배 시키거나, 상기 '툴박스 세포(Toolbox engineered cell)'를 포함하는 난소를 가지는 암컷과 야생형(WT) 수컷을 자연교배 시키는 것을 포함할 수 있다.

- [1414] 기술한 자연교배를 통해 생산된 동물은 키메릭 또는 상동성 동물일 수 있다.
- [1416] **[툴박스를 이용한 2차 유전자 편집(gene editing)]**
- [1417] 본 출원에서는, 기술한 바와 같이 툭박스가 게놈에 삽입되어 형질전환 되는 경우를 1차 유전자 편집(gene editing)이라 한다.
- [1418] 상기 1차 유전자 편집(gene editing)에 의해 게놈에 삽입된 툭박스를 이용해서, 추가적인 2차 유전자 편집(gene editing)이 일어날 수 있다. 또한, n차 유전자 편집(gene editing)된 게놈을 이용해서, n+1차 유전자 편집(gene editing)이 일어날 수 있다 (n은 2이상의 자연수). 상기 n차 및 n+1차 유전자 편집(gene editing)은 한 세포의 게놈에서 일어날 수 도 있고, 다른 세포의 게놈에서 일어날 수 도 있다.
- [1419] 상기 'n차 유전자 편집'은 툭박스의 구성 요소로서 포함된 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 유전자 편집일 수 있다.
- [1420] 또한, 상기 'n차 유전자 편집'은 툭박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 유전자 편집일 수 있다.
- [1421] 나아가, 상기 'n차 유전자 편집'은 툭박스의 구성 요소로서 포함된 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 이용한 유전자 편집일 수 있다.
- [1422] 설명의 편의를 위해 이하에서는, 툭박스의 구성으로 포함된 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 및/또는 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 이용한 2차 유전자 편집에 대해서 설명한다.
- [1423]
- [1424] **1. 툭박스에 포함된 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 2차 유전자 편집**
- [1425] 이하에서는, 툭박스 내에 존재하는 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 2차 유전자 편집을 설명한다.
- [1426] 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 2차 유전자 편집은 툭박스 내부에서 일어날 수 있다.
- [1428] **1-1. 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 2차 유전자 교체 편집**
- [1429] **1-1-1. 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 2차 유전자 교체 편집을 위한 툭박스**
- [1430] 본 출원의 몇몇 실시예에 따르면, 교체 편집을 위한 툭박스가 제공될 수 있다.
- [1431] 상기 교체 편집을 위한 툭박스는 제1 ITR 서열, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함할 수 있다.
- [1432] 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 제1 폴리뉴클레오타이드가 포함될 수 있다. 상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 단백질 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드(untranscribed polynucleotide), 번역되지 않는 RNA(untranslated RNA)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 비-기능적 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상 일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [1433] 이하에서는, 상기 교체 편집을 위한 툭박스의 몇몇 실시예를 설명한다.
- [1434] 예를 들어, 상기 교체 편집을 위한 툭박스는 제1 ITR 서열, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 툭박스일 수 있다.
- [1435] 다른 예를 들어, 상기 교체 편집을 위한 툭박스는 제1 ITR 서열, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 툭박스일 수 있다.
- [1436] 또 다른 예를 들어, 상기 교체 편집을 위한 툭박스는 제1 ITR 서열, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 형광 단백질 유전자, 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 툭박스일 수 있다.

- [1437] 또 다른 예를 들어, 상기 교체 편집을 위한 툴박스는 제1 ITR 서열, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 목적 단백질(target protein)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 툴박스일 수 있다.
- [1438] 또 다른 예를 들어, 상기 교체 편집을 위한 툴박스는 제1 ITR 서열, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 목적 단백질(target protein)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 툴박스일 수 있다.
- [1439] 이하에서는, 전술한 교체 편집을 위한 툴박스를 이용한 2차 유전자 교체 편집 방법에 대해 설명한다. 즉, 특정 폴리뉴클레오타이드를 교체하는 방법에 대해 설명한다.
- [1441] **1-1-2. 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 2차 유전자 교체 편집 방법**
- [1442] 교체 편집을 위한 툴박스가 삽입된 계놈에서, 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 존재하는 제1 폴리뉴클레오타이드는 제2 폴리뉴클레오타이드로 교체될 수 있다.
- [1443] 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 제2 폴리뉴클레오타이드로 교체하기 위한 일 방법은, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드를 상기 교체 편집을 위한 툴박스가 삽입되어 있는 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다.
- [1444] 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 상기 세포 내로 전달되는 방법은 다양할 수 있다.
- [1445] 예를 들어, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것에 의해 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 상기 세포 내에 전달될 수 있다. 상기 제2 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것은 상기 제2 폴리뉴클레오타이드를 플라스미드 벡터에 포함시켜 상기 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것은 상기 제2 폴리뉴클레오타이드를 바이러스성 벡터에 포함시켜 상기 세포 내로 형질 도입(transduction)하는 것을 포함할 수 있다.
- [1446] 상기 제2 폴리뉴클레오타이드는 상기 제3 리컴비나아제 인식 사이트(RRS3)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제4 리컴비나아제 인식 사이트(RRS4)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 사이에 위치한다. 이 경우, 상기 제3 리컴비나아제 인식 사이트(RRS3)는 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)와 한 쌍을 이루는 것일 수 있으며, 상기 제4 리컴비나아제 인식 사이트(RRS4)는 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)와 한 쌍을 이루는 것일 수 있다.
- [1447] 또한, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 제2 폴리뉴클레오타이드로 교체하기 위한 일 방법은, 제1 리컴비나아제 및 제2 리컴비나아제를 상기 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다.
- [1448] 이 경우, 상기 제1 리컴비나아제는 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1) 및/또는 상기 제3 리컴비나아제 인식 사이트(RRS3)와 상호작용할 수 있고, 상기 제2 리컴비나아제는 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2) 및/또는 상기 제4 리컴비나아제 인식 사이트(RRS4)와 상호작용할 수 있다.
- [1449] 상기 리컴비나아제가 상기 세포 내로 전달되는 방법은 다양할 수 있다.
- [1450] 예를 들어, 상기 리컴비나아제를 단백질로 상기 세포 내에 도입하는 것에 의해 상기 리컴비나아제가 상기 세포 내에 전달될 수 있다.
- [1451] 다른 예를 들어, 상기 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내에 도입하는 것에 의해 상기 리컴비나아제가 상기 세포 내에 전달될 수 있다. 상기 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내에 도입하는 것은, 상기 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 플라스미드 벡터에 포함시켜 상기 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것은 상기 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 바이러스성 벡터에 포함시켜 상기 세포 내로 형질 도입 하는 것을 포함할 수 있다.
- [1452] 전술한 방법에 의해 상기 세포 내로 전달된 상기 제1 리컴비나아제는 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제3 리컴비나아제 인식 사이트(RRS3)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 상호작용 할 수 있다.
- [1453] 또한, 상기 세포 내로 전달된 상기 제2 리컴비나아제는(recombinase) 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제4 리컴비나아제 인식 사이트(RRS4)를 암호화하는 폴리뉴클레오

타이드와 상호작용 할 수 있다.

- [1454] 상호작용에 의해 상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 상기 틀박스로부터 제거될 수 있고, 상기 제2 폴리뉴클레오타이드가 상기 틀박스에 삽입될 수 있다.
- [1456] 이하에서는, 상기 방법에 의해 교체 편집 되는 다양한 실시예 및 교체 편집에 의한 효과를 설명한다. 이는, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드 및/또는 상기 제2 폴리뉴클레오타이드의 종류에 따라 다를 수 있다.
- [1457] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따른 교체 편집을 위한 틀박스에 포함된 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 제2 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 교체 편집 될 수 있다.
- [1458] 이 경우, 교체 편집된 틀박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포에 별도의 추가적 처리 없이도, 상기 제2 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 제2 가이드 핵산이 발현되어 인위적 뉴클레아제 복합체를 형성할 수 있고 계놈에서 3차 유전자 편집이 일어날 수 있다.
- [1459] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따른 교체 편집을 위한 틀박스에 포함된 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 교체 편집 될 수 있다. 상기 제1 가이드 핵산의 서열 및 상기 제2 가이드 핵산의 서열은 상이할 수 있다.
- [1460] 이 경우, 상기 교체 편집에 의해 인위적 뉴클레아제를 이용한 유전자 편집의 타겟 사이트가 변경될 수 있다.
- [1461] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따른 교체 편집을 위한 틀박스에 포함된 형광 단백질 유전자는 목적 단백질 유전자(target protein gene) 로 교체 편집 될 수 있다.
- [1462] 이 경우, 교체 편집에 의해 상기 세포 내에서 상기 형광 단백질(fluorescent protein)이 발현되지 않는다. 이러한 성질을 이용하여, 상기 세포의 계놈에 상기 목적 단백질 유전자(target protein gene)이 삽입되었는지 선별할 수 있다.
- [1463] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따른 교체 편집을 위한 틀박스에 포함된 제1 목적 단백질 유전자(target protein gene)는 제2 목적 단백질 유전자(target protein gene)로 교체 편집 될 수 있다.
- [1464] 이러한 2차 유전자 편집에 의해, 상기 세포 내에서 원하는 시기에 원하는 목적 단백질이 발현될 수 있다.
- [1465] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따른 교체 편집을 위한 틀박스에 포함된 제1 목적 단백질 유전자(target protein gene)는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로 교체 편집 될 수 있다.
- [1466] 이러한 2차 유전자 편집에 의해, 상기 세포에서 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 가이드 핵산이 발현될 수 있다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 가이드 핵산은 인위적 뉴클레아제 복합체를 형성할 수 있으며, 형성된 인위적 뉴클레아제 복합체에 의해 상기 세포의 계놈에서 추가적인 3차 유전자 편집이 일어날 수 있다.
- [1468] **1-2. 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 2차 유전자 삽입 편집**
- [1469] **1-2-1. 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 삽입 편집을 위한 틀박스**
- [1470] 본 출원의 몇몇 실시예에 따르면, 삽입 편집을 위한 틀박스가 제공될 수 있다.
- [1471] 상기 삽입 편집을 위한 틀박스는 제1 ITR 서열, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함할 수 있다.
- [1472] 이하에서는, 상기 삽입 편집을 위한 틀박스의 몇몇 실시예를 설명한다.
- [1473] 예를 들어, 상기 삽입 편집을 위한 틀박스는 제1 ITR 서열, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 틀박스일 수 있다.
- [1474] 다른 예를 들어, 상기 삽입 편집을 위한 틀박스는 제1 ITR 서열, 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 틀박스일 수 있다.
- [1475] 또 다른 예를 들어, 상기 삽입 편집을 위한 틀박스는 제1 ITR 서열, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암

호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 툴박스일 수 있다.

- [1476] 또 다른 예를 들어, 상기 삽입 편집을 위한 툴박스는 제1 ITR 서열, 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 툴박스일 수 있다.
- [1477] 또 다른 예를 들어, 상기 삽입 편집을 위한 툴박스는 제1 ITR 서열, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 툴박스일 수 있다.
- [1478] 이하에서는, 전술한 삽입 편집을 위한 툴박스를 이용한 2차 유전자 삽입 편집 방법에 대해 설명한다. 즉, 특정 폴리뉴클레오타이드를 삽입하는 방법에 대해 설명한다.
- [1480] **1-2-2. 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 2차 유전자 삽입 편집 방법**
- [1481] 삽입 편집을 위한 툴박스가 삽입된 계놈에서, 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 위치하는 자리에 제1 폴리뉴클레오타이드가 삽입 될 수 있다.
- [1482] 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 삽입하기 위한 일 방법은, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 상기 삽입 편집을 위한 툴박스가 삽입되어 있는 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다.
- [1483] 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 세포 내로 전달되는 방법은 다양할 수 있다.
- [1484] 예를 들어, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것에 의해 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 세포 내에 전달될 수 있다. 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것은 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 플라스미드 벡터에 포함시켜 상기 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것은 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 바이러스성 벡터에 포함시켜 상기 세포 내로 형질 도입하는 것을 포함할 수 있다.
- [1485] 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터에는 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 더 포함된다. 이 경우, 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)는 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)와 한 쌍을 이루는 것이다.
- [1487] 또한, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 삽입(insertion)하기 위한 일 방법은, 제1 리컴비나아제를 상기 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다.
- [1488] 이 경우, 상기 제1 리컴비나아제는 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1) 및/또는 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)와 상호작용할 수 있다.
- [1489] 상기 리컴비나아제가 상기 세포 내로 전달되는 방법은 전술한 바 있어서 자세한 설명은 생략한다.
- [1490] 전술한 방법에 의해 상기 세포 내로 전달된 상기 제1 리컴비나아제는 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 상호작용 할 수 있다.
- [1491] 상호작용에 의해 상기 제1 폴리뉴클레오타이드가 상기 툴박스에 삽입될 수 있다.
- [1493] 이하에서는, 상기 방법에 의해 삽입 편집 되는 다양한 실시예 및 삽입 편집에 의한 효과를 설명한다. 이는, 상기 삽입 편집을 위한 툴박스 및/또는 제1 폴리뉴클레오타이드의 종류에 따라 다를 수 있다.
- [1494] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따른 삽입 편집을 위한 툴박스에 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되어 있는 경우, 상기 툴박스에 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입(insertion)될 수 있다.
- [1495] 이 경우, 상기 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 삽입된 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역에 의해, 상기 세포 내에서 인위적 뉴클레아제 복합체가 형성될 수 있다. 상기 세포 내에서 형성된 인위적 뉴클레아제 복합체에 의해, 상기 2차 유전자 편집(삽입 편집) 후, 별도의 처리 없이도 추가적인 3차 유전자 편집이 일어날 수 있다.
- [1496] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따른 삽입 편집을 위한 툴박스에 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화

하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되어 있는 경우, 상기 틀박스에 상기 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사를 위한 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입(insertion)될 수 있다.

[1497] 이 경우, 상기 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입된 시점에 상기 제1 가이드 핵산이 발현될 수 있으며, 이를 통해 상기 세포 내에서 인위적 뉴클레아제 복합체가 형성될 수 있다. 즉, 상기 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입 시점을 조절하여, 원하는 시점에 제1 가이드 핵산을 발현시킬 수 있다. 결국, 상기 2차 유전자 편집(삽입 편집)을 통해, 3차 유전자 편집 시점을 조절할 수 있다.

[1498] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따른 삽입 편집을 위한 틀박스에 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되어 있는 경우, 상기 틀박스에 상기 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역을 위한 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입(insertion)될 수 있다.

[1499] 이 경우, 상기 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입된 시점에 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 발현될 수 있으며, 이를 통해 상기 세포 내에서 인위적 뉴클레아제 복합체가 형성될 수 있다. 즉, 상기 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입 시점을 조절하여, 원하는 시점에 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 발현시킬 수 있다. 결국, 상기 2차 유전자 편집(삽입 편집)을 통해, 3차 유전자 편집 시점을 조절할 수 있다.

[1500] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따른 삽입 편집을 위한 틀박스에 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되어 있는 경우, 상기 틀박스에 형광 단백질 유전자가 삽입(insertion)될 수 있다.

[1501] 이 경우, 상기 형광 단백질 유전자의 삽입에 의해 상기 틀박스의 구성요소인 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 게놈에 삽입되었는지 여부를 선별할 수 있다.

[1502] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따른 삽입 편집을 위한 틀박스에 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되어 있는 경우, 상기 틀박스에 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입(insertion)될 수 있다. 이 때, 상기 제2 가이드 핵산의 서열은 상기 제1 가이드 핵산의 서열과 동일하거나 상이할 수 있다.

[1503] 상기 제2 가이드 핵산의 서열이 상기 제1 가이드 핵산의 서열과 동일한 경우, 상기 세포 내에서 더 많은 양의 가이드 핵산이 발현될 수 있어 상기 틀박스를 이용한 유전자 편집 효율이 높아질 수 있다.

[1504] 상기 제2 가이드 핵산의 서열이 상기 제1 가이드 핵산의 서열과 상이한 경우, 상기 틀박스를 이용하여 유전자 편집할 수 있는 타겟 사이트가 다양해 질 수 있다.

[1506] **1-3. 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 2차 유전자 제거 편집**

[1507] **1-3-1. 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 제거 편집을 위한 틀박스**

[1508] 본 출원의 몇몇 실시예에 따르면, 제거 편집을 위한 틀박스가 제공될 수 있다.

[1509] 상기 제거 편집을 위한 틀박스는 제1 ITR 서열, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 폴리뉴클레오타이드, 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함할 수 있다.

[1510] 상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 단백질 또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드(untranscribed polynucleotide), 번역되지 않는 RNA(untranslated RNA)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 비-기능적 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상을 포함할 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[1511] 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1) 및 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)는 한 쌍을 이룰 수 있다. 설명의 편의를 위해, 이하에서는 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)의 서열 및 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)의 서열이 동일한 경우로 상정하여 설명한다.

[1513] 이하에서는, 상기 제거 편집을 위한 틀박스의 몇몇 실시예를 설명한다.

[1514] 예를 들어, 제거 편집을 위한 틀박스는 제1 ITR 서열, 구성 발현 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드,

제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 종결 코돈(stop codon), 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 툭박스일 수 있다.

- [1515] 다른 예를 들어, 제거 편집을 위한 툭박스는 제1 ITR 서열, 구성 발현 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 전사 종결 코돈, 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 툭박스일 수 있다
- [1516] 이하에서는, 전술한 제거 편집을 위한 툭박스를 이용한 2차 유전자 제거 편집 방법에 대해 설명한다. 즉, 특정 폴리뉴클레오타이드를 제거하는 방법에 대해 설명한다.
- [1518] **1-3-2. 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 2차 유전자 제거 편집 방법**
- [1519] 제거 편집을 위한 툭박스가 삽입된 계놈에서, 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 존재하는 제1 폴리뉴클레오타이드가 제거될 수 있다.
- [1520] 상기 제1 폴리뉴클레오타이드를 제거하기 위한 일 방법은, 제1 리컴비나아제를 상기 제거 편집을 위한 툭박스가 삽입되어 있는 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다.
- [1521] 상기 제1 리컴비나아제는 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1) 및 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)와 상호작용할 수 있다.
- [1522] 리컴비나아제를 상기 세포 내로 전달하는 방법은 전술한 바 있어 자세한 설명은 생략한다.
- [1523] 전술한 방법에 의해 상기 세포 내로 전달된 상기 제1 리컴비나아제는 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 상호작용 할 수 있다.
- [1524] 상기 상호작용에 의해 상기 제1 폴리뉴클레오타이드는 상기 툭박스로부터 제거될 수 있다.
- [1526] 이하에서는, 전술한 방법에 의해 제거 편집 되는 다양한 실시예 및 제거 편집에 의한 효과를 설명한다. 이는, 상기 제1 폴리뉴클레오타이드 및/또는 상기 제거 편집을 위한 툭박스의 종류에 따라 다를 수 있다.
- [1527] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따른 제거 편집을 위한 툭박스에 구성 발현 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 종결 코돈, 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되어 있는 경우, 상기 툭박스에서 상기 종결 코돈이 제거 될 수 있다.
- [1528] 이 경우, 상기 종결 코돈의 제거로 인해 상기 제1 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 발현될 수 있다. 즉, 툭박스 일부 구성요소의 제거를 통해 상기 툭박스에 포함된 특정 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역의 시점이 조절 될 수 있다.
- [1529] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따른 제거 편집을 위한 툭박스에 구성 발현 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 전사 종결 코돈(poly T), 제2 리컴비나아제 인식 사이트(RRS2)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되어 있는 경우, 상기 툭박스에서 상기 전사 종결 코돈(poly T)이 제거 될 수 있다.
- [1530] 이 경우, 상기 전사 종결 코돈(poly T)의 제거로 인해 상기 제1 가이드 핵산이 발현될 수 있다. 즉, 툭박스 일부 구성요소의 제거를 통해 상기 툭박스에 포함된 특정 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역의 시점이 조절 될 수 있다.
- [1532] **2. 툭박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집**
- [1533] 이하에서는, 계놈에 삽입된 툭박스 내에 포함된 폴리뉴클레오타이드로부터 발현된 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집에 대하여 설명한다.
- [1534] 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집은 상기 툭박스의 외부 또는 상기 툭박스의 내부에서 일어날 수 있다.

- [1536] **2-1. 발현 조절 요소를 포함하지 않는 틀박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집**
- [1537] **2-1-1. 발현 조절 요소를 포함하지 않는 틀박스**
- [1538] 본 출원의 몇몇 실시예에 따르면, 발현 조절 요소를 포함하지 않는 틀박스가 제공될 수 있다.
- [1539] 상기 발현 조절 요소를 포함하지 않는 틀박스는 제1 ITR 서열, 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함할 수 있다.
- [1540] 이하에서는, 상기 발현 조절 요소를 포함하지 않는 틀박스의 몇몇 실시예를 설명한다.
- [1541] 예를 들어, 상기 틀박스는 하나의 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스일 수 있다.
- [1542] 다른 예를 들어, 상기 틀박스는 둘 이상의 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스일 수 있다. 이 경우, 상기 둘 이상의 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열은 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1543] 상기 틀박스에 포함된 둘 이상의 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열이 동일한 경우, 세포 내에서 동일한 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현양이 증가하여 2차 유전자 편집 효율이 높아질 수 있다.
- [1544] 또 다른 예를 들어, 상기 틀박스는 하나의 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스일 수 있다.
- [1545] 또 다른 예를 들어, 상기 틀박스는 둘 이상의 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스일 수 있다. 이 경우, 상기 둘 이상의 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 서열은 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1546] 상기 틀박스에 포함된 둘 이상의 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상의 서열이 동일한 경우, 세포 내에서 동일한 서열을 갖는 가이드 핵산의 발현양이 증가하여 2차 유전자 편집 효율이 높아질 수 있다.
- [1547] 상기 틀박스 내에 포함된 둘 이상의 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상의 서열이 상이한 경우, 세포 내에서 다양한 종류의 가이드 핵산이 발현될 수 있다. 이 경우, 보다 더 많은 타겟 사이트에서 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다.
- [1548] 또 다른 예를 들어, 상기 틀박스는 한 종류 이상의 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 한 종류 이상의 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스일 수 있다.
- [1549] 이 경우, 1차 유전자 편집에 의해 상기 틀박스가 세포의 게놈에 삽입된 후, 별도의 추가적인 처리 없이 상기 세포의 게놈에 존재하는 타겟 사이트에서 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다. 상기 틀박스로부터 발현된 가이드 핵산 중 하나 이상은 상기 타겟 사이트에 상보적으로 결합할 수 있다.
- [1550] 즉, 발현 조절 요소가 포함되어 있지 않으면서 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스가 게놈에 삽입된 경우, 추가적인 처리 없이도 게놈에서 n 차(n 은 2이상의 자연수) 유전자 편집이 일어날 수 있다.
- [1552] 전술한 발현 조절 요소를 포함하지 않는 틀박스는 세포의 게놈 및/또는 염색체에 삽입될 수 있다.
- [1553] 전술한 다양한 구성을 가지는 각각의 틀박스는 다양한 조합으로 한 세포의 게놈 및/또는 염색체에 삽입될 수 있다.
- [1554] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 하나의 세포의 게놈에 제1 틀박스 및 제2 틀박스가 삽입되어 있을 수 있다.
- [1555] 예를 들어, 상기 제1 틀박스는 제1 ITR 서열, 한 종류 이상의 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함할 수 있다. 상기 제2 틀박스는 제3 ITR 서열, 한 종류 이상의 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제4 ITR 서열을 포함할 수 있다.
- [1556] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 제1 틀박스 및 상기 제2 틀박스는 각각 다른 세포의 게놈

(및/또는 염색체)에 삽입되어 있을 수 있다.

- [1557] 예를 들어, 하나의 개체에 존재하는 제1 세포의 게놈에 제1 툴박스가 삽입되어 있고, 상기 개체에 존재하는 제2 세포의 게놈에 제2 툴박스가 삽입되어 있을 수 있다. 상기 제1 툴박스는 한 종류 이상의 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 제2 툴박스는 한 종류 이상의 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [1558] 상기 각각 다른 세포는 비분리된 세포(non-isolated cell)로, 하나의 개체에 포함되어 있는 것일 수 있다.
- [1559] 상기 각각 다른 세포는 비분리된 세포(non-isolated cell)로, 수정란 및/또는 배아에 포함되어 있는 것일 수 있다.
- [1561] 이하에서는, 전술한 발현 조절 요소를 포함하지 않고 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 툴박스를 이용한 2차 유전자 편집 방법에 대해 설명한다.
- [1563] **2-1-2. 2차 유전자 편집 방법**
- [1564] 본 출원에서는 발현 조절 요소를 포함하지 않고 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 툴박스가 삽입된 세포에서 2차 유전자 편집하는 방법을 제공한다.
- [1565] 상기 세포의 게놈에 삽입된 툴박스의 구성에 따라서 2차 유전자 편집을 하기 위한 다양한 방법들이 제공될 수 있다.
- [1567] 예를 들어, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 가이드 핵산을 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다.
- [1568] 또한, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 도너 폴리뉴클레오타이드를 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다.
- [1569] 상기 가이드 핵산을 세포 내로 전달하는 것은, 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 구체적으로, 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 RNA 형태로 상기 세포 내에 도입되거나, 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 벡터에 포함되어 상기 세포 내에 도입될 수 있다.
- [1570] 또한, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드를 세포 내로 전달하는 것은, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 상기 세포 내로 도입하는 것을 포함한다.
- [1571] 상기 가이드 핵산이 세포 내로 전달되는 경우, 상기 가이드 핵산은 타겟 사이트에 결합할 수 있다.
- [1572] 또한, 세포의 발현 시스템에 의해 상기 툴박스에 삽입되어 있던 폴리뉴클레오타이드로부터 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 상기 세포 내에서 발현될 수 있고, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 핵산과 복합체를 이룬 상태에서 상기 게놈 상에 존재하는 타겟 사이트를 자를 수 있게 된다.
- [1573] 상기 타겟 사이트가 잘리게 되면, 상기 타겟 사이트에서 비상동적 말단 결합(NHEJ)에 의한 복구 시스템(repairing system)과 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 반복적인 상호작용에 의해 인델(indel)이 발생할 수 있으며, 이에 따라 상기 타겟 사이트의 근처의 특정 서열(sequence)이 망가지게 될 수 있다. 이로 인해 상기 특정 서열(sequence)을 포함하는 유전자는 더 이상 정상적인 기능을 수행하지 못하는 상태, 즉 녹아웃 상태가 될 수 있다.
- [1574] 또한, 상기 가이드 핵산과 함께 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 세포 내로 제공되는 경우, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제에 의해 잘린 타겟 사이트에 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 녹인 될 수 있다.
- [1576] 다른 예를 들어, 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다.
- [1577] 또한, 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 도너 폴리뉴클레오타이드를 세포 내로 전달하는 것을 포함할 수 있다.

- [1578] 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 세포 내로 전달하는 것은, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 단백질 및/또는 폴리펩타이드의 형태로 세포 내에 전달하는 것을 포함한다. 또한, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 세포 내로 전달하는 것은, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 벡터에 포함되어 상기 세포 내로 도입될 수 있다.
- [1580] 다른 예를 들어, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(103) 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(105)가 포함된 툴박스(도 8의 (a) 참고)가 삽입된 게놈을 가지는 세포에는 별도의 처리를 하지 않더라도 상기 가이드 핵산이 결합할 수 있는 타겟 유전자(target gene)가 녹아웃 될 수 있다.
- [1581] 도 8의 (a)는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(103) 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(105)가 제1 ITR 서열(101) 및 제2 ITR 서열(107) 사이에 포함된 툴박스를 나타낸다.
- [1582] 구체적으로, 상기 툴박스가 세포의 게놈에 삽입되는 경우, 세포 내 발현 메커니즘에 의해 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 가이드 핵산이 발현될 수 있다. 상기 가이드 핵산은 상기 세포의 게놈에 존재하는 타겟 사이트(231)에 결합할 수 있고, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 핵산과 인위적 뉴클레아제 복합체를 형성한 상태에서 상기 타겟 사이트(231)를 자를 수 있다.
- [1583] 도 8의 (b)는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(103) 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(105)가 포함된 툴박스(도 8의 (a) 참고)가 삽입된 게놈에서 타겟 사이트(231)가 잘린 형태를 나타낸다. 타겟 사이트(231)은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(103) 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(105)의 복합체에 의해 제1 영역(231(a)) 및 제2 영역(231(b))로 나뉘어질 수 있다.
- [1584] 즉, 상기 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서는 별도의 추가적인 처리를 하지 않더라도, 상기 가이드 핵산의 일부와 동일하거나 상보적인 서열을 가지는 타겟 사이트를 포함하는 타겟 유전자가 녹아웃될 수 있다 (도 8의 (b) 참고).
- [1585] 다만, 상기 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드가 제공되는 경우, 전술한 메커니즘에 의해 상기 특정 서열을 포함하는 유전자가 녹아웃 되기 전에 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 녹아웃될 수 있는 가능성도 존재한다.
- [1587] 또 다른 예를 들어, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 제1 툴박스 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 제2 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서는 별도의 처리를 하지 않더라도 상기 가이드 핵산의 일부와 동일하거나 상보적인 서열을 가지는 타겟 사이트를 포함하는 타겟 유전자가 녹아웃 될 수 있다
- [1588] 구체적으로, 상기 제1 툴박스 및 상기 제2 툴박스가 세포의 게놈에 삽입되는 경우, 세포 내 발현 메커니즘에 의해 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 가이드 핵산은 인위적 뉴클레아제 복합체를 형성할 수 있으며, 상기 인위적 뉴클레아제 복합체는 가이드 핵산이 상보적으로 결합할 수 있는 타겟 사이트를 자를 수 있다.
- [1589] 즉, 상기 제1 툴박스 및 상기 제2 툴박스가 모두 삽입되어있는 게놈을 가지는 세포에서는 별도의 처리 없이도 상기 가이드 핵산이 상보적으로 결합할 수 있는 타겟 사이트를 포함하는 타겟 유전자가 녹아웃 될 수 있다.
- [1590] 다만, 상기 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드가 제공되는 경우, 전술한 메커니즘에 의해 상기 타겟 사이트를 포함하는 타겟 유전자가 녹아웃 되기 전에 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 녹아웃 될 가능성도 존재한다.
- [1591] 전술한 바와 달리 상기 제1 툴박스는 한 개체의 제1 세포의 게놈에 삽입되어 있고, 상기 제2 툴박스는 상기 개체의 제2 세포의 게놈에 삽입되어 있을 수 있다.
- [1592] 이 경우, 세포 내 발현 메커니즘에 의해서 상기 제1 세포에서는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 발현될 수 있으며, 상기 제2 세포에서는 가이드 핵산이 발현될 수 있다.
- [1593] 상기 제1 세포에서 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 세포 간 전달 시스템에 의해 상기 제1 세포로부터 이동할 수 있다. 또한, 상기 제2 세포에서 발현된 가이드 핵산은 세포 내 전달 시스템에 의해 상기 제2 세포로부터 이동할 수 있다. 즉, 세포 간 전달 시스템 의한 이동을 통해, 한 개체의 제1 세포에서 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 제2 세포에서 발현된 가이드 핵산이 동일한 세포 내에 존재할 수 있다. 이때, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 상기 가이드 핵산이 복합체를 형성할 수 있고, 상기 세포의 게놈에서 유전자 편집이 일어날 수 있다.

- [1594] 예를 들어, 상기 제1 세포에서 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 제2 세포로 이동하여 상기 제2 세포에서 발현된 가이드 핵산과 복합체를 형성할 수 있고, 이 경우, 상기 제2 세포에서 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다.
- [1595] 다른 예를 들어, 상기 제2 세포에서 발현된 상기 가이드 핵산은 상기 제1 세포로 이동하여 상기 제1 세포에서 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 복합체를 형성할 수 있고, 이 경우, 상기 제1 세포에서 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다.
- [1596] 또 다른 예를 들어, 상기 제1 세포에서 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 상기 제2 세포에서 발현된 상기 가이드 핵산이 상기 개체에 존재하는 제3 세포로 이동할 수 있다. 이 경우, 상기 제3 세포에서 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 상기 가이드 핵산이 복합체를 형성할 수 있으며, 상기 제3 세포에서 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다.
- [1597] 2차 유전자 편집에 대한 메커니즘은 전술한 바 있으므로, 자세한 설명은 생략한다.
- [1598] 전술한 2차 유전자 편집하는 방법은 분리된 세포(isolated cell)에서의 유전자 편집 방법 일 수 있다.
- [1600] 비분리된 세포(non-isolated cell)에서 2차 유전자 편집하는 일 방법은, 개체의 조직 또는 기관에 전술한 RNA, 플라스미드 벡터, 폴리펩타이드 및/또는 단백질을 주사(injection)하는 방법을 포함할 수 있다.
- [1601] 나아가, 수정란 및/또는 배아에서 2차 유전자 편집하는 일 방법은, 수정란에 전술한 RNA, 플라스미드 벡터, 폴리펩타이드 및/또는 단백질을 미세주입 하는 방법을 포함할 수 있다.
- [1603] 이하에서는, 전술한 2차 유전자 편집이 일어날 수 있는 타겟 사이트에 대해 설명한다.
- [1604] 상기 유전자 편집이 일어날 수 있는 타겟 사이트는 세포에 제공된 가이드 핵산의 종류에 따라 다를 수 있다.
- [1605] 상기 가이드 핵산의 제공은 세포 외부에서 세포 내로 전달된 것을 의미할 수 있다.
- [1606] 또한, 상기 가이드 핵산의 제공은 세포의 게놈에 삽입된 폴리뉴클레오타이드의 발현에 의해 제공된 것을 의미할 수 있다. 이 경우, 상기 세포의 게놈에 삽입된 폴리뉴클레오타이드는 틀박스의 구성요소로서 포함된 것일 수 있다.
- [1607] 예를 들어, 한 종류의 가이드 핵산이 세포 내로 제공되는 경우, 가이드 핵산이 결합할 수 있는 타겟 사이트에서 유전자 편집이 일어날 수 있다.
- [1608] 다른 예를 들어, 두 가지 다른 종류의 제1 가이드 핵산 및 제2 가이드 핵산이 세포 내로 제공되는 경우, 제1 가이드 핵산이 결합할 수 있는 제1 타겟 사이트 또는 제2 가이드 핵산이 결합할 수 있는 제2 타겟 사이트에서 유전자 편집이 일어날 수 있다.
- [1610] **2-2. 발현 조절 요소를 포함하는 틀박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집**
- [1611] **2-2-1. 발현 조절 요소를 포함하는 틀박스**
- [1612] 본 출원의 몇몇 실시예에 따르면, 발현 조절 요소를 포함하는 틀박스가 제공될 수 있다.
- [1613] 상기 발현 조절 요소는 특정 폴리뉴클레오타이드의 발현 시기 및/또는 장소를 조절하기 위한 요소를 의미할 수 있다.
- [1614] 발현 조절 요소가 포함된 틀박스의 경우, 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건이 처리되지 않으면, 상기 틀박스 내부에 포함된 일부 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역이 억제될 수 있다.
- [1615] 본 출원에서 사용되는 용어 "발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건"은 상기 발현 조절 요소에 의해 전사 및/또는 번역이 억제되는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역을 유도하거나 증가 시키도록 하는 물질 및/또는 조건일 수 있다.
- [1617] 상기 발현 조절 요소를 포함하는 틀박스는 제1 ITR 서열, 발현 조절 요소, 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함할 수 있다.
- [1618] 상기 발현 조절 요소는 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역을 조절하는 요소일 수 있다.
- [1619] 이 때, 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 특정 물질 및/또는 조건이 처리되지 않으면, 상기 인위적 뉴클레

아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역이 억제될 수 있다.

- [1620] 상기 발현 조절 요소를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포의 경우, 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건의 처리가 없으면 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소가 발현될 수 없다. 이 경우, 인위적 뉴클레아제가 외부에서 별도로 세포 내로 전달되기 전에는 2차 유전자 편집이 일어날 수 없다.
- [1622] 이하에서는, 상기 발현 조절 요소를 포함하는 툴박스의 몇몇 실시예를 설명한다. 도 9는 발현 조절 요소(130)를 포함하는 툴박스의 몇몇 실시예를 도시한다.
- [1623] 예를 들어, 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(132) 및 상기 발현 조절 요소(130)를 포함할 수 있다 (도 9의 (a) 참고).
- [1624] 다른 예를 들어, 툴박스는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(134) 및 상기 발현 조절 요소(130)를 포함할 수 있다(도 9의 (b) 참고).
- [1625] 또 다른 예를 들어, 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 하나 이상의 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에 발현조절 요소를 포함할 수 있다.
- [1626] 구체적으로, 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(132) 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(134)를 포함하고, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에 상기 발현 조절 요소(130)를 포함할 수 있다. 또한, 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(134)의 5' 말단에는 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(131)가 포함될 수 있다 (도 9의 (c) 참고).
- [1627] 구체적으로, 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(132) 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(134)를 포함하고, 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(134)의 5' 말단에 상기 발현 조절 요소(130)를 포함할 수 있다. 또한, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(132)의 5' 말단에는 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(131)가 포함될 수 있다 (도 9의 (d) 참고).
- [1628] 구체적으로, 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(132) 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(134)를 포함하고, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(132)의 5' 말단에 상기 발현 조절 요소(130(a))를 포함하며, 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에 상기 발현 조절 요소(130(b))를 포함할 수 있다 (도 9의 (e) 참고).
- [1629] 계놈 상에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 모두 포함되어 있는 경우라도, 발현 조절 요소가 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 적어도 하나 이상에 더 포함되어 있는 경우, 특별한 처리 없이 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다고 단정할 수 없다.
- [1631] 이하에서는, 발현 조절 요소(130)의 몇몇 구체적인 실시예를 개시한다. 도 10은 발현 조절 요소의 몇몇 실시예를 도시한다.
- [1632] 예를 들어, 상기 발현 조절 요소(130)는 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(151)를 포함할 수 있다 (도 10의 (a) 참고).
- [1633] 세포의 계놈에 상기 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(151)가 삽입되어 있는 경우, 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건의 처리 없이는 상기 유도 프로모터가 작동할 수 없다. 이 경우 상기 유도 프로모터의 3' 방향에 존재하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역이 일어나지 않을 수 있다. 구체적으로, 상기 유도 프로모터가 Tet-on 프로모터인 경우, 상기 Tet-on 프로모터에 영향을 미치는 물질 (예를 들어, 테트라사이클린)이 처리되지 않는 경우 상기 Tet-on 프로모터의 3'방향에 있는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역이 일어나지 않을 수 있다.
- [1634] 다른 예를 들어, 상기 발현 조절 요소(130)는 [리컴비나아제 인식 사이트(RRS) (153)-전사 종결 코돈 (154)-리컴비나아제 인식 사이트(RRS) (155)](이하, RTR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) (153)와 전사 종결 코돈 (154) 사이에 엑소-폴리뉴클레오타이드가 더 포함될 수

있다.

- [1635] 즉, 본 출원에서 의미하는 RTR은 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) (153)와 전사 종결 코돈 (154) 사이에 엑소-폴리뉴클레오타이드가 더 포함된 것을 의미할 수 있다.
- [1636] 상기 RTR은 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(152)와 전사 및/또는 번역을 하고자 하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 포함 될 수 있다 (도 10의 (b) 참고).
- [1637] 세포의 게놈에 상기 RTR이 삽입되어 있는 경우, 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건의 처리 없이 상기 전사 종결 코돈이 제거될 수 없으며, 이 경우 상기 RTR의 3' 방향에 존재하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역이 일어나지 않을 수 있다. 구체적으로, 상기 세포에, 상기 RTR에 영향을 미치는 물질인 리컴비나아제(예를 들어, Cre 리컴비나아제, Dre 리컴비나아제 등.)가 처리되지 않는 경우 상기 RTR의 3'방향에 있는 폴리뉴클레오타이드의 전사가 일어나지 않을 수 있다.
- [1638] 또 다른 예를 들어, 상기 발현 조절 요소(130)는 [리컴비나아제 인식 사이트(RRS) (153)- 종결 코돈 (156)-리컴비나아제 인식 사이트(RRS) (155)](이하, RSR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함 할 수 있다. 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) (153)와 종결 코돈 (156) 사이에 엑소-폴리뉴클레오타이드가 더 포함될 수 있다.
- [1639] 즉, 본 출원에서 의미하는 RSR은 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) (153)와 종결 코돈 (156) 사이에 엑소-폴리뉴클레오타이드가 더 포함된 것을 의미할 수 있다.
- [1640] 상기 RSR은 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(152)와 전사 및/또는 번역을 하고자하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 포함 될 수 있다 (도 10의 (c) 참고).
- [1641] 세포의 게놈에 상기 RSR이 삽입되어 있는 경우, 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건의 처리 없이 상기 종결 코돈이 제거될 수 없으며, 이 경우 상기 RSR의 3' 방향에 존재하는 폴리뉴클레오타이드의 번역이 일어나지 않을 수 있다. 구체적으로, 상기 세포에, 상기 RSR에 영향을 미치는 물질인 리컴비나아제(예를 들어, Cre 리컴비나아제, Dre 리컴비나아제 등.)가 처리되지 않는 경우 상기 RSR의 3'방향에 있는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역이 일어나지 않을 수 있다.
- [1642] 또 다른 예를 들어, 상기 발현 조절 요소(130)는 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하지 않으며, 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) (157)를 포함 하는 경우일 수 있다 (도 10의 (d) 참고).
- [1643] 이 경우, 상기 세포에 i) 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 또는 그 변이체와 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 와 ii) 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)와 상호작용할 수 있는 리컴비나아제가 처리되지 않는다면, 상기 RRS의 3'방향에 존재하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역이 일어날 수 없다.
- [1645] 본 출원에서 제공되는 발현 조절 요소(130)를 포함하는 각각의 툴박스는 조합을 이뤄 하나의 세포의 게놈(및/또는 염색체)에 삽입되어 있을 수 있다.
- [1646] 즉, 하나의 세포의 게놈에 제1 툴박스 및 제2 툴박스가 삽입되어 있을 수 있으며, 이 경우, 상기 제1 툴박스 및 상기 제2 툴박스 중 어느 하나 이상은 발현 조절 요소(130)를 포함할 수 있다.
- [1647] 예를 들어, 상기 제1 툴박스는 발현 조절 요소(130) 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 제2 툴박스는 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [1648] 다른 예를 들어, 상기 제1 툴박스는 발현 조절 요소(130) 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 제2 툴박스는 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [1649] 또 다른 예를 들어, 상기 제1 툴박스는 발현 조절 요소(130) 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 제2 툴박스는 발현 조절 요소(130) 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [1650] 이 경우에도, 상기 발현 조절 요소(130)에 의해 상기 인위적 뉴클레아제의 구성요소의 발현이 억제될 수 있기때문에, 1차 유전자 편집에 의해 상기 툴박스가 게놈에 삽입되더라도 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건의 추가적인 처리 없이 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다고 단정할 수 없다.

[1652] **2-2-2. 2차 유전자 편집 방법**

- [1653] 본 출원에서는 발현 조절 요소 및 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 툴박스로부터 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 발현 시켜 2차 유전자 편집하는 방법을 제공한다.
- [1654] 게놈에 삽입된 툴박스의 구성에 따라서 2차 유전자 편집을 하기 위한 다양한 방법들이 제공될 수 있다.
- [1655] 설명의 편의를 위해, 이하에서는 상기 툴박스의 구성으로서 상기 발현 조절 요소의 3' 말단에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되어 있는 경우를 상정하여 설명한다.
- [1656] 예를 들어, 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 상기 유도 프로모터를 작동시킬 수 있는 물질 및/또는 조건의 처리와 가이드 핵산을 전달하는 것을 포함할 수 있다. 나아가, 상기 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 상기 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 더 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [1657] 상기 세포 내에 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건을 처리하는 것, 가이드 핵산을 제공하는 것과 상기 도너 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것은 동시에 처리되고 제공될 수 있으며, 이는 하기의 다른 예들에도 적용될 수 있다.
- [1658] 상기 유도 프로모터를 작동시킬 수 있는 물질 또는 조건에 대해서는 전술한 바 있어 자세한 설명은 생략한다. 또한, 상기 가이드 핵산 및/또는 도너 폴리뉴클레오타이드를 세포 내에 제공하는 방법은 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [1659] 상기 유도 프로모터를 작동시킬 수 있는 물질 및/또는 조건이 상기 세포에 처리되는 경우, 상기 유도 프로모터가 활성화될 수 있으며, 이 경우, 상기 유도 프로모터의 3' 말단에 존재하는 폴리뉴클레오타이드가 전사 및/또는 번역되어 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 발현될 수 있다.
- [1660] 상기 세포 내로 제공된 가이드 핵산은 상기 세포의 게놈에 존재하는 타겟 사이트에 결합할 수 있다. 또한, 전술한 메커니즘에 의해 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 핵산과 복합체를 이루며 상기 타겟 사이트를 자를 수 있고, 이 경우, 상기 타겟 사이트를 포함하는 타겟 유전자가 nick아웃 될 수 있다.
- [1661] 나아가, 상기 세포 내로 도너 폴리뉴클레오타이드가 제공되는 경우, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 상기 타겟 사이트가 잘린 자리에 nick인 될 수 있다.
- [1662] 즉, 상기 유도 프로모터를 작동시킬 수 있는 물질 및/또는 조건의 처리에 의해 상기 유도 프로모터의 3' 말단에 위치하는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역이 시간적으로 조절될 수 있으며, 이를 통해 유전자 편집도 시간적으로 조절될 수 있다.
- [1664] 다른 예를 들어, 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 RSR이 포함된 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 위치특이적 리컴비나아제(SSR) 및 가이드 핵산을 상기 세포에 제공하는 것을 포함할 수 있다. 나아가, 상기 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 상기 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 더 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [1665] 상기 위치특이적 리컴비나아제(SSR)를 세포 내로 제공하는 것은, 상기 위치특이적 리컴비나아제(SSR)를 단백질 또는 상기 위치특이적 리컴비나아제(SSR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 제공하는 것을 포함한다. 상기 위치특이적 리컴비나아제(SSR)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터에 포함되어 상기 세포 내로 도입될 수 있다.
- [1666] 상기 가이드 핵산 및/또는 도너 폴리뉴클레오타이드를 세포 내에 제공하는 방법은 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [1667] 상기 위치특이적 리컴비나아제(SSR)가 상기 세포 내로 전달되는 경우, 상기 위치특이적 리컴비나아제(SSR)와 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)가 상호작용할 수 있고, 상호작용을 통해 상기 종결 코돈이 제거될 수 있다. 이 경우, 상기 RSR의 3' 말단에 존재하는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 발현될 수 있다.
- [1668] 상기 세포 내로 제공된 가이드 핵산은 상기 세포의 게놈에 존재하는 타겟 사이트에 결합할 수 있다. 또한, 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 핵산과 복합체를 이루며 상기 타겟 사이트를 자를 수 있고, 이 경우, 상기 타겟 사이트를 포함하는 타겟 유전자가 nick아웃 될 수 있다.

- [1669] 나아가, 상기 세포 내로 도너 폴리뉴클레오타이드가 제공되는 경우, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 상기 타겟 사이트가 잘린 자리에 낙인 될 수 있다.
- [1670] 즉, 상기 리컴비나아제(SSR)의 전달에 의해, 상기 RSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 위치하는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역이 시간적으로 조절될 수 있으며, 이를 통해 유전자 편집도 시간적으로 조절될 수 있다.
- [1672] 또 다른 예를 들어, 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 RTR이 포함된 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 위치특이적 리컴비나아제(SSR) 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 상기 세포에 제공하는 것을 포함할 수 있다. 나아가, 상기 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 상기 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 더 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [1673] 상기 위치특이적 리컴비나아제(SSR), RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및/또는 도너 폴리뉴클레오타이드를 세포 내로 제공하는 방법은 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [1674] 상기 위치특이적 리컴비나아제(SSR)가 상기 세포 내로 제공된 경우, 상기 위치특이적 리컴비나아제(SSR)와 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)의 상호작용을 통해 상기 전사 종결 코돈이 제거될 수 있다. 이 경우, 상기 RSR의 3'말단에 존재하는 상기 가이드 핵산이 발현될 수 있다. 상기 가이드 핵산은 상기 세포의 게놈에 존재하는 타겟 사이트에 결합할 수 있다.
- [1675] 상기 세포 내로 제공된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 핵산과 복합체를 이루며 상기 타겟 사이트를 자를 수 있고, 이 경우, 상기 타겟 사이트를 포함하는 타겟 유전자가 낙아웃 될 수 있다.
- [1676] 나아가, 상기 세포 내로 도너 폴리뉴클레오타이드가 제공되는 경우, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 상기 타겟 사이트가 잘린 자리에 낙인 될 수 있다.
- [1677] 즉, 상기 리컴비나아제(SSR)의 제공에 의해, 상기 RTR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 위치하는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역이 시간적으로 조절될 수 있으며, 이를 통해 유전자 편집도 시간적으로 조절될 수 있다.
- [1679] 또 다른 예를 들어, 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되지 않고, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 제1 위치특이적 리컴비나아제(SSR1) 및 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포에 제공하는 것을 포함할 수 있다. 상기 제1 위치특이적 리컴비나아제(SSR1)는 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)와 상호작용할 수 있다. 나아가, 상기 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 상기 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 더 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [1680] 상기 제1 위치특이적 리컴비나아제(SSR1) 및 상기 도너 폴리뉴클레오타이드를 세포 내로 제공하는 방법은 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [1681] 상기 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)와 쌍을 이루는 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 와 함께 플라스미드 벡터에 포함되어 상기 세포 내로 제공될 수 있다.
- [1682] 상기 제1 위치특이적 리컴비나아제(SSR1) 및 상기 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 상기 세포 내로 제공된 경우, 상기 제1 위치특이적 리컴비나아제(SSR1) 및 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)가 상호작용하여, 상기 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 상기 세포의 게놈에 존재하는 툴박스에 삽입될 수 있다. 이 경우, 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)의 3'말단에 존재하는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 전사 및/또는 번역될 수 있다.
- [1683] 상기 세포 내로 제공된 가이드 핵산은 상기 세포의 게놈에 존재하는 타겟 사이트에 결합할 수 있다. 또한, 상기 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 핵산과 복합체를 이루며 상기 타겟 사이트를 자를 수 있고, 이 경우, 상기 타겟 사이트를 포함하는 타겟 유전자가 낙아웃 될 수 있다.
- [1684] 나아가, 상기 세포 내로 도너 폴리뉴클레오타이드가 제공되는 경우, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 상기 타겟 사이트가 잘린 자리에 낙인 될 수 있다.
- [1685] 즉, 상기 제1 리컴비나아제(SSR1) 및 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 제공에 의해, 상기 제1 리컴

비나아제 인식 사이트(RRS1)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 3' 말단에 위치하는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역이 시간적으로 조절될 수 있으며, 이를 통해 유전자 편집도 시간적으로 조절될 수 있다.

- [1687] 이하에서는 상기 발현 조절 요소의 3' 말단에 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되어 있는 틀박스를 이용한 2차 유전자 편집 방법을 설명한다. 다만, 발현 조절 요소의 3' 말단에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 틀박스를 이용한 2차 유전자 편집 방법 및 메커니즘에 대해서 구체적으로 설명하였는바, 유전자 편집 메커니즘에 대한 자세한 설명은 생략한다.
- [1688] 예를 들어, 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 틀박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 상기 세포에 유도 프로모터를 작동시킬 수 있는 물질 및/또는 조건의 처리와 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 제공하는 것을 포함할 수 있다. 나아가, 상기 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 상기 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 더 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [1689] 상기 세포 내에 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건의 처리, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 제공하는 것과 상기 도너 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것은 동시에 처리되고 제공될 수 있으며, 이는 하기의 다른 예들에도 적용될 수 있다.
- [1691] 다른 예를 들어, 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 RTR이 포함된 틀박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 위치특이적 리컴비나아제(SSR) 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 상기 세포에 제공하는 것을 포함할 수 있다. 나아가, 상기 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 상기 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 더 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [1692] 또 다른 예를 들어, 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되지 않고, 제1 리컴비나아제 인식 사이트(RRS1)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드와 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 틀박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 제1 위치특이적 리컴비나아제(SSR1) 및 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포에 제공하는 것을 포함할 수 있다. 나아가, 상기 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 상기 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 더 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [1694] 전술한 바와 같이, 분리된 세포에서 2차 유전자 편집하는 일 방법은, 분리된 세포에 전술한 다양한 종류의 물질(예를 들어, 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질), RNA, 플라스미드 벡터, 바이러스성 벡터, 폴리펩타이드 및/또는 단백질을 직접 전달하는 것을 포함할 수 있다.
- [1695] 또한, 비분리된 세포에서 2차 유전자 편집하는 일 방법은, 개체의 조직 또는 기관에 전술한 다양한 종류의 물질(예를 들어, 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질), RNA, 플라스미드 벡터, 바이러스성 벡터, 폴리펩타이드 및/또는 단백질을 주사하는 것을 포함할 수 있다.
- [1696] 나아가, 수정란 및/또는 배아에서 2차 유전자 편집하는 일 방법은, 동물의 수정란 1세포기 전핵 상태에서 전술한 다양한 종류의 물질(예를 들어, 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질), RNA, 플라스미드 벡터, 바이러스성 벡터, 폴리펩타이드 및/또는 단백질을 미세주입(MI) 하는 것을 포함할 수 있다.
- [1697] 또한, 수정란 및/또는 배아에서 2차 유전자 편집하는 일 방법은, 동물의 2세포기 이후 배아에 전술한 다양한 종류의 물질(예를 들어, 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질), RNA, 플라스미드 벡터, 바이러스성 벡터, 폴리펩타이드 및/또는 단백질을 미세주입 하는 것을 포함할 수 있다.
- [1699] 전술한 바와 같이, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 틀박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포, 수정란 및/또는 배아의 경우, 유전자 편집을 하고자하는 때마다 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 제공될 필요가 없다. 이 경우, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 큰 사이즈로 인한 문제점(예를 들어, 낮은 전달 효율)이 해결될 수 있다.
- [1702] **2-3. 틀박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집된 형질전환 배아 및 동물**
- [1703] **2-3-1. 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집된 형질전환 배아**
- [1704] **2-3-1-1. 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집된 형질전환 배아 구성**

- [1705] 본 출원의 몇몇 실시예에 따르면, 틀박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 세포 (이하, '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)')를 하나 이상 포함하는 형질전환 배아가 제공될 수 있다.
- [1706] 본 명세서에 의해 제공되는 일 구현예에 따르면, 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 엔도-폴리뉴클레오타이드가 녹아웃 된 계놈을 가지는 형질전환 배아가 제공될 수 있다. 이 때, 상기 가이드 핵산은 상기 엔도-폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [1707] 상기 엔도-폴리뉴클레오타이드가 녹아웃된 형태는, i) 상기 엔도-폴리뉴클레오타이드의 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 포함되어 있지 않은 형태, ii) 상기 엔도-폴리뉴클레오타이드의 서열에 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함되어 있는 형태, 및 iii) 상기 엔도-폴리뉴클레오타이드의 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거되고, 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함되어 있는 형태 중 어느 하나일 수 있다.
- [1709] 본 출원에서 사용되는 용어 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)'는 2차 유전자 편집이 일어난 계놈을 가지는 세포를 의미하며, 상기 '2차 유전자 편집'은 전술한 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 유전자 편집, 발현 조절 요소를 포함하지 않는 틀박스를 이용한 유전자 편집 및 발현 조절 요소를 포함하는 틀박스를 이용한 유전자 편집을 포함할 수 있다.
- [1710] 다만, 본 출원에 있어서 '2차 유전자 편집 세포(non-2nd gene editing cell)'라는 의미는 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 세포를 의미하는 것일 뿐, 세포의 계놈에 틀박스가 삽입되어 있는지 여부는 문제되지 않는다. 즉, 계놈에서 2차 유전자 편집이 일어난 세포라면, 상기 계놈 상에 틀박스가 삽입된 경우에도 본 출원에서 말하는 '2차 유전자 편집 세포'일 수 있고, 상기 계놈 상에 틀박스가 삽입되지 않은 경우에도 본 출원에서 말하는 '2차 유전자 편집 세포'일 수 있다.
- [1712] 또한, 본 출원에서 사용되는 용어 '비(非) 2차 유전자 편집 세포(non-2nd gene editing cell)'는 2차 유전자 편집 되지 않은 계놈을 포함하는 세포를 의미한다.
- [1713] 다만, 본 출원에 있어서 '비(非) 2차 유전자 편집 세포(non-2nd gene editing cell)'라는 의미는 2차 유전자 편집이 되지 않은 계놈을 가지는 세포를 의미하는 것일 뿐, 전술한 2차 유전자 편집이 되지 않고, 상기 틀박스(100)가 삽입되어 있는 계놈을 가지는 세포도 이에 해당될 수 있다. 즉, 상기 2차 유전자 편집이 되지 않은 경우라면, 다른 유전적 조작이 된 계놈을 가지는 세포도 본 출원에서 말하는 '비(非) 2차 유전자 편집 세포(non-2nd gene editing cell)'일 수 있다.
- [1715] 본 출원의 몇몇 실시예에 따르면, 틀박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집된 형질전환 배아는 키메릭 이거나 상동성 일 수 있다.
- [1716] 상기 상동성인 배아는 상기 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)'만 가지고 있는 형질전환 배아를 의미할 수 있다.
- [1718] 상기 키메릭 배아는 상기 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)'에 더하여, 상기 '비(非) 2차 유전자 편집 세포(non-2nd gene editing cell)'를 함께 가지고 있는 형질전환 배아를 의미할 수 있다.
- [1719] 본 출원에서 제공될 수 있는 키메릭 형질전환 배아의 일 예는, 제1 틀박스와 타겟 사이트를 포함하는 계놈을 가지는 제1 세포 및 제2 틀박스와 변형된 사이트(modified site)를 포함하는 계놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질전환 배아일 수 있다. 상기 제1 틀박스와 상기 제2 틀박스의 서열은 동일하거나 상이할 수 있다.
- [1720] 이때, 상기 제1 틀박스 및/또는 상기 제2 틀박스에는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상이 포함될 수 있다. 또한, 상기 제1 틀박스 및/또는 상기 제2 틀박스에는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 어느 하나 이상에 발현 조절 요소가 더 포함될 수 있다. 이 경우, 상기 가이드 핵산은 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [1721] 상기 타겟 사이트는 엔도-폴리뉴클레오타이드일 수 있다.

- [1722] 상기 타겟 사이트는 엑소-폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 상기 변형된 사이트(modified site)는 유전자 편집에 의해 상기 타겟 사이트의 서열이 달라진 것일 수 있다.
- [1723] 구체적으로 상기 타겟 사이트는 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역을 포함할 수 있으며, 상기 변형된 사이트(modified site)는 제4 영역, 제5 영역 및 제6 영역을 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 영역의 서열 및 상기 제4 영역의 서열은 서로 동일하고, 상기 제3 영역의 서열 및 제6 영역의 서열은 서로 동일하며, 상기 제2 영역의 서열 및 상기 제4 영역의 서열은 서로 상이하다.
- [1724] 상기 제2 영역 및 상기 제5 영역에 PAM서열이 포함되어 있을 수 있다. 상기 제3 영역 및 상기 제6 영역에 PAM서열이 포함되어 있을 수 있다.
- [1725] 상기 제5 영역의 서열은 i)상기 제2 영역의 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 포함되어 있지 않은 형태, ii) 상기 제2 영역의 서열에 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함되어 있는 형태, 또는 iii) 상기 제2 영역의 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거되고 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함되어 있는 형태일 수 있다. ii) 및 iii)의 경우, 추가적으로 더 포함되어 있는 하나 이상의 뉴클레오타이드는 편집 가능한 구성요소(editing enabling component), 단백질이나 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 비 기능 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 번역되지 않는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드, 인위적 인트론(artificial intron) 및 발현 조절 요소 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [1726] 상기 타겟 사이트는 상기 수정란 및/또는 배아의 엔도-폴리뉴클레오타이드 일 수 있다.
- [1727] 상기 타겟 사이트 및 상기 변형된 사이트는 PAM 서열에 인접한 서열일 수 있다.
- [1728] 상기 타겟 사이트 및 상기 변형된 사이트의 5' 방향에는 제1 ITR 서열이 포함되어 있고, 3' 방향에는 제2 ITR 서열이 포함되어 있을 수 있다.
- [1729] 본 출원에서 제공될 수 있는 키메라 형질전환 배아의 다른 예는, 제1 툴박스 및 타겟 사이트를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포 및 툴박스를 포함하지 않으나 변형된 유전자(modified gene)를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질전환 배아일 수 있다.
- [1730] 이때, 상기 제1 툴박스에는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상이 포함될 수 있다. 또한, 상기 제1 툴박스에는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5'말단 중 어느 하나 이상에 발현 조절 요소가 더 포함될 수 있다. 이 경우, 상기 가이드 핵산은 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [1731] 상기 변형된 사이트(modified site)는 유전자 편집에 의해 상기 타겟 사이트의 서열이 달라진 것일 수 있다.
- [1732] 구체적으로 상기 타겟 사이트는 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역을 포함할 수 있으며, 상기 변형된 사이트(modified site)는 제4 영역, 제5 영역 및 제6 영역을 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 영역의 서열 및 상기 제4 영역의 서열은 서로 동일하고, 상기 제3 영역의 서열 및 제6 영역의 서열은 서로 동일하며, 상기 제2 영역의 서열 및 상기 제4 영역의 서열은 서로 상이하다.
- [1733] 상기 제5 영역의 서열은 i)상기 제2 영역의 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 포함되어 있지 않은 형태, ii) 상기 제2 영역의 서열에 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함되어 있는 형태, 또는 iii) 상기 제2 영역의 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거되고 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함되어 있는 형태일 수 있다.
- [1734] 상기 타겟 사이트는 상기 수정란 및/또는 배아의 엔도-폴리뉴클레오타이드 일 수 있다.
- [1735] 상기 타겟 사이트 및 상기 변형된 사이트는 PAM 서열에 인접한 서열일 수 있다.
- [1736] 상기 타겟 사이트 및 상기 변형된 사이트의 5' 방향에는 제1 ITR 서열이 포함되어 있고, 3' 방향에는 제2 ITR 서열이 포함되어 있을 수 있다.
- [1737] 구체적으로, 상기 타겟 사이트와 상기 PAM 서열은 제1 ITR 서열과 제2 ITR 서열 사이에 포함되어있을 수 있고, 상기 변형된 사이트와 상기 PAM 서열은 제1 ITR 서열과 제2 ITR 서열 사이에 포함되어있을 수 있다.
- [1739] 이하에서는, 게놈에 삽입된 툴박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제에 의해 2차 유전자 편집된 게놈을 가지는

세포를 하나 이상 포함하는 형질전환 배아를 제작하는 방법에 대해 설명한다.

[1741] **2-3-1-2. 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집된 형질전환 배아 제작 방법**

[1742] 툴박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 수정란 및/또는 배아를 생산하기 위한 일 방법은, '2차 유전자 편집을 위한 요소'를 수정란에 미세주입(MI) 하는 것을 포함할 수 있다.

[1743] 이 때, 상기 수정란 및/또는 배아는 자연교배 또는 체외수정을 통해 얻어질 수 있다. 상기 자연교배 및/또는 체외수정은 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 동물로부터 생산된 생식세포와 상기 동물과 다른 성별을 가진 동물의 생식세포에 의해 생산될 수 있다.

[1744] 본 출원에서 사용되는 용어 "2차 유전자 편집을 위한 요소"는 계놈에서 2차 유전자 편집이 가능할 수 있도록 세포, 배아 또는 동물에 제공되는 요소를 의미한다.

[1745] 예를 들어, 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건, 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 위치-특이적 리컴비나아제(SSR), RNA-가이드 엔도뉴클레아제, 가이드 핵산 및 도너 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[1746] 보다 구체적으로, 본 명세서에 의해 제공되는 유전자 편집된 형질전환 배아를 제작하기 위한 일 구현 방법은 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 계놈을 가지는 수정란 또는 배아에 상기 타겟 사이트에 결합할 수 있는 가이드 핵산을 제공하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 유전자 편집된 형질전환 배아를 제작하기 위한 일 구현 방법은 상기 수정란 또는 상기 배아에 도너 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것을 더 포함할 수 있다. 이 때, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 상기 가이드 핵산과 동시에 제공될 수 있다. 예를 들어, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드와 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 하나의 벡터에 포함되어 제공될 수 있다.

[1747] 상기 수정란 또는 상기 배아는 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 계놈을 가지는 동물로부터 생산된 생식세포와 상기 동물과 다른 성별을 가진 동물의 생식세포를 이용해 체외수정 하여 얻은 것일 수 있다.

[1749] 보다 구체적으로, 본 명세서에 의해 제공되는 유전자 편집된 형질전환 배아를 제작하기 위한 다른 구현 방법은 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에 발현 조절 요소를 포함하는 계놈을 가지는 수정란 또는 배아에 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및 조건 중 하나 이상을 제공하는 것을 포함할 수 있다.

[1750] 또한, 유전자 편집된 형질전환 배아를 제작하기 위한 일 구현 방법은 상기 수정란 또는 상기 배아에 도너 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것을 더 포함할 수 있다.

[1751] 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및 조건 중 하나 이상과 동시에 제공될 수 있다.

[1753] 툴박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 수정란 및/또는 배아를 생산하기 위한 다른 방법은 체세포 핵이식(SCNT)하는 것을 포함할 수 있다.

[1754] 이 때, 상기 체세포 핵이식에 사용되는 체세포는 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 툴박스가 삽입된 계놈을 가질 수 있다.

[1755] 상기 체세포 핵이식(SCNT)은, 전술한 방법에 의해 생산된 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)'의 핵을 탈핵 난자(enucleated oocyte)에 이식하는 것을 포함할 수 있다. 이 때, 상기 '2차 유전자 편집 세포'는 형질전환 공여세포로 볼 수 있다.

[1756] 보다 구체적으로, 본 명세서에 의해 제공되는 유전자 편집된 형질전환 배아를 제작하기 위한 일 구현 방법은 i) 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 상기 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 형질전환 공여세포를 제작하는 것 및 ii) 상기 형질전환 공여세포의 핵을 탈핵 난자에 이식하는 것;을 포함할 수 있다.

- [1757] 상기 형질전환 공여세포를 제작하는 것은 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 계놈을 가지는 세포에 상기 타겟 사이트에 결합할 수 있는 가이드 핵산을 제공하는 것을 포함할 수 있다. 상기 형질전환 공여세포를 제작하는 것은 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 계놈을 가지는 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [1758] 이 때, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 상기 가이드 핵산과 동시에 제공될 수 있다. 예를 들어, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드와 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 하나의 벡터에 포함되어 제공될 수 있다.
- [1759] 보다 구체적으로, 본 명세서에 의해 제공되는 유전자 편집된 형질전환 배아를 제작하기 위한 다른 구현 방법은 i) 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에 발현 조절 요소를 포함하며, 상기 타겟 사이트에서 유전자 편집된 계놈을 가지는 형질전환 공여세포를 제작하는 것과 ii) 상기 형질전환 공여세포의 핵을 탈핵 난자에 이식하는 것을 포함할 수 있다.
- [1760] 상기 형질전환 공여세포를 제작하는 것은 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에 발현 조절 요소를 포함하는 계놈을 가지는 세포에 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및 조건 중 하나 이상을 제공하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 형질전환 공여세포를 제작하는 것은 상기 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [1761] 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및 조건 중 하나 이상과 동시에 제공될 수 있다.
- [1763] **2-3-2. 인위적 뉴클레아제를 이용한 2차 유전자 편집된 형질전환 동물**
- [1764] **2-3-2-1. 인위적 뉴클레아제를 이용한 2차 유전자 편집된 형질전환 동물 구성**
- [1765] 본 출원의 몇몇 실시예에 따르면, 튜박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 세포(이하, '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)')를 하나 이상 포함하는 형질전환 동물이 제공될 수 있다.
- [1766] 본 명세서에 의해 제공되는 일 구현예에 따르면, 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 엔도-폴리뉴클레오타이드가 நீ아아웃 된 계놈을 가지는 형질전환 동물이 제공될 수 있다. 이 때, 상기 가이드 핵산은 상기 엔도-폴리뉴클레오타이드에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [1767] 상기 엔도-폴리뉴클레오타이드가 நீ아아웃된 형태는, i) 상기 엔도-폴리뉴클레오타이드의 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 포함되어 있지 않은 형태, ii) 상기 엔도-폴리뉴클레오타이드의 서열에 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함되어 있는 형태, 및 iii) 상기 엔도-폴리뉴클레오타이드의 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거되고, 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함되어 있는 형태 중 어느 하나일 수 있다.
- [1769] 튜박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 이용한 2차 유전자 편집된 형질전환 동물은 키메라 동물이거나 상동성 동물일 수 있다.
- [1770] 상기 상동성 동물은 상기 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)' 만 가지고 있는 형질전환 동물을 의미하는 것 일 수 있다.
- [1772] 상기 키메라 동물은 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)' 에 더하여, '비(非) 2차 유전자 편집 세포(non-2nd gene editing cell)' 를 함께 가지고 있는 형질전환 동물을 의미할 수 있다.
- [1773] 본 출원에서 제공될 수 있는 키메라 형질전환 동물의 일 예는, 제1 튜박스과 타겟 사이트를 포함하는 계놈을 가지는 제1 세포 및 제2 튜박스과 변형된 사이트(modified site)를 포함하는 계놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질전환 동물일 수 있다. 상기 제1 튜박스과 상기 제2 튜박스의 서열은 동일하거나 상이할 수 있다.

- [1774] 이때, 상기 제1 툴박스 및/또는 상기 제2 툴박스에는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상이 포함될 수 있다. 또한, 상기 제1 툴박스 및/또는 상기 제2 툴박스에는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 어느 하나 이상에 발현 조절 요소가 더 포함될 수 있다. 이 경우, 상기 가이드 핵산은 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [1775] 상기 타겟 사이트는 엔도-폴리뉴클레오타이드일 수 있다.
- [1776] 상기 타겟 사이트는 엑소-폴리뉴클레오타이드일 수 있다.
- [1777] 상기 변형된 사이트(modified site)는 유전자 편집에 의해 상기 타겟 사이트의 서열이 달라진 것일 수 있다.
- [1778] 구체적으로 상기 타겟 서열은 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역을 포함할 수 있으며, 상기 변형된 서열은 제4 영역, 제5 영역 및 제6 영역을 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 영역의 서열 및 상기 제4 영역의 서열은 서로 동일하고, 상기 제3 영역의 서열 및 제6 영역의 서열은 서로 동일하며, 상기 제2 영역의 서열 및 상기 제4 영역의 서열은 서로 상이하다.
- [1779] 상기 제2 영역 및 상기 제5 영역에 PAM서열이 포함되어 있을 수 있다. 상기 제3 영역 및 상기 제6 영역에 PAM서열이 포함되어 있을 수 있다.
- [1780] 상기 제5 영역의 서열은 i) 상기 제2 영역의 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 포함되어 있지 않은 형태, ii) 상기 제2 영역의 서열에 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함되어 있는 형태, 또는 iii) 상기 제2 영역의 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거되고 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함되어 있는 형태일 수 있다. ii) 및 iii)의 경우, 추가적으로 더 포함되어 있는 하나 이상의 뉴클레오타이드는 편집 가능한 구성요소(editing enabling component), 단백질이나 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 비 기능 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 번역되지 않는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 전사되지 않는 폴리뉴클레오타이드, 인위적 인트론(artificial intron) 및 발현 조절 요소 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [1781] 상기 타겟 사이트 및 상기 변형된 사이트는 PAM 서열에 인접한 서열일 수 있다.
- [1782] 상기 타겟 사이트 및 상기 변형된 사이트의 5' 방향에는 제1 ITR 서열이 포함되어 있고, 3' 방향에는 제2 ITR 서열이 포함되어 있을 수 있다.
- [1784] 본 출원에서 제공될 수 있는 키메라 형질전환 배아의 다른 예는, 제1 툴박스 및 타겟 사이트를 포함하는 게놈을 가지는 제1 세포 및 툴박스를 포함하지 않으나 변형된 유전자(modified gene)를 포함하는 게놈을 가지는 제2 세포를 포함하는 형질전환 동물일 수 있다.
- [1785] 이때, 상기 제1 툴박스에는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상이 포함될 수 있다. 또한, 상기 제1 툴박스에는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 어느 하나 이상에 발현 조절 요소가 더 포함될 수 있다. 이 경우, 상기 가이드 핵산은 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있다.
- [1786] 상기 변형된 사이트(modified site)는 유전자 편집에 의해 상기 타겟 사이트의 서열이 달라진 것일 수 있다.
- [1787] 구체적으로 상기 타겟 서열은 제1 영역, 제2 영역 및 제3 영역을 포함할 수 있으며, 상기 변형된 서열은 제4 영역, 제5 영역 및 제6 영역을 포함할 수 있다. 이때, 상기 제1 영역의 서열 및 상기 제4 영역의 서열은 서로 동일하고, 상기 제3 영역의 서열 및 제6 영역의 서열은 서로 동일하며, 상기 제2 영역의 서열 및 상기 제4 영역의 서열은 서로 상이하다.
- [1788] 상기 제5 영역의 서열은 i)상기 제2 영역의 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 포함되어 있지 않은 형태, ii) 상기 제2 영역의 서열에 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함되어 있는 형태, 또는 iii) 상기 제2 영역의 서열 중 하나 이상의 뉴클레오타이드가 제거되고 하나 이상의 뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함되어 있는 형태일 수 있다.
- [1789] 상기 타겟 사이트는 상기 동물의 엔도-폴리뉴클레오타이드 일 수 있다.
- [1790] 상기 타겟 사이트 및 상기 변형된 사이트는 PAM 서열에 인접한 서열일 수 있다.

- [1791] 상기 타겟 사이트 및 상기 변형된 사이트의 5' 방향에는 제1 ITR 서열이 포함되어 있고, 3' 방향에는 제2 ITR 서열이 포함되어 있을 수 있다.
- [1792] 구체적으로, 상기 타겟 사이트와 상기 PAM 서열은 제1 ITR 서열과 제2 ITR 서열 사이에 포함되어있을 수 있고, 상기 변형된 사이트와 상기 PAM 서열은 제1 ITR 서열과 제2 ITR 서열 사이에 포함되어있을 수 있다.
- [1794] 이하에서는, 게놈에 삽입된 틀박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제에 의해 2차 유전자 편집된 게놈을 가지는 세포를 하나 이상 포함하는 형질전환 동물을 제작하는 방법에 대해 설명한다.
- [1796] **2-3-2-2. 인위적 뉴클레아제를 이용한 2차 유전자 편집된 형질전환 동물 제작 방법**
- [1797] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 의한 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)' 를 포함하는 동물을 생산하는 일 방법은, 인위적 뉴클레아제의 구성요소에 의해 2차 유전자 편집된 게놈을 가지는 수정란 및/또는 배아를 대리모의 자궁에 이식하는 것을 포함할 수 있다.
- [1798] 예를 들어, 전술한 바와 같이 상기 '2차 유전자 편집을 위한 요소'의 미세주입(MI)에 의해 생산된 수정란 및/또는 배아를 대리모의 자궁에 착상시켜 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)' 를 포함하는 동물을 생산할 수 있다. 이 경우, 생산된 동물은 키메라이거나 상동성 일 수 있다.
- [1799] 다른 예를 들어, 전술한 2차 유전자 편집된 게놈을 가지는 세포를 이용한 체세포 핵이식(SCNT)에 의해 생산된 수정란 및/또는 배아를 대리모의 자궁에 착상시켜 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)' 를 포함하는 동물을 생산할 수 있다. 이 경우, 생산된 동물은 상동성 일 수 있다.
- [1800] 보다 구체적으로, 본 명세서에 의해 제공되는 유전자 편집된 형질전환 동물을 제작하기 위한 일 구현 방법은 i) 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 상기 타겟 사이트에서 유전자 편집된 게놈을 가지는 배아를 제작하는 것과 ii) 상기 배아를 대리모에 이식하는 것을 포함할 수 있다.
- [1801] 상기 배아를 제작하는 것은 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 게놈을 가지는 수정란 또는 배아에 상기 타겟 사이트에 결합할 수 있는 가이드 핵산을 제공하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 배아를 제작하는 것은 상기 수정란 또는 상기 배아에 도너 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [1802] 이 때, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 상기 가이드 핵산과 동시에 제공될 수 있다. 예를 들어, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드와 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 하나의 벡터에 포함되어 제공될 수 있다.
- [1803] 상기 배아를 제작하는 것은 i) 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하며, 상기 타겟 사이트에서 유전자 편집된 게놈을 가지는 형질전환 공여세포를 제작하는 것 및 상기 형질전환 공여세포의 핵을 탈핵 난자에 이식하는 것을 포함할 수 있다.
- [1804] 상기 형질전환 공여세포를 제작하는 것은 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 게놈을 가지는 세포에 상기 타겟 사이트에 결합할 수 있는 가이드 핵산을 제공하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 형질전환 공여세포를 제작하는 것은
- [1805] 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 게놈을 가지는 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것을 더 포함할 수 있다.
- [1806] 이 때, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 상기 가이드 핵산과 동시에 제공될 수 있다. 예를 들어, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드와 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 하나의 벡터에 포함되어 제공될 수 있다.
- [1808] 보다 구체적으로, 본 명세서에 의해 제공되는 유전자 편집된 형질전환 동물을 제작하기 위한 다른 구현 방법은 i) 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에 발현 조절 요소를 포함하며, 상기 타겟 사이트에서 유전자 편집된 게놈을 가지는 배아를 제작하는 것과 ii) 상기 배아를 대리모에 이식하는 것을 포함할 수 있다.
- [1809] 상기 배아를 제작하는 일 구현 방법은 타겟 사이트, 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레

오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에 발현 조절 요소를 포함하는 게놈을 가지는 수정란 또는 배아에 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및 조건 중 하나 이상을 제공하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 배아를 제작하는 것은 상기 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것을 더 포함할 수 있다.

[1810] 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및 조건 중 하나 이상과 동시에 제공될 수 있다.

[1811] 상기 배아를 제작하는 다른 구현 방법은 i) 타겟 사이트, 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에 발현 조절 요소를 포함하는 게놈을 가지는 형질전환 공여세포를 제작하는 것과 ii) 상기 형질전환 공여세포의 핵을 탈핵 난자에 이식하는 것을 포함할 수 있다.

[1812] 상기 형질전환 공여세포를 제작하는 것은 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 타겟 사이트에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하고, 상기 알엔에이-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 및 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단 중 하나 이상에 발현 조절 요소를 포함하는 게놈을 가지는 세포에 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및 조건 중 하나 이상을 제공하는 것을 포함할 수 있다. 또한, 상기 형질전환 공여세포를 제작하는 것은 상기 세포에 도너 폴리뉴클레오타이드를 제공하는 것을 더 포함할 수 있다.

[1813] 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및 조건 중 하나 이상과 동시에 제공될 수 있다.

[1815] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 의한 상기 2차 유전자 편집된 게놈을 가지는 동물을 생산하는 일 방법은, 전술한 '2차 유전자 편집을 위한 요소'를 동물의 조직에 주사하는 것을 포함할 수 있다. 전술한 조직에 주사하는 방법을 통해 생산된 동물은 키메릭 동물일 수 있다.

[1817] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 의한 상기 2차 유전자 편집된 게놈을 가지는 동물을 생산하는 일 방법은, 상기 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)' 를 포함하는 정소를 가지는 수컷 또는 상기 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)' 를 포함하는 난소를 가지는 암컷을 자연 교배시키는 것을 포함할 수 있다.

[1818] 예를 들어, 상기 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)' 를 포함하는 정소를 가지는 수컷과 상기 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)' 를 포함하는 난소를 가지는 암컷을 자연교배 시킬 수 있다.

[1819] 다른 예를 들어, 상기 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)' 를 포함하는 정소를 가지는 수컷과 야생형(WT) 암컷을 자연교배 시키거나, 상기 '2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)' 를 포함하는 난소를 가지는 암컷과 야생형(WT) 수컷을 자연교배 시킬 수 있다.

[1821] **3. PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스를 이용한 2차 유전자 편집**

[1822] 이하에서는, 게놈에 삽입된 틀박스 내에 포함된 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드에서의 2차 유전자 편집에 대하여 설명한다. 상기 2차 유전자 편집은 도너 폴리뉴클레오타이드의 핵인일 수 있다.

[1823] 즉, 인위적으로 상기 게놈에 삽입된 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스는, 유전자 편집이 될 수 있는 타겟 사이트로 기능할 수 있다.

[1824] 전술한 바와 같이, 상기 틀박스는 세이프 하버(safe harbor)내에 위치할 수 있어, 상기 틀박스에서 유전자 편집이 일어나더라도 세포 내 게놈의 단백질 또는 RNA 발현에 영향을 미치지 않을 수 있다.

[1826] **3-1. PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 가지는 틀박스**

[1827] 본 출원의 몇몇 실시예에 따르면, 제1 ITR 서열, PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 ITR 서열을 포함하는 틀박스가 제공될 수 있다.

[1828] 상기 틀박스에는 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 추가적으로 더 포함될 수

있다. 예를 들어, 상기 틀박스에는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 중 적어도 하나 이상이 추가적으로 더 포함될 수 있다.

- [1829] 이하에서는 상기 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드의 몇몇 실시예를 설명한다.
- [1830] 예를 들어, PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드는 마커 유전자(marker gene)를 포함할 수 있으며, 상기 마커 유전자에 대한 구체적인 내용은 전술한 바 있어 자세한 설명은 생략한다.
- [1831] 다른 예를 들어, PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함 할 수 있다.
- [1832] 또 다른 예를 들어, PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드는 개시코돈(start codon) (AUG)을 포함하지 않는 폴리뉴클레오타이드를 포함 할 수 있다. 상기 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드가 개시코돈(AUG)을 포함하고 있지 않는 경우, 게놈에 인위적으로 삽입된 상기 폴리뉴클레오타이드에 의해 전사 및/또는 번역되는 RNA 혹은 단백질이 발생되지 않을 수 있다.
- [1833] 즉, 외부에서 삽입된 폴리뉴클레오타이드가 개시코돈(start codon)(AUG)을 포함하지 않는 경우, RNA 혹은 단백질이 발현되지 않아 세포 내 안정성을 유지 하면서 상기 외부에서 삽입된 폴리뉴클레오타이드가 인위적 뉴클레아제에 의해 잘릴 수 있는 자리로 활용될 수 있다는 장점이 있다.
- [1835] 본 출원의 몇몇 실시예에 따르면, 하나의 틀박스 내에 다수의 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드(이하, 인위적 편집 사이트(artificial editing site))가 포함될 수 있다.
- [1836] 본 출원에서 사용되는 용어 "인위적 편집 사이트(artificial editing site)"는 틀박스 내에 존재하는 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드(polynucleotide)를 의미하는 것으로, 게놈에 포함되어 유전자 편집이 일어날 수 있는 타겟 사이트로 기능할 수 있다.
- [1837] 예를 들어, 하나의 틀박스에 2개의 인위적 편집 사이트(artificial editing site) 가 포함될 수 있다. 즉, 하나의 틀박스에 제1 인위적 편집 사이트 및 제2 인위적 편집 사이트가 포함될 수 있다.
- [1838] 상기 제1 인위적 편집 사이트의 서열은 상기 제2 인위적 편집 사이트의 서열과 동일할 수 있다.
- [1839] 상기 제1 인위적 편집 사이트의 서열은 상기 제2 인위적 편집 사이트의 서열과 상이할 수 있다.
- [1840] 다른 예를 들어, 하나의 틀박스에 3개 이상의 인위적 편집 사이트(artificial editing site)가 포함될 수 있다. 다만, 설명의 편의를 위하여 이하에서는 하나의 틀박스에 포함될 수 있는 인위적 편집 사이트의 개수가 두 개인 경우에 대해서 설명한다.
- [1841] 이하의 설명(인위적 편집 사이트의 개수가 두 개인 경우에 대한 설명)은 인위적 편집 사이트의 개수가 n개(n은 3이상의 자연수)인 경우에도, n개 중에서 임의로 선택된 2개의 인위적 편집 사이트들 사이의 관계에 그대로 적용될 수 있다.
- [1842] 도 11은 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드가 포함되어 있는 틀박스의 몇몇 실시예를 도시한다.
- [1843] 도 11의 (a)는 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드(203) 하나가 제1 ITR 서열(201) 및 제2 ITR 서열(207) 사이에 포함되어 있는 틀박스(140(a))를 도시한다.
- [1844] 도 11의 (b)는 제1 인위적 편집 사이트(205) 및 제2 인위적 편집 사이트 (206)가 제1 ITR 서열(201) 및 제2 ITR 서열(207) 사이에 포함되어 있는 틀박스(140(b))를 도시한다. 이 때, 상기 제1 인위적 편집 사이트(205)의 서열 및 상기 제2 인위적 편집 사이트(206)의 서열은 서로 동일하다.
- [1845] 도 11의 (c)는 제1 인위적 편집 사이트(202) 및 제2 인위적 편집 사이트(204)가 제1 ITR 서열(201) 및 제2 ITR 서열(207) 사이에 포함되어 있는 틀박스(140(c))를 도시한다. 이 때, 상기 제1 인위적 편집 사이트(202)의 서열 및 상기 제2 인위적 편집 사이트 (204)의 서열은 서로 상이하다.
- [1846] 상기 틀박스는 게놈 또는 염색체 상에 삽입되어 있을 수 있으며, 틀박스가 게놈 또는 염색체 상에 삽입되어 있는 형태 및 방법에 대해서는 전술한 바 있어, 자세한 설명은 생략한다.
- [1848] 이하에서는 전술한 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포, 수정란, 배아 또는 동물에서 2차 유전자 편집 방법 및 2차 유전자 편집된 게놈의 형태를 설명한다.
- [1850] **3-2. PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스에서 2차 유전자 편집 방법**

- [1851] 이하에서는 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스가 삽입된 세포에서 2차 유전자 편집하는 방법을 설명한다. PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스가 세포 내에 삽입되는 방법은 전술한 틀박스 삽입 방법에 의해 충분히 설명될 수 있어 자세한 설명은 생략한다.
- [1852] 상기 세포의 게놈에 삽입된 틀박스의 구성에 따라서 2차 유전자 편집을 하기 위한 다양한 방법들이 제공될 수 있다.
- [1853] 설명의 편의를 위해, 이하에서는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 게놈 상에 삽입되어 있는 경우를 상정하여 설명한다.
- [1854] 예를 들어, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 상기 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스와 동일한 틀박스 또는 상기 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스와 상이한 틀박스에 포함되어 게놈상에 삽입되어 있을 수 있다. 다른 예를 들어, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 틀박스의 구성요소로 포함되지 않고 게놈상에 삽입되어 있을 수 있다.
- [1855] 이하에서는, 도 11의 (a)에 도시된 틀박스를 이용하여 2차 유전자 편집하는 방법에 대해서 설명한다.
- [1856] 도 12는 도 11의 (a)에 도시된 틀박스를 이용하여 2차 유전자 편집되는 과정을 도시한다.
- [1857] PAM 서열을 가지는 하나의 폴리뉴클레오타이드(203)가 포함된 틀박스(140(a))가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 가이드 핵산 및 도너 폴리뉴클레오타이드(232)를 세포 내에 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [1858] 상기 가이드 핵산의 일부 서열은 상기 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드(203)의 일부 서열과 동일하거나 상보적일 수 있다.
- [1859] 상기 가이드 핵산을 상기 세포 내에 제공하는 방법은 다양할 수 있다.
- [1860] 예를 들어, 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것에 의해 상기 가이드 핵산이 상기 세포 내에 제공될 수 있다. 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 RNA 형태로 도입되거나 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터에 포함되어 상기 세포 내로 도입될 수 있다.
- [1861] 다른 예를 들어, 상기 틀박스(140(a)) 또는 상기 틀박스(140(a))와 상이한 틀박스에 포함되어 있는 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로부터 상기 가이드 핵산이 발현되는 것에 의해, 상기 가이드 핵산이 상기 세포 내에 제공될 수 있다. 또한, 게놈에 삽입되어 있는 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로부터 상기 가이드 핵산이 발현되는 것에 의해, 상기 가이드 핵산이 상기 세포 내에 제공될 수 있다.
- [1862] 또 다른 예를 들어, 상기 가이드 핵산이 상기 틀박스(140(a)) 또는 상기 틀박스(140(a))와 상이한 틀박스에 포함되어 있으나 전술한 발현 조절 요소에 의해 정상적으로 발현되고 있지 못한 경우, 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건의 처리에 의해 상기 가이드 핵산이 상기 세포 내에 제공될 수 있다. 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건에 대해서는 전술한 바 있어 자세한 설명은 생략한다.
- [1863] 상기 도너 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내에 전달하는 방법은 다양할 수 있다.
- [1864] 예를 들어, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터를 상기 세포 내로 도입하는 것에 의해 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 상기 세포 내에 전달될 수 있다.
- [1865] 전술한 방법에 의해, 상기 세포 내로 상기 가이드 핵산이 제공되면, 상기 가이드 핵산은 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 상호작용할 수 있고, 상기 가이드 핵산 및 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 세포 내에서 복합체를 형성할 수 있다.
- [1866] 또한, 세포 내로 제공된 상기 가이드 핵산은 상기 폴리뉴클레오타이드(203)에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 핵산과 복합체를 이룬 상태에서 상기 폴리뉴클레오타이드(203)를 자를 수 있게 된다. 이 경우, 세포 내로 제공된 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(232)는 상기 폴리뉴클레오타이드(203)에 너인 될 수 있으며, 그 결과 상기 폴리뉴클레오타이드(203)는 두 영역(203(a) 및 203(b))으로 나뉠 수 있다 (도 12 참고).
- [1868] 이어서, 도 11의 (b)에 도시된 틀박스를 이용하여 2차 유전자 편집하는 방법에 대해서 설명한다.

- [1869] 도 13은 도 11의 (b)에 도시된 틀박스를 이용하여 2차 유전자 편집되는 과정을 도시한다.
- [1870] 제1 인위적 편집 사이트(205) 및 제2 인위적 편집 사이트(206)가 포함된 틀박스(140(b))가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 상기 세포에 가이드 핵산 및 도너 폴리뉴클레오타이드를 세포 내에 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [1871] 전술한 바와 같이, 상기 제1 인위적 편집 사이트(205) 및 상기 제2 인위적 편집 사이트(206)는 동일한 서열을 포함할 수 있다.
- [1872] 상기 가이드 핵산의 일부 서열은 상기 제1 인위적 편집 사이트(205) 및/또는 상기 제2 인위적 편집 사이트(206)와 동일하거나 상보적일 수 있다.
- [1873] 상기 가이드 핵산을 상기 세포 내에 제공하는 방법은 다양할 수 있다.
- [1874] 예를 들어, 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것에 의해 상기 가이드 핵산이 상기 세포 내에 제공될 수 있다.
- [1875] 다른 예를 들어, 상기 틀박스(140(b)) 또는 상기 틀박스(140(b))와 상이한 틀박스에 포함되어 있는 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로부터 상기 가이드 핵산이 발현되는 것에 의해, 상기 가이드 핵산이 상기 세포 내에 제공될 수 있다.
- [1876] 또 다른 예를 들어, 상기 가이드 핵산이 상기 틀박스(140(b)) 또는 상기 틀박스(140(b))와 상이한 틀박스에 포함되어 있으나 전술한 발현 조절 요소에 의해 정상적으로 발현되고 있지 못한 경우, 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건의 처리에 의해 상기 가이드 핵산이 상기 세포 내에 제공될 수 있다.
- [1877] 상기 도너 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내에 전달하는 방법은 다양할 수 있으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같이 자세한 설명은 생략한다.
- [1879] 전술한 방법에 의해, 상기 세포 내로 상기 가이드 핵산이 제공되면, 상기 가이드 핵산은 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 상호작용 할 수 있고, 상기 가이드 핵산 및 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 세포 내에서 복합체를 형성할 수 있다.
- [1880] 또한, 세포 내로 제공된 상기 가이드 핵산은 상기 제1 인위적 편집 사이트(205) 및/또는 상기 제2 인위적 편집 사이트(206)에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 핵산과 복합체를 이룬 상태에서 상기 제1 인위적 편집 사이트(205) 및/또는 상기 제2 인위적 편집 사이트(206)를 자를 수 있게 된다.
- [1881] 이 경우, 세포 내로 도입된 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(232)는 상기 제1 인위적 편집 사이트(205) 및/또는 상기 제2 인위적 편집 사이트(206)에 녹인 될 수 있다.
- [1882] 그 결과, 상기 제1 인위적 편집 사이트(205)는 제1 영역(205(a)) 및 제2 영역(205(b))으로 나뉘어질 수 있다. 또한, 상기 제2 인위적 편집 사이트(206)는 제1 영역(206(a)) 및 제2 영역 (206(b)) 으로 나뉘어 질 수 있다 (도 13의 (b) 내지 도 13의 (d) 참고).
- [1883] 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(232)가 상기 제1 인위적 편집 사이트(205) 및 상기 제2 인위적 편집 사이트(206)에 모두 녹인 된 경우, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(232)가 녹인된 세포에서 더 많은 양의 폴리펩타이드가 발현될 수 있다. 상기 폴리펩타이드는 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(232)가 암호화하는 것 일 수 있다 (도 13 참고).
- [1885] 나아가, 도 11의 (c)에 도시된 틀박스를 이용하여 2차 유전자 편집하는 방법에 대해서 설명한다.
- [1886] 도 14는 도 11의 (c)에 도시된 틀박스를 이용하여 2차 유전자 편집되는 과정을 도시한다.
- [1887] 제1 인위적 편집 사이트(202) 및 제2 인위적 편집 사이트(204)가 포함된 틀박스(140(c))가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집을 하기 위한 일 방법은, 상기 세포에 제1 가이드 핵산, 제2 가이드 핵산, 제1 도너 폴리뉴클레오타이드(232(a)) 및 제2 도너 폴리뉴클레오타이드(232(b))를 세포 내로 제공하는 것을 포함할 수 있다. 전술한 바와 같이, 상기 제1 인위적 편집 사이트(202) 및 상기 제2 인위적 편집 사이트(204)는 상이한 서열이다.
- [1888] 이 경우, 상기 제1 가이드 핵산의 일부 서열은 상기 제1 인위적 편집 사이트(202)의 일부 서열과 동일하거나 상

보적일 수 있다. 상기 제2 가이드 핵산의 일부 서열은 상기 제2 인위적 편집 사이트(204)의 일부 서열과 동일하거나 상보적일 수 있다.

- [1889] 또한, 상기 제1 도너 폴리뉴클레오타이드(232(a))의 5' 및 3' 말단에는 상기 제1 인위적 편집 사이트(202)의 일부 서열과 동일한 서열을 포함할 수 있다. 또한, 상기 제2 도너 폴리뉴클레오타이드(232(b))의 5' 및 3' 말단에는 상기 제2 인위적 편집 사이트(204)의 일부 서열과 동일한 서열을 포함할 수 있다. 즉, 상기 제1 도너 폴리뉴클레오타이드(232(a)) 및 상기 제2 도너 폴리뉴클레오타이드(232(b))의 5' 및 3' 말단은 상동성 재조합(homologous recombination)을 위한 서열을 포함할 수 있다.
- [1890] 상기 제1 가이드 핵산 및 제2 가이드 핵산을 상기 세포 내에 제공하는 방법은 다양할 수 있다.
- [1891] 예를 들어, 상기 제1 가이드 핵산 및/또는 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것에 의해 상기 제1 및 제2 가이드 핵산이 상기 세포 내에 제공될 수 있다.
- [1892] 다른 예를 들어, 상기 툴박스(140(c)) 또는 상기 툴박스(140(c))와 상이한 툴박스에 포함되어 있는 상기 제1 가이드 핵산 및/또는 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로부터 상기 제1 가이드 핵산 및 제2 가이드 핵산이 발현되는 것에 의해, 상기 제1 가이드 핵산 및/또는 제2 가이드 핵산이 상기 세포 내에 제공될 수 있다. 이 경우, 상기 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 동일한 툴박스 또는 상이한 툴박스에 포함되어 상기 세포 내에 제공될 수 있다.
- [1893] 또 다른 예를 들어, 상기 제1 가이드 핵산 및/또는 제2 가이드 핵산이 상기 툴박스(140(c)) 또는 상기 툴박스(140(c))와 상이한 툴박스에 포함되어 있으나 전술한 발현 조절 요소에 의해 정상적으로 발현되고 있지 못한 경우, 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건의 처리에 의해 상기 제1 가이드 핵산 및/또는 제2 가이드 핵산이 상기 세포 내에 제공될 수 있다. 이 경우도, 상기 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 상기 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 동일한 툴박스 또는 상이한 툴박스에 포함되어 상기 세포 내에 제공될 수 있다.
- [1894] 상기 제1 도너 폴리뉴클레오타이드 및 제2 도너 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내에 전달하는 방법은 다양할 수 있다.
- [1895] 예를 들어, 상기 제1 도너 폴리뉴클레오타이드 및 제2 도너 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 상기 세포 내로 도입하는 것에 의해 상기 제1 도너 폴리뉴클레오타이드 및 제2 도너 폴리뉴클레오타이드가 상기 세포 내에 전달될 수 있다. 이 경우, 상기 제1 및 제2 도너 폴리뉴클레오타이드는 동일한 벡터에 포함되어 상기 세포 내로 전달될 수 있다. 또는, 상기 제1 및 제2 도너 폴리뉴클레오타이드는 상이한 벡터에 포함되어 상기 세포 내로 전달될 수 있다. 상기 벡터는 플라스미드 벡터 또는 바이러스성 벡터일 수 있다.
- [1896] 전술한 방법에 의해, 상기 세포 내로 상기 제1 가이드 핵산 및/또는 제2 가이드 핵산이 제공되면, 상기 제1 가이드 핵산 및/또는 제2 가이드 핵산은 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제와 상호작용할 수 있고, 상기 제1 가이드 핵산 및/또는 제2 가이드 핵산과 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 세포 내에서 복합체를 형성할 수 있다.
- [1897] 세포 내로 제공된 상기 제1 가이드 핵산은 상기 제1 인위적 편집 사이트(202)에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 제1 가이드 핵산과 복합체를 이룬 상태에서 상기 제1 인위적 편집 사이트(202)를 자를 수 있게 된다. 이 경우, 세포 내로 제공된 상기 제1 도너 폴리뉴클레오타이드(232(a))가 상기 제1 인위적 편집 사이트(202)에 녹인 될 수 있다.
- [1898] 또한, 세포 내로 제공된 상기 제2 가이드 핵산은 상기 제2 인위적 편집 사이트(204)에 특이적으로 결합할 수 있다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 제2 가이드 핵산과 복합체를 이룬 상태에서 상기 제2 인위적 편집 사이트(204)를 자를 수 있게 된다. 이 경우, 세포 내로 제공된 상기 제2 도너 폴리뉴클레오타이드(232(b))가 상기 제2 인위적 편집 사이트(204)에 녹인 될 수 있다.
- [1899] 그 결과, 상기 제1 인위적 편집 사이트(202)는 제1 영역(202(a)) 및 제2 영역(202(b))으로 나뉘어질 수 있다. 또한, 상기 제2 인위적 편집 사이트(204)는 제1 영역(204(a)) 및 제2 영역(204(b))으로 나뉘어질 수 있다(도 14의 (b) 내지 도 14의 (d) 참고).
- [1900] 상기 툴박스(140(c))가 2차 유전자 편집된 형태는 상기 제1 도너 폴리뉴클레오타이드(232(a))가 상기 제1 인위적 편집 사이트(202)에 녹인 되어 있는 형태일 수 있다(도 14의 (b) 참고).

- [1901] 또한, 상기 틀박스(140(c))가 2차 유전자 편집된 다른 형태는 상기 제2 도너 폴리뉴클레오타이드(232(b))가 상기 제2 인위적 편집 사이트(204)에 낙인 되어 있는 형태일 수 있다(도 14의 (c) 참고).
- [1902] 나아가, 상기 틀박스(140(c))가 2차 유전자 편집된 형태는 상기 제1 도너 폴리뉴클레오타이드(232(a))가 상기 제1 인위적 편집 사이트(202)에 낙인 되고, 상기 제2 도너 폴리뉴클레오타이드(232(b))가 상기 제2 인위적 편집 사이트(204)에 낙인 된 형태일 수 있다(도 14의 (d) 참고).
- [1903] 즉, 상기 틀박스(140(c))에서 2차 유전자 편집이 일어나는 경우, 상이한 서열을 가지는 상기 제1 도너 폴리뉴클레오타이드(232(a)) 및 상기 제2 도너 폴리뉴클레오타이드(232(b))가 각각 제1 인위적 편집 사이트(202) 및 제2 인위적 편집 사이트(204)에 낙인 될 수 있다. 이 경우, 상기 제1 및 제2 도너 폴리뉴클레오타이드(232)가 낙인 된 세포에서 제1 폴리펩타이드 및 제2 폴리펩타이드가 발현될 수 있다. 상기 제1 폴리펩타이드는 상기 제1 도너 폴리뉴클레오타이드(232(a))가 암호화하는 것일 수 있으며, 상기 제2 폴리펩타이드는 상기 제2 도너 폴리뉴클레오타이드(232(b))가 암호화하는 것 일 수 있다.
- [1905] 전술한 몇몇 예들과 달리, 상기 세포의 게놈에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입되어있지 않은 경우, 상기 세포에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 추가적으로 제공하여 2차 유전자 편집할 수 있다.
- [1906] 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 상기 세포 내에 전달하는 방법은 다양할 수 있다.
- [1907] 예를 들어, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 단백질로 세포 내에 도입하는 것에 의해 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 상기 세포 내에 전달될 수 있다. 또한, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것에 의해 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 상기 세포 내에 전달될 수 있다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 상기 세포 내로 도입하는 것은, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터에 포함시켜 상기 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다.
- [1909] 전술한 바와 같이, 분리된 세포에서 2차 유전자 편집하는 일 방법은 분리된 세포에 전술한 RNA, 플라스미드 벡터, 폴리펩타이드 및/또는 단백질을 직접 전달하는 방법을 포함할 수 있다.
- [1910] 뿐만 아니라, 비분리된 세포에서 2차 유전자 편집하는 일 방법은 개체의 조직 또는 기관에 전술한 RNA, 플라스미드 벡터, 폴리펩타이드 및/또는 단백질을 주사하는 방법을 포함할 수 있다.
- [1911] 나아가, 수정란 및/또는 배아에서 2차 유전자 편집하는 일 방법은 동물의 수정란 1세포기 전핵 상태에서 전술한 RNA, 플라스미드 벡터, 폴리펩타이드 및/또는 단백질을 미세주입 하는 방법을 포함할 수 있다.
- [1913] 이하에서는, 틀박스에 포함된 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스에서 2차 유전자 편집이 일어난 경우의 효과를 설명한다.
- [1914] 본 출원에 개시된 몇몇 실시예에 의해 제공되는 틀박스에 포함된 PAM 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 종류에 따라, 2차 유전자 편집에 의한 효과가 다를 수 있다.
- [1915] 예를 들어, 상기 PAM 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 마커 유전자 인 경우, 상기 PAM 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 타겟 사이트로 하여 도너 폴리뉴클레오타이드가 낙인 되면 상기 마커 유전자가 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 세포 내에서 발현될 수 없다. 이러한 성질을 통해, 게놈에 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 낙인 된 세포를 선별할 수 있다. 마커 유전자를 이용한 유전자 편집된 세포의 선별에 대한 자세한 내용은 후술할 것이다.
- [1916] 다른 예를 들어, 상기 PAM 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드인 경우, 상기 PAM 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 타겟 사이트로 하여 도너 폴리뉴클레오타이드가 낙인 되면 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 세포 내에서 발현될 수 없다.
- [1917] 이 경우, 상기 타겟 사이트는 상기 PAM 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및 번역에 의해 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 이용해 잘리고, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 낙인된 것일 수 있다. 상기 도너 폴리뉴클레오타이드의 낙인 후에는 세포 내에서 더 이상 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 발현되지 않아 원하지 않는 추가적인 유전자 편집이 일어나지 않는 장점이 있다.
- [1919] 이하에서는 전술한 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스가 게놈에 삽입된 세포, 수정란,

배아 또는 동물을 이용해 생산된 2차 유전자 편집된 배아 또는 동물의 구성 및 제작 방법에 대하여 설명한다.

- [1921] **3-3. PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 툴박스에서 2차 유전자 편집된 형질전환 배아 및 동물**
- [1922] **3-3-1. PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 툴박스에서 2차 유전자 편집된 형질전환 배아**
- [1923] **3-3-1-1. PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 툴박스에서 2차 유전자 편집된 형질전환 배아 구성**
- [1924] 본 출원의 몇몇 실시예에 따르면, 툴박스에 포함된 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드에서 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 2차 유전자 편집 세포(gene editing cell)(이하, 'PAM 2차 유전자 편집 세포')를 하나 이상 포함하는 형질전환 배아가 제공될 수 있다.
- [1925] 또한, 본 출원에서 사용되는 용어 'PAM 비(非) 2차 유전자 편집 세포(non-2nd gene editing cell)' 는 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드에서 2차 유전자 편집 되지 않은 계놈을 포함하는 세포를 의미한다.
- [1926] 다만, 본 출원에 있어서 'PAM 비(非) 2차 유전자 편집 세포(non-2nd gene editing cell)' 라는 의미는 2차 유전자 편집이 되지 않은 계놈을 가지는 세포를 의미하는 것일 뿐, 전술한 2차 유전자 편집이 되지 않고, 상기 툴박스(100)가 삽입되어 있는 계놈을 가지는 세포도 이에 해당될 수 있다. 즉, 상기 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드에서 2차 유전자 편집이 되지 않은 경우라면, 다른 유전적 조작이 된 계놈을 가지는 세포도 본 출원에서 말하는 'PAM 비(非) 2차 유전자 편집 세포(non-2nd gene editing cell)' 일 수 있다.
- [1928] 'PAM 2차 유전자 편집 세포'를 포함하는 형질전환 배아는 키메릭 이거나 상동성 일 수 있다.
- [1929] 상기 상동성 배아는 상기 'PAM 2차 유전자 편집 세포'만 가지고 있는 형질전환 배아를 의미할 수 있다.
- [1930] 상기 키메릭 배아는 상기 'PAM 2차 유전자 편집 세포'에 더하여, 상기 'PAM 비(非) 2차 유전자 편집 세포(non-2nd gene editing cell)' 를 함께 가지고 있는 형질전환 배아를 의미할 수 있다.
- [1932] 이하에서는, 계놈에 삽입된 툴박스에 포함되어 있는 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드가 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 세포를 하나 이상 포함하는 형질전환 배아를 제작하는 방법에 대해 설명한다.
- [1934] **3-3-1-2. PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 툴박스에서 2차 유전자 편집된 형질전환 배아 제작 방법**
- [1935] 툴박스에 포함된 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드에서 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 수정란 또는 배아를 생산하기 위한 일 방법은, PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드가 삽입된 계놈을 가지는 수정란 또는 배아에 '2차 유전자 편집을 위한 요소'를 미세주입(MI)하는 것을 포함할 수 있다.
- [1936] 본 출원에서 사용되는 용어 '2차 유전자 편집을 위한 요소'는 계놈에서 2차 유전자 편집이 가능할 수 있도록 세포, 배아 또는 동물에 제공되는 요소를 의미한다. 예를 들어, 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건, 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 포함하는 폴리뉴클레오타이드, 위치-특이적 리컴비나아제(SSR), RNA-가이드 엔도뉴클레아제, 가이드 핵산 및 도너 폴리뉴클레오타이드 중 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [1937] 툴박스에 포함된 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드에서 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 수정란 또는 배아를 생산하기 위한 일 방법은, 체세포 핵이식(SCNT)하는 것을 포함할 수 있다. 상기 체세포 핵이식(SCNT)은, 전술한 방법에 의해 생산된 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드에서 2차 유전자 편집된 세포의 핵을 탈핵 난자에 이식하는 것을 포함할 수 있다.
- [1939] **3-3-2. PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 툴박스에서 2차 유전자 편집된 형질전환 동물**
- [1940] **3-3-2-1. PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 툴박스에서 2차 유전자 편집된 형질전환 동물 구성**
- [1941] 본 출원의 몇몇 실시예에 따르면, 툴박스에 포함된 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드에서 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 PAM 2차 유전자 편집 세포를 하나 이상 포함하는 형질전환 동물이 제공될 수 있다.
- [1942] 'PAM 2차 유전자 편집 세포'를 포함하는 형질전환 동물은 키메릭 동물이거나 상동성 동물일 수 있다.
- [1943] 상기 상동성 동물은 상기 'PAM 2차 유전자 편집 세포'만 가지고 있는 형질전환 동물을 의미할 수 있다.
- [1944] 상기 키메릭 동물은 상기 'PAM 2차 유전자 편집 세포'에 더하여, 상기 'PAM 비(非) 2차 유전자 편집 세포(non-

2nd gene editing cell)' 를 함께 가지고 있는 형질전환 동물을 의미할 수 있다.

- [1946] 이하에서는, 게놈에 삽입된 틀박스에 포함되어 있는 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드가 2차 유전자 편집된 게놈을 가지는 세포를 하나 이상 포함하는 형질전환 동물을 제작하는 방법에 대해 설명한다.
- [1948] **3-3-2-2. PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스에서 2차 유전자 편집된 형질전환 동물 제작 방법**
- [1949] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 의한 'PAM 2차 유전자 편집 세포'를 포함하는 동물을 생산하는 일 방법은, 전술한 방법에 의해 생산된 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드에서 2차 유전자 편집된 게놈을 가지는 수정란 또는 배아를 대리모의 자궁에 이식하는 것을 포함할 수 있다.
- [1950] 예를 들어, 전술한 바와 같이 '2차 유전자 편집을 위한 요소'의 미세주입(MI)에 의해 생산된 수정란 및/또는 배아를 대리모의 자궁에 착상시켜 'PAM 2차 유전자 편집 세포' 를 포함하는 동물을 생산할 수 있다. 이 경우, 생산된 동물은 키메라 이거나 상동성 일 수 있다.
- [1951] 다른 예를 들어, 전술한 바와 같이 'PAM 2차 유전자 편집 세포'를 이용한 체세포 핵이식(SCNT)에 의해 생산된 수정란 및/또는 배아를 대리모의 자궁에 착상시켜 'PAM 2차 유전자 편집 세포' 를 포함하는 동물을 생산할 수 있다. 이 경우, 생산된 동물은 상동성 일 수 있다.
- [1953] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 의한 'PAM 2차 유전자 편집 세포'를 포함하는 동물을 생산하는 일 방법은, PAM 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드가 삽입된 게놈을 가지는 동물의 조직에 전술한 '2차 유전자 편집을 위한 요소'를 주사하는 것을 포함할 수 있다. 조직에 주사하는 방법을 통해 생산된 동물은 키메라 동물일 수 있다.
- [1955] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 의한 'PAM 2차 유전자 편집 세포'를 포함하는 동물을 생산하는 일 방법은, 상기 'PAM 2차 유전자 편집 세포' 를 포함하는 정소를 가지는 수컷 또는 상기 'PAM 2차 유전자 편집 세포' 를 포함하는 난소를 가지는 암컷을 자연 교배시키는 것을 포함할 수 있다.
- [1956] 예를 들어, 상기 'PAM 2차 유전자 편집 세포' 를 포함하는 정소를 가지는 수컷과 상기 'PAM 2차 유전자 편집 세포' 를 포함하는 난소를 가지는 암컷을 자연교배 시킬 수 있다.
- [1957] 다른 예를 들어, 상기 'PAM 2차 유전자 편집 세포' 를 포함하는 정소를 가지는 수컷과 야생형 암컷을 자연교배 시키거나, 상기 'PAM 2차 유전자 편집 세포' 를 포함하는 난소를 가지는 암컷과 야생형 수컷을 자연교배 시킬 수 있다.
- [1959] **4. 2차 유전자 편집된 게놈을 가지는 세포를 포함하는 형질 전환 동물의 이용 태양**
- [1960] 이하에서는 전술한 '2차 유전자 편집 세포' 및/또는 'PAM 2차 유전자 편집 세포'를 하나 이상 포함하는 형질 전환 동물을 이용할 수 있는 태양에 대하여 설명한다.
- [1961] 상기 '2차 유전자 편집'은 전술한 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용한 유전자 편집, 발현 조절 요소를 포함하지 않는 틀박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제를 이용한 유전자 편집, 발현 조절 요소를 포함하는 틀박스로부터 발현된 인위적 뉴클레아제를 이용한 유전자 편집 및 PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 틀박스에서의 유전자 편집 중 어느 하나 이상 일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [1963] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 형질 전환 동물을 이용하는 일 태양은, 바이오리액터, 품종개량 동물, 질병 저항성 동물, 질환 모델 동물로 활용하는 것을 포함할 수 있다.
- [1964] 예를 들어, '2차 유전자 편집 세포' 및/또는 'PAM 2차 유전자 편집 세포'가 도너 폴리뉴클레오타이드가 게놈에 녹인 된 세포인 경우, 상기 형질 전환 동물은 바이오리액터로서 활용될 수 있다.
- [1965] 상기 형질 전환 동물이 대형 동물인 경우, 녹인 된 상기 도너 폴리뉴클레오타이드에 의해 발현될 수 있는 폴리펩타이드를 대량으로 수득할 수 있다.
- [1966] 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 인간 알부민을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 인간 인터류킨-2를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 인간 에리트로포이에틴을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 인간 인슐린을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 오메가3를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [1967] 상기 도너 폴리뉴클레오타이드는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 링커(linker)를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 형태일 수 있다. 이 경우, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 녹인 된 게놈을 가지는

는 세포에서는 상기 목적 단백질과 상기 링커가 포함된 융합 단백질(fusion protein)이 발현될 수 있다. 발현된 융합 단백질(fusion protein)에서 상기 링커를 절단하여 상기 목적 단백질을 얻을 수 있다. 링커에 대해서는 전문적인 바 있어 자세한 설명은 생략한다.

- [1968] 이하에서는, 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 링커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 도너 폴리뉴클레오타이드로 녹인된 게놈을 가지는 세포를 포함하는 형질 전환 동물로부터 목적 단백질을 생산하는 과정을 설명한다.
- [1969] 도 15는 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 링커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 도너 폴리뉴클레오타이드로 녹인되고, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 녹인된 세포를 포함하는 형질 전환 동물로부터 상기 목적 단백질이 생산되는 과정을 도시한다.
- [1970] 도 15의 (a)는 도너 폴리뉴클레오타이드(150)를 포함하는 벡터 및 동물의 게놈에 존재하는 프로모터(145) 및 타겟 사이트(142)를 도시한다.
- [1971] 도 15의 (b)는 도너 폴리뉴클레오타이드(150)가 타겟 사이트(142)에 녹인 된 형태를 나타낸다.
- [1972] 도 15의 (c)는 도너 폴리뉴클레오타이드(150)가 녹인된 게놈을 가지는 세포, 배아 또는 동물에서 발현된 융합 단백질(160)을 나타낸다.
- [1973] 도 15의 (d)는 융합 단백질(160)로부터 인슐린(148)이 수득된 형태를 나타낸다.
- [1974] 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(150)가 인간 인슐린을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(143)와 링커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(141)를 포함하는 경우로 상정하여 설명한다.
- [1975] 가이드 핵산 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 세포 내로 제공되면, 상기 가이드 핵산 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 상호작용에 의해 세포 내에서 복합체를 형성할 수 있으며, 상기 인위적 뉴클레아제 복합체에 의해 상기 가이드 핵산의 일부와 동일하거나 상보적인 서열을 갖는 폴리뉴클레오타이드(142)가 잘릴 수 있다. 상기 세포 내에 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(150)가 제공되는 경우, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(150)는 상기 폴리뉴클레오타이드(142)에 녹인될 수 있다(도 15의 (a) 참고). 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(150)가 녹인된 형태는 상기 폴리뉴클레오타이드가 잘린 제1 영역(142(a)) 및 제2 영역(142(b)) 사이에 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(150)가 포함된 형태이다.
- [1976] 가이드 핵산 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 세포 내로 제공하는 방법은 전문적인 바 있어, 자세한 설명은 생략한다.
- [1977] 전문적인 바에 의해, 도너 폴리뉴클레오타이드(150)가 녹인 된 게놈을 가지는 세포를 하나 이상 포함하는 동물로부터 융합 단백질(160)이 발현될 수 있다. 상기 융합 단백질(160)은 상기 폴리뉴클레오타이드 제1 영역(142(a))이 암호화하는 폴리펩타이드(144), 상기 링커(146) 및 상기 인간 인슐린(148)이 포함된 형태일 수 있다. 상기 동물로부터 상기 융합 단백질(160)이 수득 및 정제될 수 있고(도 15의 (c) 참고), 수득 및/또는 정제된 상기 융합 단백질(160)에 존재하는 링커(146)의 절단을 통해 상기 인간 인슐린(148)이 수득될 수 있다 (도 15의 (d) 참고).
- [1978] 전문적인 바와 같이, 인간 인슐린을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 링커를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 구성을 가지는 도너 폴리뉴클레오타이드를 이용하면, 동물의 체내에서는 인간 인슐린을 포함하는 융합 단백질이 발현될 수 있어, 인간 인슐린의 작은 크기로 인한 동물의 체내에서 저혈당 쇼크(shock)가 발생하지 않을 수 있다.
- [1980] 다른 예를 들어, '2차 유전자 편집 세포' 및/또는 'PAM 2차 유전자 편집 세포'가 엑소 폴리뉴클레오타이드 및/또는 엔도-폴리뉴클레오타이드가 녹아웃 게놈을 가지는 세포인 경우, 상기 형질전환 동물은 품종 개량 동물, 질병 저항성 동물 또는 질환 모델 동물로 활용될 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [1981] 상기 품종 개량 동물은 유청 단백질(whey protein)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 녹아웃 된 동물이거나 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입(insertion) 또는 녹인 된 동물일 수 있다.
- [1982] 구체적으로, 상기 품종 개량 동물은 유청 단백질(whey protein)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 녹아웃 된 동물일 수 있다. 상기 유청 단백질(whey protein)은 베타-락토글로불린(β -lactoglobulin), 알파-락토글로불린(α -lactoglobulin) 및 소 혈청 알부민(bovine serum albumin) 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 유청 단백질(whey protein)이 베타-락토글로불린(β -lactoglobulin) 경우, 상기 동물의 유즙(milk)에는 당업자에

게 알려지 유발 주요인자로 알려진 상기 베타-락토글로불린(β -lactoglobulin)이 포함되어 있지 않을 수 있다.

- [1983] 구체적으로, 상기 품종 개량 동물은 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입 또는 녹인 된 동물일 수 있다. 상기 목적 단백질은 인간 알부민을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 인간 인터튜킨-2를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 인간 에리트로포이에틴을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 인간 인슐린을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 오메가3를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [1984] 구체적으로, 상기 질병 저항성 동물은 전염병 저항성 동물 또는 광우병 방지 소일 수 있다. 상기 전염병은 트리파노소마병(Trypanosomiasis) 일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다. 상기 광우병 방지 소는 프리온 단백질(prion protein)을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 녹아아웃 된 계놈을 가진 세포를 포함하는 소일 수 있다.
- [1985] 구체적으로, 상기 질환 모델 동물은 종양 모델 동물일 수 있다. 상기 종양 모델 동물은 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene)가 녹아아웃 된 계놈을 가진 세포를 포함하는 동물 일 수 있다. 예를 들어, 상기 종양 억제 유전자(tumor suppressor gene)는 RB1 유전자(RB1 gene), p53 유전자(p53 gene), pVHL 유전자(pVHL gene), APC 유전자(APC gene), ST5 유전자(ST5 gene), YPEL3 유전자(YPEL3 gene), ST7 유전자(ST7 gene) 및 ST14 유전자(ST14 gene)일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [1987] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 '2차 유전자 편집 세포' 및/또는 'PAM 2차 유전자 편집 세포'를 하나 이상 포함하는 형질 전환 동물을 이용하는 일 태양은, 상기 형질 전환 동물로부터 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 생식세포 또는 수정란(및/또는 배아)을 얻는 것을 포함할 수 있다. 이 경우, 상기 생식세포는 정자 또는 난자일 수 있다.
- [1988] 상기 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 생식세포를 야생형(WT) 또는 상기 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 다른 생식세포와 수정시켜 상기 '2차 유전자 편집 세포' 및/또는 'PAM 2차 유전자 편집 세포'를 포함하는 자손을 생산할 수 있다.
- [1989] 상기 2차 유전자 편집된 계놈을 가지는 수정란(및/또는 배아)가 대리모의 자궁에 착상되는 경우, 상기 '2차 유전자 편집 세포'를 포함하는 개체 및/또는 자손을 생산할 수 있다.
- [1991] **[툴박스를 이용한 형질 전환 세포 선별]**
- [1992] **1. 형광 단백질 유전자를 포함하는 툭박스를 이용한 형질 전환 세포 선별**
- [1993] **1-1. 형광 단백질 유전자를 포함하는 툭박스가 삽입된 계놈의 구조**
- [1994] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 형광 단백질 유전자를 포함하는 툭박스 (이하, 형광 툭박스(fluorescent Toolbox))가 제공될 수 있다.
- [1995] 상기 형광 툭박스(fluorescent Toolbox)는 제1 ITR 서열과 제2 ITR서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 상기 형광 단백질 유전자가 포함된 구조일 수 있다.
- [1996] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 형광 툭박스(fluorescent Toolbox)가 삽입된 계놈을 포함하는 세포가 제공될 수 있다. 이때, 상기 세포에 삽입된 상기 형광 툭박스(fluorescent Toolbox)의 위치 및 개수는 다양할 수 있다. 상기 세포는 체세포, 생식세포 또는 줄기세포 일 수 있다.
- [1997] 또한, 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 형광 툭박스(fluorescent Toolbox)가 삽입된 계놈을 포함하는 수정란 및/또는 배아가 제공될 수 있다. 이때, 상기 수정란 및/또는 배아를 구성하는 세포들 중 적어도 하나에는 상기 형광 툭박스(fluorescent Toolbox)가 포함되어 있어야 하며, 상기 세포들 중 상기 형광 툭박스(fluorescent Toolbox)가 포함되어 있는 세포의 수는 제한되지 않는다.
- [1998] 상기 형광 툭박스가 삽입된 세포, 수정란 및/또는 배아의 제조방법은 전술한 툭박스가 삽입된 세포의 제조방법과 유사하기 때문에 자세한 설명은 생략한다.
- [1999] 상기 형광 툭박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포, 수정란 및/또는 배아에서는 세포 내 발현 메커니즘에 따라 상기 형광 단백질이 발현될 수 있다. 상기 형광 단백질의 발현에 의해 상기 세포로부터 형광이 발색될 수 있으며, 형광 발색에 따라 세포 외부로 형광 신호(fluorescence signal)가 제공될 수 있다.
- [2000] 세포 외부로 제공되는 상기 형광 신호(fluorescence signal)를 이용해, 상기 형광 툭박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포, 수정란 및/또는 배아가 상기 형광 툭박스가 삽입되지 않은 계놈을 가지는 세포, 배아 및/또는 수정란과 구별될 수 있다.

- [2001] 만약, 본 출원에 의해 제공되는 튜박스가 삽입된 세포를 제조하고, 튜박스가 삽입된 세포, 배아 및/또는 수정란이 정확하게 선별되어야 할 때, 전술한 바와 같은 형광 튜박스가 사용되면, 튜박스가 삽입된 세포, 수정란 및/또는 배아가 쉽게 선별될 수 있을 것이다.
- [2003] 또한, $n+1$ 개(n 은 1 이상의 자연수)의 형광 튜박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서는, n 개의 형광 튜박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 보다 더 많은 양의 형광 단백질이 발현될 수 있다. 즉, $n+1$ 개(n 은 1 이상의 자연수)의 형광 튜박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 제공되는 형광 신호가 n 개의 형광 튜박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 제공되는 형광 신호보다 클 수 있다.
- [2004] 이 경우, 보다 큰 형광 신호를 제공하는 세포를 선택함으로써, 상기 형광 튜박스가 삽입된 세포를 더욱 정확하게 선별할 수 있다.
- [2005] 나아가, 배아를 구성하는 전체 세포의 계놈에 포함된 형광 튜박스가 $n+1$ 개인 제1 배아의 경우, 배아를 구성하는 전체 세포의 계놈에 포함된 형광 튜박스가 n 개인 제2 배아에서 발현된 형광 단백질 보다 더 많은 양의 형광 단백질이 발현될 수 있다. 즉, 상기 제1 배아에서 제공되는 시각적 신호가 상기 제2 배아에서 제공되는 시각적 신호보다 클 수 있다.
- [2006] 이 경우, 보다 큰 형광 신호를 제공하는 제1 배아를 선택함으로써, 상기 형광 튜박스가 삽입된 배아를 더욱 정확하게 선별할 수 있다.
- [2007] 이하에서는, 이러한 형광 튜박스를 이용한 2차 유전자 편집 후, 상기 2차 유전자 편집이 정상적으로 이루어진 세포, 배아 및/또는 수정란을 선별하는 방법에 대해서 설명한다.
- [2009] **1-2. 형광 단백질 유전자를 포함하는 튜박스를 이용한 형질 전환 세포 선별**
- [2010] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 형광 튜박스를 이용한 2차 유전자 편집 후, 상기 2차 유전자 편집된 형질전환 세포, 수정란 및/또는 배아를 선별하는 방법이 제공될 수 있다. 상기 형광 튜박스를 이용한 2차 유전자 편집은 상기 형광 튜박스에 포함된 형광 단백질 유전자의 일 영역을 타겟 사이트로 하여 도너 폴리뉴클레오타이드를 넣은 시키는 것을 포함할 수 있다.
- [2012] 예를 들어, 한 개의 형광 튜박스가 삽입되어있는 계놈을 가지는 세포에서 상기 형광 단백질 유전자의 일 영역을 타겟 사이트로 하는 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다. 이 경우, 상기 세포에서 형광 단백질이 발현될 수 없다. 즉, 상기 2차 유전자 편집이 일어난 세포에서는 형광이 발색될 수 없으며, 이에 의해 상기 세포의 외부로 아무런 시각적 신호가 제공될 수 없다.
- [2013] 따라서, 세포의 외부로 제공되는 시각적 신호의 유무에 따라, 상기 2차 유전자 편집이 일어난 세포가 상기 2차 유전자 편집이 일어나지 않은 계놈을 가지는 세포와 구별될 수 있다.
- [2014] 다른 예를 들어, 제1 형광 튜박스 및 제2 형광 튜박스가 삽입되어있는 계놈을 가지는 세포에서 상기 제1 형광 튜박스에서만 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다. 이 경우, 2차 유전자 편집이 일어나지 않고 제1 형광 튜박스 및 제2 형광 튜박스가 삽입되어 있는 계놈을 가지는 세포와 비교했을 때, 상기 제1 형광 튜박스에서만 2차 유전자 편집이 일어난 세포(이하, 제1 세포)에서 발현되는 형광 단백질의 양이 적을 수 있다. 즉, 2차 유전자 편집이 일어나지 않은 세포와 비교할 때, 상기 제1 세포에서는 보다 적은 양의 형광이 발색될 수 있으며, 이에 의해 상기 제1 세포의 외부로 제공되는 시각적 신호가 보다 약할 수 있다.
- [2015] 따라서, 세포의 외부로 제공되는 시각적 신호의 강도(intensity)에 따라, 상기 2차 유전자 편집이 일어난 제1 세포가 상기 2차 유전자 편집이 일어나지 않은 계놈을 가지는 세포와 구별될 수 있다.
- [2016] 상기 형광 튜박스를 이용한 2차 유전자 편집 방법 및 메커니즘은 전술한 튜박스를 이용한 2차 유전자 편집 방법 및 메커니즘에 의해 설명될 수 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [2018] 전술한 유전자 편집된 세포를 선별하기 위한 방법은, 분리된 세포(isolated cell)뿐만 아니라 비분리된 세포(non-isolated cell), 수정란 및/또는 배아에서도 활용될 수 있다.
- [2019] 예를 들어, 배아를 구성하는 전체 세포의 계놈에 삽입된 형광 튜박스가 $n+2$ 개(n 은 1 이상의 자연수)인 배아의 경우, n 개의 형광 튜박스에서만 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다 (이하에서는 n 개의 형광 튜박스에서만 2차 유전자 편집이 일어난 배아를 제1 배아로 표현한다.).
- [2020] 2차 유전자 편집이 일어나지 않은 상태인 $n+2$ 개의 형광 튜박스가 삽입되어 있는 상기 배아와 비교했을 때, 상기

제1 배아에서 발견되는 형광 단백질의 양이 작을 수 있다. 즉, 2차 유전자 편집이 일어나지 않은 상기 배아와 비교할 때, 상기 제1 배아에서는 보다 적은 양의 형광이 발색될 수 있으며, 이에 의해 상기 제1 배아의 외부로 제공되는 시각적 신호가 약할 수 있다.

[2021] 따라서, 배아의 외부로 제공되는 시각적 신호의 강도에 따라, 상기 2차 유전자 편집이 일어난 제1 배아가 상기 2차 유전자 편집이 일어나지 않은 계놈을 가지는 배아로부터 구별될 수 있다.

[2022] 또 다른 예를 들어, 상기 $n+2$ 개의 형광 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 배아에서 $n+1$ 개의 형광 툴박스에서만 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다. 이하에서는 $n+1$ 개의 형광 툴박스에서만 2차 유전자 편집이 일어난 배아를 제 2 배아로 표현한다.

[2023] 전술한 제1 배아와 비교했을 때, 상기 제2 배아에서 발견되는 형광 단백질의 양은 보다 적을 수 있다. 즉, 제1 배아와 비교했을 때, 보다 더 많은 타겟 사이트 에서 2차 유전자 편집이 일어난 상기 제2 배아에서는 보다 적은 양의 형광이 발색될 수 있으며, 이에 의해 상기 제2 배아의 외부로 제공되는 시각적 신호가 약할 수 있다.

[2024] 이 경우, 보다 약한 형광 신호를 제공하는 제2 배아를 선택함으로써, 제2 유전자 편집이 일어난 배아를 더욱 정확하게 선별할 수 있다.

[2026] **2. 표면 단백질 유전자를 포함하는 툴박스를 이용한 형질 전환 세포 선별**

[2027] **2-1. 표면 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈의 구조**

[2028] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 표면 단백질 유전자를 포함하는 툴박스(이하, 표면 툴박스(surface Toolbox))가 제공될 수 있다.

[2029] 상기 표면 툴박스(surface Toolbox)는 제1 ITR 서열과 제2 ITR서열을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 사이에 상기 표면 단백질 유전자가 포함된 구조일 수 있다. 설명의 편의를 위해, 이하에서는 하나의 표면 툴박스에는 하나의 표면 단백질 유전자가 포함되어 있는 경우로 상정한다.

[2030] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 표면 툴박스가 삽입된 계놈을 포함하는 세포가 제공될 수 있다. 이때, 상기 세포는 체세포, 생식세포 또는 줄기세포 일 수 있다.

[2031] 또한, 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 표면 툴박스가 삽입된 계놈을 포함하는 수정란 및/또는 배아가 제공될 수 있다.

[2032] 상기 표면 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포, 수정란 및/또는 배아에서는 세포 내 발현 메커니즘에 따라 상기 표면 단백질이 발현될 수 있다. 이 경우 상기 세포, 수정란 및/또는 배아의 표면에 상기 표면 단백질이 나타날 수 있다.

[2033] 상기 표면 단백질과 상호작용할 수 있는 항체를 이용하여, 상기 표면 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포, 수정란 및/또는 배아가 상기 표면 툴박스가 삽입되지 않은 계놈을 가지는 세포, 배아 및/또는 수정란과 구별될 수 있다. 이 경우, 상기 항체는 마그네틱 입자(magnetic particle) 또는 형광단(fluorophore)과 상호작용을 할 수 있다.

[2034] 따라서, 자기적 성질(magnetic property) 또는 형광 신호(fluorescence signal)를 이용하여, 상기 표면 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포, 배아 및/또는 수정란이 표면 툴박스가 삽입되지 않은 계놈을 가지는 세포, 배아 및/또는 수정란으로부터 구별될 수 있다.

[2035] 만약, 본 출원에 의해 제공되는 툴박스가 삽입된 세포를 제조하고, 툴박스가 삽입된 세포, 배아 및/또는 수정란이 정확하게 선별되어야 할 때, 전술한 바와 같은 표면 툴박스가 사용되면, 상기 표면 단백질과 상호작용할 수 있는 항체를 이용해 툴박스가 삽입된 세포, 수정란 및/또는 배아가 쉽게 선별될 수 있을 것이다.

[2037] 도 16은 상기 표면 툴박스(320)가 삽입된 계놈을 가지는 세포를 선별하는 일 실시예를 도시한다. 설명의 편의를 위해, 상기 세포를 분리된 세포로 상정하여 설명한다.

[2038] 도 16의 (a)는 표면 툴박스가 삽입되지 않은 계놈(310)을 도시한다. 이러한 계놈(310)을 가지는 세포(311)의 표면에는 표면 단백질이 발현되지 않는다.

[2039] 도 16의 (b)는 표면 툴박스(320)가 삽입된 계놈의 일부를 도시한다. 상기 표면 툴박스(320)는 제1 ITR 서열(322)와 제2 ITR 서열(329) 사이에 상기 표면 단백질 유전자(325)가 포함된 구조일 수 있다. 이러한 계놈을 가

지는 세포(321)의 표면에는 표면 단백질 (323)이 발현될 수 있다.

- [2040] 도 16의 (c)는 표면 단백질이 발현되지 않은 세포와 표면 단백질이 발현된 세포 중 표면 단백질이 발현된 세포를 선별하기 위해 크로마토그래피를 이용하는 과정을 도시한다.
- [2041] 표면 틀박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포를 선별하기 위하여, 세포(311, 321)를 항체(324)를 포함하고 있는 크로마토그래피(chromatography)에 흘려주면, 상기 표면 틀박스(320)가 삽입된 계놈을 가지는 세포(321)는 항체(324)와 표면 단백질(323)간의 상호작용에 의해 크로마토그래피(chromatography)에 결합될 수 있다. 즉, 상기 표면 단백질(323) 및 항체(324)의 상호작용에 의해, 상기 크로마토그래피(chromatography)에 결합된 세포(321)가 선별(selection)될 수 있다 (도 16의 (c) 참고).
- [2043] 이하에서는, 표면 틀박스를 이용한 2차 유전자 편집 후, 상기 2차 유전자 편집이 정상적으로 이루어진 세포, 배아 및/또는 수정란을 선별하는 방법에 대해서 설명한다.
- [2045] **2-2. 표면 단백질 유전자를 포함하는 틀박스를 이용한 형질전환 세포 선별**
- [2046] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 표면 틀박스를 이용한 2차 유전자 편집 후, 상기 2차 유전자 편집된 형질전환 세포, 수정란 및/또는 배아를 선별하는 방법이 제공될 수 있다. 상기 표면 틀박스를 이용한 2차 유전자 편집은 상기 표면 틀박스에 포함된 표면 단백질 유전자에 도너 폴리뉴클레오타이드를 녹인 시키는 것을 포함할 수 있다. 전술한 바와 같이, 하나의 표면 틀박스에 하나의 표면 단백질 유전자가 포함되어 있는 경우로 상정하여 설명한다.
- [2048] 예를 들어, 하나의 표면 틀박스가 삽입되어있는 계놈을 가지는 세포에서 표면 단백질 유전자를 타겟으로 하는 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다.
- [2049] 이 경우, 상기 세포에서 표면 단백질이 발현될 수 없다. 즉, 상기 2차 유전자 편집이 일어난 세포의 표면에는 표면 단백질이 나타날 수 없으며, 이에 의해 상기 2차 유전자 편집이 일어난 세포는 상기 표면 단백질과 상호작용 할 수 있는 항체와 상호작용할 수 없다.
- [2050] 따라서, 상기 항체와 상기 세포의 상호작용 여부에 따라, 상기 2차 유전자 편집이 일어난 계놈을 가지는 세포가 상기 2차 유전자 편집이 일어나지 않은 계놈을 가지는 세포와 구별될 수 있다.
- [2051] 둘 이상의 표면 틀박스가 삽입되어있는 계놈을 가지는 세포의 경우에도, 전술한 바와 같이 상기 항체와 상기 세포의 상호작용 여부에 따라 상기 2차 유전자 편집이 일어난 계놈을 가지는 세포가 상기 2차 유전자 편집이 일어나지 않은 계놈을 가지는 세포와 구별될 수 있다.
- [2052] 이 경우, 계놈에 삽입되어 있는 모든 표면 틀박스에서 2차 유전자 편집된 세포가 선별될 수 있다.
- [2053] 상기 표면 틀박스를 이용한 2차 유전자 편집 방법 및 메커니즘은 전술한 틀박스를 이용한 2차 유전자 편집 방법 및 메커니즘에 의해 설명될 수 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [2055] 전술한 유전자 편집된 세포를 선별하기 위한 방법은, 분리된 세포(isolated cell)뿐만 아니라 비분리된 세포(non-isolated cell), 수정란 및/또는 배아에서도 활용될 수 있다.
- [2056] 예를 들어, 배아를 구성하는 전체 세포의 계놈에 삽입된 표면 틀박스가 n개(n은 2이상의 자연수) 이상인 경우, 상기 n개의 표면 틀박스 모두에서 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다. 이 경우, 상기 2차 유전자 편집이 일어난 배아에서는 표면 단백질이 발현될 수 없다. 즉, 상기 2차 유전자 편집이 일어난 배아의 표면에는 표면 단백질이 나타날 수 없으며, 이에 의해 상기 2차 유전자 편집이 일어난 배아는 상기 표면 단백질과 상호작용 할 수 있는 항체와 상호작용할 수 없다.
- [2057] 즉, 상기 항체와 상기 세포의 상호작용 여부에 따라, 상기 2차 유전자 편집이 일어난 배아가 상기 2차 유전자 편집이 일어나지 않은 배아와 구별될 수 있다. 이 경우, 선별된 배아는 상기 배아를 구성하는 전체 세포의 계놈에 삽입되어 있는 모든 표면 틀박스에서 2차 유전자 편집이 일어난 세포일 수 있다.
- [2059] 도 17은 표면 틀박스(320)가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집된 세포를 선별하는 일 실시예를 도시한다. 설명의 편의를 위해, 상기 세포는 분리된 세포로 상정하여 설명한다.
- [2060] 도 17의 (a)는 상기 표면 틀박스(320)가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집되지 않은 경우의 계놈 및 세포(321)를 도시한다.
- [2061] 도 17의 (b)는 상기 표면 틀박스(320)가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집된 경우의 계놈 및 세

포를 도시한다.

[2062] 상기 표면 툴박스(320)가 삽입된 계놈을 가지는 세포의 계놈에 삽입되어 있는 표면 툴박스에 도너 폴리뉴클레오타이드(232)가 녹인 되고, 상기 표면 단백질 유전자(325)가 제1 영역(325(a)) 및 제2 영역(325(b))로 나뉘어지는 경우, 상기 세포(331)의 표면에서는 표면 단백질(323)이 발현되지 않는다.

[2063] 도 17의 (c)는 표면 툴박스에 도너 폴리뉴클레오타이드(232)가 녹인 된 세포를 선별하기 위해 크로마토그래피를 이용하는 과정을 도시한다.

[2064] 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(232)가 녹인 된 세포(331) 및 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(232)가 녹인되지 않은 세포(321)를 항체(324)가 포함된 크로마토그래피에 흘려주면 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(232)가 녹인 된 세포(331)는 상기 크로마토그래피에 결합할 수 없다. 이러한 성질을 이용해, 상기 크로마토그래피에 결합되지 않은 세포(331)를 수득하여 2차 유전자 편집된 세포를 선별(selection)할 수 있다 (도 17의 (c) 참고).

[2066] **3. 자살 유전자를 포함하는 툴박스를 이용한 형질 전환 세포 선별**

[2067] **3-1. 자살 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈의 구조**

[2068] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 자살 유전자를 포함하는 툴박스(이하, 자살 툴박스(suicide Toolbox))가 제공될 수 있다.

[2069] 도 18의 (a)는 자살 툴박스의 일 실시예를 도시한다.

[2070] 도 18의 (a)를 참고하면, 자살 툴박스 (340)는 제1 ITR 서열(343) 및 제2 ITR 서열(349) 사이에 자살 유전자(347) 및 상기 자살 유전자의 발현을 조절할 수 있는 발현 조절 요소(345)가 포함된 구조일 수 있다.

[2071] 설명의 편의를 위해, 이하에서는 하나의 자살 툴박스에 하나의 자살 유전자가 포함되어 있는 경우로 상정하여 설명한다. 또한, 상기 발현 조절 요소(345)가 Tet-on 프로모터(Tet-on promoter) 이며, 상기 자살 유전자(347)는 티미딘 키나아제 유전자(thymidine kinase gene)인 경우로 상정하여 설명한다.

[2072] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 자살 툴박스(suicide Toolbox)가 삽입된 계놈을 포함하는 세포가 제공될 수 있다. 이 때, 상기 세포는 체세포, 생식세포 또는 줄기세포 일 수 있다.

[2073] 또한, 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 자살 툴박스가 삽입된 계놈을 포함하는 수정란 및/또는 배아가 제공될 수 있다.

[2075] 상기 자살 툴박스(340)가 삽입된 계놈을 가지는 세포(341), 수정란 및/또는 배아에 테트라사이클린(tetracycline)을 처리할 경우, 세포 내 발현 메커니즘에 따라 상기 세포, 수정란 및/또는 배아에서는 상기 티미딘 키나아제(thymidine kinase)가 발현될 수 있다.

[2076] 상기 티미딘 키나아제가 발현된 세포, 수정란 및/또는 배아에 프로드러그(prodrug)(예를 들어, 감시클로버(ganciclovior))를 제공할 경우, 상기 세포 및/또는 수정란과 배아의 일부 세포가 사멸될 수 있다. 상기 프로드러그는 티미딘 키나아제와 상호작용할 수 있고, 이로 인해 상기 티미딘 키나아제가 발현된 세포가 사멸될 수 있다.

[2077] 즉, 상기 자살 툴박스가 삽입되어 있는 계놈을 가지는 세포는 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건과 프로드러그의 처리에 의해 사멸될 수 있다.

[2078] 이하에서는, 자살 툴박스를 이용한 2차 유전자 편집 후, 상기 2차 유전자 편집이 정상적으로 이루어진 세포, 배아 및/또는 수정란을 선별하는 방법에 대해서 설명한다.

[2080] **3-2. 자살 유전자를 포함하는 툴박스를 이용한 형질전환 세포 선별**

[2081] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 자살 툴박스를 이용한 2차 유전자 편집 후, 상기 2차 유전자 편집된 형질전환 세포, 수정란 및/또는 배아를 선별하는 방법이 제공될 수 있다. 상기 자살 툴박스를 이용한 2차 유전자 편집은 상기 자살 툴박스에 포함된 자살 유전자에 도너 폴리뉴클레오타이드를 녹인 시키는 것을 포함할 수 있다. 전술한 바와 같이, 하나의 자살 툴박스에는 하나의 자살 유전자가 포함되어 있는 경우로 상정하여 설명한다.

[2082] 하나의 자살 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 자살 유전자의 일 부분을 타겟 사이트로 하여 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다. 이 때, 자살 유전자의 일 부분을 타겟 사이트로 하여 유전자 편집이 일어난 세포에 프

로드러그를 제공하더라도, 상기 세포는 사멸되지 않는다.

- [2083] 따라서, 상기 세포에 테트라사이클린 및 프로드러그를 처리한 후 상기 세포의 사멸 여부에 따라, 상기 2차 유전자 편집이 일어난 계놈을 가지는 세포가 상기 2차 유전자 편집이 일어나지 않은 계놈을 가지는 세포와 구별될 수 있다.
- [2084] 즉, 상기 테트라사이클린 및 프로드러그의 처리에도 생존하고 있는 세포는 상기 2차 유전자 편집이 일어난 계놈을 가지는 세포일 수 있다.
- [2086] 둘 이상의 자살 툴박스가 삽입되어있는 계놈을 가지는 세포의 경우에도, 전술한 바와 같이 상기 세포의 사멸 여부에 따라 상기 2차 유전자 편집이 일어난 계놈을 가지는 세포가 상기 2차 유전자 편집이 일어나지 않은 계놈을 가지는 세포와 구별될 수 있다. 이 경우, 선별된 세포는 계놈에 삽입되어 있는 모든 자살 툴박스에서 2차 유전자 편집이 일어난 세포일 수 있다.
- [2087] 이하에서는, 도 18을 참고하여, 자살 툴박스에 포함된 자살 유전자에 도너 폴리뉴클레오타이드가 핵인되거나 핵인 되지 않았을 경우의 세포 사멸 여부에 대해 보다 구체적으로 설명한다.
- [2088] 도 18은 상기 자살 툴박스 (340)가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 2차 유전자 편집된 세포를 선별하는 일 실시예를 도시한다. 설명의 편의를 위해, 상기 세포를 분리된 세포(isolated cell)로 상정하여 설명한다.
- [2089] 상기 세포의 계놈에 삽입되어 있는 자살 툴박스 (340)에 도너 폴리뉴클레오타이드(232)가 핵인 되는 경우, 상기 자살 유전자 (347)는 제1 영역(347(a))과 제2 영역(347(b))으로 나뉘어질 수 있다. 이 때, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드(232)가 핵인 된 세포(351)에 테트라사이클린을 처리하여 Tet-on 프로모터(345)가 작동하더라도, 상기 세포에서 티미딘 키나아제가 발현될 수 없다. 이 경우, 상기 세포에 프로드러그가 제공되더라도 상기 세포 (351)는 사멸되지 않는다 (도 18의 (b) 참고).
- [2090] 반면, 상기 세포의 계놈에 삽입되어 있는 자살 툴박스(340)에 도너 폴리뉴클레오타이드가 핵인 되지 않은 경우, 상기 세포에 테트라사이클린을 처리하면 Tet-on 프로모터(345)가 작동할 수 있다. 상기 Tet-on 프로모터(345)의 작동에 의해 자살 유전자(347)의 전사 및/또는 번역이 일어나 티미딘 키나아제가 발현될 수 있다. 상기 티미딘 키나아제가 발현된 세포에 프로드러그가 제공되면 상기 세포는 사멸될 수 있다.
- [2091] 이 경우, 사멸되지 않은 세포(351)를 얻을 수 있으며, 이 경우 2차 유전자 편집된 세포가 선별 될 수 있다 (도 18의 (a) 참고).
- [2094] 전술한 유전자 편집된 세포를 선별하기 위한 방법은, 분리된 세포뿐만 아니라 비분리된 세포, 수정란 및/또는 배아에서도 적용될 수 있다.
- [2095] 예를 들어, 배아를 구성하는 전체 세포의 계놈에 삽입된 자살 툴박스가 n개(n은 2이상의 자연수) 이상인 경우, 상기 n개의 자살 툴박스 모두에서 2차 유전자 편집이 일어날 수 있다. 이 경우, 상기 배아에 테트라사이클린이 제공되더라도, 전술한 바와 같은 2차 유전자 편집이 일어난 배아에서는 티미딘 키나아제가 발현될 수 없다. 이 때, 상기 배아에 프로드러그가 제공되더라도, 상기 배아를 구성하는 세포는 사멸되지 않는다.
- [2096] 즉, 상기 배아를 구성하는 세포의 사멸 여부에 따라, 상기 2차 유전자 편집이 일어난 배아가 상기 2차 유전자 편집이 일어나지 않은 배아와 구별될 수 있다. 이 경우, 계놈에 삽입되어 있는 모든 표면 툴박스에서 2차 유전자 편집된 배아가 선별될 수 있다.
- [2098] **[툴박스를 이용한 성별 선택]**
- [2099] **1. SRY 유전자(SRY gene) 삽입 및/또는 SRY 유전자(SRY gene) 녹아웃에 의한 성별 선택**
- [2100] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 의한 성별 선택을 위한 일 방법은, 계놈에 SRY 유전자(SRY gene)를 삽입하거나 계놈으로부터 SRY 유전자(SRY gene)를 녹아웃 시키는 것을 포함할 수 있다.
- [2101] 이하에서는, 계놈에 SRY 유전자(SRY gene)가 삽입 된 수컷 개체 및 상기 수컷 개체를 생산하는 방법을 설명한다. 또한, 계놈으로부터 SRY 유전자(SRY gene)가 녹아웃 된 암컷 개체 및 상기 암컷 개체를 생산하는 방법에 대해 설명한다.
- [2103] **1-1. SRY 유전자 삽입에 의한 수컷 개체 생산**
- [2104] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, SRY 유전자가 삽입된 XX 염색체를 가지는 수컷 동물이 제공될 수

있다.

- [2105] 예를 들어, 상기 SRY 유전자가 엔도-폴리뉴클레오타이드에 삽입된 계놈을 가지는 수컷 동물이 제공될 수 있다.
- [2106] 다른 예를 들어, 상기 SRY 유전자가 엑소-폴리뉴클레오타이드에 삽입된 계놈을 가지는 수컷 동물이 제공될 수 있다. 상기 엑소-폴리뉴클레오타이드는 툴박스 내부에 존재하는 경우이거나, 툴박스 외부에 존재하는 경우일 수 있다.
- [2107] 상기 SRY 유전자는 다양한 메커니즘을 통해 계놈 상에 삽입될 수 있다.
- [2108] 예를 들어, 상기 SRY 유전자는 툴박스의 구성 요소로서 계놈에 삽입될 수 있다. 상기 SRY 유전자가 툴박스의 구성요소로서 세포, 수정란(및/또는 배아) 및/또는 조직의 계놈에 삽입되기 위한 방법은, 전술한 툴박스의 삽입 방법에 의해 충분히 설명되는바, 구체적인 설명은 생략한다.
- [2109] 다른 예를 들어, 상기 SRY 유전자는 계놈에 삽입되어 있던 인위적 뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드로부터 발현된 인위적 뉴클레아제 복합체에 의해 계놈에 억인 될 수 있다.
- [2110] 상기 인위적 뉴클레아제 복합체에 의해 상기 SRY 유전자가 세포, 수정란(및/또는 배아) 및/또는 조직의 계놈에 삽입되기 위한 일 방법은, 상기 SRY 유전자를 포함하는 도너 폴리뉴클레오타이드를 세포, 수정란(및/또는 배아) 및/또는 조직에 제공하는 것을 포함한다.
- [2111] 또 다른 예를 들어, 상기 SRY 유전자는 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)를 이용해 계놈에 삽입될 수 있다.
- [2112] 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)에 의해 상기 SRY 유전자가 세포, 수정란(및/또는 배아) 및 조직의 계놈에 삽입되기 위한 일 방법은, 상기 SRY 유전자, 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 및 위치특이적 리컴비나아제(SSR)를 상기 세포, 수정란(및/또는 배아) 및/또는 조직에 제공하는 것을 포함한다. 이 경우, 상기 위치특이적 리컴비나아제(SSR)는 상기 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)와 상호작용할 수 있다.
- [2113] 상기 툴박스, 트랜스포사아제, 도너 폴리뉴클레오타이드, 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 및 위치특이적 리컴비나아제(SSR) 등을 상기 세포, 수정란(및/또는 배아) 및/또는 조직에 제공하는 방법은 전술한 바 있어, 구체적인 설명은 생략한다.
- [2115] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, SRY 유전자가 삽입된 XX 염색체를 가지는 수컷 동물을 생산하는 방법이 제공될 수 있다.
- [2116] 예를 들어, SRY 유전자가 삽입된 XX 염색체를 가지는 수컷 동물을 생산하는 일 방법은, SRY 유전자가 삽입된 X 염색체를 가지는 정자와 야생형 난자를 수정시키는 것을 포함할 수 있다.
- [2117] 상기 SRY 유전자가 삽입된 X 염색체를 가지는 정자는, 상기 SRY 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 생식 기관(또는 생식 조직)을 가지는 동물로부터 생산될 수 있다.
- [2118] 다른 예를 들어, SRY 유전자가 삽입된 XX 염색체를 가지는 수컷 동물을 생산하는 일 방법은, SRY 유전자가 삽입된 X 염색체를 가지는 난자와 야생형 정자를 수정시키는 것을 포함할 수 있다.
- [2119] 상기 SRY 유전자가 삽입된 X 염색체를 가지는 난자는, 상기 SRY 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 생식 기관(또는 생식 조직)을 가지는 동물로부터 생산될 수 있다.
- [2120] 또 다른 예를 들어, SRY 유전자가 삽입된 XX 염색체를 가지는 수컷 동물을 생산하는 일 방법은, SRY 유전자가 삽입된 XX 염색체를 가지는 수정란 및/또는 배아를 대리모의 자궁에 이식하는 것을 포함할 수 있다.
- [2121] 상기 SRY 유전자가 삽입된 XX 염색체를 가지는 수정란 및/또는 배아는, 전술한 체세포 핵이식(SCNT) 또는 미세주입(MI)에 의해 생산될 수 있다.
- [2122] 또 다른 예를 들어, SRY 유전자가 삽입된 XX 염색체를 가지는 수컷 동물을 생산하는 일 방법은, 전술한 SRY 툴박스(SRY Toolbox), 트랜스포사아제, 도너 폴리뉴클레오타이드, 리컴비나아제 인식 사이트(RRS) 및/또는 위치특이적 리컴비나아제(SSR)등을 동물의 생식 기관 또는 생식 조직에 주사하는 것을 포함할 수 있다.
- [2123] 전술한 방법에 의해 생산된 XX 염색체를 가지는 수컷 동물로부터 정자를 얻을 수 있다.
- [2125] **1-2. SRY 유전자 녀아웃에 의한 암컷 개체 생산**
- [2126] **1-2-1. SRY 유전자 녀아웃에 의한 암컷 개체 생산**

- [2127] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, SRY 유전자가 녹아웃 된 XY 염색체를 가지는 암컷 동물이 제공될 수 있다.
- [2128] 이하에서는, SRY 유전자 녹아웃을 위한 툴박스 및 SRY 유전자가 녹아웃 된 계놈을 가지는 동물의 생산 방법에 대해서 설명한다.
- [2130] **1-2-1-1. SRY 유전자 녹아웃을 위한 툴박스**
- [2131] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, Y 염색체상에 존재하는 SRY 유전자를 녹아웃 시키기 위한 툴박스(이하, SRY 녹아웃 툴박스(SRY knockout Toolbox))가 제공될 수 있다.
- [2132] 상기 SRY 녹아웃 툴박스(SRY knockout Toolbox)는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 인위적 뉴클레아제 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 구성일 수 있다. 상기 SRY 녹아웃 툴박스(SRY knockout Toolbox)에는 발현 조절 요소가 추가적으로 더 포함될 수 있다.
- [2133] 예를 들어, SRY 녹아웃 툴박스(SRY knockout Toolbox)는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 구성일 수 있다. 이 경우, 상기 가이드 핵산의 일부 서열은 SRY 유전자의 일부 서열과 동일하거나 상보적이다.
- [2134] 다른 예를 들어, SRY 녹아웃 툴박스(SRY knockout Toolbox)는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 구성일 수 있다. 또한, 상기 SRY 녹아웃 툴박스(SRY knockout Toolbox)는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역을 조절하는 발현 조절 요소가 더 포함된 구성일 수 있다. 이 경우, 상기 가이드 핵산의 일부 서열은 SRY 유전자의 일부 서열과 동일하거나 상보적이다.
- [2136] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 SRY 녹아웃 툴박스가 삽입된 계놈을 포함하는 세포가 제공될 수 있다. 상기 세포는 체세포, 생식세포 또는 줄기세포 일 수 있다.
- [2137] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 SRY 녹아웃 툴박스가 삽입된 계놈을 포함하는 수정란 및/또는 배아가 제공될 수 있다.
- [2138] 도 19의 (a)는 SRY 녹아웃 툴박스(360)가 삽입된 계놈의 일 실시예를 도시한다.
- [2139] 상기 SRY 녹아웃 툴박스(360)는 제1 ITR 서열(361) 및 제2 ITR 서열(367) 사이에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(363) 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(365)가 포함된 구성일 수 있다. 상기 가이드 핵산의 일부 서열은 SRY 유전자의 일부 서열과 동일하거나 상보적이다.
- [2140] 상기 SRY 녹아웃 툴박스(360)는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(363)의 전사 및/또는 번역을 조절 하기 위하여 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(362)를 포함할 수 있다. 설명의 편의를 위해 상기 유도 프로모터는 Tet-on 프로모터(Tet-on promoter)인 경우로 상정한다.
- [2141] 또한, 상기 SRY 녹아웃 툴박스(360)는 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(365)의 전사를 위한 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(364) 를 포함할 수 있다.
- [2143] 이하에서는, SRY 녹아웃 툴박스가 삽입된 계놈에서 SRY 유전자를 녹아웃하는 방법 및 SRY 유전자가 녹아웃된 계놈을 가지는 암컷 동물을 생산하는 방법을 설명한다.
- [2145] **1-2-1-2. 툴박스 이용한 SRY 유전자 녹아웃 및 SRY 유전자 녹아웃 된 계놈을 가지는 암컷 개체의 생산 방법**
- [2146] 이하에서는, 세포의 계놈에서 SRY 유전자를 녹아웃 하는 몇몇 방법을 제공한다. 설명의 편의를 위해 상기 세포를 분리된 세포(isolated cell)로 상정한다. 상기 세포의 계놈에 삽입된 SRY 툴박스의 구성에 따라서 SRY 유전자를 녹아웃 하기 위한 다양한 방법들이 제공될 수 있다.
- [2147] 예를 들어, SRY 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 SRY 녹아웃 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 SRY 유전자를 녹아웃 하기 위한 일 방법은, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 세포 내로 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [2148] 다른 예를 들어, 발현 조절 요소, RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 , SRY 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 SRY 녹아웃 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 SRY

유전자를 녹아웃 하기 위한 일 방법은, 발현 조절 요소에 영향을 미치는 조건 및/또는 물질을 상기 세포 내로 제공하는 것을 포함할 수 있다.

- [2149] 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및/또는 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질을 세포 내로 제공하는 방법은 전술한 바 있어, 구체적인 설명은 생략한다.
- [2151] 도 19를 참고하여 보다 구체적으로 SRY 유전자가 녹아웃 되는 메커니즘을 구체적으로 설명한다.
- [2152] 도 19의 (b)는 SRY 녹아웃 툴박스(360)가 삽입된 계놈에서 SRY 유전자(400)가 녹아웃 된 계놈의 형태를 도시한다.
- [2154] 상기 SRY 녹아웃 툴박스(360)가 포함된 계놈을 가지는 세포에서는, 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(364)에 의해 상기 가이드 핵산이 세포 내에서 발현될 수 있으며, 발현된 가이드 핵산은 상기 세포의 계놈에 존재하는 내재성(endogenous) 유전자인 SRY 유전자(400)에 상보적으로 결합할 수 있다.
- [2155] 상기 SRY 녹아웃 툴박스(360)가 삽입된 계놈을 가지는 세포에 테트라사이클린이 제공 되는 경우, 상기 Tet-on 프로모터(362)가 작동할 수 있으며, 이 경우 세포 내에서 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제가 발현될 수 있다. 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 핵산과 복합체를 이루면서, 상기 SRY 유전자(400)를 자를 수 있다.
- [2156] 즉, 수컷의 계놈에서 SRY 유전자(400)가 녹아웃 될 수 있다. 이 경우, 상기 SRY 유전자(400)는 제1 영역(400(a)) 및 제2 영역(400(b))으로 나뉘어 질 수 있다.
- [2158] 본 출원에서는 SRY 유전자가 녹아웃 된 계놈을 가지는 암컷 동물을 생산하는 방법을 제공한다.
- [2159] 예를 들어, SRY 유전자가 녹아웃 된 계놈을 가지는 암컷 동물을 생산하는 일 방법은, SRY 유전자가 녹아웃 된 Y 염색체를 가지는 정자와 난자를 수정시키는 것을 포함할 수 있다.
- [2160] 상기 SRY 유전자가 녹아웃 된 Y 염색체를 가지는 정자는 상기 SRY 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 생식 기관(또는 조직)을 가지는 동물로부터 생산될 수 있다. 또한, 상기 난자는 야생형 정자일 수 있다.
- [2161] 다른 예를 들어, SRY 유전자가 녹아웃 된 계놈을 가지는 암컷 동물을 생산하는 일 방법은, SRY 유전자가 녹아웃 된 XY 염색체를 가지는 수정란 및/또는 배아를 대리모의 자궁에 이식하는 것을 포함할 수 있다.
- [2162] 상기 SRY 유전자가 녹아웃 된 XY 염색체를 가지는 수정란 및/또는 배아는, 전술한 체세포 핵이식(SCNT) 또는 미세주입(MI)에 의해 생산될 수 있다.
- [2163] 또 다른 예를 들어, SRY 유전자가 녹아웃 된 계놈을 가지는 암컷(female) 동물을 생산하는 일 방법은, 전술한 발현 조절 요소 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 동물의 생식 기관 또는 생식 조직에 주사하는 것을 포함할 수 있다.
- [2164] 전술한 방법들로부터 생산된 XY 염색체를 가지는 암컷 동물로부터 유즙이나 난자를 얻을 수 있다.
- [2166] **1-2-2. 운동성 손상 유전자(motility-damaging gene) 녹인에 의한 암컷 개체 생산**
- [2167] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 운동성 손상 유전자(motility-damaging gene)의 녹인을 통해 Y 염색체를 가지는 정자의 운동성이 손상될 수 있으며, 이 경우, 상대적으로 높은 확률로 XX 염색체를 가지는 암컷 동물이 제공될 수 있다.
- [2168] 이하에서는, 운동성 손상 유전자(motility-damaging gene)의 녹인을 위한 툴박스 및 운동성 손상 유전자(motility-damaging gene)가 녹인된 계놈을 가지는 정자의 생산 방법 등에 대해 설명한다.
- [2170] **1-2-2-1. 운동성 손상 유전자 녹인을 위한 툴박스**
- [2171] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, Y 염색체에만 존재할 수 있는 폴리뉴클레오타이드에 운동성 손상 유전자를 녹인 시키기 위해 사용될 수 있는 툴박스(이하, 'Y 염색체 타겟 툴박스(Y chromosome target Toolbox)')가 제공될 수 있다.
- [2172] 예를 들어, 상기 툴박스는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 구성일 수 있다. 이 경우, 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 Y 염색체에만 존재할 수 있는 폴리뉴클레오타이드의 일부와 동일하거나 상보적인 서열이다.

- [2173] 다른 예를 들어, 상기 툴박스는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 구성일 수 있다. 또한, 상기 툴박스는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 상기 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역을 조절하는 발현 조절 요소가 더 포함된 구성일 수 있다. 이 경우, 상기 가이드 핵산의 일부 서열은 Y 염색체에만 존재할 수 있는 폴리뉴클레오타이드의 일부 서열과 동일하거나 상보적이다.
- [2174] 전술한 예시들에 개시된 상기 Y 염색체에만 존재할 수 있는 폴리뉴클레오타이드는 SRY 유전자일 수 있다.
- [2175] 상기 운동성 손상 유전자를 녹인 시키기 위해 사용될 수 있는 툴박스는 전술한 SRY 녹아웃 툴박스(SRY knockout Toolbox)일 수 있다.
- [2177] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 'Y 염색체 타겟 툴박스(Y chromosome target Toolbox)'가 삽입된 계놈을 포함하는 세포가 제공될 수 있다. 상기 세포는 체세포, 생식세포 또는 줄기세포 일 수 있다.
- [2178] 또한, 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 'Y 염색체 타겟 툴박스(Y chromosome target Toolbox)'가 삽입된 계놈을 포함하는 수정란 및/또는 배아가 제공될 수 있다.
- [2180] **1-2-2-2. 툴박스를 이용한 운동성 손상 유전자의 녹인 및 운동성 손상 유전자가 녹인 된 정자의 생산방법**
- [2181] 이하에서는, 세포의 계놈에 운동성 손상 유전자를 녹인 하는 몇몇 방법을 제공한다. 설명의 편의를 위해 상기 세포를 분리된 세포(isolated cell)로 상정한다. 상기 세포의 계놈에 삽입된 'Y 염색체 타겟 툴박스(Y chromosome target Toolbox)'의 구성에 따라서 운동성 손상 유전자를 녹인 하기 위한 다양한 방법들이 제공될 수 있다.
- [2182] 예를 들어, 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 'Y 염색체 타겟 툴박스(Y chromosome target Toolbox)'가 삽입된 계놈을 가지는 세포의 계놈에 운동성 손상 유전자를 녹인 하기 위한 일 방법은, RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 운동성 손상 유전자를 세포 내로 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [2183] 다른 예를 들어, 발현 조절 요소, RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 'Y 염색체 타겟 툴박스(Y chromosome target Toolbox)'가 삽입된 계놈을 가지는 세포의 계놈에 운동성 손상 유전자를 녹인 하기 위한 일 방법은, 발현 조절 요소에 영향을 미치는 조건 및/또는 물질 및 운동성 손상 유전자를 상기 세포 내로 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [2184] 상기 운동성 손상 유전자를 상기 세포 내로 제공하는 것은 상기 운동성 손상 유전자를 포함하는 플라스미드 벡터를 상기 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다.
- [2185] 상기 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질, 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및/또는 운동성 손상 유전자가 상기 세포 내로 제공되는 경우, 세포 내에서 발현된 상기 가이드 핵산은 상기 세포의 계놈에 존재하는 Y 염색체에만 존재할 수 있는 폴리뉴클레오타이드에 상보적으로 결합할 수 있다. 또한, 세포의 발현 시스템에 의해 발현되거나 주입된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 가이드 핵산과 복합체를 이루며 상기 Y 염색체에만 존재할 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 자를 수 있다. 이 경우, 상기 Y 염색체에만 존재할 수 있는 폴리뉴클레오타이드에 상기 운동성 손상 유전자가 녹인 될 수 있다.
- [2187] 본 출원에서는 SRY 유전자에 운동성 손상 유전자가 녹인 된 Y 염색체를 가지는 정자를 생산하는 방법을 제공한다.
- [2188] 예를 들어, 상기 운동성 손상 유전자가 녹인 된 Y 염색체를 가지는 정자를 생산하는 일 방법은, 전술한 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질, RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및/또는 운동성 손상 유전자를 동물의 생식 기관 또는 생식 조직에 주사하는 것을 포함할 수 있다.
- [2189] 상기 운동성 손상 유전자가 녹인 된 Y 염색체를 가지는 수컷 동물의 생식 조직 또는 생식 기관에서는 상기 운동성 손상 유전자가 녹인 된 Y 염색체를 가지는 정자가 생성될 수 있다.
- [2190] 다른 예를 들어, 상기 운동성 손상 유전자가 녹인 된 Y 염색체를 가지는 정자를 생산하는 일 방법은, 전술한 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질, RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및/또는 운동성 손상 유전자를 정자에 직접 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [2191] 전술한 방법들에 의해 얻어진 운동성 손상 유전자가 녹인된 Y 염색체를 가지는 정자는 운동성이 떨어질 수

있고, 이로 인해 상기 정자는 X 염색체를 가지는 정자에 비해 난자와의 수정이 상대적으로 어려워 질 수 있다.

- [2192] 이 경우, XY 염색체를 가지는 수정란 및/또는 배아가 생산될 확률보다, 더 높은 확률로 XX 염색체를 갖는 수정란 및/또는 배아가 생산될 수 있으며, 결과적으로 XX 염색체를 갖는 암컷 개체가 생산될 수 있다.
- [2194] **2. X 염색체 및 Y 염색체에 형광 단백질 유전자 녹인에 의한 성별 선택**
- [2195] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 의한 성별 선택을 위한 일 방법은, 한 개체의 X 염색체 및 Y 염색체에 특이적으로 존재하는 유전자에 인접한 사이트에 각각 다른 종류의 형광 단백질 유전자를 녹인 시키는 것을 포함할 수 있다.
- [2196] 이하에서는, 상기 X 염색체 및 Y 염색체에 특이적으로 존재하는 유전자에 인접한 사이트에 형광 단백질 유전자를 녹인 시키기 위해 사용되는 툴박스의 구성 및 상기 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포에서 상기 툴박스의 작동 메커니즘을 설명한다.
- [2198] **2-1. X 염색체 및 Y 염색체에 형광 단백질 유전자 녹인을 위한 툴박스**
- [2199] 본 출원에서 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 동물의 X 염색체에 특이적으로 존재하는 유전자에 인접한 제1 타겟 사이트 및 Y 염색체에 특이적으로 존재하는 유전자에 인접한 제2 타겟 사이트에 각각 다른 형광 단백질 유전자를 녹인 시키기 위한 툴박스 (이하, XY 염색체 구분 툴박스(XY Chromosome Classification Toolbox))가 제공된다.
- [2200] 설명의 편의를 위해, 이하에서는 상기 X 염색체에 특이적으로 존재하는 유전자를 DAX 유전자(DAX gene)로, 상기 Y 염색체에 특이적으로 존재하는 유전자를 SRY 유전자로 상정한다.
- [2201] 예를 들어, 상기 XY 염색체 구분 툴박스는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함될 수 있다. 상기 제1 가이드 핵산은 상기 제1 타겟 사이트의 일부와 동일하거나 상보적인 서열을 포함하며, 상기 제2 가이드 핵산은 상기 제2 타겟 사이트의 일부와 동일하거나 상보적인 서열을 포함한다.
- [2202] 상기 제1 타겟 사이트는 DAX 유전자(DAX gene)에 인접한 폴리뉴클레오타이드이며, 상기 제2 타겟 사이트는 SRY 유전자에 인접한 폴리뉴클레오타이드이다.
- [2203] 다른 예를 들어, 상기 XY 염색체 구분 툴박스는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함될 수 있다. 이 경우, 상기 툴박스는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현을 조절하는 발현 조절 요소를 포함할 수 있다.
- [2204] 상기 제1 가이드 핵산은 상기 제1 타겟 사이트의 일부와 동일하거나 상보적인 서열을 포함하며, 상기 제2 가이드 핵산은 상기 제2 타겟 사이트의 일부와 동일하거나 상보적인 서열을 포함한다.
- [2206] 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 XY 염색체 구분 툴박스(XY Chromosome Classification Toolbox)가 삽입된 계놈을 포함하는 세포가 제공될 수 있다. 상기 세포는 체세포, 생식세포 또는 줄기세포일 수 있다.
- [2207] 또한, 본 출원에 의해 제공되는 몇몇 실시예에 따르면, 상기 XY 염색체 구분 툴박스(XY Chromosome Classification Toolbox)가 삽입된 계놈을 포함하는 수정란 및/또는 배아가 제공될 수 있다.
- [2209] 도 20의 (a)는 동물의 계놈 상에 상기 XY 염색체 구분 툴박스(XY Chromosome Classification Toolbox)가 삽입된 형태를 도시한다.
- [2210] 도 20의 (b)는 상기 XY 염색체 구분 툴박스(XY Chromosome Classification Toolbox)가 삽입된 계놈에 존재하는 내재성 유전자인 DAX 유전자(DAX gene)(421) 및 SRY 유전자(431)와, 상기 DAX 유전자에 인접한 타겟 사이트(420) 및 상기 SRY 유전자에 인접한 타겟 사이트(430)를 도시한다.
- [2212] 상기 XY 염색체 구분 툴박스(370)는 제1 ITR 서열 (371) 및 제2 ITR 서열 (379) 사이에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(373), 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(375) 및 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(377)를 포함 할 수 있다.
- [2213] 상기 툴박스(370)는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현을 조절하는 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(372)를 포함한다. 설명의 편의를 위해, 상기 유도 프로모터를 Tet-on 프로모터로 상정하여 설명한다.

또한, 상기 툴박스(370)는 상기 제1 가이드 핵산의 발현을 조절하는 프로모터(374)와 상기 제2 가이드 핵산의 발현을 조절하는 프로모터(376)를 더 포함할 수 있다.

- [2214] 상기 제1 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(375)는 DAX 유전자(DAX gene)(421)에 인접한 제1 타겟 사이트(420)의 일부와 동일하거나 상보적인 서열을 포함하며, 상기 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(377)는 SRY 유전자(431)에 인접한 제2 타겟 사이트(430)의 일부와 동일하거나 상보적인 서열을 포함한다.
- [2215] 이하에서는, 상기 XY 염색체 구분 툴박스가 삽입된 게놈에서 DAX 유전자(DAX gene)에 인접한 제1 타겟 사이트에 제1 형광 단백질 유전자를 녹인 시키고 SRY 유전자에 인접한 제2 타겟 사이트에 제2 형광 단백질 유전자를 녹인 시키는 방법 및 개체의 성별을 선택하는 방법에 대하여 설명한다.
- [2217] **2-2. X 염색체 및 Y 염색체에 형광 단백질 유전자 녹인 방법 및 성별 선택 방법**
- [2218] 제1 가이드 핵산 및 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서 형광 단백질 유전자를 녹인 하기 위한 일 방법은, RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 제1 형광 단백질 유전자 및 제2 형광 단백질 유전자를 세포 내로 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [2219] 발현 조절 요소, RNA-가이드 엔도뉴클레아제, 제1 가이드 핵산 및 제2 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함된 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포에서 형광 단백질 유전자를 녹인 하기 위한 일 방법은, 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건, 제1 형광 단백질 유전자 및 제2 형광 단백질 유전자를 세포 내로 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [2220] 이 경우, 상기 제1 형광 단백질 유전자의 5' 말단 및 3' 말단은 상기 제1 타겟 사이트의 일부와 동일한 서열을 포함할 수 있으며, 상기 제2 형광 단백질 유전자의 5' 말단 및 3' 말단은 상기 제2 타겟 사이트의 일부와 동일한 서열을 포함할 수 있다.
- [2221] 상기 제1 형광 단백질 유전자 및 제2 형광 단백질 유전자를 상기 세포 내로 도입하는 것은, 상기 제1 형광 단백질 유전자 및 제2 형광 단백질 유전자를 포함하는 비-바이러스성 벡터(예를 들어, 플라스미드 벡터) 또는 바이러스성 벡터를 상기 세포 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다.
- [2223] 이하에서는, 도 20을 참고하여 보다 구체적으로 세포의 게놈에 존재하는 제1 타겟 사이트에 상기 제1 형광 단백질 유전자가 녹인 되고, 상기 제2 타겟 사이트에 상기 제2 형광 단백질 유전자가 녹인 되는 메커니즘을 설명한다.
- [2224] 도 20의 (c)는 상기 제1 타겟 사이트(420)에 상기 제1 형광 단백질 유전자(423)가 녹인되고 상기 제2 타겟 사이트(430)에 상기 제2 형광 단백질 유전자(433)가 녹인 된 게놈의 형태 및 녹인에 의한 형광 발현 과정을 도시한다.
- [2225] 상기 XY 염색체 구분 툴박스(370)에 포함된 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(374)에 의해 상기 제1 가이드 핵산이 상기 XY 염색체 구분 툴박스(370)가 삽입된 게놈을 가지는 세포 내에서 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 제1 가이드 핵산은 상기 제1 타겟 사이트(420)에 특이적으로 결합할 수 있다. 또한, 상기 테트라사이클린(tetracycline)의 처리에 의해 Tet-on 프로모터가 작동하여 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 제1 타겟 사이트(420)를 자를 수 있고, 상기 제1 타겟 사이트(420)에 상기 제1 형광 단백질 유전자(423)가 녹인 될 수 있다. 이 때, 상기 제1 타겟 사이트(420)는 제1 영역(420(a)) 및 제2 영역(420(b))으로 나뉘어질 수 있다.
- [2226] 또한, 상기 XY 염색체 구분 툴박스(370)에 포함된 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(376)에 의해 상기 제2 가이드 핵산이 상기 세포 내에서 발현될 수 있으며, 상기 제2 가이드 핵산은 상기 제2 타겟 사이트(430)에 상보적으로 결합할 수 있다. 또한, 상기 테트라사이클린의 처리에 의해 Tet-on 프로모터가 작동하여 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 상기 제2 타겟 사이트(430)를 자를 수 있고, 상기 제2 타겟 사이트(430)에 상기 제2 형광 단백질 유전자(433)가 녹인 될 수 있다. 이 때, 상기 제1 타겟 사이트(430)는 제1 영역(430(a)) 및 제2 영역(430(b))으로 나뉘어질 수 있다.
- [2228] 이하에서는, 전술한 바와 같이 제1 형광 단백질 유전자 및 제2 형광 단백질 유전자의 녹인을 통한 배아 및/또는 개체의 성별을 선택하는 방법을 설명한다.
- [2229] 예를 들어, 제1 형광 단백질 유전자 및 제2 형광 단백질 유전자의 녹인에 의해 성별 선택하는 일 방법은, 전술

한 틀박스가 녹인된 게놈을 가지는 수컷의 생식 조직 및/또는 생식 기관에 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건, RNA-가이드 엔도뉴클레아제, 제1 형광 단백질 유전자 및/또는 제2 형광 단백질 유전자를 주사하는 것을 포함할 수 있다 (도 20 참고).

- [2230] 상기 수컷 생식 조직 및/또는 생식 기관에 상기 제1 형광 단백질 유전자(423) 및/또는 제2 형광 단백질 유전자(433)가 녹인 되는 경우, 상기 수컷으로부터 상기 제1 형광 단백질 유전자(423)가 녹인된 X 염색체를 가지는 제1 정자(520) 및/또는 상기 제2 형광 단백질 유전자(433)가 녹인된 Y 염색체를 가지는 제2 정자(530)가 생산될 수 있다.
- [2231] 상기 제1 정자(520)와 야생형 난자(500)가 수정되는 경우, 제1 형광 단백질 유전자가 녹인된 게놈을 가지는 제1 배아(521)가 생산될 수 있다. 상기 제1 배아(521)에서는 제1 형광 단백질이 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 제1 형광 단백질의 발현에 의해, 상기 제1 배아로부터 제1 형광(523)이 발색될 수 있으며, 형광 발색에 따라 세포 외부로 형광 신호가 제공될 수 있다.
- [2232] 상기 제2 정자(530)와 야생형 난자(500)가 수정되는 경우, 제2 형광 단백질 유전자가 녹인된 게놈을 가지는 제2 배아(531)가 생산될 수 있다. 상기 제2 배아(531)에서는 제2 형광 단백질이 발현될 수 있다. 이 경우, 상기 제2 형광 단백질의 발현에 의해, 상기 제2 배아로부터 제2 형광(533)이 발색될 수 있으며, 형광 발색에 따라 세포 외부로 형광 신호가 제공될 수 있다.
- [2233] 즉, 상기 제1 형광 단백질 유전자가 녹인된 게놈을 가지는 제1 배아와 상기 제2 형광 단백질 유전자가 녹인된 게놈을 가지는 제2 배아로부터 서로 다른 형광 신호가 제공될 수 있으며, 이로 인해, XX 염색체를 가지는 배아(521)와 XY 염색체를 가지는 배아(531)가 구별될 수 있다.
- [2235] 다른 예를 들어, 제1 형광 단백질 유전자 및 제2 형광 단백질 유전자의 녹인에 의해 성별 선택하는 일 방법은, 전술한 틀박스가 녹인된 게놈을 가지는 생식세포의 수정 시 발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질 및/또는 조건, RNA-가이드 엔도뉴클레아제, 제1 형광 단백질 유전자 및/또는 제2 형광 단백질 유전자를 수정란에 미세주입(MI)하는 것을 포함할 수 있다.
- [2236] 이 경우, 상기 제1 형광 단백질 유전자(423) 또는 상기 제2 형광 단백질 유전자 (433)가 녹인 된 배아가 생산될 수 있다.
- [2237] 전술한 바와 같이, 상기 제1 형광 단백질 유전자가 녹인된 게놈을 가지는 배아와 상기 제2 형광 단백질 유전자가 녹인된 게놈을 가지는 배아에서 서로 다른 형광 단백질이 발현 될 수 있다. 이 경우, 형광 신호를 이용해, XX 염색체를 가지는 배아와 XY 염색체를 가지는 배아가 구별될 수 있다.
- [2239] 상기 방법들에 의해 선별된 배아를 대리모의 자궁에 이식하면 원하는 성별의 개체가 생산될 수 있다.
- [2240] 전술한 방법을 이용하면, 비교적 초기 단계의 배아에서 형광 단백질이 발현될 수 있어 보다 빠르게 배아의 선별이 가능하며, 빠르게 선별된 배아가 보다 안전하게 대리모의 자궁에 착상될 수 있다는 장점이 있다.
- [2242] **[틀박스 제거 시스템(excision system)]**
- [2243] **1. 틀박스 제거 시스템(excision system)의 구성**
- [2244] 본 출원에 의한 몇몇 실시예는 제거 틀박스(excision Toolbox)를 제공할 수 있다. 상기 제거 틀박스(excision Toolbox)는 '틀박스 제거를 위한 구성요소'를 포함한다. 상기 '틀박스 제거를 위한 구성요소'는 틀박스가 삽입되어 있는 게놈으로부터 상기 틀박스를 제거시킬 수 있는 요소를 발현 시킬 수 있는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 구성을 의미한다.
- [2245] 상기 제거 틀박스(excision Toolbox)는 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 설명의 편의를 위해, 상기 제거 틀박스(excision Toolbox)에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되어 있는 것으로 상정하여 설명한다.
- [2246] 이하에서는, 다양한 종류의 제거 틀박스(excision Toolbox)의 구성, 상기 제거 틀박스(excision Toolbox) 제작 방법 및 상기 다양한 종류의 제거 틀박스(excision Toolbox)가 특정 조건에서 게놈으로부터 제거되는 메커니즘을 보다 구체적으로 개시한다.
- [2248] **1-1. 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 특정 조건에서 발현될 수 있는 구성을 가지는 틀박스가 삽입된 게놈의 구조**

- [2249] 본 출원에 의한 몇몇 실시예에 따르면, 유도 프로모터 및/또는 조직 특이적 프로모터에 의해 트랜스포사아제의 발현이 조절되는 제거 툴박스가 제공될 수 있다. 상기 제거 툴박스는 위치-특이적 재조합에 의한 삽입 또는 제거에 의한 것일 수 있다.
- [2251] 이하에서는, 위치-특이적 재조합에 의한 삽입에 의해 제거 툴박스를 생산하는 경우, 제거 툴박스의 구성 및 생산 방법에 대해 설명한다.
- [2252] 예를 들어, 제거 툴박스(excision Toolbox)는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 5'에서 3' 방향으로 포함된 구성일 수 있다.
- [2253] 다른 예를 들어, 제거 툴박스는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 조직 특이적 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 5'에서 3' 방향으로 포함된 구성일 수 있다.
- [2254] 또 다른 예를 들어, 제거 툴박스는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 제1 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 조직 특이적 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 제2 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 5'에서 3' 방향으로 포함된 구성일 수 있다.
- [2255] 도 21은 유도 프로모터 및 조직 특이적 프로모터에 의해 트랜스포사아제의 발현이 조절될 수 있는 제거 툴박스의 일 실시예를 도시한다.
- [2256] 제거 툴박스(700(b))는 제1 ITR 서열(701) 및 제2 ITR 서열(705) 사이에, 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소(700(c))가 포함된 구성일 수 있다. 또한, 상기 제거 툴박스(700(b))에는 하나 이상의 리컴비나아제 인식 사이트가 더 포함될 수 있다.
- [2257] 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소(700(c))에는 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(707), 제1 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(704), 조직 특이적 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(709) 및 제2 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(706)가 포함될 수 있다. 이 경우, 상기 제1 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(704) 및 상기 제2 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(706)는 동일한 서열일 수 있다. 상기 제1 트랜스포사아제 및 제2 트랜스포사아제는 상기 제1 ITR 서열(701) 및 제2 ITR 서열(705)와 상호작용 할 수 있다.
- [2259] 이하에서는, 상기 제거 툴박스(excision Toolbox)(700(b))를 제작하는 방법을 설명한다.
- [2260] 상기 제거 툴박스(700(b))를 제작하는 일 방법은, 툴박스(700(a))가 삽입된 계놈을 가지는 세포에 리컴비나아제를 제공하는 것과 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소(700(c))를 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [2261] 상기 리컴비나아제는 상기 툴박스(700(a))에 포함된 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)(703) 및 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소(700(c))에 포함된 리컴비나아제 인식 사이트(702)와 상호작용 할 수 있으며, 상기 리컴비나아제를 제공하는 방법은 전술한 바 있어, 구체적인 설명은 생략한다.
- [2262] 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소(700(c))를 세포 내에 제공하는 방법은 다양할 수 있다. 예를 들어, 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소를 포함하는 플라스미드 벡터를 상기 세포 내로 도입하는 것에 의해 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소가 세포 내에 제공될 수 있다.
- [2263] 전술한 바에 따라, 상기 세포 내로 제공된 리컴비나아제는 상기 툴박스(700(a))에 포함된 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)(703) 및 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소에 포함된 리컴비나아제 인식 사이트(702)와 상호작용 할 수 있으며, 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소는 상기 툴박스(700(a))의 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)(703) 위치에 삽입될 수 있다. 이를 통해, 특정 조건에서 트랜스포사아제가 발현될 수 있는 제거 툴박스(700(b))가 제작될 수 있다.
- [2265] 이하에서는, 위치-특이적 재조합에 의한 종결 코돈의 제거에 의해 생산된 제거 툴박스의 구성 및 생산 방법에 대해 설명한다.
- [2266] 예를 들어, 제거 툴박스는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 리컴비나아제 인식 사이트, 및 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 5'에서 3' 방향으로 포

함된 구성일 수 있다.

- [2267] 다른 예를 들어, 제거 틀박스는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 조직 특이적 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 리컴비나아제 인식 사이트, 및 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 5'에서 3' 방향으로 포함된 구성일 수 있다
- [2268] 또 다른 예를 들어, 제거 틀박스는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 리컴비나아제 인식 사이트, 제1 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 조직 특이적 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 리컴비나아제 인식 사이트, 및 제2 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 5'에서 3' 방향으로 포함된 구성일 수 있다
- [2270] 도 22는 유도 프로모터 및 조직 특이적 프로모터에 의해 트랜스포사아제의 발현이 조절될 수 있는 제거 틀박스의 다른 실시예를 도시한다.
- [2271] 상기 제거 틀박스(800(b))는 제1 ITR 서열(801) 및 제2 ITR 서열(808) 사이에, 틀박스 제거를 위한 구성요소가 포함된 구성일 수 있다.
- [2272] 상기 틀박스 제거를 위한 구성요소에는 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(802), 제1 리컴비나아제 인식 사이트 (803(b)), 제1 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(804), 조직 특이적 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(805), 제2 리컴비나아제 인식 사이트 (806(b)), 및 제2 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(807)가 포함될 수 있다. 상기 제1 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(804) 및 상기 제2 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(807)는 동일한 서열일 수 있다. 상기 제1 트랜스포사아제 및 제2 트랜스포사아제는 상기 제1 ITR 서열(801) 및 제2 ITR 서열(808)와 상호작용 할 수 있다.
- [2273] 또한, 상기 제1 리컴비나아제 인식 사이트 (803(b)) 및 제2 리컴비나아제 인식 사이트 (806(b))는 동일한 서열일 수 있다.
- [2275] 이하에서는, 상기 제거 틀박스(800(b))를 제작하는 방법을 설명한다.
- [2276] 상기 제거 틀박스(800(b))를 제작하는 일 방법은, 틀박스(800(a))가 삽입된 계층을 가지는 세포에 리컴비나아제를 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [2277] 상기 세포 내로 제공된 리컴비나아제는 상기 틀박스(800(a))에 포함된 제1 RSR (803(a)) 및 제2 RSR (806(a))을 구성하는 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)와 상호작용 할 수 있다. 상기 제1 RSR(803(a)) 및 제2 RSR(806(a))은 동일한 서열일 수 있다.
- [2278] 전술한 바에 따라, 상기 세포 내로 제공된 리컴비나아제가 상기 제1 RSR(803(a)) 및 제2 RSR (806(a))를 구성하는 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)와 상호작용하면, 종결 코돈이 제거될 수 있다.
- [2279] 이를 통해, 특정 조건에서 트랜스포사아제가 발현될 수 있는 제거 틀박스(800(b))가 생산될 수 있다.
- [2281] **1-2. 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 특정 조건에서 발현될 수 있는 구성을 가지는 틀박스가 삽입된 계층의 구조**
- [2282] 본 출원에 의한 몇몇 실시예에 따르면, 유도 프로모터 및/또는 조직 특이적 프로모터에 의해 리컴비나아제의 발현이 조절되는 제거 틀박스가 제공될 수 있다.
- [2283] 예를 들어, 제거 틀박스는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 구성 발현 프로모터 및 RSR 및 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 5'방향에서 3' 방향으로 포함된 구성일 수 있다.
- [2284] 다른 예를 들어, 제거 틀박스는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 조직 특이적 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 구성 발현 프로모터, RSR 및 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 5'방향에서 3' 방향으로 포함된 구성일 수 있다.
- [2285] 또 다른 예를 들어, 제거 틀박스는 제1 ITR 서열 및 제2 ITR 서열 사이에 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 구성 발현 프로모터 및 RSR 및 제1 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 조직 특이적 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 구성 발현 프로모터, RSR 및 제2 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타

이드가 5' 방향에서 3' 방향으로 포함된 구성일 수 있다.

- [2287] 도 23은 유도 프로모터 및 조직 특이적 프로모터에 의해 리컴비나아제의 발현이 조절될 수 있는 제거 툴박스의 일 실시예를 도시한다.
- [2288] 상기 제거 툴박스(900(b))는 제1 ITR 서열(901) 및 제2 ITR 서열(906) 사이에, 툴박스 제거를 위한 구성요소가 포함된 구성일 수 있다.
- [2289] 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소에는 유도 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(908), 제1 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(909), 조직 특이적 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(910), 제2 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(911), 프로모터를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(903), RSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(904) 및 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(905)가 포함될 수 있다. 또한, 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소에는 하나 이상의 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)가 더 포함될 수 있다.
- [2290] 상기 제1 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(909) 및 상기 제2 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(911)는 동일한 서열을 갖는다. 상기 제1 리컴비나아제 및 상기 제2 리컴비나아제는 RSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(904)를 구성하는 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)와 상호작용할 수 있다.
- [2292] 이하에서는 상기 제거 툴박스(900(b))를 제작하는 방법을 설명한다.
- [2293] 상기 제거 툴박스(900(b))를 제작하는 일 방법은, 툴박스(900(a))가 삽입된 계놈을 가지는 세포에 제3 리컴비나아제 및 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소(900(c))를 제공하는 것을 포함할 수 있다.
- [2294] 상기 제3 리컴비나아제 및 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소(900(c))를 세포 내로 제공하는 방법은 전술한 바 있어, 구체적인 설명은 생략한다.
- [2295] 세포 내로 제공된 상기 제3 리컴비나아제는 상기 툴박스(900(a))에 포함된 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)(902) 및 세포 내로 제공된 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소(900(c))에 포함된 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)(907)와 상호작용할 수 있다.
- [2296] 상기 상호작용에 의해, 상기 툴박스 제거를 위한 구성요소(900(c))는 상기 툴박스(900(a))의 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)(902) 위치에 삽입될 수 있다. 이를 통해, 특정 조건에서 트랜스포사아제가 발현될 수 있는 제거 툴박스(900(b))가 제작될 수 있다.
- [2298] **2. 제거 툴박스를 이용한 제거 메커니즘**
- [2299] 이하에서는, 본 출원에 의해 제공되는 제거 툴박스(excision Toolbox)가 특정 조건에서 제거되는 메커니즘을 설명한다.
- [2300] 또한, 본 출원에 의해 제공되는 제거 툴박스로부터 발현되는 물질 의해, 계놈에 억인된 도너 폴리뉴클레오타이드가 상기 계놈으로부터 제거되는 메커니즘을 설명한다.
- [2302] **2-1. 제거 툴박스의 제거 메커니즘**
- [2303] **2-1-1. 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 특정 조건에서 발현될 수 있는 구성을 가지는 제거 툴박스의 제거 메커니즘**
- [2304] 본 출원에서는 전술한 유도 프로모터 및 조직 특이적 프로모터에 의해 트랜스포사아제의 발현이 조절되는 제거 툴박스의 제거 메커니즘을 설명한다.
- [2305] 설명의 편의를 위해, 상기 유도 프로모터는 세포 복제 단계에서 나타날 수 있는 저온 조건에서 작동할 수 있는 프로모터이고, 상기 조직 특이적 프로모터는 생식 조직에서 활성화되는 프로모터인 경우로 상정하여 설명한다. 상기 생식 조직은 정소 또는 난소일 수 있다.
- [2307] 이하에서는, 도 21을 참고하여, 세포 복제 단계에서 제거 툴박스(700(b))가 세포의 계놈으로부터 제거되는 메커니즘을 설명한다. 설명의 편의를 위해, 상기 세포는 분리된 세포(isolated cell)로 상정한다.
- [2308] 세포 복제 단계에서, 전술한 제거 툴박스(700(b))가 삽입된 계놈을 가지는 세포에 저온 조건이 가해질 수 있다. 상기 저온 조건에서 상기 유도 프로모터(707)가 작동할 수 있으며, 상기 유도 프로모터(707)의 작동에 의해 상기 세포에서 제1 트랜스포사아제가 발현될 수 있다.

- [2309] 상기 제1 트랜스포사아제가 상기 세포 내에서 발현되면, 상기 제1 트랜스포사아제는 세포의 게놈에 존재하는 1 ITR 서열(701) 및 제2 ITR 서열(705)와 상호작용할 수 있다. 이 경우, 상기 제거 툴박스(excision Toolbox)(700(b))가 상기 세포의 게놈으로부터 제거될 수 있다.
- [2310] 따라서, 상기 제거 툴박스(700(b))가 삽입된 게놈을 가지는 세포가 복제되는 단계에서, 상기 제거 툴박스(700(b))는 상기 세포의 게놈으로부터 제거될 수 있다. 이 경우, 상기 제거 툴박스(700(b))가 삽입된 게놈을 가지는 복제된 세포가 생산될 수 없다.
- [2311] 이어서, 생식 조직에서 제거 툴박스(700(b))가 게놈으로부터 제거되는 메커니즘을 설명한다.
- [2312] 전술한 제거 툴박스(700(b))가 삽입된 게놈을 가지는 생식 조직에서는 상기 조직 특이적 프로모터(709)가 작동할 수 있으며, 상기 조직 특이적 프로모터(709)의 작동에 의해 상기 생식 조직에서 제2 트랜스포사아제가 발현될 수 있다.
- [2313] 상기 제2 트랜스포사아제가 상기 생식 조직에서 발현되면, 상기 제2 트랜스포사아제는 상기 조직의 게놈에 존재하는 제1 ITR 서열(701) 및 제2 ITR 서열(705)와 상호작용할 수 있다. 이 경우, 상기 제거 툴박스(700(b))가 상기 생식 조직의 게놈으로부터 제거될 수 있다.
- [2314] 즉, 생식 조직의 게놈에서는 상기 제거 툴박스(700(b))가 제거될 수 있다. 따라서, 상기 제거 툴박스(700(b))가 삽입된 게놈을 가지는 세포 및/또는 동물로부터 상기 제거 툴박스(700(b))가 삽입된 게놈을 가지는 생식세포가 생산될 수 없다.
- [2316] 본 출원에서 제공되는 제거 툴박스(800(b))의 제거 메커니즘은 상기 제거 툴박스(700(b))와 실질적인 제거 메커니즘이 동일한 바, 자세한 설명은 생략한다.
- [2318] **2-1-2. 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 특정 조건에서 발현될 수 있는 구성을 가지는 제거 툴박스 제거 메커니즘**
- [2319] 본 출원에서는 전술한 유도 프로모터 및 조직 특이적 프로모터에 의해 리컴비나아제의 발현이 조절되는 제거 툴박스의 제거 메커니즘을 설명한다. 설명의 편의를 위해, 이하에서는 상기 유도 프로모터는 세포 복제 단계에서 나타날 수 있는 저온 조건에서 작동할 수 있는 프로모터이고, 상기 조직 특이적 프로모터는 생식 조직에서 작동할 수 있는 프로모터인 경우로 상정하여 설명한다.
- [2321] 이하에서는, 세포 복제 단계에서 제거 툴박스(900(b))가 게놈으로부터 제거되는 메커니즘을 설명한다.
- [2322] 세포 복제 단계에서, 전술한 제거 툴박스(900(b))가 삽입된 게놈을 가지는 세포에 저온 조건이 가해질 수 있다. 상기 저온 조건에서 상기 유도 프로모터(908)가 작동할 수 있으며, 상기 유도 프로모터(908)의 작동에 의해 상기 세포에서 제1 리컴비나아제가 발현될 수 있다.
- [2323] 상기 세포 내에서 발현된 제1 리컴비나아제는, 상기 제거 툴박스(900(b))에 존재하는 RSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(904)를 구성하는 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)와 상호작용할 수 있다. 이 경우, 상기 RSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(904)로부터 종결 코돈이 제거될 수 있고, 상기 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(905)의 전사 및/또는 번역이 일어날 수 있다. 즉, 상기 종결 코돈의 제거에 의해, 상기 세포 내에서 상기 트랜스포사아제가 발현될 수 있다.
- [2324] 발현된 상기 트랜스포사아제는 세포의 게놈에 존재하는 제1 ITR 서열(901) 및 제2 ITR 서열(906)와 상호작용할 수 있다. 이 경우, 상기 제거 툴박스(excision Toolbox)(900(b))가 상기 세포의 게놈으로부터 제거될 수 있다.
- [2325] 따라서, 상기 제거 툴박스(900(b))가 삽입된 게놈을 가지는 세포를 이용해 세포 복제를 시도하는 경우, 상기 제거 툴박스(900(b))는 상기 세포의 게놈으로부터 제거될 수 있다. 이 경우, 상기 제거 툴박스(900(b))가 삽입된 게놈을 가지는 복제된 세포가 생산될 수 없다.
- [2326] 이어서, 생식 조직에서 제거 툴박스(900(b))가 게놈으로부터 제거되는 메커니즘을 설명한다.
- [2327] 전술한 제거 툴박스(900(b))가 삽입된 게놈을 가지는 생식 조직에서는 상기 조직 특이적 프로모터(910)가 작동할 수 있으며, 상기 조직 특이적 프로모터(910)의 작동에 의해 상기 조직에서 제2 리컴비나아제가 발현될 수 있다.
- [2328] 상기 생식 조직에서 발현된 제2 리컴비나아제는, 상기 제거 툴박스(900(b))에 존재하는 RSR을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(904)를 구성하는 리컴비나아제 인식 사이트(RRS)와 상호작용할 수 있다. 이 경우, 상기 RSR을

암호화하는 폴리뉴클레오타이드(904)로부터 종결 코돈이 제거될 수 있다. 상기 종결 코돈의 제거에 의해, 상기 세포 내에서 상기 트랜스포사아제가 발현될 수 있다.

[2329] 발현된 상기 트랜스포사아제는 세포의 게놈에 존재하는 제1 ITR 서열(901) 및 제2 ITR 서열(906)와 상호작용할 수 있다. 이 경우, 상기 제거 툴박스(900(b))가 상기 생식 조직의 게놈으로부터 제거될 수 있다.

[2330] 즉, 생식 조직의 게놈에서는 상기 제거 툴박스(900(b))가 제거될 수 있다. 따라서, 상기 제거 툴박스(900(b))가 삽입된 게놈을 가지는 세포 및/또는 동물로부터 상기 제거 툴박스(700(b))가 삽입된 게놈을 가지는 생식세포가 생산될 수 없다.

[2332] **2-2. 유전자 편집된 부분의 제거 메커니즘**

[2333] 이하에서는, 제거 툴박스로부터 발현되는 트랜스포사아제에 의해, 게놈 상에 낙인된 도너 폴리뉴클레오타이드가 상기 게놈으로부터 제거되는 메커니즘을 설명한다.

[2334] 앞서 개시한 바에 따르면, 상기 제거 툴박스에는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되어 있다고 상정하였으며, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드의 낙인은 상기 제거 툴박스로부터 발현된 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 이용한 유전자 편집에 의한 것일 수 있다.

[2335] 특정 조건에서, 상기 제거 툴박스(excision Toolbox)로부터 트랜스포사아제가 발현되는 메커니즘은 전술한 바와 같이, 트랜스포사아제가 발현되는 메커니즘에 대한 구체적인 설명은 생략한다.

[2337] 유전자 편집에 의해 게놈에 낙인된 도너 폴리뉴클레오타이드는 제거 툴박스로부터 발현되는 트랜스포사아제에 의해 상기 게놈으로부터 제거될 수 있다.

[2338] 예를 들어, 도너 폴리뉴클레오타이드가 상기 제거 툴박스 내부에 낙인되어 있는 경우에는, 상기 제거 툴박스로부터 발현되는 트랜스포사아제에 의해 상기 제거 툴박스가 제거됨으로써 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 상기 게놈으로부터 제거될 수 있다.

[2339] 다른 예를 들어, 도너 폴리뉴클레오타이드가 상기 제거 툴박스가 아닌 다른 툴박스의 내부에 낙인되어 있는 경우에는, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드의 5' 및 3' 말단에 상기 제거 툴박스로부터 발현되는 트랜스포사아제와 상호작용할 수 있는 ITR 서열을 가지는 경우에 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 상기 게놈으로부터 제거될 수 있다.

[2340] 또 다른 예를 들어, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 툴박스가 아닌 엔도-폴리뉴클레오타이드에 낙인(knockin)되어 있는 경우에도, 상기 도너 폴리뉴클레오타이드의 5' 및 3' 말단에 상기 제거 툴박스로부터 발현되는 트랜스포사아제와 상호작용할 수 있는 ITR 서열을 가지는 경우에 상기 도너 폴리뉴클레오타이드가 상기 게놈으로부터 제거될 수 있다.

[2342] **3. 제거 툴박스의 활용**

[2343] 이하에서는, 툴박스의 구성을 제거 툴박스로 변경할 필요성이 있는 경우에 대해 설명한다. 즉, 제거 툴박스의 활용 태양에 대하여 설명한다.

[2344] 설명의 편의를 위해, 이하에서는 툴박스에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 포함되는 것으로 상정한다.

[2345] 상기 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포를 생산한 당업자가 제3자에게 상기 툴박스가 삽입된 게놈을 가지는 세포 및/또는 동물을 판매하는 경우, 당업자로부터 상기 세포 및/또는 동물을 구입한 제3자는 상기 세포 및/또는 동물로부터 발현된 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 획득할 수 있다. 이 경우, 제3자가 상기 세포 및/또는 동물로부터 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 획득하는 것은 정당한 이익으로 볼 수 있다.

[2346] 뿐만 아니라, 당업자가 상기 툴박스를 이용해 세포의 게놈에 도너 폴리뉴클레오타이드가 낙인된 게놈을 가지는 세포 및/또는 동물을 판매하는 경우, 상기 세포 및/또는 동물을 구입한 제3자는 상기 세포 및/또는 동물로부터 도너 RNA 및/또는 단백질을 획득할 수 있다. 상기 도너 RNA 및/또는 단백질은 상기 도너 폴리뉴클레오타이드의 전사 및/또는 번역에 의해 발현된 것이다. 이 경우, 제3자가 구입에 의한 상기 세포 및/또는 동물로부터 상기 도너 RNA 및/또는 단백질을 획득하는 것은 정당한 이익으로 볼 수 있다.

[2348] 상기 세포 및/또는 동물로부터 발현된 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제, 도너 RNA 및/또는 도너 단백질을 획득하는 것 외에도, 상기 세포 및/또는 동물을 구입한 제3자는 구입한 세포 및/또는 동물을 이용하여 부당하게 추

가적인 이익을 얻을 수 있다.

- [2349] 예를 들어, 상기 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포를 구입한 제3자가 부당하게 추가적인 이익을 얻을 수 있는 일 예는, 상기 세포를 복제하여 상기 툴박스 및/또는 도너 폴리뉴클레오타이드가 삽입된 계놈을 가지는 다수의 세포를 생산하거나 판매하는 것을 포함할 수 있다.
- [2350] 다른 예를 들어, 상기 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 생식세포를 구입한 제3자가 부당하게 추가적인 이익을 얻을 수 있는 일 예는, 상기 생식세포를 이용한 체외수정에 의해 상기 툴박스 및/또는 도너 폴리뉴클레오타이드가 삽입된 계놈을 가지는 개체를 생산하는 것을 포함할 수 있다.
- [2351] 또 다른 예를 들어, 상기 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 동물을 구입한 제3자가 부당하게 추가적인 이익을 얻을 수 있는 일 예는, 상기 동물을 이용하여 상기 툴박스 및/또는 도너 폴리뉴클레오타이드가 삽입된 계놈을 가지는 생식세포를 생산하거나 판매하는 것을 포함할 수 있다.
- [2352] 또 다른 예를 들어, 상기 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 동물을 구입한 제3자가 부당하게 추가적인 이익을 얻을 수 있는 일 예는, 상기 동물을 이용하여 상기 툴박스 및/또는 도너 폴리뉴클레오타이드가 삽입된 계놈을 가지는 자손을 생산하거나 판매하는 것을 포함할 수 있다.
- [2353] 전술한 바와 같이, 상기 세포 및/또는 동물을 구입한 제3자가 부당하게 추가적인 이익을 얻는 것을 방지 하기 위하여, 당업자는 상기 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입된 계놈을 가지는 세포 및/또는 동물을 제3자에게 판매할 때 상기 툴박스의 구성을 상기 제거 툴박스의 구성으로 변경한 후 판매할 수 있다.
- [2355] 이하에서는 상기 툴박스의 구성을 상기 제거 툴박스의 구성으로 변경한 경우의 메커니즘 및 효과를 설명한다.
- [2356] 설명의 편의를 위해, 이하에서는 상기 제거 툴박스의 제거 메커니즘 및 효과에 대해서만 설명하였으나, 이는 도너 폴리뉴클레오타이드에도 동일하게 적용될 수 있다.
- [2357] 당업자가 상기 제거 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포 및/또는 동물을 판매하는 경우, 상기 세포 및/또는 동물을 구입한 제3자가 전술한 바와 같이 부당하게 추가적인 이익을 얻으려 할 때 상기 세포 및/또는 동물 계놈으로부터 상기 제거 툴박스가 제거될 수 있다.
- [2358] 예를 들어, 상기 제거 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 세포를 구입한 제3자가 상기 세포를 복제하려 할 경우, 상기 제거 툴박스에 포함되어 있는 유도 프로모터가 작동하여 트랜스포사아제가 발현될 수 있고, 결과적으로 상기 세포의 계놈에서 제거 툴박스가 제거될 수 있다.
- [2359] 다른 예를 들어, 상기 제거 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 동물을 구입한 제3자가 상기 동물을 이용하여 생식세포를 생산하려는 경우, 상기 조직에서는 조직 특이적 프로모터의 활성화에 의하여 트랜스포사아제가 발현될 수 있고, 결과적으로 제거 툴박스가 제거된 생식세포가 생산 될 수 있다.
- [2360] 또 다른 예를 들어, 상기 제거 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 동물을 구입한 제3자가 상기 동물을 이용하여 자손을 생산하려는 경우, 생식 조직에서는 조직 특이적 프로모터의 활성화에 의하여 트랜스포사아제가 발현될 수 있고, 결과적으로 제거 툴박스가 제거된 자손이 생산 될 수 있다.
- [2361] 즉, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입된 계놈을 가지는 세포 및/또는 동물을 구입한 제3자가 부당하게 추가적인 이익을 얻는 것을 방지하기 위하여, 당업자는 상기 툴박스를 상기 제거 툴박의 구성으로 변경할 수 있다.
- [2363] 이하, 본 발명을 실험예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기의 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [2365] **[실험예 1] 체세포 핵 이식을 이용한 목적 단백질 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환 배아 제작**
- [2366] 본 발명자들은 소의 계놈에 목적 단백질 유전자(target protein gene)를 삽입하기 위하여 하기의 실험을 진행하였다.
- [2367] 상기 목적 단백질 유전자 삽입 여부를 시각적으로 확인하기 위하여, 본 발명자들은 상기 목적 단백질로 형광 단백질 유전자를 선택하여 실험을 진행하였고, 상기 형광 단백질 유전자가 포함된 툴박스를 제작하여, SCNT 방식으로 제작된 툴박스를 포함하는 소의 수정란을 만들었다.

[2369] 1. 목적 단백질 유전자를 포함하는 툴박스 벡터 제작

[2370] 녹색 형광 단백질 유전자 및 적색 형광 단백질 유전자가 포함된 툴박스를 포함하는 최종 발현 벡터를 제작하기 위하여 녹색 형광 단백질 및 적색 형광 단백질 유전자가 Gateway PCR cloning(MultiSite Gateway® ProPlus, Invitrogen, 12537100, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)을 이용해 증폭되었다.

[2371] 녹색 형광 단백질 유전자 및 적색 형광 단백질 유전자의 증폭을 위하여 사용된 PCR 프라이머는 하기 표 2에 개시된 바와 같다.

[2372] 본 명세서에서 서열 번호는 SEQ ID NO 로 표기한다.

표 2

프라이머 종류	SEQ Name	SEQ ID NO	서열
GFP-Forward	pr_GFP_F_1	SEQ ID NO:1	GgggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcACCAT GGCCAGCAAAGGAGAAGAAGCTT
GFP-Reverse	pr_GFP_R_1	SEQ ID NO:2	GgggaccactttgtacaagaaagctgggtcTTATTT GTAGAGCTCATCCATGCC
RFP-Forward	pr_RFP_F_1	SEQ ID NO:3	GgggacaagtttgtacaaaaaagcaggcttcACCAT GGATAGCACTGAGAACGTCAT
RFP-Reverse	pr_RFP_R_1	SEQ ID NO:4	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcCTACTG GAACAGGTGGTGGC

[2376] 본 발명자들은 증폭된 녹색 형광 단백질 유전자 및/또는 적색 형광 단백질 유전자를 이용하여 최종 발현 벡터 (final expression vector)를 제작하였다.

[2378] 도 24의 (a)는 녹색 형광 단백질을 발현 시키기 위한 최종 발현 벡터의 일부를 도시하며, 도 24의 (b)는 적색 형광 단백질을 발현 시키기 위한 최종 발현 벡터의 일부를 도시한다.

[2379] 상기 최종 발현 벡터를 제작하기 위한 Entry vector로 pDonor(Invitrogen)가 이용되었으며, Destination vector로 p-CCAGG 프로모터가 있는 PB-CA 및 Tet-on 프로모터가 있는 PB-TET 벡터가 이용되었다.

[2381] 하기의 표 3에 본 실험예에 이용된 피기백(piggybac, PB) 서열을 개시하였다.

표 3

트랜스포존 종류	SEQ Name	SEQ ID NO	서열
5' PB	tp_PB_1	SEQ ID NO:5	TTAACCCCTAGAAAGATAGTCTGCGTAAAATTGACGCATGCATTCTTGAATATT GCTCTCTCTTTCTAAATAGCGGAATCCGTCGCTGTGCATTTAGGACATCTCAG TCGCCGCTTGGAGCTCCCGTGAGGCGTGCTGTCAATGCGGTAAGTGTCAGTGA TTTTGAACTATAACGACCGGTGAGTCAAAATGACGCATGATTATCTTTTACGT GACTTTAAGATTTAACTCATACGATAATTATATTGTTATTTCATGTTCTACTT ACGTGATAACTTATATATATATATTTCTTGTATAGATATC
3' PB	tp_PB_2	SEQ ID NO:6	TTTGTTACTTTATAGAAGAAATTTTGAGTTTTTGTTTTTTTTTAATAAAATAAT AAACATAAATAAATTTGTTTGTGAATTTATTATTAGTATGTAAGTGTAATAATA ATAAACTTAATATCTATTTCAAATTAATAAATAAACCTCGATATACAGACCGAT AAAACACATGCGTCAATTTTACGCATGATTATCTTTAACGTACGTCACAATATG ATTATCTTCTAGGGTTAA

[2385] 2. 복제 배아 제작 (SCNT)

[2386] 2-1. 소의 세포 분리

[2387] 본 발명자들은 목적 단백질 유전자가 포함된 툴박스를 계놈에 삽입시키기 위하여, 소의 태아로부터 섬유아세포를 분리하였다.

[2388] 임신 45일째의 소의 태아 조직이 외과용 칼로 잘게 잘려졌고, 25 % (w/v) 트립신과 1mM EDTA (Invitrogen)가 첨가된 Dulbecco 's modified Eagle 's 배지 (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용해 37°C 조건에서 1시간 동안 해리되었다.

[2389] 트립신 처리 된 세포가 1,500rpm에서 2분간 원심 분리되었으며, Ca₂⁺ 및 Mg₂⁺가 없는 DPBS에서 1회 세척된 후,

100-mm 플라스틱 배양 접시에 시딩(seeding) 되었다.

[2390] 시딩(seeding)된 세포는 5% CO₂ 및 95% 공기의 가습 대기의 39 °C 조건에서, 10% (v/v) FBS, 1mM 글루타민, 25mM NaHCO₃, 1% (v/v) 최소 필수 배지(MEM)가 첨가된 DMEM 배지에서 6 내지 8일동안 배양되었다.

[2391] 시딩(seeding)된 세포 중 미부착(unattached) 세포 및 절편체 덩어리가 제거된 후, 부착 세포(attached cell)가 배양 접시에서 서로 융합성(confluent)을 가질 때 까지 배양 되었고, 0.1% 트립신 및 0.02% EDTA를 이용하여 5분간 트립신화(trypsinization)하여 4 내지 6일 간격으로 추가 배양되었다. 상기 배양된 세포는 추가적인 계대 배양을 위해 3개의 새로운 배양 접시에 할당되었고, 그다음 -196°C의 액체 질소에서 동결 배지에 저장되었다.

[2393] **2-2. 툴박스 벡터 트랜스펙션**

[2394] 본 발명자들은 상기 방법으로 저장해 놓은 세포를 해동시켜 3~4일간 배양한 후, 트립신을 이용하여 단일층으로부터 섬유아세포를 회수하였으며, 회수된 섬유아세포를 이용해 SCNT를 위한 공여 세포(donor cell)를 제작하였다.

[2396] 트랜스펙션(transfection)을 진행하기 약 18 내지 24시간 전에 회수된 섬유아세포가 6 웰(6 well) 플레이트(plate)에 분주되었다. 상기 세포가 약 50 내지 60% confluency를 이루었을 때, 공지된 제조사의 방법에 따라 상기 섬유아세포로 트랜스펙션이 진행되었다.

[2397] 녹색 형광 단백질 유전자가 포함된 플라스미드 벡터(PB-CA-GFP) 및 pCy43 벡터(Transposase expression vector, Sanger Institute, Hinxton, UK)가 상기 회수된 섬유아세포에 트랜스펙션된 후 녹색 형광 단백질이 발현되는 공여세포(이하, GFP 공여세포)가 제작되었다.

[2398] 또한, 적색 형광 단백질 유전자가 포함된 플라스미드 벡터(PB-TET-RFP) 및 pCy43 벡터(Transposase expression vector, Sanger Institute, Hinxton, UK)가 상기 회수된 섬유아세포에 트랜스펙션 된 후 적색 형광 단백질이 발현되는 공여세포(이하, RFP 공여세포)가 제작되었다.

[2399] 상기 pCy43 벡터는 PB-CA-GFP 또는 PB-TET-RFP의 전위(transpose)를 위해 이용되었다.

[2400] 전술한 방법에 의해 제작된 GFP 공여세포에서 녹색 형광 단백질의 발현이 확인되었다.

[2401] 도 25의 (a)는 상기 GFP 공여세포에서 녹색 형광 단백질의 발현을 나타낸다 (도 25의 (a) 참고, 왼쪽: 가시광선(visible light) 조건, 오른쪽: 형광(fluorescent light) 조건).

[2402] 또한, 전술한 방법에 의해 제작된 RFP 공여세포에 2 mg/ml, 독시사이클린(doxycycline)과 1 mg/ml 네오마이신(Neomycin)이 처리되었을 때 적색 형광 단백질의 발현이 확인되었으며, 독시사이클린(doxycycline)이 제거된 후 8 일째에 RFP의 발현이 사라진 것이 확인되었다.

[2403] 도 25의 (b)는 RFP 공여세포에 독시사이클린과 네오마이신이 처리되었을 때 적색 형광 단백질의 발현을 나타내며 (도 25의 (b) (b-1) 참고, 위: 가시광선(visible light) 조건, 아래: 형광(fluorescent light) 조건), 독시사이클린(doxycycline)이 제거된 후 8 일째에 RFP의 발현이 사라지는 것을 나타낸다 (도 25의 (b) (b-2) 참고, 위: 가시광선(visible light) 조건, 아래: 형광(fluorescent light) 조건).

[2404] 상기 결과에 의해, Tet-on 프로모터를 이용하는 경우 독시사이클린(doxycycline) 처리에 의해 적색 형광 단백질의 발현 시기가 조절될 수 있다는 것이 확인되었다.

[2405] 다시 말해, 발현 조절요소로서 유도 프로모터(e.g. Tet-on 프로모터)가 사용되는 경우, 유도 프로모터를 활성화시킬 수 있는 조건이나 물질(e.g. 독시사이클린)의 처리를 통해 유도 프로모터가 작동될 수 있으며, 상기 유도 프로모터의 작동에 의해 목적 단백질의 전사 및/또는 번역이 시간적으로 조절될 수 있다는 것이 확인되었다.

[2406] 전술한 형광 단백질 발현 여부의 확인을 통해, 목적 단백질 유전자가 삽입된 게놈을 가지는 공여세포가 선별되었고, 선별된 공여세포를 이용한 체세포 핵이식(SCNT)을 통해 형질전환 배아가 생산되었다.

[2407]

[2408] **2-3. 공여 세포를 이용한 복제 배아 제작(SCNT)**

[2409] 상기 방법에 의해 제작된 GFP 공여세포 또는 RFP 공여세포의 핵은 탈핵 난지(enucleated oocyte)로 전이(transfer)된 후 전기적으로 융합 되었고, 이오노마이신(ionomycin)에 의해 4분간 활성화 된 후 6-DMAP에서 4시

간 동안 배양되었다.

[2410] 전술한 전기적 융합에 의해 얻어진 녹색 형광 단백질을 발현할 수 있는 복제 배아(이하, GFP 복제 배아) 또는 적색 형광 단백질을 발현할 수 있는 복제 배아(이하, RFP 복제 배아)는 미네랄 오일(mineral oil)로 도포된 화학적으로 정의된 배지 (chemically defined medium)의 25 μ L microdrop, 39° C, 5% CO₂ 조건의 배양기 (incubator)에서 7~8일 동안 배양되었다. 상기 화학적으로 정의된 배지 (chemically defined medium)는 종래 알려진 방법에 따라 제조되었다.

[2412] **2-4. 목적 단백질 유전자를 포함하는 플라스미드 삽입 여부 확인**

[2413] **2-4-1. PCR, RT-PCR 결과**

[2414] 전술한 방법에 의해 생산된 소의 형질전환 배아(GFP 복제 배아 및 RFP 복제 배아)의 계놈에 녹색 형광 단백질 유전자 및 적색 형광 단백질 유전자가 삽입(integration)되었는지 여부와 mRNA 발현 여부를 검출하기 위하여 DNA PCR 및 RT-PCR (Eppendorf Vapo Protect Mastercycler, Eppendorf, Germany)이 수행되었다.

[2415] DNA PCR을 위해, DNA 추출 키트 (DNeasy Blood & Tissue kit 69506, Qiagen, Limburg, Netherlands)를 사용하여 형질전환 소의 혈액 또는 세포에서 계놈 DNA가 추출되었다.

[2416] RT-PCR을 위해, RNA 추출 키트 (Easy spin total RNA 추출 키트, Cat. 17221, iNtRON, 성남)를 사용하여 전체 RNA(total RNA)가 추출되었으며, cDNA를 합성하기 위해 cDNA 합성 키트 (RNA to cDNA EcoDry 제 Premix Kit, PT5153-2, Clontech, California, US)가 사용되었다. cDNA의 합성을 위해 1 μ g 의 전체 RNA (total RNA)가 사용되었다.

[2418] PCR을 수행하기 위해 사용된 프라이머는 하기 표 4와 같다.

표 4

프라이머 종류	SEQ Name	SEQ ID NO	서열
GFP-Forward	pr_GFP_F_2	SEQ ID NO:7	CACATGAAGCAGCAGCTT
GFP-Reverse	pr_GFP_R_2	SEQ ID NO:8	AGTTCACCTTGATGCCGTTTC
RFP-Forward	pr_RFP_F_2	SEQ ID NO:9	CCCCGTAATGCAGAAGAAGA
RFP-Reverse	pr_RFP_R_2	SEQ ID NO:10	GGTGATGTCCAGCTTGGAGT
GAPDH-Forward	pr_GAPDH_F_1	SEQ ID NO:11	GGCGTGAACCACGAGAAGTA
GAPDH-Reverse	pr_GAPDH_R_1	SEQ ID NO:12	CCCTCCACGATGCCAAAGT

[2421] 도 26은 상기 형질 전환 배아 (GFP 복제 배아 및 RFP 복제 배아)의 RT-PCR 및 DNA PCR 결과를 나타낸다 (A: 계놈 DNA를 주형으로 한 PCR 결과, B: cDNA를 주형으로 한 PCR 결과, C: RT-PCR을 통한 GAPDH mRNA 발현, M: 분자 마커, control: 형질 전환 되지 않은 배아).

[2423] **2-4-2. 배아에서 형광 단백질 발현 확인**

[2424] 상기 형질전환 배아(GFP 복제 배아 및 RFP 복제 배아)에서 mosaicism 없이 GFP 또는 RFP가 발현되는 것이 시각적으로 확인되었다.

[2425] 도 27의 (a)는 GFP 복제 배아에서 녹색 형광 단백질이 발현되는 것을 나타낸다 (왼쪽: 가시광선(visible light) 조건, 오른쪽: 형광(fluorescent light) 조건).

[2426] 도 27의 (b)는 7일째의 RFP 복제 배아에 독시사이클린(doxycycline)이 처리되고 2일 동안 더 배양된 결과를 나타낸다. 형질 전환된 배아에 독시사이클린이 처리된 경우 적색 형광 단백질의 발현이 확인되었고 (도 27의 (b)에서 점선(dashed line)의 오른쪽(right) 참고), 형질 전환 되지 않은 배아에 독시사이클린이 처리된 경우 적색 형광 단백질이 발현되지 않는 것이 확인되었다 (도 27의 (b)에서 점선(dashed line)의 왼쪽(left) 참고).

[2427] 본 실험을 통해, 형질전환을 위한 목적 단백질 유전자가 플라스미드에 포함되어 삽입된 계놈을 가지는 세포 및/또는 배아가 별다른 위험 없이 생존할 수 있다는 것이 확인되었다.

[2429] **[실험예 2] 미세주입을 이용한 목적 단백질 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환 소 제작**

[2430] 본 발명자들은 소의 계놈에 목적 단백질 유전자를 삽입하기 위하여 하기의 실험을 진행하였다.

- [2431] 전술한 바와 마찬가지로, 목적 단백질 유전자의 삽입 여부를 시각적으로 확인하기 위하여, 본 발명자들은 상기 목적 단백질로 형광 단백질 유전자를 선택하여 실험을 진행하였고, 상기 형광 단백질 유전자가 포함된 툴박스를 제작하여, 미세주입(MI) 방식으로 제작된 툴박스를 포함하는 소의 수정란을 만들었으며, 상기 수정란을 대리모의 자궁에 이식하여 상기 형광 단백질 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환 소를 만들었다.
- [2433] **1. 목적 단백질을 포함하는 툴박스 벡터 제작**
- [2434] 황색 형광 단백질, 녹색 형광 단백질 및 적색 형광 단백질 유전자가 포함된 툴박스를 포함하는 최종 발현 벡터를 제작하기 위해, 황색 형광 단백질 유전자, 녹색 형광 단백질 유전자 및 적색 형광 단백질 유전자가 Gateway PCR cloning(MultiSite Gateway® ProPlus, Invitrogen, 12537100, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에 의해 증폭되었다.
- [2435] 증폭을 위해 사용된 황색 형광 단백질, 녹색 형광 단백질 및 적색 형광 단백질을 위한 프라이머는 Addgene (<http://www.addgene.org>, Plasmid # 34879)에서 구입되었다.
- [2437] 증폭된 유전자를 이용하여, 황색 형광 단백질 유전자가 포함된 툴박스를 포함하는 최종발현 벡터(이하, YFP 벡터)가 제작되었다. 도 28의 (a)는 상기 YFP 벡터의 일부를 도시한다.
- [2438] 또한, β -casein promoter와 human Interleukin 2(hIL2) cDNA가 Gateway PCR cloning(MultiSite Gateway® ProPlus, Invitrogen, 12537100, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에 의해 증폭되었고, 이는 Infusion Cloning (In fusion HD cloning kit, lontech, 639644, California, US)에 의해 PB-GFP에 삽입되어 GFP 및 hIL2 유전자가 포함된 툴박스(5'PB- β -casein promoter-hIL2- pA-pCAG-GFP-pA-3'PB 구성)를 포함하는 최종 발현벡터(이하, GFP-hIL2 벡터)가 제작되었다. 도 28의 (b)는 상기 GFP-hIL2 벡터의 일부를 도시한다.
- [2439] 나아가, Rox-GFP-polyA-rox와 적색 형광 단백질 유전자가 Gateway PCR cloning (MultiSite Gateway® ProPlus, Invitrogen, 12537100, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에 의해 증폭되었고, 이를 이용해 Rox-GFP-polyA-rox와 녹색 형광단백질 유전자가 포함된 툴박스(5'PB-pCAG-rox-GFP-pA-rox-RFP-pA-3'PB 구성)를 포함하는 최종발현 벡터(이하 GFP-RFP 벡터)가 제작되었다. 도 28의 (c)는 상기 GFP-RFP 벡터의 일부를 도시한다.
- [2440] 본 실험에 이용된 슬리핑뷰티(sleeping beauty, SB) 서열은 하기 표 5에 개시된 바와 같다.

표 5

[2442]

트랜스포존 종류	SEQ Name	SEQ ID NO	서열
5' SB	tp_SB_1	SEQ ID NO:13	atcacagt tgaagt cggaagt ttacat acact taagt tggagtc at taaaact cgt ttt caact actccacaaat tct tgt taac aaacaat agt ttt ggcaagt cagt taggacat ct act t tgtgc atgacacaagt cat ttt tccaacaat tgt ttacagacagatta ttt cact tataat t cact gta cacaat tccagt gggt cagaa gt ttacat acact aagt tgact gtgcct ttaaacagct tggaa aat tccagaaaat gatgt catggct ttagaagct
3' SB	tp_SB_2	SEQ ID NO:14	gtggaaggct actc gaaatgt ttgacccaagt taaacaat tta aaggcaat gctaccaaactaat tgagtgtat gtaact tct gaccact gggaat gtgat gaagaat aaaagct gaaat gaa tcattctctctact atttct gatatttcacat tct taaaat aaagt ggtgat cct aactgacct aagacaggaat ttt tacta ggattaaat gtcaggaat tgt gaaaagt gatt taaat gta t ttggct aaggtgtat gtaact tccgact tcaactgtat aggg atcctctagctaga

- [2444] **2. 배아 제작(MI)**
- [2445] **2-1. 난자 수집 및 시험관 내 성숙(in vitro maturation, IVM)**
- [2446] 35°C 의 식염수로 모아진 소의 난소가 2 시간 내에 도축장에서 실험실로 옮겨졌다. Cumulus-oocyte complexes(COCs)가 2-8mm의 모낭으로부터 10mL의 일회용 주사기에 부착된 18 게이지(18 guage) 바늘에 의해 흡입되었다.
- [2447] 흡입된 COCs로 부터 고르게 과립화 된 세포질(evenly-granulated cytoplasm)을 가지며 3겹 이상의 난구 세포(cumulus cell)로 둘러싸인 COC가 선별되었다.

- [2448] 선별된 COC를 10% FBS, 2 mM NaHCO₃ (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA)와 1% penicillin-streptomycin (v/v)로 보충된 HEPES-buffered tissue culture medium-199 (TCM-199; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에서 3회 세척하였다.
- [2449] 선별된 COC는 4개의 웰 접시(well-dishes) (30-40 oocytes per well; Falcon, Becton-Dickinson Ltd., Plymouth, UK)에서 22시간 동안 배양되었으며, 배양 조건은 39°C 및 5% CO₂ 조건이고, 배양액은 10% FBS, 0.005 AU/ml FSH (Antrin, Teikoku, Japan), 100 μM Cysteamine (Sigma-Aldrich), 및 1 μg/ml 17β-estradiol(Sigma-Aldrich)로 보충된 450 μL의 TCM-199가 이용되었다.
- [2451] **2-2. 정자 수집, 체외 수정(in vitro fertilization, IVF) 및 체외 배양(in vitro culture of embryos, IVC)**
- [2452] 원심분리를 통해 소의 해동된 정액으로부터 정자가 분리되었으며, 원심분리는 Percoll 불연속 구배(discontinuous gradient) (45-90%)에서 1500rpm으로 15분간 진행되었다.
- [2453] Percoll 용액 45%는 90% Percoll(Nutricell, Campinas, SP, Brazil) 1mL와 capacitation-TALP (Nutricell) 1mL로 제조되었다.
- [2454] 원심분리에 의해 얻어진 정자 펠렛(sperm pellet)은 1500rpm에서 5분간 capacitation-TALP (Nutricell)로 2회 세척되었다.
- [2455] 상기 정자 펠렛(sperm pellet)으로부터 얻어진 활성 운동성 정자는 성숙한 난자(24시간의 IVM)와의 수정을 위해 사용되었다.
- [2456] 39 ° C 온도 및 5%의 CO₂의 습도 조건에서, 미네랄 오일(mineral oil)로 오버레이(overlaid)된 IVF-TALP 배지(Nutricell)의 30 μL 마이크로드롭(microdrops)에서 18시간동안 난자와 1-2× 10⁶ 정자/mL가 수정되었다.
- [2457] 추정 접합체(presumptive zygotes)는 미네랄 오일(Sigma-Aldrich)로 오버레이(overlaid)된 배양 배지에서 배양되었으며, 배양 조건은 5% O₂, 5% CO₂ 및 90% N₂의 대기의 39°C 온도 조건이다.
- [2458] 배양 후 2일 째에 상기 접합체의 분열속도가 기록되었고, 배아의 발달은 국제 태아 전이 협회(International Embryo Transfer Society, IETS)의 단계에 따라 모니터링 되었다.
- [2460] **2-3. 미세 주입(MI)**
- [2461] 난구세포가 제거된 수정란의 세포질에, microinjector machine(Femtojet® , Eppendorf, Germany)을 이용하여 전술한 YFP 벡터, GFP-hIL2 벡터 및 GFP-RFP 벡터(이하, 툴박스 벡터)와 트랜스포사아제 벡터가 미세주입되었다.
- [2462] 수정란의 세포질에 미세주입된 벡터의 양은 각각 100 ng/mL(툴박스 벡터와 트랜스포사아제 벡터의 비율은 1:1)이다.
- [2463] 슬리핑뷰티(SB)에 대한 트랜스포사아제 벡터(pCMV (CAT) T7-SB100X) 및 피기백(PB)에 대한 트랜스포아제 벡터(pCy43)는 Addgene(<http://www.addgene.org>, Plasmid # 34879)에서 구입하고 Sanger Institute (Hinxton, UK)에서 제공 되었다.
- [2464] 벡터의 미세주입 후 7 일이 경과한 때, 형광 단백질을 발현하는 배아가 선별되었다.
- [2465] 즉, 전술한 방법을 통해 황색 형광 단백질 유전자가 포함된 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 배아(이하, YFP 배아), 녹색 형광 단백질 유전자 및 hIL2 유전자가 포함된 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 배아(이하, GFP-hIL2 배아) 및 rox-GFP-polyA-rox 및 적색 형광 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 배아 (이하, GFP-RFP 배아)가 생산되었다.
- [2467] **3. 목적 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환 소 제작**
- [2468] **3-1. 형질전환 소 제작**
- [2469] 본 발명자들은 전술한 미세주입을 통해 제작한 소의 배아를 대리모의 자궁에 이식하여 형질전환 소를 제작하였다.
- [2470] 형광 단백질을 발현하는 배아는 20% FBS로 보충된 PBS에서 경질단법(transcervical method)에 의해 대리모의 자궁각(uterine horn)으로 이식(transfer)되었다.

- [2471] 발달 일(post estrus) 45 일째 직장 검사(rectal palpation)와 초음파 검사(ultrasonography)를 통해 배아의 생존과 임신이 확인되었다.
- [2473] **3-2. SNU-SB1 (암컷) 개체 생산 및 목적 단백질 유전자를 포함하는 툴박스 삽입 여부 확인**
- [2474] 전술한 방법을 통해 YFP 배아가 이식된 대리모로부터 SNU-SB1(암컷)이 태어났다. 도 29의 (a)는 상기 SNU-SB1을 나타낸다.
- [2475] SNU-SB1의 코에서 황색 형광 단백질의 발현이 확인되었으며, 일차 피부세포(primary skin cell)에서도 황색 형광 단백질의 발현이 확인되었다
- [2476] 도 29의 (b)는 SNU-SB1의 코에서 황색 형광 단백질의 발현을 나타내며, 도 29의 (c)는 SNU-SB1의 일차 피부세포에서 황색 형광 단백질의 발현을 나타낸다 (도 29의 (c) 참고, 왼쪽 열: 야생형 소의 피부세포, 오른쪽 열: 형질전환 소의 피부세포, 위: 가시광선 조건, 아래: 형광 조건).
- [2477] 나아가, DNA PCR에 의해 황색 형광 단백질 유전자의 삽입(integration)이 확인되었다. 도 29의 (d)는 DNA PCR을 통한 황색 형광 단백질 유전자의 삽입을 확인한 결과를 나타낸다 (도 29의 (d) 참고, 1: 분자 마커, 2: 야생형 소, 3: 양성 대조군, 4: 형질전환 소의 피, 5: 형질전환 소의 귀 조직, 6: 형질전환 소의 태반, 7: 음성 대조군).
- [2478] DNA PCR 을 위한 DNA 추출 방법에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [2480] **3-3. SNU-PB2 (암컷) 개체 생산 및 목적 단백질 유전자를 포함하는 툴박스 삽입 여부 확인**
- [2481] 전술한 방법을 통해 GFP-hIL2 배아가 이식된 대리모로부터 SNU-PB2(암컷)가 태어났다.
- [2482] SNU-PB2의 눈과 코 등에서 녹색 형광 단백질의 발현이 확인되었으며, SNU-PB2의 일차 피부세포(primary skin cell)에서도 녹색 형광 단백질의 발현이 확인되었다.
- [2483] 도 30의 (a)는 SNU-PB2의 눈과 코에서의 녹색 형광 단백질의 발현을 나타내며, 도 30의 (b)는 SNU-PB2의 일차 피부세포에서 녹색 형광 단백질의 발현을 나타낸다 (도 30의 (b) 참고, 왼쪽: 가시광선 조건, 오른쪽: 형광 조건).
- [2484] 나아가, DNA PCR (Eppendorf Vapo Protect Mastercycler, Eppendorf, Germany)을 통해 계놈상에 GFP-hIL2 벡터에 포함된 유전자 녹색 형광 단백질 유전자가 삽입된 것이 확인되었다.
- [2485] 도 30의 (c)는 DNA PCR을 통한 녹색 형광 단백질 유전자의 삽입을 확인한 결과를 나타낸다 (도 30의 (c) 참고, 1: 분자 마커, 2: 야생형 소, 3: 형질전환 소의 피, 4: 양성 대조군의 DNA, 5: 음성 대조군).
- [2486] 또한, 소의 일차 세포(primary cell)를 이용한 RT-PCR (Eppendorf Vapo Protect Mastercycler, Eppendorf, Germany) 을 통해 계놈상에 녹색 형광 단백질 유전자의 삽입 및 mRNA의 발현이 확인되었다.
- [2487] 도 30의 (d)는 RT-PCR을 통한 녹색 형광 단백질 유전자의 삽입을 확인한 결과를 나타낸다 (도 30의 (d) 참고, 1: 야생형 소의 cDNA, 2: 형질전환 소의 cDNA, 3: 음성 대조군).
- [2488] DNA PCR 및 RT-PCR을 위한 DNA 및 RNA 추출 방법에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [2489] 상기 결과들을 통해, SNU-PB2의 계놈에 GFP-hIL2 벡터에 포함된 유전자가 삽입된 것이 확인 되었다.
- [2492] **3-4. SNU-PB1 (수컷) 개체 생산 및 목적 단백질 유전자를 포함하는 툴박스 삽입 여부 확인**
- [2493] 전술한 방법을 통해 GFP-RFP 배아가 이식된 대리모로부터 SNU-PB1 (수컷)이 태어났다. 도 31의 (a)는 SNU-PB1에서 녹색 형광 단백질의 발현을 나타낸다.
- [2494] SNU-PB1으로부터 분리 배양된 일차 피부세포(primary skin cell)에 Dre 리컴비나아제가 트랜스펙션 되기 전에는 녹색 형광 단백질의 발현이 관찰되었다.
- [2495] SNU-PB1로부터 분리 배양 된 일차 피부세포(primary skin cell)에 mRNA 형태의 Dre 리컴비나아제가 트랜스펙션 된 후에는 상기 세포에서 적색 형광 단백질의 발현이 관찰되었다.
- [2496] 도 31의 (b)는 SNU-PB1으로부터 분리 배양 된 일차 피부세포에서 녹색 형광 단백질의 발현 및 적색 형광 단백질의 발현을 확인한 결과를 나타낸다 (도 31의 (b) 참고, 위: 가시광선 조건, 아래: 형광 조건, 왼쪽: Dre 리컴비나아제 트랜스펙션 전, 오른쪽: Dre 리컴비나아제 트랜스펙션 후).

- [2497] 나아가, Dre 리컴비나아제가 트랜스펙션 되기 전 DNA PCR 및 RT-PCR에 의해, 계놈 내 녹색 형광 단백질 유전자의 삽입과 mRNA의 발현이 확인되었다 (도 32의 (a) 및 도 32의 (b) 참고). 도 32의 (a)는 Dre 리컴비나아제가 트랜스펙션 되기 전 DNA PCR 결과를 나타낸다 (도 32의 (a) 참고, 1: 분자 마커, 2: 야생형 소, 3: 형질전환 소의 피, 4: 양성대조군(녹색 형광 단백질 유전자), 5: 음성대조군). 도 32의 (b)는 Dre 리컴비나아제가 트랜스펙션 되기 전 RT-PCR 결과를 나타낸다 (도 32의 (b) 참고, 1: 분자 마커, 2: 야생형 소, 3: 형질전환 소, 4: 음성대조군).
- [2498] 또한, Dre 리컴비나아제가 트랜스펙션 된 후, DNA PCR에 의해 녹색 형광 단백질 유전자가 계놈으로부터 제거된 것이 확인되었다. 도 32의 (c)는 Dre 리컴비나아제가 트랜스펙션 된 후 DNA PCR 결과를 나타낸다 (도 32의 (c) 참고, 1: 분자 마커, 2: Dre 트랜스펙션 전, 3: Dre 트랜스펙션 후, 4: 음성대조군).
- [2499] DNA PCR 및 RT-PCR을 위한 DNA 및 RNA 추출 방법에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [2500] 상기 결과를 통해, 본 발명자들은 리컴비나아제 인식사이트(RRS)가 삽입된 계놈의 세포 또는 동물에 리컴비나아제를 제공하여 원하는 종류의 목적 단백질을 시간적으로 조절하여 발현시킬 수 있다는 것을 확인하였다.
- [2502] **4. 목적 단백질 유전자를 포함하는 툴박스가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환 자손 소 생산**
- [2503] **4-1. 형질전환 자손 소**
- [2504] **4-1-1. SNU-F1-1 소**
- [2505] 암컷 소(SNU-SB1)와 수컷 소(SNU-PB1)의 자연교배(natural breeding)에 의해 자손 소(SNU-F1-1)가 생산되었다
- [2506] 도 33의 (a)는 자손 소인 SNU-F1-1 및 부모 소인 SNU-SB1을 나타낸다 (도 33의 (a) 참고, 왼쪽 화살표: SNU-F1-1, 오른쪽: SNU-SB1).
- [2507] 본 발명자들은 자손인 SNU-F1-1의 일차 피부 세포(primary skin cell)에서 녹색 형광 단백질이 발현되는 것을 시각적으로 확인하였으며, Dre 리컴비나아제 처리 후에는 적색 형광 단백질이 발현되는 것을 시각적으로 확인하였다.
- [2508] 도 33의 (b)는 SNU-F1-1의 일차 피부 세포에 Dre 리컴비나아제 처리 전에 녹색 형광 단백질이 발현되는 것과, Dre 리컴비나아제 처리 후의 적색 형광 단백질이 발현되는 것을 나타낸다 (위: Dre 처리 전, 아래: Dre 처리 후).
- [2509] 나아가, DNA PCR 분석을 통해 SNU-F1-1의 계놈에 전술한 GFP-RFP 벡터의 구성인 PB-CAG promoter-Rox- GFP-Rox-RFP-PB가 삽입되어있는 것이 확인되었다.
- [2510] 도 34는 SNU-F1-1의 DNA PCR 분석 결과를 나타낸다 (도 34 참고, 1: 분자 마커, 2: 양성 대조군(GFP-RFP 벡터), 3: 야생형 형질전환 소 DNA, 4: SNU-PB1의 피로부터 얻어진 DNA, 5: SNU-F1-1의 피로부터 얻어진 DNA, 6: SNU-F1-1의 세포에 Dre 리컴비나아제가 처리되어 얻어진 DNA, 7: 음성대조군(nuclease-free water)). DNA PCR을 위한 DNA 추출 방법에 대해서는 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [2511] 또한, 본 발명자들은 자손 소(SNU-F1-1)의 DNA 서열을 분석하였고, 이를 통해 상기 수컷 소(SNU-PB1)의 계놈에 삽입되어 있는 PB-CAG promoter-Rox- GFP-Rox-RFP-PB를 포함하는 툴박스가 계놈 상에 삽입 되어있는 것을 확인하였으며, 상기 툴박스의 삽입 좌위에 대하여는 후술할 것이다.
- [2513] **4-1-2. SNU-F1-2 소**
- [2514] 암컷 소(SNU-PB2)와 수컷 소(SNU-PB1)의 자연교배(natural breeding)에 의해 상기 암컷 소(SNU-PB2)가 SNU-F1-2를 임신하였다. 다른 소의 공격에 의해 상기 암컷 소(SNU-PB2)가 임신중에 공격을 받아 상해를 입었고, 상기 암컷 소(SNU-PB2)는 안락사 되었다.
- [2515] 본 발명자들은 SNU-F1-2 태아로부터 얻어진 태아 섬유아세포(fetal fibroblasts)에서 녹색 형광 단백질이 발현되는 것을 시각적으로 확인하였다
- [2516] 도 35는 SNU-F1-2 태아 섬유아세포에서 녹색 형광 단백질의 발현을 나타낸다 (도 35 아래 참고, 왼쪽: 가시광선 조건, 오른쪽: 형광 조건).
- [2517] 또한, 본 발명자들은 SNU-F1-2 태아(fetus)의 DNA 서열 분석을 통해 상기 암컷 소(SNU-PB2)의 계놈에 삽입되어 있는 PB-beta-casein promoter-hIL2-pA-CAG promoter-GFP-pA-PB를 포함하는 툴박스가 태아 SNU-F1-2의 계놈

상에도 전달되는 것을 확인하였다. 상기 툭박스의 삽입 좌위에 대하여는 후술할 것이다.

[2519] 본 실험을 통해, 형질전환을 위한 목적 단백질 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 동물이 건강상 문제없이 생존할 수 있으며, 건강한 자손을 생산할 수 있다는 것이 확인되었다.

[2520] 또한, 상기 결과들을 통해서, F0 세대 형질전환 소의 계놈에 포함되어 있는 툭박스가 F1 세대로 전달 (transmission)될 수 있다는 것이 확인 되었다.

[2522] **4-2. 암컷 소의 유증**

[2523] 본 발명자들은 계놈에 삽입된 유전자로부터 발현된 단백질이 암컷 소의 유증에 포함되어 있을 수 있다는 것을 보여주기 위해, 전술한 SNU-PB2의 계놈에 삽입된 툭박스(5'PB-β-casein promoter-hIL2- pA-pCAG-GFP-Pa-3'PB 구성된 툭박스)와 동일한 구성의 툭박스가 삽입된 암컷 소의 유증을 분석하였다.

[2524] 형광 단백질 유전자를 포함하는 툭박스가 삽입된 계놈을 가지는 암컷 소의 유증을 공 초점 현미경(confocal microscope)를 이용해 분석한 결과, 암컷 소의 유증에서 녹색 형광 단백질이 발현되는 것이 시각적으로 확인되었다.

[2525] 도36의 (a)는 공 초점 현미경을 통해 소의 유증에서 형광 단백질의 발현 여부를 확인한 결과를 나타낸다 (도 36의 (a) 참고, 왼쪽: 야생형 소의 유증, 오른쪽: 툭박스 삽입 형질전환 소의 유증).

[2526] 또한, 상기 툭박스 구성요소에 의해 발현된 인간 인터류킨(human interleukin; hIL)이 암컷 소의 유증에 포함되어 있는 것이 ELISA 에 의해 확인되었다.

[2527] 도 36의 (b)는 ELISA를 통해 유증에 인간 인터류킨이 포함되어 있는 것을 확인한 결과를 나타낸다 (도 36의 (b) 참고, 위: ELISA control, 아래: 1 내지 3- 야생형 소 유증, 4 내지 8- 툭박스 삽입 형질전환 소 유증).

[2528] 녹색 형광 단백질 및 인간 인터류킨(human interleukin; hIL)이 포함된 유증을 자손 소가 섭취하더라도 건강상 문제 없이 생존할 수 있다는 것이 확인되었다.

[2529] 본 실험을 통해, 형질전환 암컷 소의 유증에 엑소-폴리뉴클레오타이드의 전사 및 번역을 통해 발현된 단백질이 포함되어 있을 수 있다는 것이 확인되었다. 즉, 형질전환 소가 바이오리액터로서 활용될 수 있다는 것이 확인되었다.

[2531] **5. 계놈 상 목적 단백질 유전자가 삽입될 수 있는 삽입 좌위**

[2532] 본 발명자들은 서열분석을 통해 F0 형질전환 소 및 자손 소의 계놈에 목적 단백질 유전자 (e.g. 형광 단백질 유전자)를 포함하는 툭박스가 삽입될 수 있는 삽입 좌위를 확인하였다.

[2534] 서열 분석을 위해 DNA 샘플이 준비되었고, DNA 샘플은 혈액이나 일차 세포에서 DNA 추출 키트를 사용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 추출 되었다. Qubit fluorometer dsDNA 분석 키트 (Invitrogen, CA)와 Infinite F200 Pro NanoQuant (TECAN, Männedorf)를 사용하여 계놈 DNA의 품질 (O.D. 260/280 ratio is 1.8-2.0 and O.D. 260/230 ratio greater than 1.6) 및 라이브러리를 만들기 위한 양(1 ug)이 확인되었다

[2535] 대량 서열 분석을 위한 라이브러리(library)를 준비하기 위해, F0 형질전환 소(SNU-SB1, SNU-PB1 및 SNU-PB1)와 자손 소(SNU-F1-1 및 SNU-F1-2)의 샘플로부터 정제된 계놈 DNA가 Covaris S2 Ultrasonicator에 의해 무작위로 절단되어 평균 350bp 크기의 DNA 단편(DNA fragment)이 얻어졌다. TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit(from Illumina (San Diego, CA))를 이용해 DNA 시퀀싱 라이브러리가 제작되었으며, 이는 제조사의 프로토콜에 의해 준비되었다.

[2536] 최종 라이브러리 크기와 품질은 Agilent High Sensitivity DNA kit (AgilentTechnologies, Santa Clara)에 의해 평가되었다.

[2537] 시퀀싱은 the TruSeq Paired End Cluster Kit v3 and the TruSeq SBS

[2538] Kit v3-HS (FC-401-3001)를 이용하여 Illumina HiSeq 2500에서 수행되었으며, 이미지 분석은 HiSeq 제어 소프트웨어 (버전 2.2.58)를 사용하여 수행되었다.

[2539] Remaining reads는 BWA ver. 0.7.5a. 를 사용하여, Bos taurus 계놈 (UMD 3.1, http://asia.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Annotation)과 목적 단백질 유전자 서열이 동시에 mapping되었다.

[2540] BWA에 의해 생성된 mappind data BAM(aligned format)으로, 목적 단백질 유전자의 삽입 좌위가 분석되었다.

- [2541] BWA는 Smith-Waterman-like scoring scheme에 의해 결정된바와 같이, 관독의 극한값(extream of the read)에서 일부 뉴클레오타이드가 생략(이하, soft-clipped) 될 수 있다는 것을 의미한다.
- [2542] Soft-Clipped 시퀀스의 매핑 된(mapped) 패턴을 확인함으로써, 삽입 좌위가 추론되었다.
- [2543] 나아가, Delly softwarer가 목적 단백질 유전자 삽입의 지표로서 게놈 구조 변화의 평가를 위해 병렬적으로 적용되었다.
- [2544] 마지막으로 IGV 소프트웨어를 사용하여 수동으로 후보 삽입 좌위가 검사 되었다.
- [2545] copy number variations (CNVs)은 The Control-FREEC software에 의해 확인 되었다. 이 소프트웨어는 관심 영역의 배수의 계산에 사용된다.
- [2548] **5-1. 부모 세대 형질전환 소의 게놈에 목적 단백질 유전자가 삽입될 수 있는 삽입 좌위**
- [2549] 이하에서는, 상기 서열분석을 통해 확인한 부모 세대 형질전환 소의 게놈에 목적 단백질 유전자를 포함하는 틀박스가 삽입되어 있는 삽입 사이트에 대해 설명한다.
- [2550] 하기 표 6은 SNU-SB-1의 게놈에 틀박스가 삽입되어 있는 삽입 좌위를 개시한다.
- [2551] 하기 표 7은 SNU-PB-1의 게놈에 틀박스가 삽입되어 있는 삽입 좌위를 개시한다.
- [2552] 하기 표 8은 SNU-PB-2의 게놈에 틀박스가 삽입되어 있는 삽입 좌위를 개시한다.
- [2553] 하기 표 6 내지 표 10에 기재된 좌위 번호(locus number)는 염색체 상에 틀박스가 삽입된 위치를 인위적으로 넘버링(numbering)한 것이다.
- [2554] 전술한 바와 같이, 틀박스의 좌위는 틀박스를 기준으로 틀박스의 5' 말단에서 가장 가까운 내인성 유전자(이하, 5' 유전자)와 틀박스를 기준으로 틀박스의 3' 말단에서 가장 가까운 내인성 유전자(이하, 3' 유전자) 중 하나 이상에 의해 특정 될 수 있다.
- [2555] 예를 들어, 하기 표 6의 좌위 번호 4-1 및 21-1은 소의 게놈에 존재하는 다른 좌위이다.
- [2556] 다른 예를 들어, 하기 표 7의 좌위 번호 6-1 및 6-2는 소의 게놈에 존재하는 다른 좌위이다.

표 6

소의 게놈 염색체	좌위 번호	5' 유전자	3' 유전자
4	4-1	MIS184	HUNK
21	21-1	TRPM1	APBA2
26	26-1	MKI67	EBF3

표 7

소의 게놈 염색체	좌위 번호	5' 유전자	3' 유전자
1	1-1	MIS184	HUNK
2	2-1	SLC38A11	COBLL1
3	3-1	GBP5	GBP4
4	4-2	TSGA13	MKLN1
5	5-1	ATXN7L3B	CAPS2
6	6-1	DKK2	GIMD1
	6-2	PLAC8	COQ2
7	7-1	ERAP2	LNPEP
14	14-1	CSMD3	CSMD3
17	17-1	ORAI1	RNF34
22	22-1	bta-mir-2370	DENND6A
25	25-1	AUTS2	ENSBTAG0000047342
26	26-2	EMX2	RAB11FIP2
X	X-1	WWC3	DDX3Y

표 8

[2561] 소의 게놈 염색체	좌위 번호	5'유전자	3'유전자
3	3-2	PEX19	PEA15
	3-3	PDE4B	OB-R
5	5-2	TMEM5	AVPR1A
	5-3	XRCC6BP1	CTDSP2
	5-4	MPST	KCTD17
6	6-3	LCORL	SLIT2
7	7-2	C7H5orf30	NUDT12
9	9-1	STXBP5	SAMD5
10	10-1	ALDH6A1	VSX2
11	11-1	PTP	LRRTM4
	11-2	PSMD13	-
15	15-1	SMAP	INSC
18	18-1	HSD17B2	CDH13
X	X-2	ARAF	SYN1
	X-3	PBDC1	MAGEE2

[2563] 5-2. 자손 소의 게놈에 목적 단백질 유전자가 삽입될 수 있는 삽입 좌위

[2564] 5-2-1. 부모 세대 형질전환 소와 자손 소의 게놈에 삽입된 목적 단백질 유전자의 삽입 좌위 비교

[2565] 이하에서는, 서열분석을 통해 확인한 부모 세대 형질전환 소의 게놈에 목적 단백질 유전자를 포함하는 틀박스가 삽입되어 있는 삽입 사이트와 자손 소의 게놈에 목적 단백질을 포함하는 틀박스가 삽입되어 있는 삽입 사이트를 비교하였다.

[2566] 하기 표 9는 SNU-F1-1의 게놈에 틀박스가 삽입되어 있는 삽입 좌위를 개시한다.

표 9

[2568] 소의 게놈 염색체	좌위 번호	5'유전자	3'유전자
4	4-2	TSGA13	MKLN1
	4-4	ENSBTAG00000001198.5	ENSBTAG000000046257.1
6	6-1	DKK2	GIMD1

[2570] 자손 소인 SNU-F1-1의 피부 섬유아세포(skin fibroblasts)를 이용한 서열분석 결과, 자손 소 SNU-F1-1의 게놈에 틀박스가 삽입되어 있는 삽입 좌위가 부모 세대의 소(SNU-PB1, 수컷)의 게놈에 상기 틀박스가 삽입되어 있는 삽입 좌위 중 일부와 일치한다는 것이 확인되었다 (표 7 및 표 9 참고).

[2572] 하기 표 10은 SNU-F1-2의 게놈에 틀박스가 삽입되어 있는 삽입 좌위를 개시한다.

표 10

[2574] 소의 게놈 염색체	좌위 번호	5'유전자	3'유전자
1	1-2	ENSBTAG000000025847.3	ENSBTAG000000011051.5
3	3-4	PDE4B	LEPR
4	4-3	NPVF	C7orf31
10	10-1	ALDH6A1	VSX2
12	12-1	ENSBTAG000000010680.5	U2
X	X-3	PBDC1	MAGEE2

[2576] 자손 소인 SNU-F1-2의 태아 섬유아세포(fetal fibroblasts)를 이용한 서열분석 결과, 자손 소 SNU-F1-2의 게놈에 틀박스가 삽입되어 있는 삽입 좌위가 부모 세대의 소(SNU-PB2, 암컷)의 게놈에 상기 틀박스가 삽입되어 있는 삽입 좌위 중 일부와 일치하는 것이 확인되었다 (표 8 및 표 10 참고).

[2578] 전술한 바와 같이 상기 서열분석을 통해, 부모 세대 동물 게놈에 목적 단백질을 유전자가 삽입된 삽입 좌위 중 적

어도 하나 이상은 자식 세대의 동물 계놈에 그대로 전달(transmission)되어 존재할 수 있다는 것이 확인되었다.

[2580] **5-2-2. 계놈에 삽입된 목적 단백질 유전자 수와 목적 단백질 발현 양의 관계**

[2581] 본 발명자들은 SNU-F1-1 와 SNU-F1-2 를 분석하여 목적 단백질의 발현 양과 상기 세포의 계놈에 삽입된 목적 단백질 유전자 수의 관계를 조사 하였다. 이는 SNU-F1-1의 피부 섬유아세포와 SNU-F1-2의 태아 유래 섬유아세포에서의 형광 강도를 측정하여 확인되었다.

[2582] 형광 강도(fluorescence intensity)의 측정에 의해, SNU-F1-2의 태아 유래 섬유아세포에서의 형광 단백질 발현 수준은, SNU-F1-1 섬유아세포에서의 형광 단백질 발현 수준 보다 약 2.2배 높다는 것이 확인되었다 (도 35 참고, 위: SNU-F1-1, 아래: SNU-F1-2, 왼쪽: 가시광선 조건, 오른쪽: 형광 조건).

[2583] SNU-F1-1 및 SNU-F1-2 시료의 형광 강도를 정량화하기 위해, ImageJ (v1.50, NIH)를 사용하여 동일한 크기 및 밀도의 세포 이미지가 획득되었다.

[2584] SNU-F1-2의 계놈에는 목적 단백질 유전자가 6개의 삽입 사이트에 삽입되어있는 반면, SNU-F1-1 계놈에는 목적 단백질 유전자가 3개의 삽입 사이트에 삽입되어 있다는 점에 의해, 상기 결과로 부터 형질전환 소의 세포에서 상기 목적 단백질 유전자(외부에서 삽입된 유전자에 의해 발현되는 형질전환 단백질)의 발현 수준은 외부에서 삽입된 유전자의 카피 수(copy number)와 관련이 있음이 확인되었다.

[2587] **[실험예 3] 계놈에 삽입된 목적 단백질을 타겟 사이트로 한 유전자 편집**

[2588] 본 발명자들은 전술한 방법에 의해 인위적으로 소의 계놈에 삽입된 목적 단백질 유전자를 타겟으로 하여 유전자 편집이 가능하다는 것을 보여주는 실험을 진행하였다.

[2589] 즉, 하기의 실험 결과에 의해 전술한 인위적으로 계놈에 삽입된 '인위적 편집 사이트(artificial editing site)'에서도 유전자 편집이 가능하다는 것이 뒷받침될 수 있다.

[2590] 본 발명자들은 인위적으로 계놈에 삽입된 목적 단백질 유전자에서 유전자 편집이 일어날 수 있다는 것을 보다 효과적으로 확인하기 위하여, 상기 목적 단백질 유전자로서 녹색 형광 단백질 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 세포를 이용해 하기의 실험을 진행하였다.

[2592] **1. 목적 단백질 유전자 녀아웃**

[2593] **1-1. 녹색 형광 단백질 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 섬유아세포 분리**

[2594] 본 발명자들은 외부에서 삽입된 목적 단백질 유전자를 녀아웃 시킬 수 있다는 것을 확인하기 위해, 녹색 형광 단백질 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환된 배아의 조직으로부터 녹색 형광 단백질 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 섬유아세포 (이하, GFP 섬유아세포)를 분리하였다.

[2595] GFP 섬유아세포를 분리하기 위해, GFP 배아가 이식된 대리모로부터 태아가 수집되었으며, 태아의 수집은 대리모가 임신한지 40일 쯤에 진행되었다.

[2596] 수집된 태아의 피부가 콜라게나아제(collagenase)에 의해 효소 분해(enzyme digestion)된 후, 일차 섬유아세포(primary fibroblasts)가 배양 접시(culture dishes)에 부착되었다.

[2597] 일차 섬유아세포(primary fibroblasts)는 상기 배양 접시에서 배양 배지(DMEM (Gibco, Carlsbad, CA, USA), 15% FBS (Gibco), 100 mM betamercaptoethanol (Sigma), 1% NEAA (Sigma), 및 1% penicillin/streptomycin (Gibco))에 의해 증식(expanded)되었다.

[2598] 분리된 섬유아세포에서 녹색 형광 단백질의 발현이 형광 현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)을 통해 확인되었다.

[2600] **1-2. 목적 단백질을 유전자를 타겟팅 하는 크리스퍼/카스9(CRISPR/Cas9) 벡터 트랜스펙션(transfection)**

[2601] 전술한 방법에 의해 분리된 GFP 섬유아세포의 계놈에 삽입되어 있는 녹색 형광 단백질 유전자를 녀아웃 시키기 위해, 단일 가이드 RNA(single guide RNA, sgRNA)를 사용하는 변형된 CRISPR/Cas9 시스템이 이용되었다.

[2602] 녹색 형광 단백질 유전자를 녀아웃 시키기 위해, U6 프로모터를 갖는 상기 sgRNA 발현 벡터 및 CMV 프로모터를 갖는 Cas9 발현 벡터가 제작되었다.

[2603] 도 37의 (a)는 녹색 형광 단백질 유전자를 특이적으로 타겟팅(targeting) 하기 위해 디자인된 sgRNA를 도시한다.

- [2604] 도 37의 (b)는 sgRNA 발현 벡터 및 Cas9 발현 벡터를 도시한다 (왼쪽: sgRNA 발현 벡터, 오른쪽: Cas9 발현 벡터).
- [2605] 상기 sgRNA 발현 벡터 및 Cas9 단백질 발현 벡터(총 10g, 1:3 비율)가 전술한 방법에 의해 분리된 섬유아세포에 트랜스펙션(transfection) 되었다. 트랜스펙션 된 섬유아세포는 38 °C, 5 % CO₂ 조건의 배양기에서 10일동안 더 배양되었다.
- [2607] **1-3. 넥아웃 확인_형광 단백질 발현 여부 및 인델(indel) 확인**
- [2608] 전술한 방법에 의해 분리된 섬유아세포에 상기 sgRNA 발현 벡터 및 Cas9 발현 벡터가 트랜스펙션 된 후, 녹색 형광 단백질의 발현이 제거된 것이 형광 현미경에 의해 확인 되었다.
- [2609] 도 38의 (a)는 녹색 형광 단백질 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 섬유아세포에 sgRNA 발현 벡터 및 Cas9 발현 벡터가 트랜스펙션 된 후 녹색 형광 단백질이 발현되지 않은 것을 확인한 결과를 나타낸다 (도 38의 (a) 참고, a: 가시광선 조건, a': 형광 조건).
- [2610] 즉, 상기 sgRNA 발현 벡터 및 Cas9 발현 벡터의 트랜스펙션 후, 녹색 형광 단백질 유전자가 넥아웃 된 것이 확인되었다.
- [2612] 또한, 본 발명자들은 녹색 형광 단백질 음성의 콜로니(colony)를 포함하는 섬유아세포로부터 전체 게놈 DNA(whole genomic DNA)을 분리해 PCR 증폭을 통한 타겟 사이트인 녹색 형광 단백질 유전자의 인델(indel)을 확인하였다.
- [2613] 전체 게놈 DNA(whole genomic DNA)의 분리는 the G-spin™ Total DNA Extraction Mini Kit (iNTRON, Seoul, Republic of Korea)를 통해 진행되었다.
- [2614] PCR 증폭을 통한 타겟 사이트의 인델 확인을 위해 타겟 사이트를 포함하는 575bp 단편(fragment)이 프라이머에 의해 증폭되었다. 상기 프라이머는 하기 표 11에 개시된 바와 같다.

표 11

PCR Primer	SEQ Name	SEQ ID NO	서열
Forward	in_pr_GFP_F_1	SEQ ID NO:15	GGACTTCCTTGTGCCAAATCT
Reverse	in_pr_GFP_R_1	SEQ ID NO:16	TAGCGGCTGAAGCACTGC

- [2618] 도 38의 (b)는 녹색 형광 단백질 유전자에 생긴 인델을 나타낸다.
- [2619] 본 실험을 통해 외부에서 제공된 가이드 핵산에 의해 소의 계놈에서 특정 유전자의 넥아웃이 일어날 수 있다는 점 및 소의 계놈에서 특정 유전자가 넥아웃이 일어나더라도 소가 생존할 수 있다는 것이 확인되었다.
- [2621] **2. 도너 폴리뉴클레오타이드의 넥아웃**
- [2622] 본 발명자들은 전술한 방법에 의해 생산된 형질전환 소의 계놈에 삽입되어 있는 녹색 형광 단백질 유전자를 타겟 유전자로 하여 도너 폴리뉴클레오타이드를 넥아웃 시키는 실험을 진행하였다.
- [2623] 전술한 방법에 의해 생산된 형질전환 소(e.g. SNU-PB2)로부터 일차 세포가 획득되었으며, Nucleofactor technology (Neon®, Invitrogen; program #16)를 통해 플라스미드 벡터들이 상기 일차 세포(primary cell)에 트랜스펙션 되었다.
- [2624] 상기 플라스미드 벡터로 i) U6 프로모터를 갖는 sgRNA(Toolgen, Seoul, Republic of Korea, GFP gene targeting) 발현벡터, ii) CMV 프로모터를 갖는 크리스퍼/카스9(CRISPR/Cas9) 발현벡터 및 iii) 도너 DNA(퓨로마이신 저항성 유전자(puromycin resistance gene)) 발현벡터가 사용되었다.
- [2625] 트랜스펙션 된 일차 세포는 4 µg/mL 퓨로마이신(puromycin)(GIBCO)과 함께 3일간 배양되었다. 배지가 신선한 배양 배지(fresh culture media)로 교체된 후, 상기 일차 세포는 10일 더 배양되었다.
- [2626] 그 결과, sgRNA(Toolgen, Seoul, Republic of Korea) 발현벡터, 크리스퍼/카스9(CRISPR/Cas9) 발현벡터 및 도너 DNA(퓨로마이신 저항성 유전자(puromycin resistance gene)) 발현 벡터가 트랜스펙션(transfection)된 일차 세포의 경우, 퓨로마이신(puromycin)이 처리된 경우에도 콜로니(colony)가 생존하는 것이 확인되었다.

- [2627] 도 39는 녹색 형광 단백질 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 일차 세포에 녹색 형광 단백질 유전자에 결합할 수 있는 gRNA, Cas9, 및 도너 DNA(퓨로마이신 저항성 유전자)가 트랜스펙션 된 경우, 상기 일차 세포가 퓨로마이신 저항성이 있다는 것을 나타낸다.
- [2629] 또한, 녹색 형광 단백질을 타겟하는 sgRNA(Toolgen, Seoul, Republic of Korea) 발현벡터, 크리스퍼/카스9(CRISPR/Cas9) 발현벡터 및 도너 DNA(퓨로마이신 저항성 유전자(puromycin resistance gene)) 발현벡터가 트랜스펙션(transfection)된 일차 세포의 경우, 더 이상 녹색 형광 단백질이 발현되지 않는다는 것이 확인되었다.
- [2630] 도 40은 녹색 형광 단백질을 타겟하는 sgRNA 발현벡터, 크리스퍼/카스9 발현벡터 및 도너 DNA(퓨로마이신 저항성 유전자) 발현벡터가 트랜스펙션(transfection)된 일차 세포에서 녹색 형광 단백질이 발현되지 않는 것을 나타낸다 (도 40 참고, 1: 트랜스펙션 전, 2: 트랜스펙션 후).
- [2631] 전술한 i) 콜로니(colony)의 생존 결과 및 ii) 녹색 형광 단백질의 미발현(non-expression) 결과를 통해, 상기 SNU-PB-2의 일차 세포에서 sgRNA와 크리스퍼/카스9을 이용한 크리스퍼/카스 시스템(CRISPR/Cas system)이 작동한다는 점이 확인되었다.
- [2633] 뿐만 아니라, 본 발명자들은 전술한 자손 소(SNU-F1-1)의 계놈에 삽입되어 있는 녹색 형광 단백질 유전자(GFP gene)를 타겟 유전자(target gene)로 하여 도너 폴리뉴클레오타이드(적색 형광 단백질 유전자 포함)를 녹인(knockin) 시키는 실험을 진행하였다.
- [2634] 전술한 방법과 같이, SNU-F1-1의 일차 세포(primary cell)가 획득되었으며, Nucleofactor technology (Neon®, Invitrogen; program #16)를 통해 i) U6 프로모터를 갖는 sgRNA(Toolgen, Seoul, Republic of Korea, GFP gene targeting) 발현벡터, ii) CMV 프로모터를 갖는 크리스퍼/카스9(CRISPR/Cas9) 발현벡터 및 iii) 도너 DNA (적색 형광 단백질 유전자 포함) 발현벡터가 상기 일차 세포(primary cell)에 트랜스펙션 되었다.
- [2635] 도 41은 도너 폴리뉴클레오타이드(414)가 일차세포의 계놈에 존재하는 녹색 형광 단백질 유전자에 녹인 되는 과정을 도시한다.
- [2636] sgRNA(Toolgen, Seoul, Republic of Korea) 발현벡터, 크리스퍼/카스9(CRISPR/Cas9) 발현벡터 및 도너 DNA(퓨로마이신 저항성 유전자(puromycin resistance gene)) 발현벡터가 트랜스펙션(transfection)된 일차 세포의 경우, 더 이상 녹색 형광 단백질이 발현되지 않는 것과 적색 형광 단백질이 발현되는 것이 확인되었다 (도 42 참고).
- [2637] 도 42는 녹색 형광 단백질 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 일차 세포에서 녹색 형광 단백질 유전자가 녹아웃 되고 적색 형광 단백질 유전자가 녹인된 후, 적색 형광 단백질이 발현되는 것을 나타낸다.
- [2638] 전술한 i) 녹색 형광 단백질의 미발현(non-expression) 및 ii) 적색 형광 단백질의 발현 결과를 통해, 상기 자손 소의 일차 세포에서도 sgRNA와 크리스퍼/카스9을 이용한 크리스퍼/카스 시스템(CRISPR/Cas system)이 작동한다는 점이 확인되었다.
- [2640] 본 실험을 통해, 외부에서 삽입해준 인위적 편집 사이트(artificial editing site)를 타겟 사이트로 하여 도너 폴리뉴클레오타이드가 녹인(knockin)될 수 있다는 것이 확인되었다.
- [2641] 또한, 본 실험을 통해 세포의 계놈에 존재하는 타겟 사이트에 도너 폴리뉴클레오타이드가 녹인(knockin)되더라도, 상기 세포가 생존할 수 있다는 점이 확인되었다.
- [2642] 나아가, 본 실험을 통해 형광 단백질 유전자를 타겟 유전자(target gene)로 하여 도너 폴리뉴클레오타이드가 녹인(knockin)된 경우, 형광 단백질이 발현되지 않아 세포의 외부로 제공되는 형광 신호(fluorescence signal)가 약해지는 점을 이용하여, 형광 단백질 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 세포(n차 유전자 편집된 세포, n은 1이상의 자연수)를 이용해 n+1차 유전자 편집된 세포를 선별할 수 있다는 것이 확인되었다.
- [2644] **[실험예 4] RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 발현하는 형질전환 소**
- [2645] **1. RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 발현하는 형질전환 소 제작**
- [2646] 본 발명자들은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 발현하는 형질전환 소 (이하, spCas9 소)를 제작 하기 위해 하기의 실험을 진행하였다.
- [2647] **1-1. 벡터 제작**

[2648] 퓨로마이신 저항성 유전자(puromycin resistance gene)와 적색 형광 단백질 유전자(RFP gene)를 포함하는 spCas9 cDNA(Toolgen으로부터 기증 됨)가 PCR을 통해 클로닝되었다.

[2649] 또한, NCBI 데이터베이스(NCBI database)에 기반한 Fat-1 DNA가 합성되었고, Fat-1 유전자는 EF1alpha promoter와 함께 클로닝 되었다.

[2650] 상기 Cas9-Puro-RFP, EF1 alpha, 그리고 fat-1 DNA들은 전술한 피기백 트랜스포존 발현벡터(PB transposon expression vector)에 넣어졌고, 최종 발현 벡터 (이하, spCas9 벡터; PB-CAG-Cas9-RFP-EF1-fat1)가 제작되었다.

[2651] 도 43의 (a)는 상기 spCas9의 벡터의 일부를 도시한다.

[2652] 본 실험예에 이용된 피기백(piggybac, PB) 서열은 상기 표 3에 개시된 바와 같다.

[2654] **1-2. 배아 제작(MI)**

[2655] 소의 계놈에 상기 spCas9 유전자를 삽입하는 방법 및 실험 조건은 전술한 목적 단백질 유전자를 삽입하는 방법 및 실험 조건과 동일한 바, 상기 spCas9 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 배아를 제작하는 방법을 간략하게 설명한다.

[2656] 전술한 바와 같이, 소의 난자는 난소로부터 COCs를 분리 및 세척하여 수집되었고, 정자는 소의 정액을 원심분리하여 수집되었다.

[2657] 수집된 난자와 정자의 체외 수정에 의해 얻어진 수정란으로부터 난구세포가 제거된 후, microinjector machine(Femtojet®, Eppendorf, Germany)을 이용하여 전술한 spCas9 벡터 및 트랜스포사아제 벡터가 세포질에 미세주입되었다 (각각 50ng/ml, 1:1 비율). 트랜스포사아제 벡터(pCy43)는 Sanger Institute (Hinxton, UK)에서 제공 되었다.

[2658] 미세주입된 배아에서 적색 형광 단백질이 발현되었다.

[2659] 도 43의 (b)는 spCas9 벡터가 미세주입된 배아에서 적색 형광 단백질의 발현을 나타낸다.

[2660] 상기 spCas9 벡터는 적색 형광 단백질 유전자를 포함하고 있는 바 (도 43의 (a) 참고), 적색 형광 단백질이 발현되는 결과에 의해 전술한 벡터가 미세주입된 배아의 계놈에 spCas9 유전자가 삽입되었다는 것이 확인되었다.

[2662] **1-3. 형질전환 소 제작**

[2663] **1-3-1. 형질전환 소**

[2664] 형질전환된 배아를 대리모의 자궁에 이식하는 방법 및 실험 조건은 전술한 바 있어 이하에서는 spCas9 소(F0)를 제작하는 방법에 대해 간략하게 설명한다.

[2665] 전술한 방법에 의해 생산된 배아가 대리모의 자궁에 이식되었고, 발달 일(post estrus) 45 일째 직장 검사(rectal palpation)와 초음파 검사(ultrasonography)를 통해 총 4마리의 대리모에서 임신이 확인되었다.

[2666] 임신기간을 거쳐 4 마리의 spCas9 소(F0)가 태어났으며, 도 43의 (c)는 SNU-Cas9-2 (F0)를 나타낸다.

[2668] 하기 표 12는 형질전환 소의 성별과 나이를 개시한다.

표 12

[2669]

이름	RFP 발현 비율 (Expression ratio)	성별	나이
SNU-Cas9-1 (F0)	58.3%	Female	5 months
SNU-Cas9-2 (F0)	33.7%	Male	23 months
SNU-Cas9-3 (F0)	87.0%	Male	6 months
SNU-Cas9-4 (F0)	74.8%	Female	24 months

[2670] 상기 spCas9 소의 혈액 분석(blood analysis) 을 위해, 경정맥(jugular vein)에서 5ml 전혈 샘플(whole blood samples)이 채취되었다. 채취된 샘플의 일부(1mL)는 Complete Blood Count (CBC) (Hemavet 950, Drew Scientific, USA)를 위해 사용되었으며, 샘플의 나머지는 혈청 화학 분석 (BS-400, Mindray, China)을 위해 사

용되었다. 혈액 분석을 통해 확인된 CBC와 혈청 분석의 모든 값은 기준 범위에 있었으며 이를 통해 Cas9이 발현되는 경우라도 상기 spCas9 소의 건강상 문제가 없다는 것이 확인되었다.

[2672] 본 발명자들은 SNU-Cas9-4 (암컷)로부터 난자를 확보하였으며, 상기 SNU-Cas9-2 (수컷)로부터 정자를 확보하였다.

[2673] 정자를 확보하기 위해, 50-55℃의 온수를 함유한 인공 질(an artificial vaginal)(Fujihira Industry, Tokyo, Japan)을 사용하여, 18 개월 된 한 수컷 형질 전환 가축에서 정액이 채취되었으며, 채취된 정액은 즉시 냉동실에 옮겨 얼려졌다.

[2674] OPTIXcell (IVM technologies, France)을 사용하여 정액이 50%:50%로 희석되었고 실온에서 10 분간 유지되었다. 그 후, 희석된 정액이 50%:50%로 다시 희석되었고, 정자의 농도가 5.0×10^7 /ml로 4℃에서 2시간 동안 유지되었다.

[2675] 농축 된 정자는 500ul의 정액 밀짚(semen straw)(IMV technologies, France)에 넣어졌고 짚 파우더(straw powder)(Fujihira Industry, Tokyo, Japan)로 밀폐 되었다. 상기 짚(straw)은 액체 질소 표면으로부터 5.0cm 위에서 30분 동안 동결되었고, 그 후 액체 질소 탱크에 던져 넣어졌다.

[2677] 생식세포의 확보 뿐만 아니라, SNU-Cas9-2(수컷) 및 SNU-Cas9-4(암컷)의 자연교배(natural breeding)에 의해 spCas9 유전자가 삽입된 계놈을 가지는 자손이 생산되었다.

[2679] **1-3-2. 형질전환 소의 계놈에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 삽입여부 확인**

[2680] **1-3-2-1. 형광 단백질 발현 확인**

[2681] spCas9 소의 세포에서 형광 단백질이 발현되는지 확인하기 위해, 상기 spCas9 소의 귀 피부 조직으로부터 일차 세포(primary cell)가 분리되고 배양되었다.

[2682] 일차 세포(primary cell)의 분리를 위해, 귀 피부 조직이 생검 편치(biopsy punch)에 의해 직경(diameter) 0.5mm 크기로 분리되었다. 상기 조직은 1% 페니실린/스트렙토마이신(1% Penicillin/Streptomycin)을 포함하는 PBS로 3회 이상 세척되었고, 수술용 블레이드(surgical blade)로 사능한 작게 절단 되었다. 절단된 조직은 콜라게나아제(Collagenase type IV, Gibco)와 함께 HBSS에서 37 °C에서 16 시간 동안 배양 되었다.

[2683] 1주 후, 피부 섬유아세포(skin fibroblasts)의 성장이 관찰되었고 배양 접시가 새로운 배양 배지(DMEM에 10% FBS, 1% NEAA, 100mM 베타-메르 캅토에탄올, 1% P/S 첨가)로 재충전(re-filled) 되었다.

[2684] 일차 세포(primary cell)가 합류(confluent)된 후 일부는 냉동 보관 되었으며, 일부는 냉동 보관 되지 않고 형광 현미경에 의해 관찰되었다.

[2685] 도 44(a)는 spCas9 소의 일차 세포에서의 적색 형광 단백질의 발현을 나타낸다.

[2686] 또한, 각 spCas9 소에서 적색 형광 단백질의 발현율(Expression ratio)이 확인되었으며, 이는 총 3회의 카운팅(counting)을 통해 100개의 세포에서 적색 형광 단백질이 발현되는 세포의 비가 계산 되었다. 각각의 spCas9 소의 적색 형광 단백질의 발현율은 표 12에 개시되어 있다.

[2688] spCas9 벡터가 적색 형광 단백질 유전자를 포함하도록 설계되었는바, 상기 결과를 통해 spCas9 유전자가 spCas9 소의 계놈에 삽입되었다는 것이 예측될 수 있다.

[2689] 다만, 본 발명자들은 각각의 spCas9 소의 계놈에 spCas9 및 Fat1 유전자의 삽입과 spCas9 및 Fat1의 발현에 대한 더욱 정확한 확인을 위해 DNA PCR 및 RT-PCR을 진행하였다.

[2691] **1-3-2-2. DNA PCR 및 RT-PCR 결과**

[2692] DNA extract kit (DNeasy Blood&Tissue kit 69506, Qiagen, Limburg, Netherlands)를 이용해 배양된 세포로부터 계놈 DNA가 추출되었으며, 추출된 DNA를 이용해 spCas9 및 Fat1에 특이적인 PCR 프라이머에 의해 PCR(Eppendorf Vapo Protect Mastercycler, Eppendorf, Germany)이 수행되었다.

[2693] DNA PCR 및 RT-PCR을 수행하기 위해 사용된 프라이머는 하기 표 13과 같다.

표 13

프라이머 종류	SEQ Name	SEQ ID NO	서열
spCas9-Forward	pr_spCas9_F_1	SEQ ID NO:17	GACAAGAAGTACAGCATCGG
spCas9-Reverse	pr_spCas9_R_1	SEQ ID NO:18	CAACCAGCTGTTTCGAGGAGA
Fat1-Forward	pr_Fat1_F_1	SEQ ID NO:19	AAACACGAAACAGGCGACCA
Fat1-Reverse	pr_Fat1_R_1	SEQ ID NO:20	TTTGTCGTTGGCCACGATTG
GAPDH-Forward	pr_GAPDH_F_2	SEQ ID NO:21	GGCGTGAACCACGAGAAGTA
GAPDH-Reverse	pr_GAPDH_R_2	SEQ ID NO:22	CCCTCCACGATGCCAAGT

[2696] 상기 PCR 산물은 DNA 마커가 있는 1% 아가로오스 젤(agarose gel)에 로딩(loded)되었다. 그 결과 DNA PCR 및 RT-PCR에 의해 spCas9 소의 게놈에 spCas9 유전자가 삽입된 것이 확인되었다.

[2697] 도 44의 (b)는 상기 spCas9 소를 이용한 DNA PCR 결과를 나타낸다 (M: 분자 마커, 1: SNU-Cas9-1(F0), 2: SNU-Cas9-2(F0), 3: SNU-Cas9-3(F0), 4: SNU-Cas9-4(F0), 5: 야생형 소, (+): 양성대조군(spCas9 DNAs), (-): 음성대조군 DNAs).

[2698] 도 44의 (c)는 상기 spCas9 소를 이용한 RT-PCR 결과를 나타낸다 (M: 분자 마커, 1: SNU-Cas9-1(F0), 2: SNU-Cas9-2(F0), 3: SNU-Cas9-3(F0), 4: SNU-Cas9-4(F0), 5: 야생형 소, (-): 음성대조군 DNAs).

[2700] **1-3-2-3. 서열 분석 (RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입될 수 있는 좌위)**

[2701] 나아가, 본 발명자들은 spCas9 소(F0)의 서열분석을 통해 spCas9 유전자의 삽입을 확인하였다.

[2703] 서열 분석 결과는 하기 표 14에 개시되어 있다.

표 14

소의 게놈 염색체	좌위 번호	5'유전자	3'유전자
1	1-3	KCNAB1	GMPS
	1-4	CHAF1B	PIGP
2	2-2	HNRNPR	LUZP1
7	7-3	MRPL22	HAVCR1
8	8-1	STMN4	CHRNA2
14	14-2	TGS1	LYN
16	16-1	H3F3C	TFB2M
18	18-2	CLIP3	OVOL3
X	X-4	MGC134232	PHKA2

[2706] 더불어, 상기 표에 기재된 좌위 외에도 SEQ ID GJ059944.1 위치에 spCas9 유전자가 삽입될 수 있다는 것이 확인되었다.

[2707] 본 실험을 통해, spCas9을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입된 게놈을 가지는 형질전환 소 및/또는 형질전환 세포에서 spCas9이 계속적으로 발현되더라도 소가 생존할 수 있다는 것이 확인되었다.

[2709] **1-3-3. 형질전환 소의 필수 유전자(essential gene)의 발현양 변화 확인**

[2710] spCas9 형질전환 소(F0)에서 발현되는 spCas9과 Fat1이 필수 유전자(essential gene)의 발현에 영향을 미치지 않는지 확인하기 위해서, RNA 시퀀싱(RNA seqencing; RNA-seq) 분석이 수행되었다.

[2711] RNA-seq 분석을 위해, spCas9 형질전환 소의 일차 세포로부터 RNA가 추출 되었다

[2712] RNA 품질은 Agilent RNA 6000 나노 키트 (Agilent Technologies, CA)에서 rRNA 밴드 무결성(integrity) 분석을 통해 평가되었다.

[2713] cDNA 라이브러리 제작에 앞서, poly (A) mRNA를 풍부하게하기 위해서 전체 RNA의 2ug과 Oligo(dT)가 있는 자기 구슬이 사용되었다.

[2714] 이어서, 정제 된 mRNA가 단편(short fragment) 로 파쇄되었고, 이중 가닥 cDNA가 즉시 합성되었다.

- [2715] 합성된 cDNA는 말단-수선(end-repair) 및 폴리(A) 첨가되었고, TruSeq Stranded mRNA 샘플 준비 키트 (Illumina, CA)를 사용하여 시퀀싱 어댑터(sequencing adapter)와 연결되었다.
- [2716] BluePippin 2 % 아가 로즈 겔 카세트(BluePippin 2% agarose gel cassette)(Sage Science, MA)에 의해 자동으로 정제된 적합한 단편(suitable fragments)은 PCR 증폭 용 주형으로 선택되었다.
- [2717] 최종 라이브러리 크기와 품질은 Agilent High Sensitivity DNA 키트 (Agilent Technologies, CA)를 사용하여 전기 영동으로 평가되었으며, 단편은 350-450bp 인 것으로 밝혀졌다.
- [2718] Illumina HiSeq2500 시퀀서(Illumina, CA)에 의해 상기 제작된 라이브러리가 시퀀싱 되었다.
- [2719] 시퀀싱 결과에 따라 확인된 낮은 품질의 판독 값은 제작사의 스크립트에 의해 필터링 되었다. 필터링 된 판독은 정렬기(aligner) STAR v.2.3.0e (Dobin et al. 2013)를 사용하여 인간 참조 게놈 (Ensembl release 72, Flicek P. 외., 2013)에 매핑(mapping)되었다.
- [2721] 유전자 발현 수준은 Ensembl release 72의 유전자 주석 데이터베이스를 사용하여 Cufflinks v2.1.1 (Trapnell C. et al, 2010)로 측정되었다.
- [2722] 비-코딩 유전자 영역(non-coding gene region)은 마스크 옵션(mask option)으로 제거되었다. 측정의 정확도를 높이기 위해, 다중 판독 보정 및 fragbias-보정 옵션이 적용되었고, 다른 모든 옵션은 기본값으로 설정되었다.
- [2723] 차별적인 발현 분석을 위해, 유전자 레벨 카운트 데이터(gene level count data)는 양측 서열을 고려하여 "-m intersection-nonempty" 옵션 및 -r 옵션이있는 HTSeq-count v0.5.4p3 (Anders S. 외, 20140) tool을 사용하여 생성되었다. 계산된 판독 횟수 데이터에 기초하여, DEG는 TCC (Sun J. 외, 2013) 라 불리는 R 패키지를 사용하여 확인되었다. 태그 수 데이터를 비교하기 위하여, TCC 패키지는 강력한 정규화 전략을 적용하며, 정규화 인자는 반복 DEGES/edgeR 방법을 사용하여 계산되었다. 기본 매개 변수 설정된 R 패키지의 p.adjust 함수를 사용하여, Q 값은 p 값을 기반으로 계산되었다. 차별적으로 발현된 유전자는 qvalue threshold가 0.05 미만인 것으로 확인되었다.
- [2724] Gene Ontology (GO) 데이터베이스는 생물학적 프로세스 (BP), 세포 구성 요소 (CC) 및 분자 기능 (MF)의 3 가지 범주에 따라 유전자를 분류하고, 선별된 유전자의 기능을 예측한다.
- [2725] DEG 분석에서 확인된 유전자를 특성화하기 위해, Fisher 's exact test (Fisher R. A., 1922)를 사용하여 GO 기반 추세 테스트가 수행되었다. P값 <0.001 (P-values<0.001)은 통계적으로 유의하다고 간주되었다.
- [2727] 진술한 방법에 의한 RNA-seq 분석 결과, 발현양에 변화가 있는 유전자가 기재된 리스트에 필수 유전자 (essential gene)가 포함되지 않는다는 것이 확인되었다. 즉, spCas9의 발현에 의해 필수 유전자(essential gene)가 영향을 받지 않는다는 것이 확인되었다.
- [2728] 하기 표 15는 spCas9 형질전환 소의 세포에서 발현양의 변화가 큰 유전자 10개(발현양 증가한 유전자 상위 5개 및 발현양 감소한 유전자 상위 5개)를 개시한다.

표 15

[2729]

Gene access number	gene	P value	Fold change	
ENSBTAG000000021211	DPT	0.0009	5.42	↑
ENSBTAG00000000745	AQP1	0.0026	3.63	↑
ENSBTAG000000007740	BMK	0.0001	3.63	↑
ENSBTAG000000012623	NDP	0.0008	3.56	↑
ENSBTAG000000002123	MYO3A	0.0001	3.38	↑
ENSBTAG000000014132	SNED1	0.0009	-5.16	↓
ENSBTAG000000015441	ACTB	0.0001	-4.45	↓
ENSBTAG000000005353	DES	0.0001	-4.41	↓
ENSBTAG000000025210	COL4A2	0.0001	-4.39	↓
ENSBTAG000000012849	COL4A1	0.0001	-4.16	↓

[2730] 1-4. 형질전환 소의 자손 소 제작

[2731] 1-4-1. 형질전환 소의 자손 소

- [2732] **1-4-1-1. 체외 수정(in vitro fertilization, IVF)을 통한 자손 소 생산**
- [2733] 도축장 유래 또는 살아있는 소의 난소에서 난자가 확보되었으며, 현미경 검사를 통해 난구세포가 잘 붙어 있는 난자가 선별되었다.
- [2734] 선별된 난자는 조직배양 배지 (TCM199)(18-낙성대 R&D센터)에서 22시간 동안 성숙 되었다. 상기 조직배양 배지는 10% 혈청과 에스트로젠, 상피성장인자, 1% 항생제가 첨가되어 사용된다.
- [2735] 22시간 동안 성숙된 난자는 동결 용해된 spCas9 소 (F0)의 정자와 수정되었다. 수정 후 약 16시간 이후에 난구 세포가 제거되었고, 수정된 배아는 현미경을 통해 평가되었다.
- [2736] 평가된 배아 중 생존 능이 있는 배아는 체외 배양 배지로 옮겨졌다. 상기 배양 배지는 무혈청 배지 (Islam et al., Theriogenology, 2011)가 이용되었다.
- [2737] 선별된 배아는 1단계 배지에서 약 4일간 배양 되었고, 2단계 배지에서 추가적으로 3일간 더 배양되었다. 그 후, 배반포의 발달이 평가되었다.
- [2738] 발달된 배아 중, 적색 형광 단백질이 발현되는 배아가 확인되었다. 본 발명자들은 적색 형광 단백질이 발현되는 배아는 Cas9이 발현되는 배아라는 것을 확인하였으며, 적색 형광 단백질이 발현되는 배아를 선별하여 대리모에 이식하였다. 이를 통해 spCas9 을 발현하는 송아지(F1)가 생산되었다.
- [2740] **1-4-1-2. 자연 교배 및 체세포 핵 이식을 통한 자손 소 생산**
- [2741] spCas9 암컷 소(F0)와 spCas9 수컷 소(F0)의 자연 교배를 통해 spCas9을 발현하는 송아지(F1)가 태어났다.
- [2742] spCas9을 발현하는 송아지(F1)의 숫자를 늘리기 위해, 체외 수정 방법 이외에 체세포 핵 이식 방법이 이용될 수 있다. 이하에서는 체세포 핵 이식 방법에 대해 설명한다.
- [2743] 도축장에서 얻어진 난자가 약 20 내지 24시간 배양 된 후, 난구 세포가 효소(하이알유로네이즈)와 물리적 방법으로 제거되었으며, 제 1 극체와 핵이 미세 피펫으로 제거되었다.
- [2744] 또한, spCas9을 발현하는 송아지(F1)의 귀 피부 섬유아세포(ear skin fibroblasts)가 배양 배지에서 100%까지 배양되었다.
- [2745] 전기적 충격 방법을 통해, 핵이 제거된 난자는 배양된 송아지(F1)의 귀 피부 섬유아세포와 융합되었다.
- [2746] 융합된 배아는 칼슘과 6-DMAP을 통하여 활성화 되었다. 활성화 후 살아 있는 복제 배아는 전술한 무혈청 배지에서 배양 되었다.
- [2748] **1-4-2. 형질전환 자손 소의 필수 유전자(essential gene)의 발현양 변화 확인**
- [2749] 전술한 방법에 의한 형질전환 자손 소의 RNA-seq 분석 결과, 발현양에 변화가 있는 유전자가 기재된 리스트에 필수 유전자(essential gene)가 포함되지 않는다는 것이 확인되었다. 즉, 형질전환 자손 소의 경우에도 spCas9 의 발현에 의해 필수 유전자(essential gene)가 영향을 받지 않는다는 것이 확인되었다.
- [2750] **2. 형질전환 소에서 발현되는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 이용한 2차 유전자 편집 - 녹아웃**
- [2751] 본 발명자들은 전술한 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 발현하는 형질전환 소(spCas9 소)로부터 유래된 체세포 및 수정란에서 타겟 유전자(target gene)의 녹아웃(knockout)이 효과적으로 일어날 수 있다는 것을 확인하는 실험을 진행하였다. 도 45는 spCas9 소의 세포의 계놈에서 타겟 유전자를 녹아웃 시키는 방법을 도시한다.
- [2753] spCas9 형질 전환 소의 세포에서 Cas9의 활성 여부를 확인하기 위해, 웹 사이트(www.rgenome.net)의 프로토콜을 사용하여 다양한 타겟 유전자에 대한 sgRNA를 발현시킬 수 있는 플라스미드 벡터가 합성되었다.
- [2754] sgRNA를 발현시킬 수 있는 플라스미드 벡터를 제작하는 방법은 전술한 바 있어, 구체적인 설명은 생략한다.
- [2755] 하기 표 16은 상기 다양한 타겟 유전자(PRNP 유전자, Beta-lactoglobulin(BLG) 유전자, Retinoblastoma 1(Rb1) 유전자, Nanog 유전자, TP53 유전자, IFNT 유전자 및 beta-casein(BCN) 유전자)에 대한 sgRNA 서열을 나타낸다.

표 16

[2757]

sgRNA 종류	SEQ Name	SEQ ID NO	서열
PRNP 유전자 타겟팅 sgRNA	gn_PRNP_1	SEQ ID NO:23	AAAAACCAACATGAAGCATGTGG
BLG 유전자 타겟팅 sgRNA	gn_BLG_1	SEQ ID NO:24	CCCCTGAGAGTGTATGTGGAGG
Rb1 유전자 타겟팅 sgRNA	gn_Rb1_1	SEQ ID NO:25	TGACCTCGCCTGGTGTTCGAGG
Nanog 유전자 타겟팅 sgRNA	gn_Nanog_1	SEQ ID NO:26	ACCACTGTCCCCTGTGTGGAGG
TP53 유전자 타겟팅 sgRNA	gn_TP53_1	SEQ ID NO:27	GCGCGGACGCGGGTGCCGGGCGG
IFNT 유전자 타겟팅 sgRNA	gn_IFNT_1	SEQ ID NO:28	AGTGGAGAGTCTGTTCATTGGG
BCN 유전자 타겟팅 sgRNA	gn_BCN_1	SEQ ID NO:29	TTGCAAGGCCAGAGCCACCAGG

[2758]

2-1. 체세포에서 녹아웃

[2759]

본 발명자들은 spCas9 소(F0)의 체세포에서 spCas9이 발현되고 타겟 유전자의 녹아웃이 일어날 수 있다는 확인하기 위해서 해당 분야의 기술자에게 잘 알려진 DNA PCR(Eppendorf Vapo Protect Mastercycler, Eppendorf, Germany)을 이용한 T7E1 분석(T7 endonuclease 1 assay)을 진행하였다.

[2760]

전술한 각 sgRNA를 발현시킬 수 있는 플라스미드 벡터가 spCas9 형질전환 소로부터 분리된 섬유아세포에 트랜스펙션 되었으며, 트랜스펙션 된 일차 세포들은 38 °C, 5 % CO₂ 조건의 배양기에서 10일동안 더 배양되었다.

[2761]

48 시간 후 배양 된 각 세포가 수확되었으며, DNA extract kit (DNeasy Blood & Tissue kit 69506, Qiagen, Limburg, Netherlands)를 이용해 상기 각각의 트랜스펙션된 세포로부터 각 세포의 게놈 DNA가 추출되었다.

[2762]

추출된 각각의 DNA는 PCR 튜브에 담겨졌으며, Direct PCR lysis kit를 이용하여, 버퍼 10 µl가 넣어졌고, proteinase K 0.5 µl가 추가적으로 넣어졌다.

[2763]

각각의 DNA가 담긴 PCR 튜브는 PCR 기계에서 56°C 조건에서 180분 동안 처리되었고, 85°C 조건에서 15분 동안 처리된 후, PRNP forward primer 및 reverse primer를 넣고 PCR이 수행되었다. PCR 수행 후 10-15 µl 의 PCR product가 얻어졌다.

[2764]

상기 PCR product는 T7 endonuclease I(T7E1 효소) 0.2 µl와 buffer 2 µl (최종 volume 20 µl)와 혼합되어 37°C 조건에서 약 30분간 반응되었고, 반응에 따른 생성물은 전기 영동되었다.

[2765]

전기 영동 결과, 상기 일차 세포에 존재하는 전술한 모든 타겟 유전자(PRNP 유전자, Beta-lactoglobulin(BLG) 유전자, Retinoblastoma 1(Rb1) 유전자, Nanog 유전자, P53 유전자 및 beta-casein(BCN) 유전자)에 돌연변이가 일어난 것이 확인되었다.

[2766]

도 46의 (a)는 DNA PCR product에 T7E1 효소 처리 후 spCas9 소의 섬유아세포에서 PRNP 유전자, Beta-lactoglobulin(BLG) 유전자, Retinoblastoma 1(Rb1) 유전자, Nanog 유전자, P53 유전자 및 beta-casein(BCN) 유전자의 전기 영동 결과를 나타낸다.

[2768]

하기 표 17은 각 타겟 유전자의 인텔을 확인하기 위한 DNA PCR용 프라이머를 개시한다.

표 17

[2769]

타겟 유전자	프라이머 종류	SEQ Name	SEQ ID NO	서열
PRNP 유전자	Forward	in_pr_PRNP_F_1	SEQ ID NO:30	GCAAGAAGCGACCAAAACCT
	Reverse	in_pr_PRNP_R_1	SEQ ID NO:31	GGTGCATGTTTCACGATAG
BLG 유전자	Forward	in_pr_BLG_F_1	SEQ ID NO:32	TTAAAGGCCGTGTCTCCAGT
	Reverse	in_pr_BLG_R_1	SEQ ID NO:33	GAAAGCCCTGGATAAGCAGC
Rb1 유전자	Forward	in_pr_Rb1_F_1	SEQ ID NO:34	CCCCACCAACTGAGTAGAA
	Reverse	in_pr_Rb1_R_1	SEQ ID NO:35	GATTCCAGAATGAGGGAGCT
Nanog 유전자	Forward	in_pr_Nanog_F_1	SEQ ID NO:36	ACCTACCATCTCGCTCTGAG
	Reverse	in_pr_Nanog_R_1	SEQ ID NO:37	ACCAAGAATCGAACCCAGGC
TP53 유전자	Forward	in_pr_TP53_F_1	SEQ ID NO:38	CTTCAGCCTTTGCTTTTTG
	Reverse	in_pr_TP53_R_1	SEQ ID NO:39	TTCCGGTCGTCCAATACTC
IFNT 유전자	Forward	in_pr_IFNT_F_1	SEQ ID NO:40	TCTTCCCATGGCTTTTGTG
	Reverse	in_pr_IFNT_R_1	SEQ ID NO:41	TGGAGATGATAAGAGCCCTC

BCN 유전자	Forward	in_pr_BCN_F_1	SEQ ID NO:42	TGGCTGGCAGTGAACATTA
	Reverse	in_pr_BCN_R_1	SEQ ID NO:43	AGGGATTGATGGTACAGATGG

- [2770] 또한, 서열분석을 통해 타겟 유전자인 PRNP 유전자가 녹아웃 된 것이 확인되었다. 도 46의 (b)는 spCas9 소의 서열분석을 통한 PRNP 유전자의 인델을 나타낸다.
- [2772] 본 실험을 통해, spCas9 소의 체세포에서 spCas9이 발현될 수 있고, 체세포 내에서 크리스퍼/카스9 시스템 (CRISPR/Cas9 system)의 작동에 의해 타겟 유전자의 녹아웃이 일어날 수 있다는 것이 확인되었다.
- [2774] **2-2. 체외 수정을 통해 생산된 F1 수정란에서 녹아웃**
- [2775] 본 발명자들은 spCas9 소의 생식세포를 이용하여 체외 수정을 통해 생산된 수정란에서 spCas9이 발현될 수 있고, 발현된 spCas9에 의해 타겟 유전자의 녹아웃이 일어날 수 있다는 것을 확인하기 위해, 하기의 실험을 진행하였다.
- [2777] **2-2-1. RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 발현하는 수정란 생산**
- [2778] SNU-Cas9-2로부터 얻은 정자와 야생형 난자가 체외 수정되어 수정란 (뿔/또는 배아)가 생성되었다. 소로부터 생식세포를 얻는 방법 및 체외수정 방법은 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [2779] 체외 수정된 수정란 (뿔/또는 배아)은 화학적으로 정의된 배양 배지에서 7일 동안 배양되었으며, 7일 후 일부 배반포(blastocysts)는 모자이크 없이(without mosaicism) 적색 형광 단백질을 발현하는 것이 형광 현미경 (Nikon, Tokyo, Japan)을 통해 확인되었다.
- [2780] 도 47의 (a)는 spCas9 소를 이용해 생산된 상실기 배아 및 배반포에서 적색 형광 단백질의 발현을 나타낸다 (도 47의 (a) 참고, (a-1): 가시광선 조건에서의 상실기 배아, (a-1'): 형광 조건에서의 상실기 배아, (a-2) 가시광선 조건에서 배반포, (a-2') 형광 조건에서 배반포).
- [2781] 즉, 상기 spCas9 수정란의 게놈에 spCas9 유전자가 삽입된 것이 시각적으로 확인되었다.
- [2783] **2-2-2. 배반포에 sgRNA 벡터 미세주입 결과**
- [2784] 전술한 SNU-Cas9-2의 정자를 이용한 체외 수정에 의해 생산된 배반포에 PRNP 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 mRNA 형태의 sgRNA 가 미세주입되었다. 미세주입 방법은 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.
- [2786] PRNP 유전자의 인델은 DNA PCR (Eppendorf Vapo Protect Mastercycler, Eppendorf, Germany) 을 통해 확인되었다.
- [2787] DNA PCR 분석을 위해 사용된 PRNP 프라이머 (Forward primer- SEQ ID NO:30, Reverse primer- SEQ ID NO:31)는 표 17에 개시된 바와 같다.
- [2788] 구체적인 인델 확인을 위한 DNA PCR 분석 방법은 하기에 개시된 바와 같다.
- [2789] 체외 수정을 통해서 얻어진 배반포에 sgRNA가 미세주입 되었고, 최종 선별된 8개의 배반포에서 추출된 DNA가 PCR 튜브에 담아졌다. Direct PCR lysis kit를 이용하여, 버퍼 10 µl가 넣어졌고, proteinase K 0.5 µl가 추가적으로 넣어졌다.
- [2790] PCR 튜브는 PCR 기계에서 56℃ 조건에서 180분 동안 처리되었고, 85℃ 조건에서 15분동안 처리된 후, PRNP forward primer 및 reverse primer를 넣고 PCR이 수행되었다. PCR 수행 후 10-15 µl 의 PCR product가 얻어졌다.
- [2791] 상기 PCR product는 T7 endonuclease I(T7E1 효소) 0.2 µl와 buffer 2 µl (최종 부피 20 µl)와 혼합되어 37℃ 조건에서 약 30분간 반응되었고, 반응에 따른 생성물은 전기 영동되었다.
- [2792] 전기 영동 결과, 각각의 배반포에서 추출된 DNA의 PRNP 유전자에서 인델 발생이 확인되었다
- [2793] 도 47의 (b)는 체외 수정에 의해 생산된 배반포에 sgRNA(PRNP 유전자를 타겟) 미세 주입 후, T7E1 처리를 통해 PRNP 유전자의 인델 발생을 확인한 것이다 (도 47의 (b) 참고, 위:(-)T7E1, 아래: (+)T7E1, 1: 마커 유전자, 2 내지 9:sgRNA가 미세주입된 배반포, 10: 야생형 수정란, 11: PRNP 유전자).
- [2795] 또한, PRNP 유전자의 인델은 배반포의 게놈 서열분석을 통해 확인되었다.

- [2796] 도 47의 (c)는 체외 수정에 의해 생산된 배반포에 sgRNA(PRNP 유전자 타겟) 미세 주입 후, 상기 배반포의 서열 분석을 통한 PRNP 유전자의 인텔 결과를 나타낸다.
- [2798] 전술한 몇몇 실험을 통해, spCas9 소의 생식세포를 이용하여 생성된 수정란에서 spCas9이 발현될 수 있고, 발현된 spCas9에 의해 타겟 유전자의 녹아웃이 일어날 수 있다는 것이 확인되었다.
- [2801] **2-3. 자연 교배를 통해 생산된 자손 소의 세포에서 녹아웃**
- [2802] 본 발명자들은 spCas9 소의 자연교배에 의해 태어난 송아지의 세포에서도 Cas9이 발현된다는 점을 확인하기 위해, 상기 송아지의 일차 세포를 분리하여 하기의 실험을 진행하였다.
- [2803] SNU-Cas9-4(암컷)과 SNU-Cas9-2(수컷)의 자연 교배에 의해 송아지(SNU-Cas9-F1)가 태어났으며, SNU-Cas9-F1에서 상기 송아지로부터 일차 세포(primary cell)가 분리되었다. 도 48의 (a)는 상기 일차 세포에서 적색 형광 단백질이 균질하게 발현되는 것을 나타낸다.
- [2804] DNA 추출 키트 (DNeasy Blood & Tissue kit 69506, Qiagen, Limburg, Netherlands)에 의해 상기 일차 세포로부터 DNA가 추출되었고, 추출된 DNA를 이용해 DNA PCR이 수행되었으며, Cas9 및 Fat1에 대한 DNA PCR 결과는 양성으로 확인되었다.
- [2805] 도 48의 (b)는 SNU-Cas9-F1 송아지의 일차 세포를 이용한 DNA PCR 결과를 나타낸다 (도 48의 (b) 참고, 1: 사이즈 마커, 2: spCas9 유전자, 3: 음성 대조군, 4: Fat1 유전자, 4: 음성 대조군).
- [2806] 상기 결과들을 통해, SNU-Cas9-F1의 일차 세포가 F0 세대의 형질전환 유전자를 포함한다는 것이 확인되었다.
- [2808] 나아가, 본 발명자들은 spCas9 소의 자연교배에 의해 태어난 송아지(F1)의 세포에서도 타겟 유전자의 녹아웃이 일어날 수 있다는 것을 확인하기 위해, sgRNA를 송아지의 일차 세포에 트랜스펙션 시키는 실험을 진행하였다.
- [2809] 구체적으로, PRNP 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 sgRNA가 트랜스펙션 된 일차 세포로부터 DNA가 추출된 후, 추출된 DNA가 PCR 튜브에 담겨졌다.
- [2810] Direct PCR lysis kit를 이용하여, 버퍼 10 μ l가 넣어졌고, proteinase K 0.5 μ l가 추가적으로 넣어졌다.
- [2811] PCR 튜브는 PCR 기계에서 56 $^{\circ}$ C 조건에서 180분 동안 처리되었고, 85 $^{\circ}$ C 조건에서 15분동안 처리된 후, PRNP forward primer 및 reverse primer를 넣고 PCR이 수행되었다. PCR 수행 후 10-15 μ l 의 PCR product가 얻어졌다.
- [2812] 상기 PCR product는 T7 endonuclease I 0.5 μ l 내지 1 μ l 과 buffer 2 μ l (최종 volume 20 μ l)와 혼합되어 37 $^{\circ}$ C 조건에서 약 30분간 반응되었고, 반응에 따른 생성물은 전기 영동되었다.
- [2813] 전기 영동 결과, PRNP 유전자에 인텔이 발생한 것이 확인되었다.
- [2814] 도 49는 PRNP 유전자를 타겟팅하는 sgRNA가 트랜스펙션 된 SNU-Cas9-F1 일차 세포의 DNA PCR을 통한 PRNP 유전자의 인텔 확인 결과를 나타낸다 (도 49 참고, 1: 사이즈 마커, 2: 야생형 소, 3: SNU-Cas9-2소, 4: SNU-Cas9-F1, 5: 음성 대조군, 6: 양성 대조군(PRNP 유전자)).
- [2815] 상기 PRNP 유전자의 돌연변이 확인을 위한 DNA PCR 분석을 위해 사용된 PRNP 프라이머는 표 17에 개시된 바와 같다.
- [2817] 본 실험을 통해 형질전환 암컷 소의 생식 능력 및 자손에 대한 전이 유전자의 생식선 전달(germline transmission)이 확인되었다.
- [2818] 또한, 본 실험을 통해 형질전환 자손에서도 spCas9이 발현될 수 있고, 상기 발현된 spCas9이 세포 또는 동물로 제공된 가이드 핵산과 함께 복합체를 이루어 타겟 유전자(target gene)를 녹아웃 시킬 수 있다는 것이 확인되었다.
- [2819] 상기 타겟 유전자(target gene)의 종류에 따라 다양한 효과가 나타날 수 있다. 예를 들어, 본 실험에서 처럼 PRNP 유전자를 타겟 유전자로 한 경우, 광우병 저항성 소가 생산될 수 있다.
- [2820] 다른 예를 들어, 본 실험에서 처럼 β -lactoglobulin 유전자를 타겟 유전자로 한 경우, 알러젠(allergen)이 제거된 우유를 얻을 수 있다.
- [2821] 즉, spCas9이 발현될 수 있는 형질전환 소는 밀크(milk) 단백질 공학에 이용될 수 있다.

[2823] **3. 형질전환 소에서 발현되는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 이용한 2차 유전자 편집 - 핵인**

[2824] 본 발명자들은 전술한 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 발현하는 형질전환 소(spCas9 소)(F0) 로 부터 유래된 세포에서 핵인이 효과적으로 일어날 수 있다는 것을 확인하기 위해, spCas9-2A-GFP를 가지고 있는 소의 태아로부터 일차세포를 확보하였다. 확보된 spCas9-2A-GFP세포에서 GFP가 발현되고는 것이 관찰되었고, GFP 위치를 타겟으로하여 mcherry 유전자를 핵인하는 실험을 진행하였다.

[2825] 구체적으로, Cas9이 발현되고 있는 세포에 두 가지 방법, 즉 1) HITI (3-2. HITI를 위한 세포 내 벡터 주입)와 2)HDR (3-3. HDR을 위한 세포 내 벡터 주입)을 이용하여 핵인 실험이 진행되었다.

[2827] **3-1. 벡터 구성**

[2828] HDR과 HITI 핵인 실험을 위해 두 종류의 도너 벡터가 제작되었다.

[2829] 도 50의 (a)는 HITI를 위한 도너 벡터의 일부를 도시한다.

[2830] HITI를 위한 도너 벡터는 핵인 하고 싶은 도너 폴리뉴클레오타이드의 5' 말단에 제1 타겟 사이트를 포함하며 3' 말단에 제2 타겟 사이트를 포함하는 구성일 수 있다. 상기 HITI를 위한 도너 벡터의 서열은 SEQ ID NO:44 와 같다(SEQ Name:HITI_RFP donor_1.) 상기 제1 타겟 사이트 및 상기 제2 타겟 사이트는 GFP 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 sgRNA와 결합될 수 있으며 인위적 뉴클레아제에 의해 잘릴 수 있다.

[2831] 도 50의 (b)는 HDR을 위한 도너 벡터의 일부를 도시한다.

[2832] HDR을 위한 도너 벡터는 핵인 하고 싶은 도너 폴리뉴클레오타이드의 5'말단에 제1 상동 염기서열(도 50의 (b)에 기재된 5'-HR) 을 포함하며 3' 말단에 제2 상동 염기서열(도 50의 (b)에 기재된 3'-HR)을 포함하는 구성일 수 있다. 상기 제1 상동 염기서열 및 상기 제2 상동 염기서열은 소의 알부민 유전자에 포함된 일부 서열과 동일하다.

[2833] 상기 HDR을 위한 도너 벡터는 SEQ ID NO:45 과 같다(SEQ Name:HDR_RFP donor_1).

[2834] 본 실험에서 사용된 HDR을 위한 도너 벡터 내의 상기 제1 상동 염기서열은 상기 SEQ ID NO:45의 1 ~ 532 번째의 염기 서열과 같으며, 상기 제2 상동 염기서열은 상기 SEQ ID NO:45의 2585 ~ 3044 번째의 염기 서열과 같다. 도 58은 상기 HDR을 위한 도너 벡터의 서열(SEQ ID NO:45)을 도시하며, 전체 서열 중 강조된 부분은 상기 제1 상동 염기서열과 상기 제2 상동 염기서열을 나타낸다.

[2836] **3-2. HITI를 위한 세포 내 벡터 주입**

[2837] spCas9 소(F0)로부터 얻어진 일차 세포가 전술한 방법에 의해 분리되고 배양되었다. 배양된 상기 spCas9 소(F0)의 일차세포가 트립신에 의해 분리되었다. 분리된 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 개의 세포에 electroporation 방법을 통해 GFP에 특이적으로 결합 할 수 있는 sgRNA 1 μ g과 HITI를 위한 도너 벡터 1 μ g 이 트랜스펙션 되었다. Neon이라는 장비를 이용하여 상기 트랜스펙션이 유도 되었고, 트랜스펙션의 조건은 장비에 포함된 프로그램 16번이 적용되었다. 트랜스펙션 후에 12시간이 지나고 신선한 배지로 교체되었고, 항생제 및 선별 마커를 이용하여 mcherry 유전자가 핵인 된 세포가 확인되었다.

[2839] 도 51의 (a)는 mcherry 유전자의 핵인을 확인한 DNA PCR 결과를 나타낸다. 상기 도 51의 (a)의 1번 라인(lane)은 마커 유전자, 2 번 라인은 상기 spCas9소의 genomic DNA (대조군), 3번 라인은 HITI를 위한 도너 벡터가 트랜스펙션 된 세포, 4번 라인은 음성 대조군이다. 상기 DNA PCR을 위한 Forward 프라이머의 서열은 SEQ ID NO:46 (SEQ Name: HITI_pr_RFP_F_1)이며, Reverse 프라이머의 서열은 SEQ ID NO:47 (SEQ Name: HITI_pr_RFP_R_1)이다.

[2840] 도 51의 (b)는 HITI를 위한 도너 벡터가 트랜스펙션된 spCas9 소의 일차세포에서 mcherry의 발현을 확인한 결과를 나타낸다.

[2842] **3-3. HDR을 위한 세포 내 벡터 주입**

[2843] 전술한 방법과 동일하게 spCas9 소(F0)로부터 얻어진 일차세포가 배양되고 분리 되었다.

[2844] 분리된 $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$ 개의 세포에 electroporation 방법을 통해 GFP 유전자에 특이적으로 결합할 수 있는 sgRNA 1 μ g 과 HDR을 위한 도너 벡터 1 μ g 이 트랜스펙션 되었다. Neon이라는 장비를 이용하여 상기 트랜스펙션이 유도 되었고, 트랜스펙션의 조건은 장비에 포함된 프로그램 16번이 적용되었다. 트랜스펙션 후에 12시간이

지나고 배지가 교체되었고, 항생제 및 선별 마커를 이용하여 mcherry 유전자가 녹인 된 세포가 확인되었다.

[2846] 도 52의 (a)는 mcherry 유전자의 녹인을 확인한 DNA PCR 결과를 나타낸다. 상기 도 52의 (a)의 1번 레인(lane)은 마커 유전자, 2 번 레인은 상기 spCas9소의 genomic DNA (대조군), 3번 레인은 HDR을 위한 도너 벡터가 트랜스펙션 된 세포, 4번 레인은 음성 대조군이다. 상기 DNA PCR을 위한 Forward 프라이머의 서열은 SEQ ID NO:48 (SEQ Name: HDR_pr_RFP_F_1)이며, Reverse 프라이머의 서열은 SEQ ID NO:49 (SEQ Name: HDR_pr_RFP_R_1)이다.

[2847] 도 52의 (b)는 HDR을 위한 도너 벡터가 트랜스펙션된 spCas9 소의 일차세포에서 mcherry의 발현을 확인한 결과를 나타낸다.

[2849] 본 실험을 통해 형질전환 소의 세포에서 spCas9이 발현될 수 있고, 상기 발현된 spCas9이 세포로 제공된 가이드 핵산과 함께 복합체를 이루어 타겟 유전자에 도너 폴리뉴클레오타이드를 녹인 시킬 수 있다는 것이 확인되었다.

[2850] 타겟 유전자의 종류에 따라 다양한 효과가 나타날 수 있다. 예를 들어, β -casein 유전자를 타겟 유전자로 하는 경우, 도너 폴리뉴클레오타이드의 종류에 따라 형질전환 소의 우유에서 다양한 단백질이 발현될 수 있다.

[2852] **3-4. 도너가 녹인된 spCas9의 일차세포를 이용한 체세포 핵 이식**

[2853] 본 발명자들은 전술한 HDR 및 HITI 방법을 통해 제작된 일차세포를 이용해 체세포 핵 이식을 하였다. 체세포 핵 이식 방법에 대한 설명은 전술한 바 있어 구체적인 설명은 생략한다.

[2854] 상기 체세포 핵이식을 통해 mcherry가 발현되는 배아가 얻어진 것이 확인되었다.

[2855] 도 53은 mcherry 유전자가 녹인된 계놈을 가지는 spCas9 소의 일차세포를 이용한 체세포 핵이식을 통해 생성된 배아에서 mcherry가 발현되는 것을 나타낸다.

[2856] 목적으로하는 다른 유전자를 포함하는 도너 벡터를 이용하여 전술한 실험 방법과 동일한 실험을 할 수 있기 때문에, HDR/HITI 방법을 통하여 목적 단백질을 암호화하는 유전자가 녹인된 다양한 종류의 세포가 정확히 만들어질 수 있다. 이를 활용하여 목적 단백질을 발현하는 소가 대량 생산될 수 있다.

[2858] **[실험예 5] RNA-가이드 엔도뉴클레아제 및 가이드 핵산을 발현하는 형질전환 소**

[2859] **1. RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터 제작**

[2860] 증폭된 spCas9 유전자, 베타-락토글로불린 유전자(β -lactoglobulin gene)(BLG gene)를 타겟팅(targeting) 하는 sgRNA 및 적색 형광 단백질 유전자를 이용하여 최종 발현 벡터(final expression vector)(이하, spCas9-sgRNA 벡터)가 제작되었다.

[2861] 도 54는 spCas9 및 sgRNA를 발현 시키기 위한 최종 발현 벡터의 일부를 도시한다.

[2862] 최종 발현 벡터에 포함된 sgRNA의 서열은 표 16에 개시된 SEQ ID NO:24와 같다.

[2864] **2. 배아 제작(MI)**

[2865] 소의 계놈에 상기 튜박스를 삽입하는 방법 및 실험 조건은 전술한 목적 단백질 유전자를 삽입하는 방법 및 실험 조건과 동일한 바, 상기 spCas9 및 sgRNA가 삽입된 계놈을 가지는 배아를 제작하는 방법을 간략하게 설명한다.

[2866] 전술한 바와 같이, 소의 난자는 난소로부터 COCs를 분리 및 세척하여 수집되었고, 정자는 소의 정액을 원심분리하여 수집되었다.

[2867] 수집된 난자와 정자의 체외 수정으로부터 얻어진 수정란에서 난구세포가 제거된 후, microinjector machine(Femtojet®, Eppendorf, Germany)을 이용하여 전술한 spCas9-sgRNA 벡터 및 트랜스포사아제 벡터가 세포질에 미세주입되었다 (spCas9-sgRNA 벡터 및 트랜스포사아제 벡터 각각 50ng/ml, 1:1 비율).

[2868] 미세주입 후 생산된 배아(spCas9-sgRNA 배아)에서 적색 형광 단백질의 발현이 시각적으로 확인되었으며, 상기 배아를 이용해 형질전환 소가 제작되었다.

[2870] **3. 형질전환 소 제작**

[2871] **3-1. 형질전환 소**

[2872] 형질전환된 배아를 대리모의 자궁에 이식하는 방법 및 실험 조건은 전술한 바 있어 이하에서는 형질전환 소를

제작하는 방법에 대해 간략하게 설명한다.

- [2873] 전술한 방법에 의해 생산된 spCas9-sgRNA 배아가 대리모의 자궁에 이식되었고, 발달 일(post estrus) 45 일째 직장 검사(rectal palpation)와 초음파 검사(ultrasonography)를 통해 배아의 생존과 대리모의 임신이 확인되었다.
- [2874] 대리모로부터 spCas9 유전자 및 sgRNA가 삽입된 계놈을 가지는 형질전환 소 (SNU-Cas9-BLG-KO-1(수컷))가 태어났으며, 상기 SNU-Cas9-BLG-KO-1(수컷)로부터 정자가 확보되었다.
- [2876] **3-2. 형질전환 소의 계놈에 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 및 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입여부 확인**
- [2877] **3-2-1. 형광 단백질 발현 확인**
- [2878] 전술한 일차 세포 분리 방법에 의해 SNU-Cas9-BLG-KO-1(수컷)의 피부 조직(skin tissue)로부터 일차 세포(primary cell)가 분리되었고, 상기 일차 세포로부터 적색 형광 단백질의 발현이 확인되었다.
- [2879] 도 55의 (a)는 SNU-Cas9-BLG-KO-1의 일차 세포에서 적색 형광 단백질의 발현을 나타낸다 (도 55의 (a) 참고, 왼쪽: 가시광선 조건, 오른쪽: 형광 조건).
- [2880] spCas9-sgRNA 벡터가 적색 형광 단백질 유전자를 포함하도록 설계되었는바, 상기 결과를 통해 spCas9 유전자 및 sgRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 SNU-Cas9-BLG-KO-1(수컷)의 계놈에 삽입되었다는 것이 시각적으로 확인되었다.
- [2882] **3-2-2. DNA PCR 및 RT-PCR 결과**
- [2883] DNA PCR 및 RT-PCR(Eppendorf Vapo Protect Mastercycler, Eppendorf, Germany)을 이용해, SNU-Cas9-BLG-KO-1(수컷)의 계놈에 spCas9 유전자 및 sgRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입여부가 확인되었다.DNA PCR 및 RT-PCR을 수행하기 위해 사용된 프라이머는 하기 표 18과 같다.

표 18

프라이머 종류	SEQ Name	SEQ ID NO	서열
spCas9-Forward	pr_spCas9_F_2	SEQ ID NO:50	gacaagaagtacagcatcgg
spCas9-Reverse	pr_spCas9_R_2	SEQ ID NO:51	caaccagctgttcgaggaga
GAPDH-Forward	pr_GAPDH_F_3	SEQ ID NO:52	GGCGTGAACCACGAGAAGTA
GAPDH-Reverse	pr_GAPDH_R_3	SEQ ID NO:53	CCCTCCACGATGCCAAAGT

[2886] DNA PCR 및 RT-PCR 방법에 대해서는 전술한 바 있어, 구체적인 설명은 생략한다.

[2888] **3-2-3. β -lactoglobulin 인텔 확인**

- [2889] the G-spin™ Total DNA Extraction Mini Kit (iNtRON, Seoul, Republic of Korea)에 의해, SNU-Cas9-BLG-KO-1(수컷)의 섬유아세포(fibroblasts)로부터 전체 계놈 DNA(whole genomic DNA)가 분리되었다.
- [2890] 분리된 전체 계놈 DNA(whole genomic DNA)를 이용한 fPCR(fluorescent PCR)을 통해, 베타-락토글로불린 유전자(β -lactoglobulin gene)의 돌연변이(mutation)가 확인되었다
- [2891] 도 55의 (b)는 fPCR을 이용해 SNU-Cas9-BLG-KO-1의 섬유아세포에서 베타-락토글로불린 유전자가 녹아온 것 확인한 결과를 나타낸다 (도 55의 (b) 참고, 왼쪽: 야생형 소의 섬유아세포, 오른쪽: BLG 녹아온 된 섬유아세포).
- [2892] 베타-락토글로불린 유전자(β -lactoglobulin gene)의 돌연변이(mutation)를 확인하기 위한 프라이머는 하기 표 19에 개시된 바와 같다.

표 19

프라이머 종류	SEQ Name	SEQ ID NO	서열
Forward primer	in_pr_BLG_F_1	SEQ ID NO:54	TAAAGCCCGTGTCTCCAGT
Reverse primer	in_pr_BLG_R_1	SEQ ID NO:55	GAAAGCCCTGGATAAGCAGC

- [2894] 본 실험을 통해, spCas9 및 가이드 핵산이 모두 발현될 수 있는 형질전환 소의 경우, 추가적인 처리를 하지 않더라도 상기 가이드 핵산의 일 영역과 동일하거나 상보적인 서열을 포함하는 타겟 유전자가 녹아웃 될 수 있는 것이 확인되었다.
- [2895] 또한, 타겟 유전자(target gene)가 녹아웃 되더라도 형질전환 세포, 형질전환 배아 및/또는 형질전환 동물이 생존할 수 있다는 것이 확인되었다.
- [2896] 상기 타겟 유전자(target gene)의 종류에 따라 다양한 효과가 나타날 수 있다. 특히 본 실험에서 처럼 β -lactoglobulin (BLG) 유전자를 타겟 유전자로 한 경우, 알러젠(allergen)이 제거된 우유를 얻을 수 있다. 즉, spCas9 및/또는 가이드 핵산이 발현될 수 있는 형질전환 소는 밀크(milk) 단백질 공학에 이용될 수 있다.
- [2897] 나아가, spCas9 및 가이드 핵산이 계속적으로 발현되더라도, 상기 형질전환 세포, 형질전환 배아 및/또는 형질전환 동물이 생존할 수 있다는 것이 확인되었다.
- [2899] **[실험예 6] 발현 조절 요소에 의해 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현이 조절되는 형질전환 소**
- [2900] 본 발명자들은 인위적 뉴클레아제의 구성요소의 발현이 조절되는 소의 일차세포를 제작 하였고, 상기 소의 일차세포에서 유전자 편집이 조절되는 것을 확인하였다.
- [2901] **1. 벡터 제작**
- [2902] 인위적 뉴클레아제의 구성요소의 발현이 조절되는 소의 일차세포를 제작하기 위한 벡터가 제작 되었다.
- [2903] 도 56을 참고하여 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현이 조절될 수 있는 벡터를 설명한다.
- [2904] 상기 벡터에는 spCas9 DNA (Toolgen으로부터 기증 됨)의 5' 말단 방향에 [loxP-녹색 형광 단백질 유전자-polyA- loxP] 가 존재한다. [loxP-녹색 형광 단백질 유전자-polyA- loxP]의 제거 전까지 Cas9의 발현이 일어나지 않는다.
- [2905] 도 56에 개시된 sgRNA는 TP53 유전자를 타겟 유전자로 하며, 상기 sgRNA의 서열은 SEQ ID NO:27 (GCGCGGACGCGGGTCCGGGCGG)과 같다
- [2907] **2. RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현이 조절되는 소의 세포 제작**
- [2908] 본 발명자들은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현이 조절되는 소의 세포를 제작하기 위해 야생형 소로부터 섬유아세포를 분리하였다.
- [2909] 소의 섬유아세포를 분리하는 방법은 [실험예 1]에서 기술한 바 있어, 구체적인 설명은 생략한다.
- [2910] 분리된 소의 섬유아세포는 6웰 플레이트에 분주되었고, 상기 세포가 플레이트 내에서 약 50 내지 60% confluency를 이루었을 때 전술한 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현이 조절될 수 있는 벡터(도 56의 (a) 참고)(이하, 발현 조절 벡터(expression controllable vector))가 트랜스펙션 되었다.
- [2911] 발현 조절 벡터가 트랜스펙션된 세포에서 녹색 형광 단백질의 발현이 확인되었으며, 녹색 형광 단백질의 발현이 확인된 소의 세포가 선별 되었다.
- [2912] 녹색 형광 단백질 유전자가 발현 조절 벡터 안에 포함되어 있기 때문에, 녹색 형광 단백질이 발현되는 소의 세포는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제의 발현이 조절되는 소의 세포 (이하, 발현 조절 세포 (expression controllable cell))이다.
- [2914] **3. 형질전환 세포에서 T7E1 분석 결과**
- [2915] 본 발명자들은 전술한 방법에 의해 제작된 발현 조절 세포의 경우 Cre 리컴비나아제(발현 조절 요소에 영향을 미치는 물질)가 처리되는 경우에만 유전자 편집이 일어날 수 있다는 것을 확인하기 위해, 상기 발현 조절 세포에 Cre 리컴비나아제를 처리하였다. 그 후, Cre 리컴비나아제가 처리된 발현 조절 세포와 처리되지 않은 발현 조절 세포의 DNA PCR 및 T7E1 분석이 진행되었다.
- [2916] 상기 Cre 리컴비나아제가 처리되지 않은 상기 발현 조절 세포로부터 DNA가 추출된 후, 상기 추출된 DNA(샘플 1)가 PCR 튜브에 담겨졌다. 또한, 상기 Cre 리컴비나아제가 처리된 상기 발현 조절 세포로부터 DNA가 추출된 후, 상기 추출된 DNA(샘플 2)가 PCR 튜브에 담겨졌다.

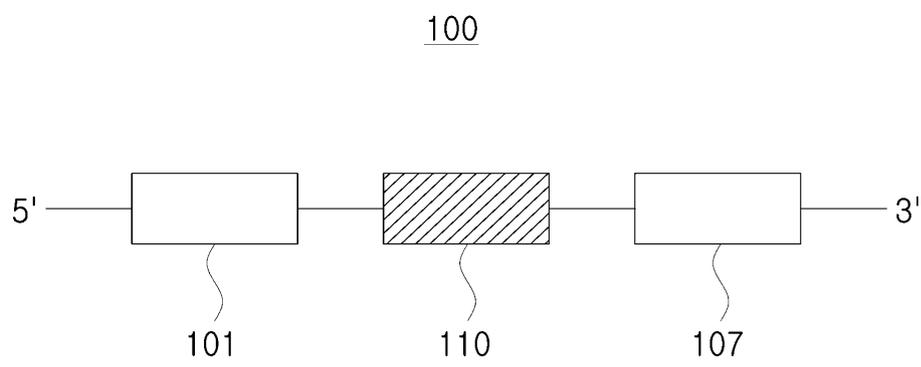
- [2917] 나아가, 음성대조군으로 DNA가 포함되지 않은 Distilled Water가 PCR 튜브에 담겨졌다.
- [2918] 양성 대조군으로 발현 조절 요소인 [loxP-녹색 형광 단백질 유전자-polyA- loxP2772]가 포함되지 않은 벡터(도 56의 (b) 참고)가 트랜스팩션되어 spCas9 DNA 및 sgRNA을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드가 삽입된 계놈을 가지는 소의 일차 세포로부터 DNA가 추출된 후, 상기 추출된 DNA(양성 대조군)가 PCR 튜브에 담겨졌다.
- [2919] Direct PCR lysis kit를 이용하여, 상기 샘플 1, 샘플 2, 음성 대조군 및 양성 대조군이 담겨진 각각의 PCR 튜브에 버퍼 10 µl가 넣어졌고, proteinase K 0.5 µl가 추가적으로 넣어졌다.
- [2920] 각각의 PCR 튜브는 PCR 기계에서 56°C 조건에서 180분 동안 처리되었고, 85°C 조건에서 15분동안 처리된 후, PRNP forward primer 및 reverse primer를 넣고 PCR이 수행되었다. PCR 수행 후 10-15 µl 의 각각의 PCR product가 얻어졌다.
- [2921] 상기 각각의 PCR product는 T7 endonuclease I 0.5 µl 내지 1 µl 과 buffer 2 µl (최종 volume 20 µl)와 혼합되어 37°C 조건에서 약 30분간 반응되었고, 반응에 따른 생성물은 전기 영동되었다.
- [2922] 그 결과, 상기 발현 조절 세포에 Cre 리컴비나아제가 처리된 경우에 타겟 유전자에서 인델이 발생하는 것이 확인되었다.
- [2923] 도 57은 Cre 리컴비나아제가 처리되지 않은 발현 조절 세포와 Cre 리컴비나아제가 처리된 발현 조절 세포에서 타겟 유전자의 인델을 확인한 DNA PCR 결과를 나타낸다 (도 57 참고, 1: 사이즈 마커, 2: 음성 대조군, 3: Cre 리컴비나아제가 처리되지 않은 발현 조절 세포, 4: Cre 리컴비나아제가 처리된 발현 조절 세포, 5: 양성 대조군).
- [2925] 본 실험을 통해 본 발명자들은 인위적 뉴클레아제의 구성요소의 발현을 조절하는 발현 조절 요소가 함께 삽입된 계놈을 가지는 소 또는 상기 소의 세포를 이용하면 유전자 편집이 원하는 때에 이루어 질 수 있도록 조절될 수 있다는 것을 확인하였다.

부호의 설명

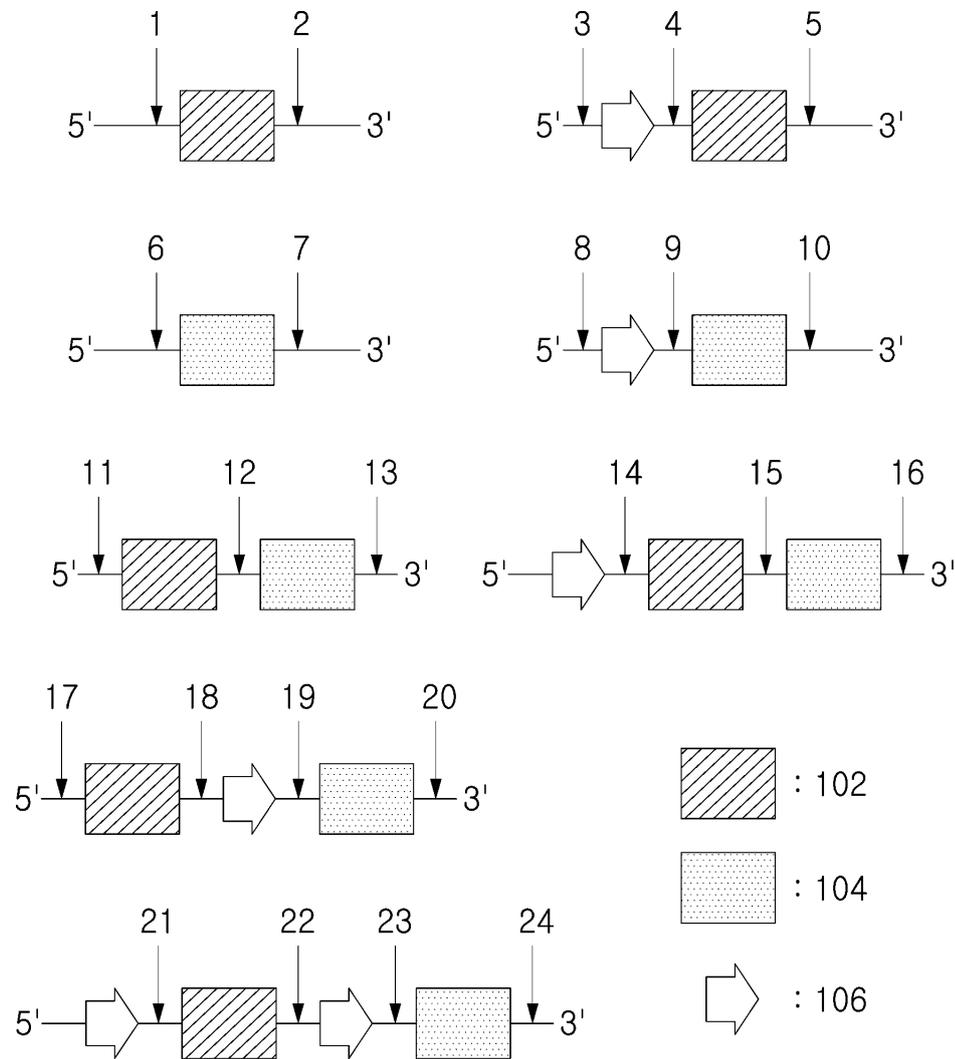
- [2928] 100, 320, 340: 틀박스
- 101, 107, 201, 207, 322, 329, 343, 349, 361, 367, 371, 379, 701, 705, 801, 808, 901, 906: ITR 서열
- 102, 103, 132, 363, 373: RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드
- 104, 105, 134, 365, 375, 377: 가이드 핵산을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드
- 110: 인위적 뉴클레아제의 구성요소를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드
- 130, 130(a), 130(b): 발현 조절 요소
- 202, 203, 204, 205, 206: PAM 서열을 가지는 폴리뉴클레오타이드
- 210, 220, 230, 240: 염색체
- 231, 420, 430: 타겟 사이트
- 232, 232(a), 232(b), 423, 433: 도너 폴리뉴클레오타이드
- 401: 수정란
- 403, 405, 407, 409, 411, 413, 415, 417: 배아
- 704, 706, 804, 807, 905: 트랜스포사아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드
- 700(b), 800(b):제거 틀박스
- 909, 911: 리컴비나아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드

도면

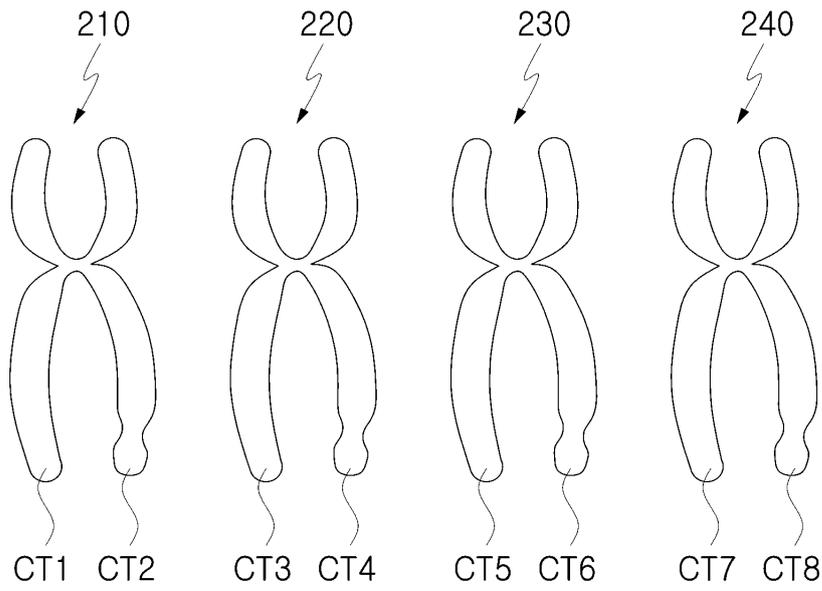
도면1



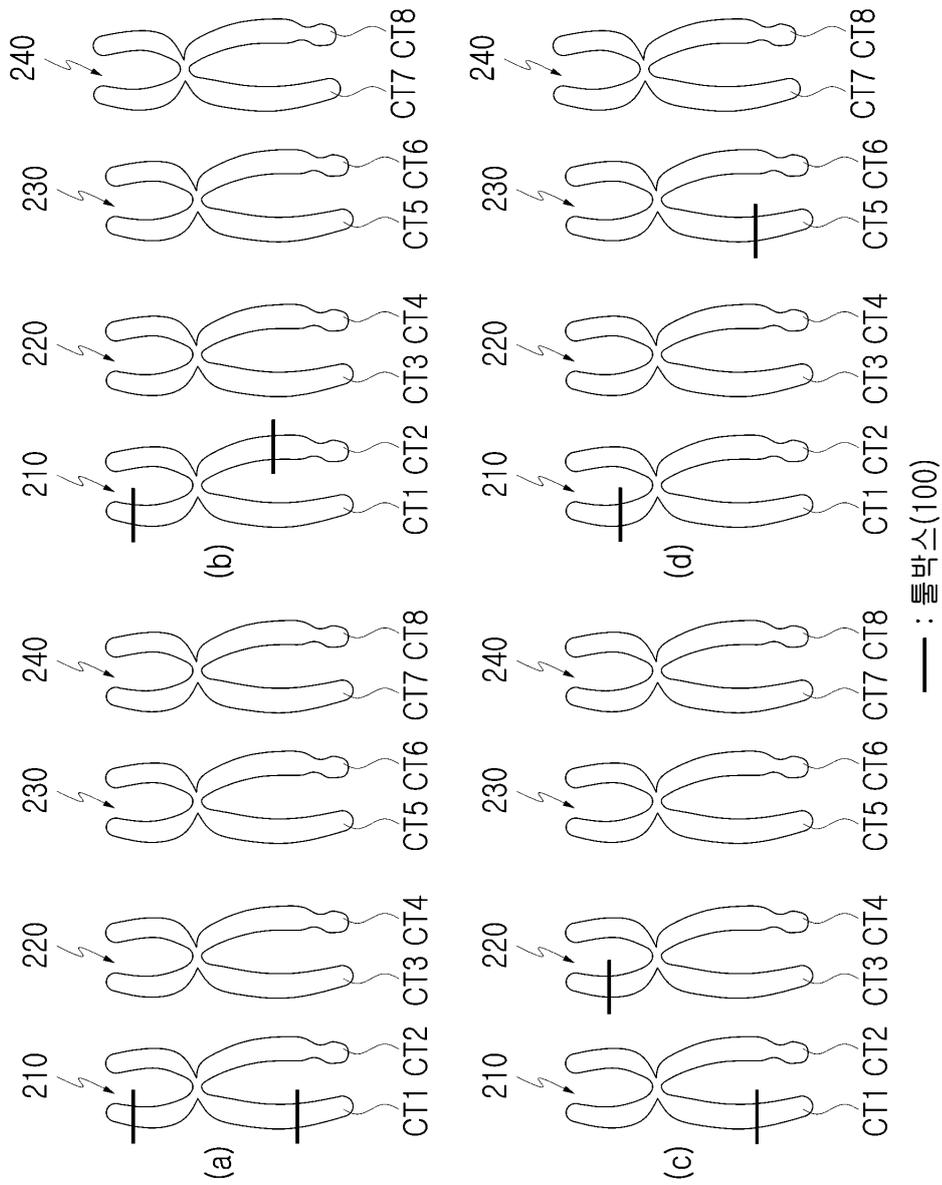
도면2



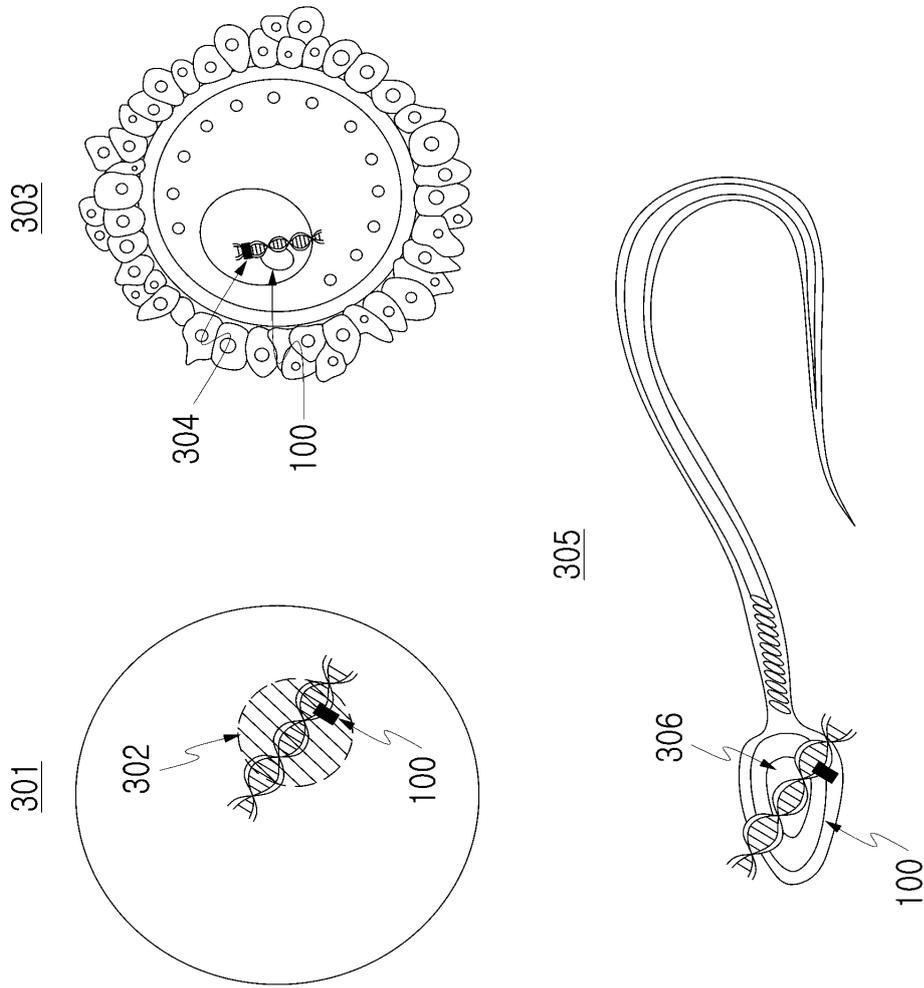
도면3



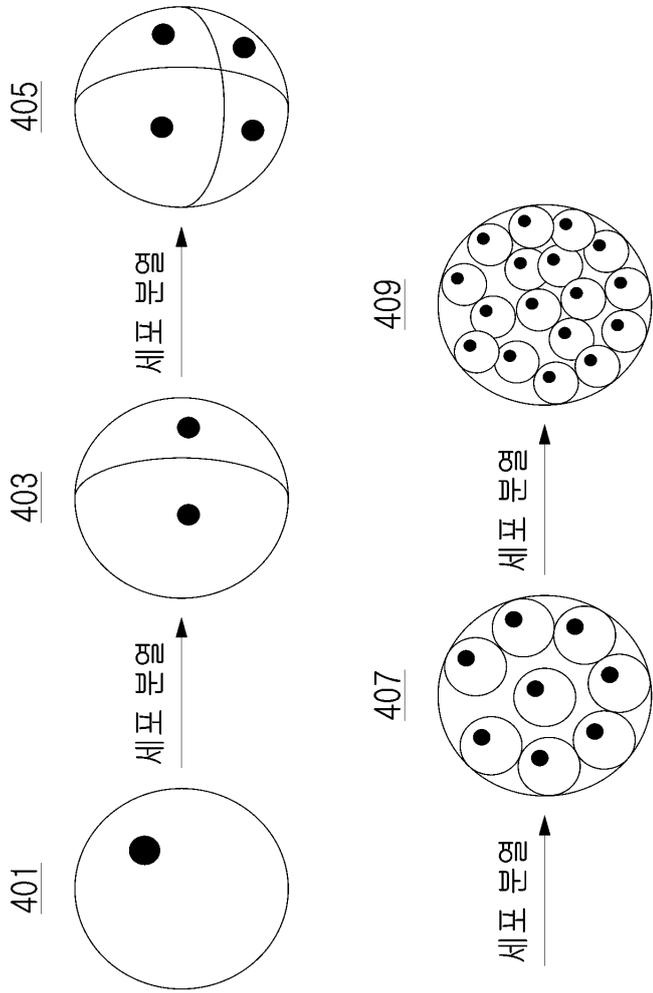
도면4



도면5

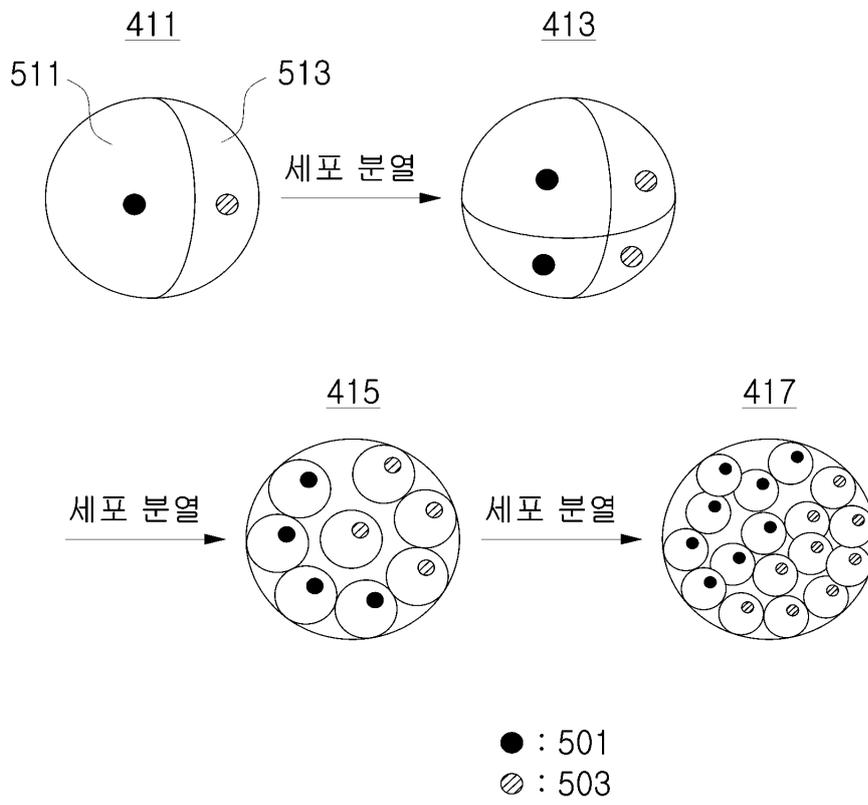


도면6

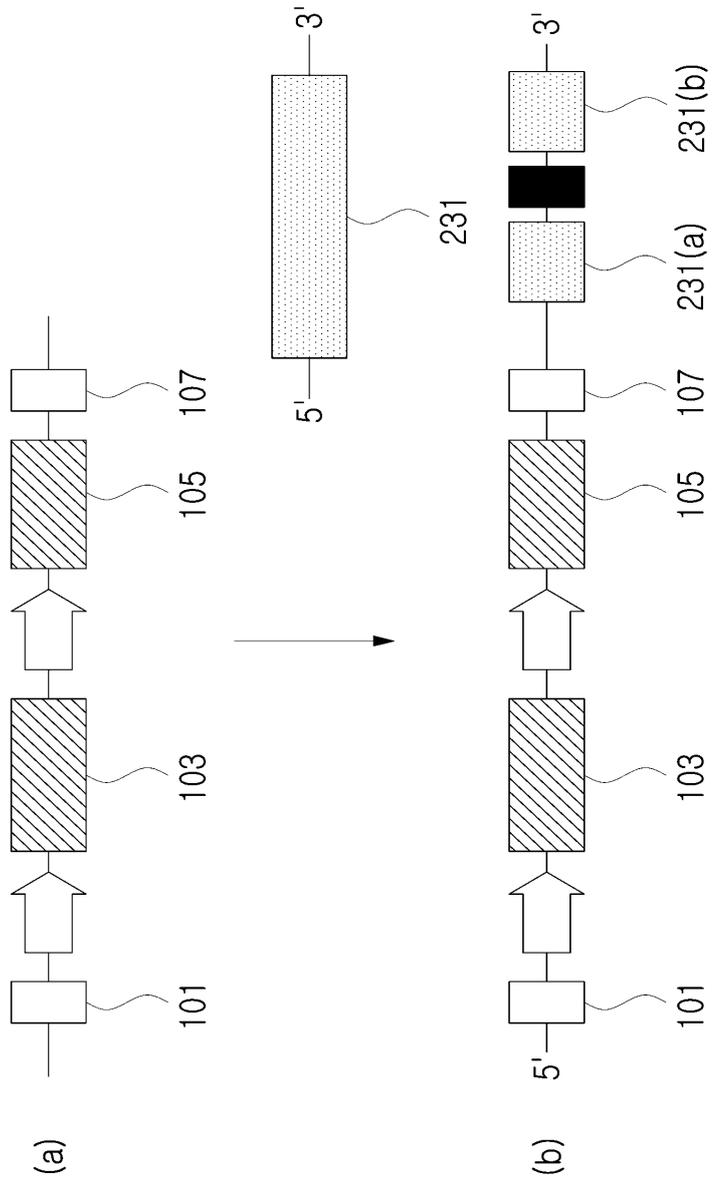


● : 툴박스가 하나 이상 삽입된 계층을 가지는 핵

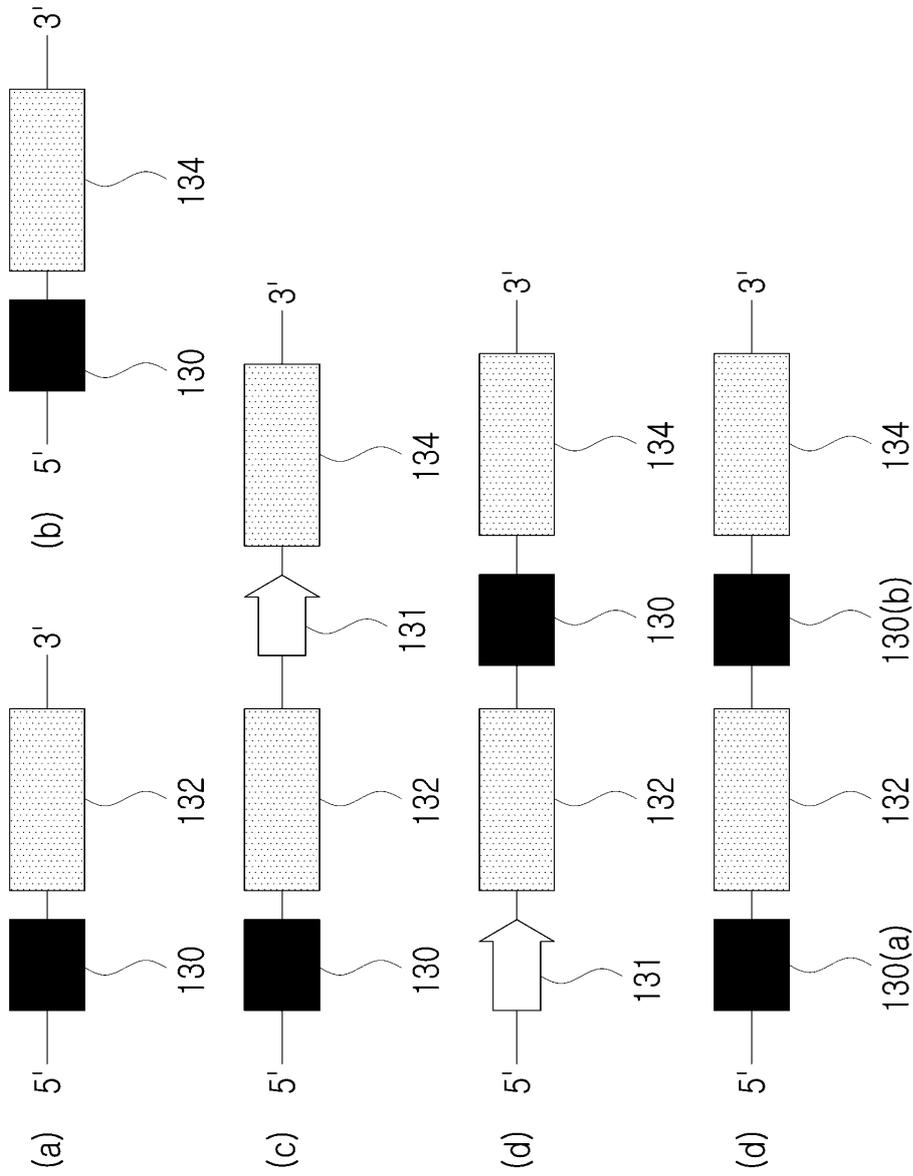
도면7



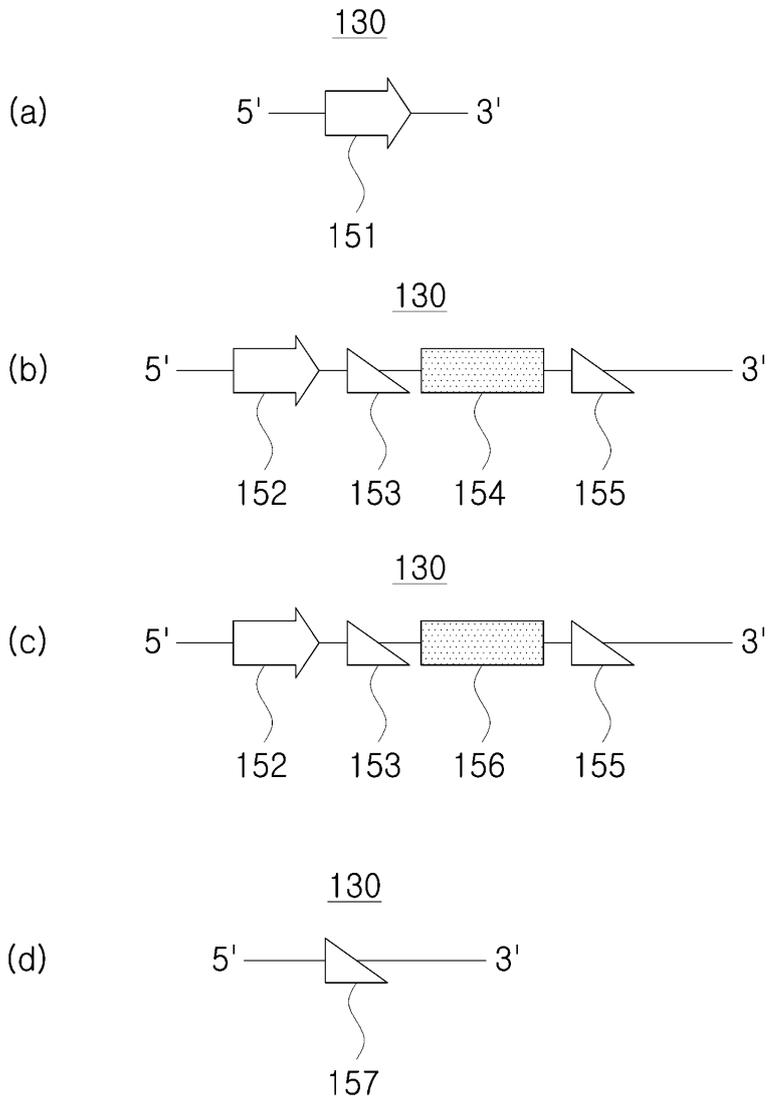
도면8



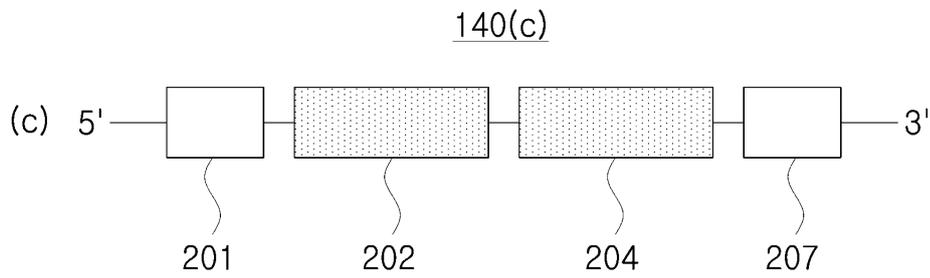
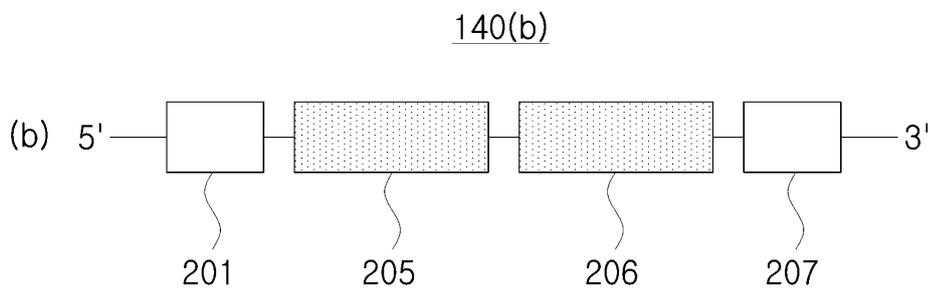
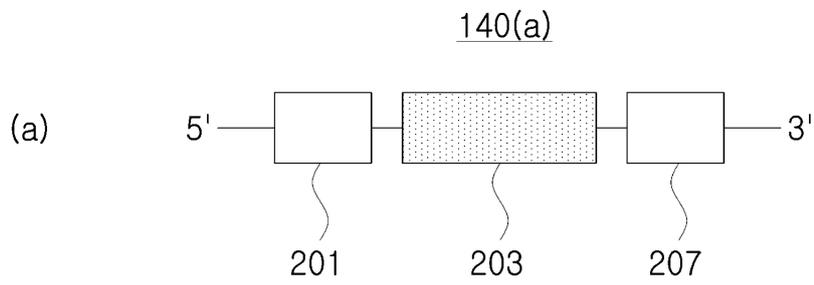
도면9



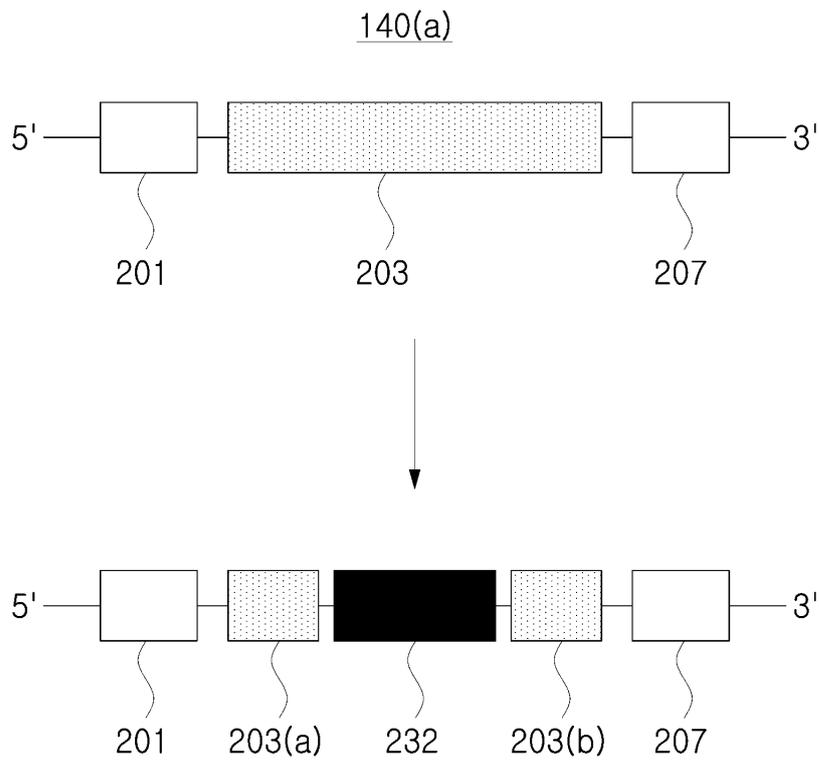
도면10



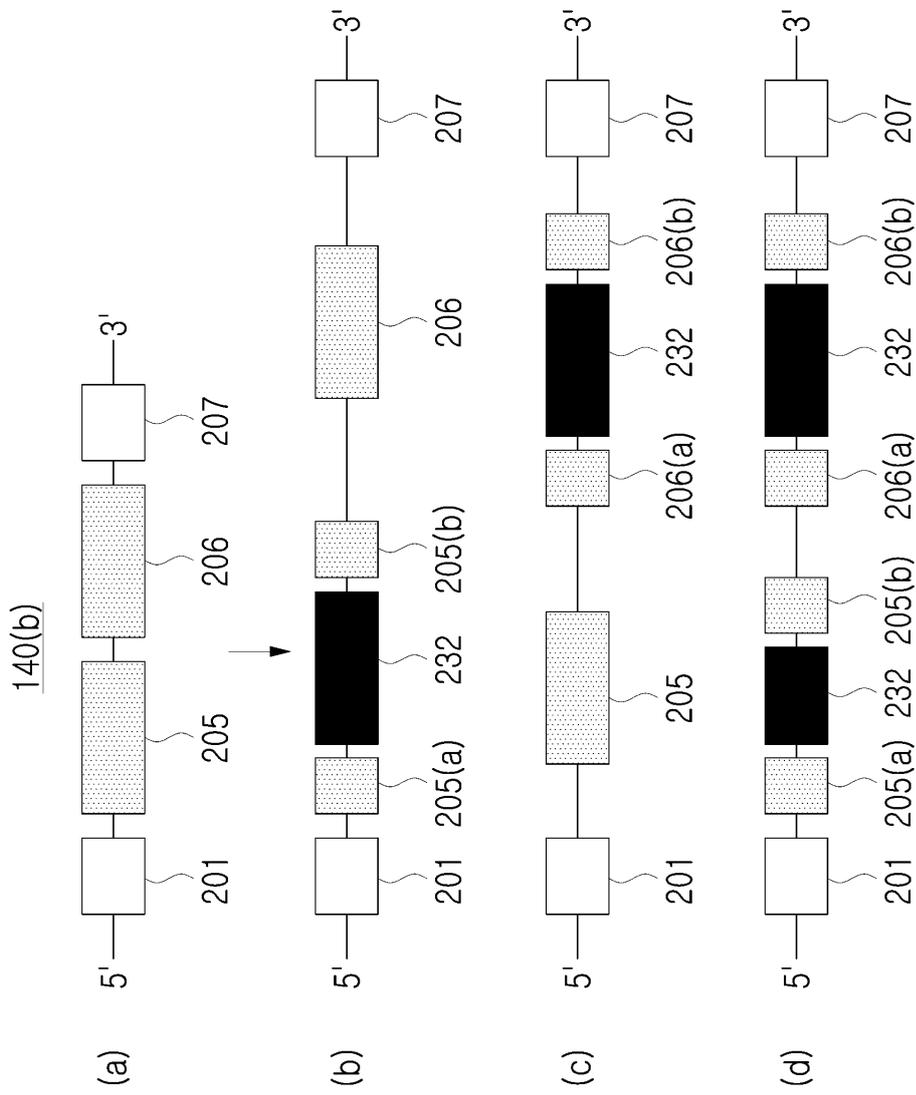
도면11



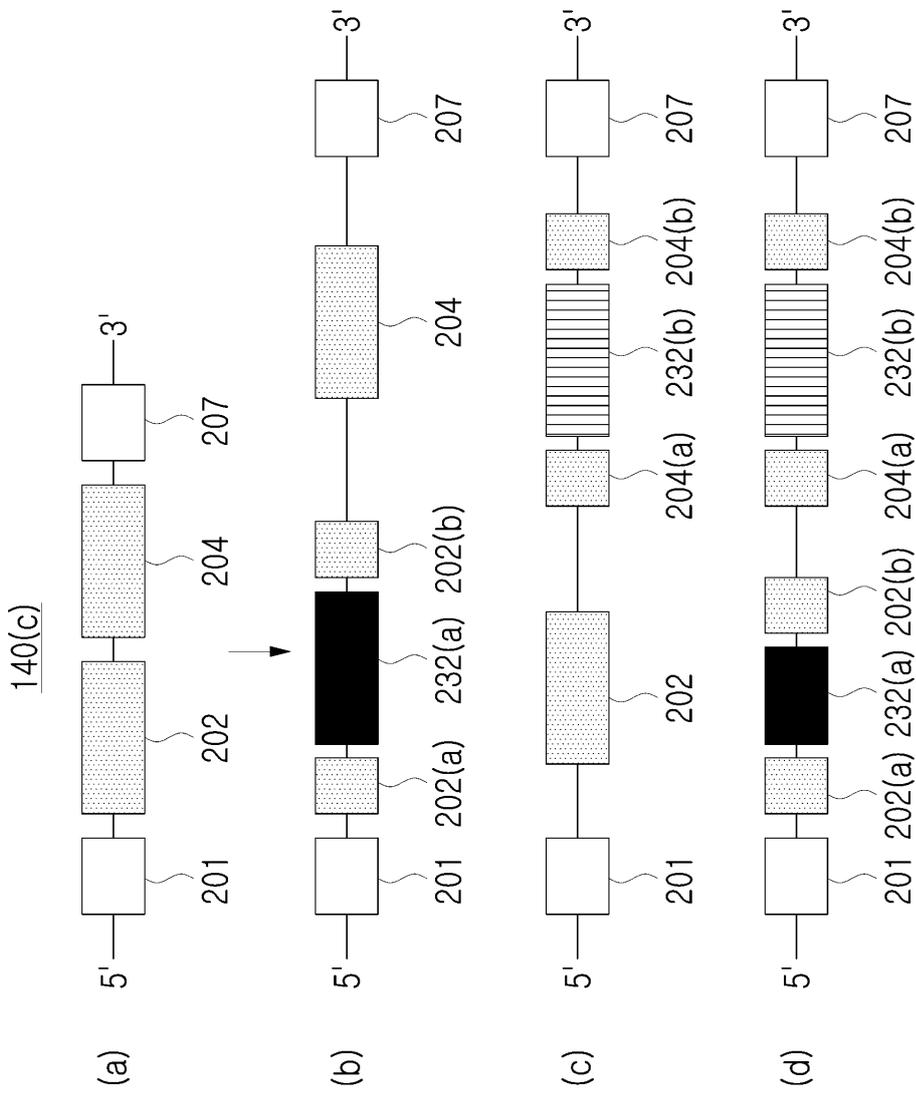
도면12



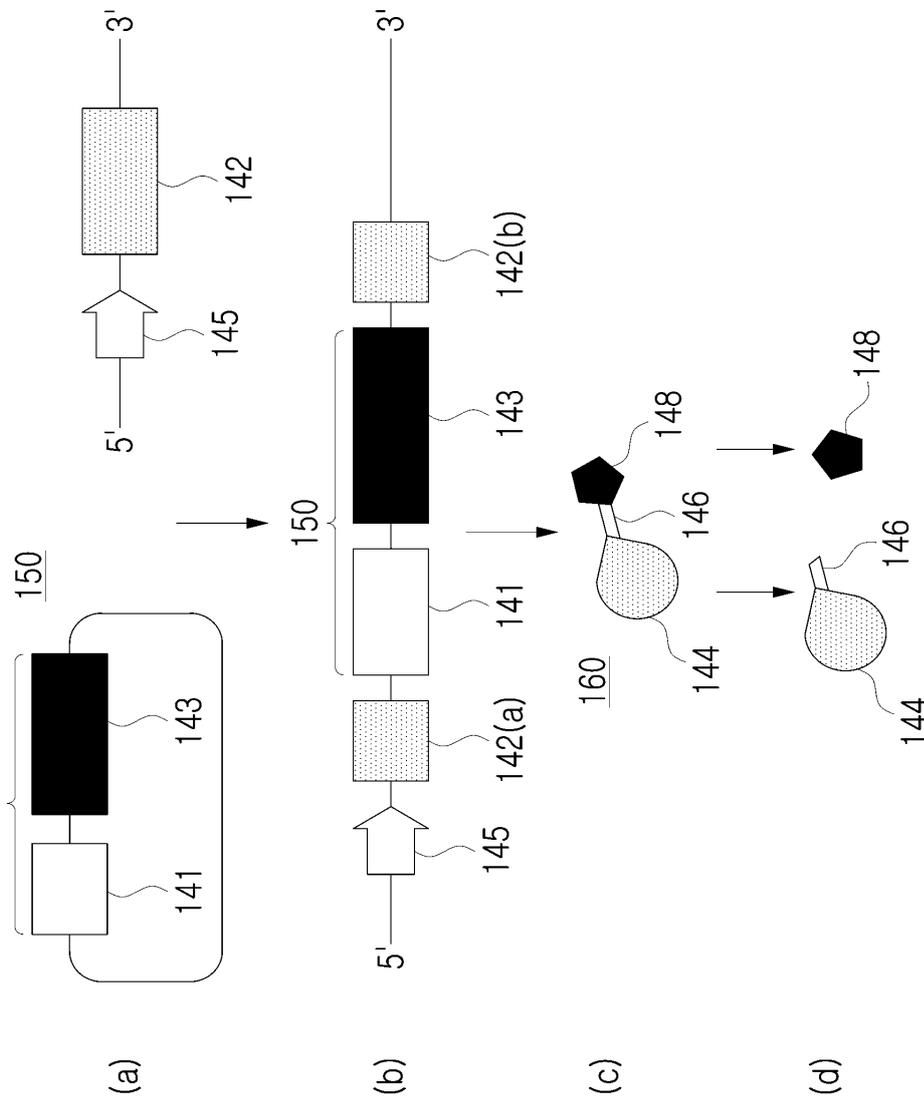
도면13



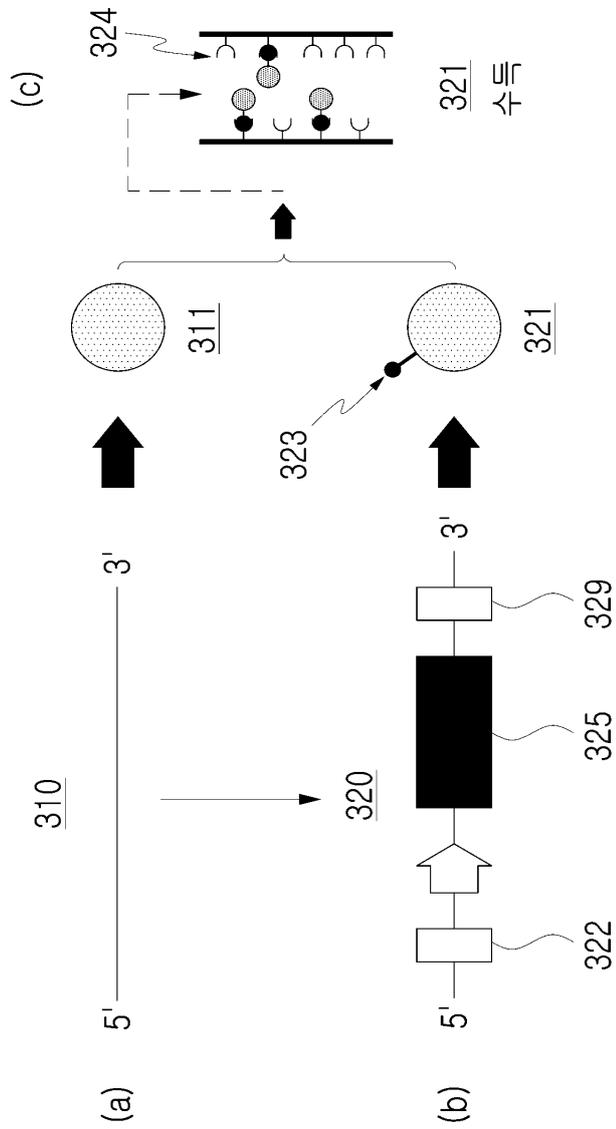
도면14



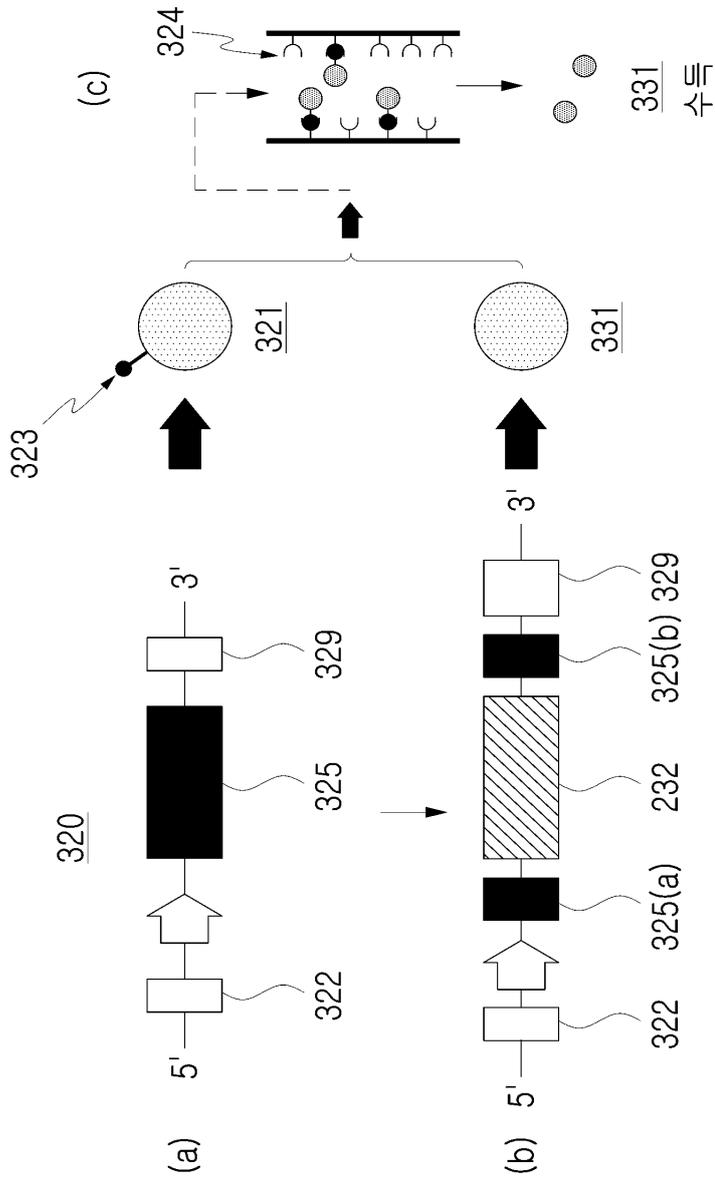
도면15



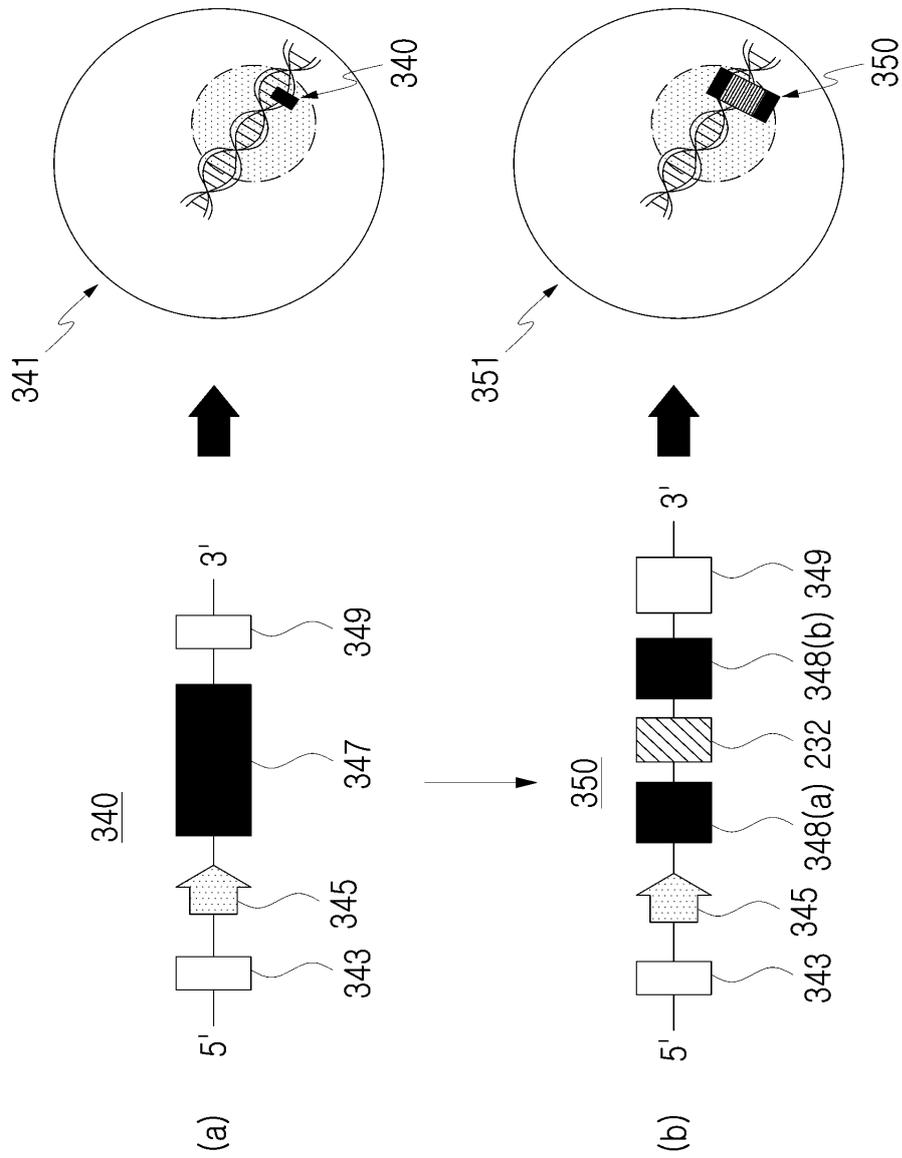
도면16



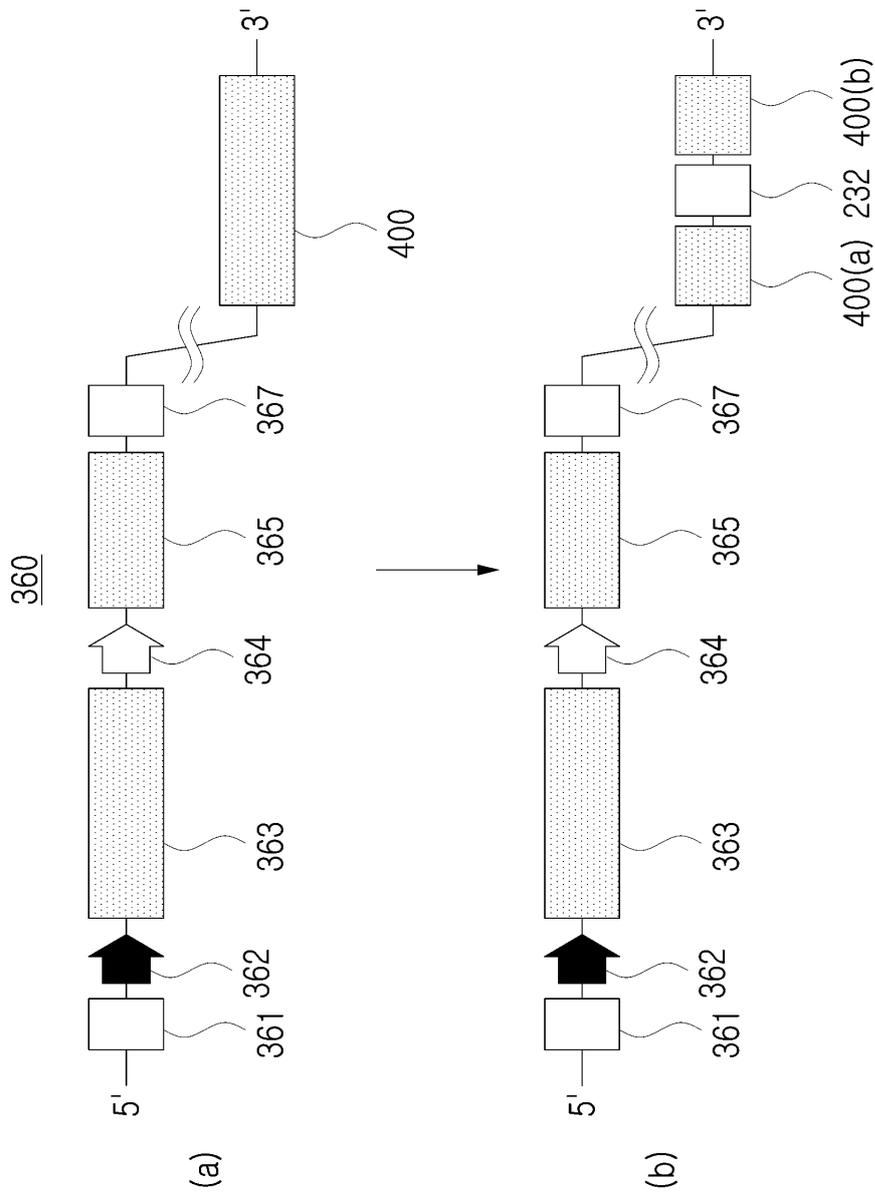
도면17



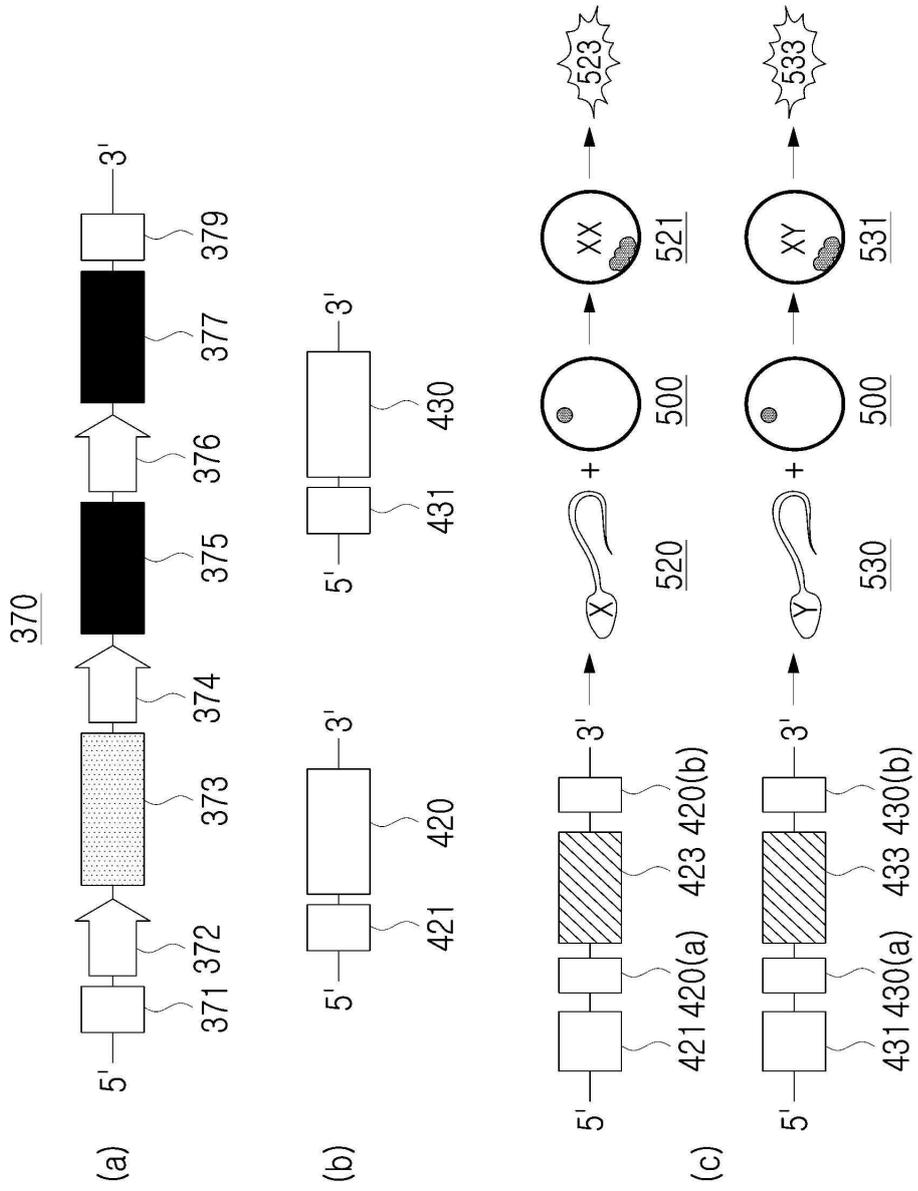
도면18



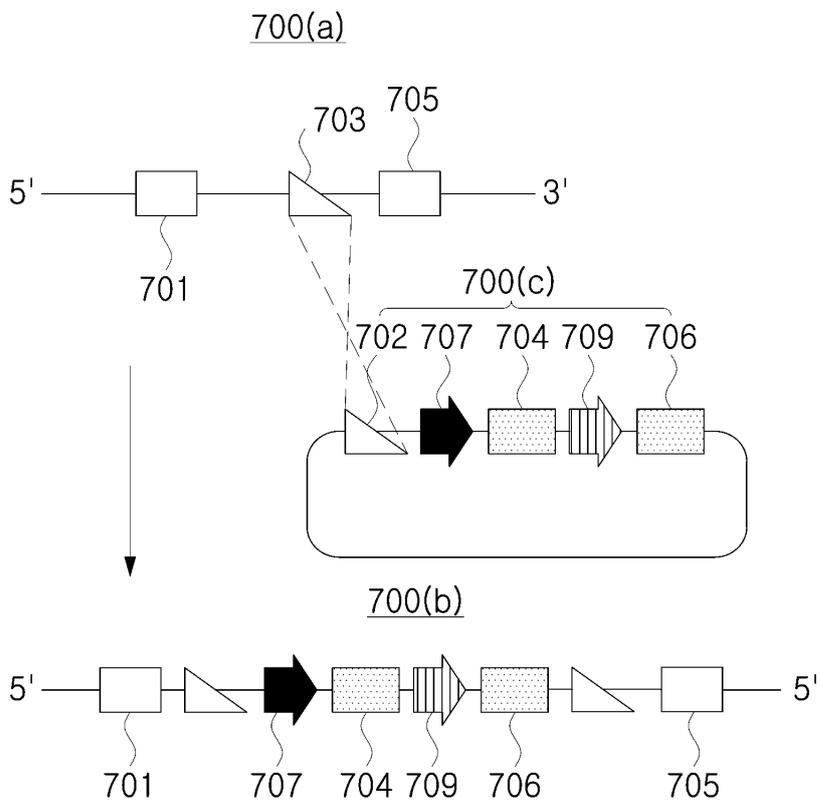
도면19



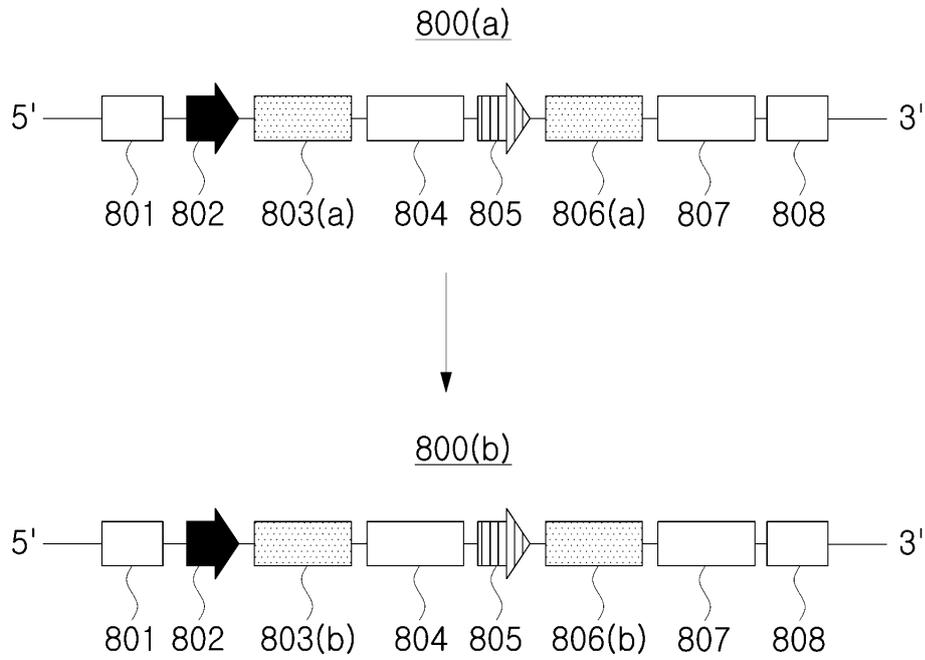
도면20



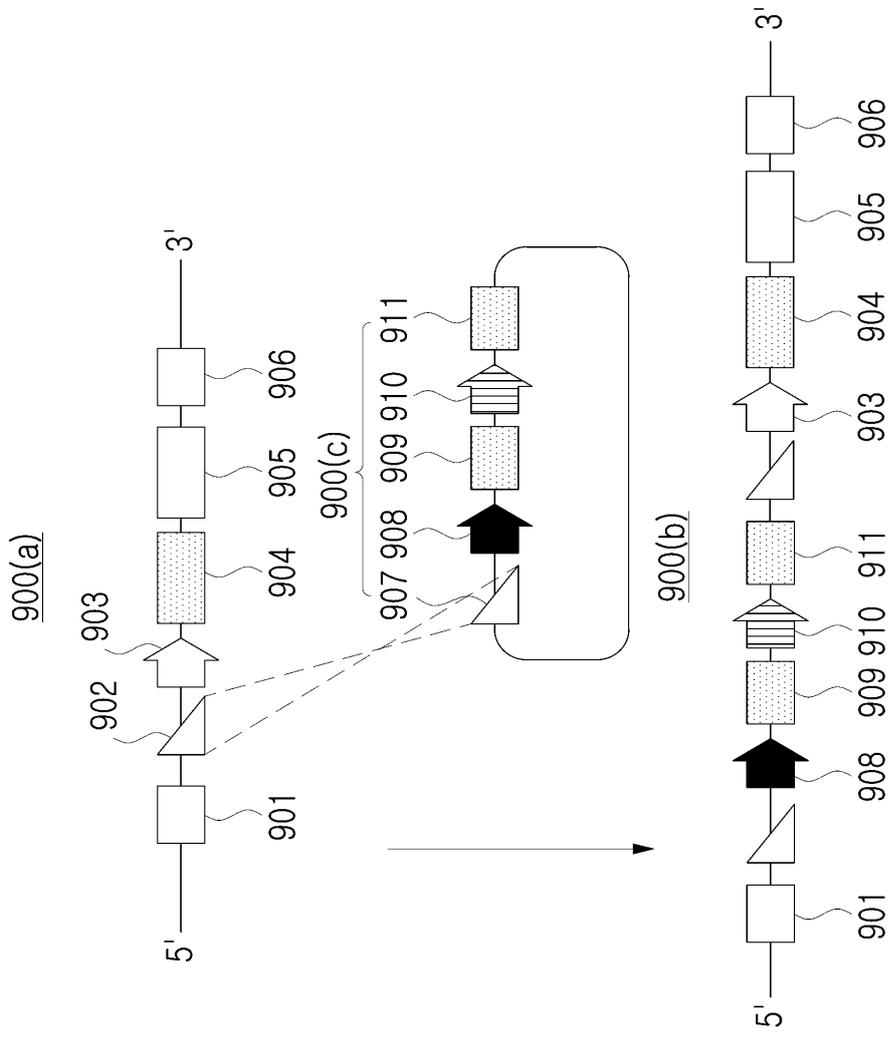
도면21



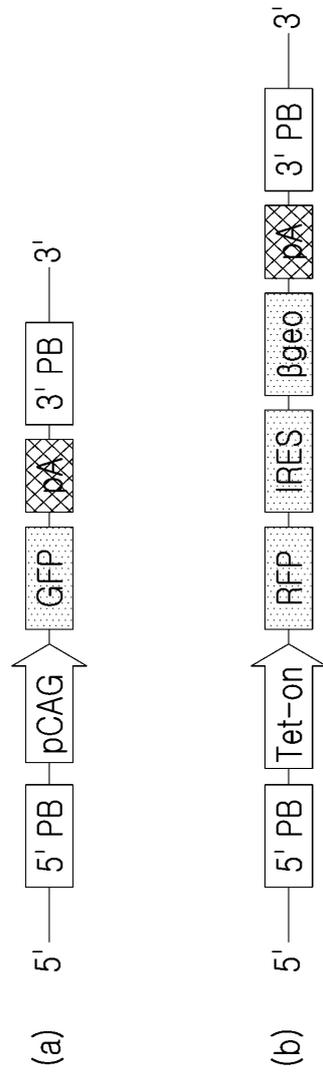
도면22



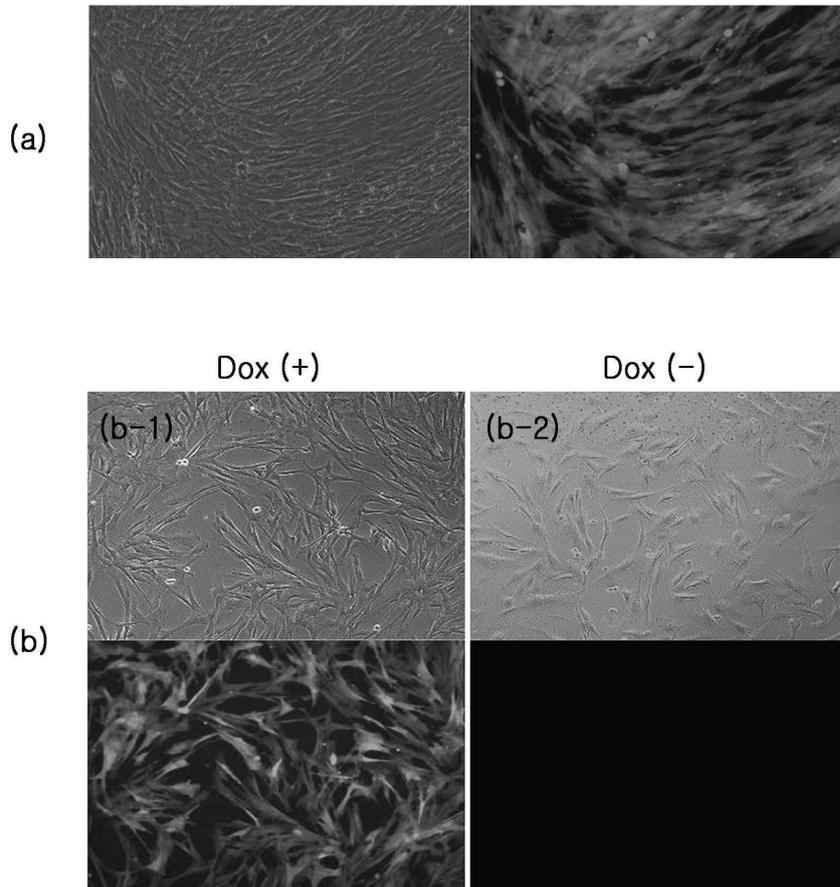
도면23



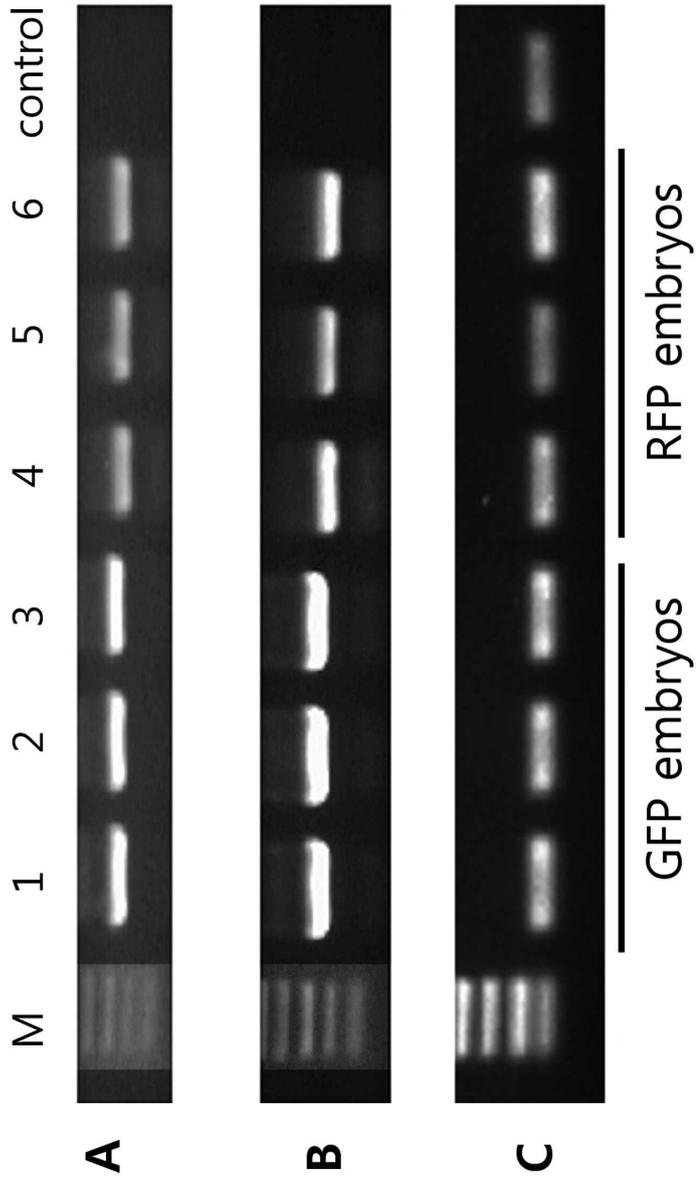
도면24



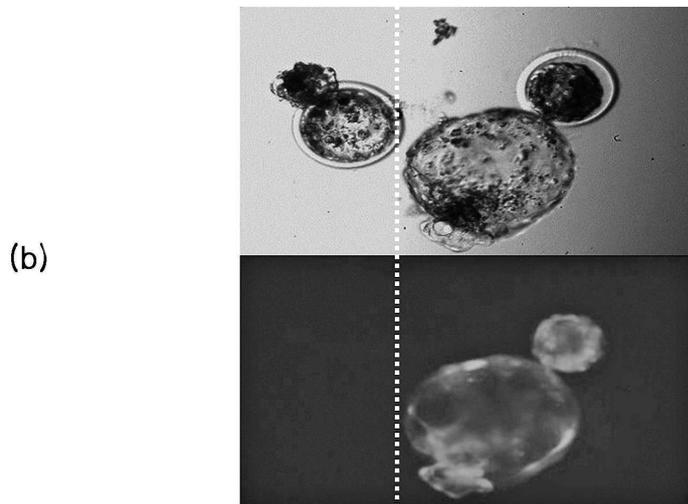
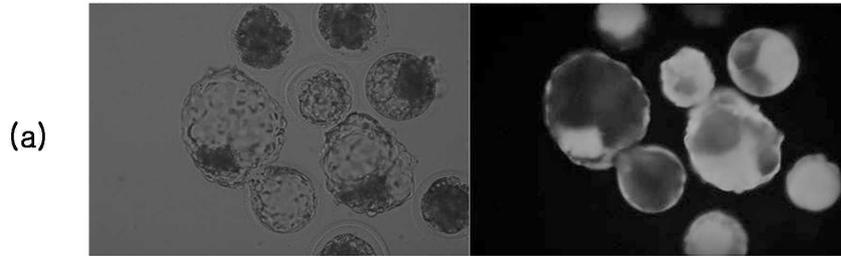
도면25



도면26

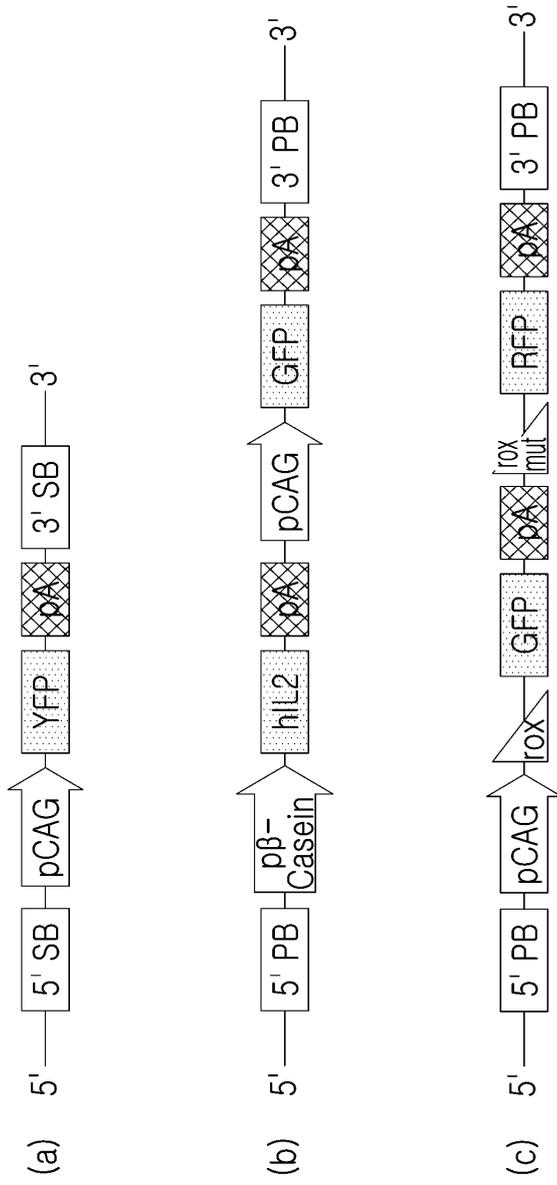


도면27

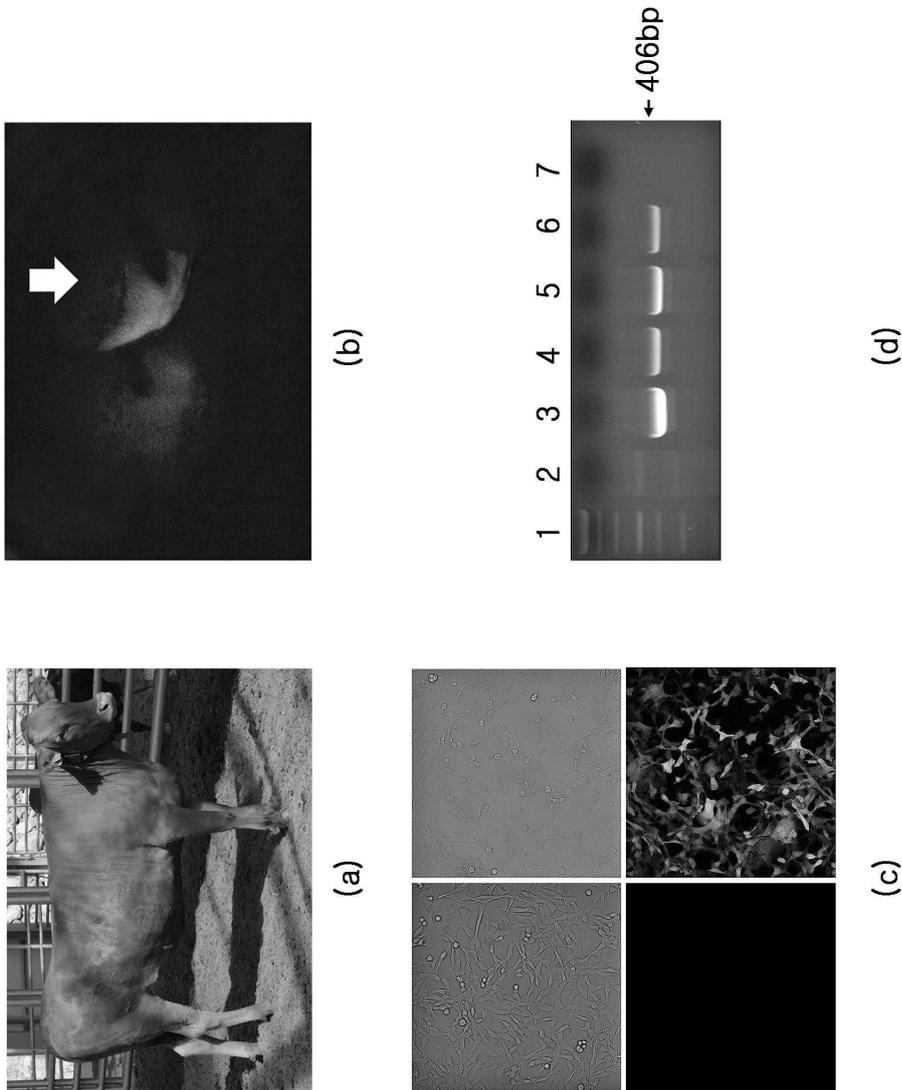


Embryos

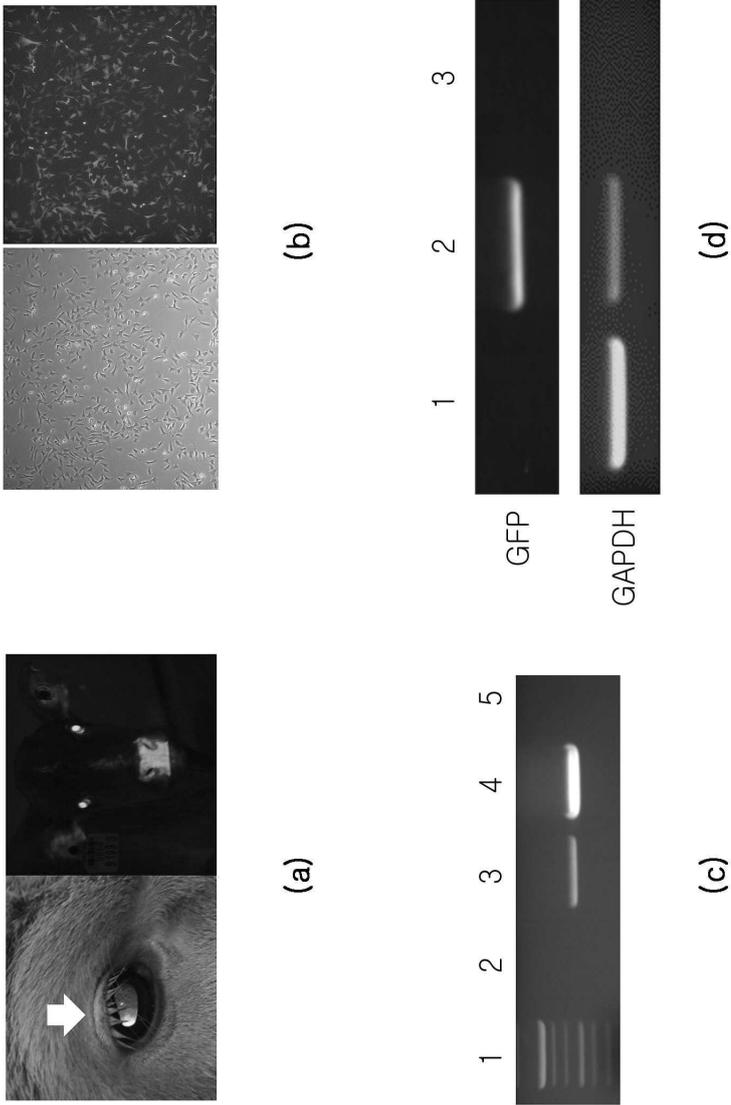
도면28



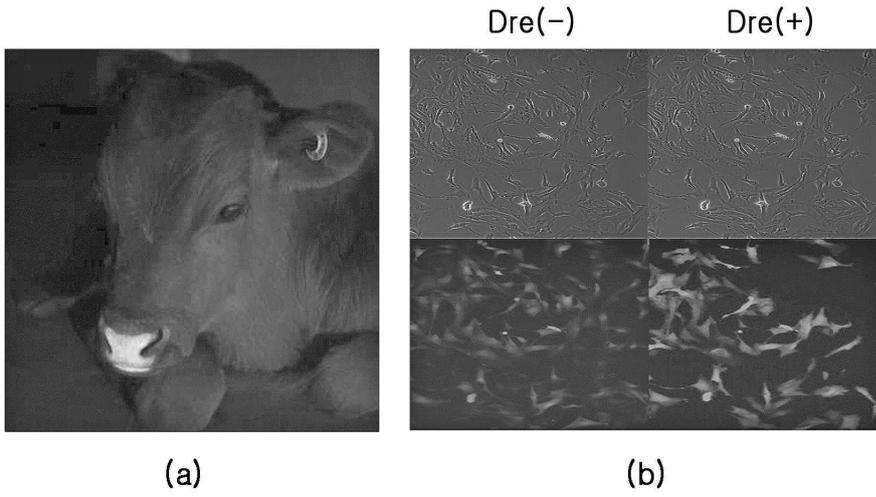
도면29



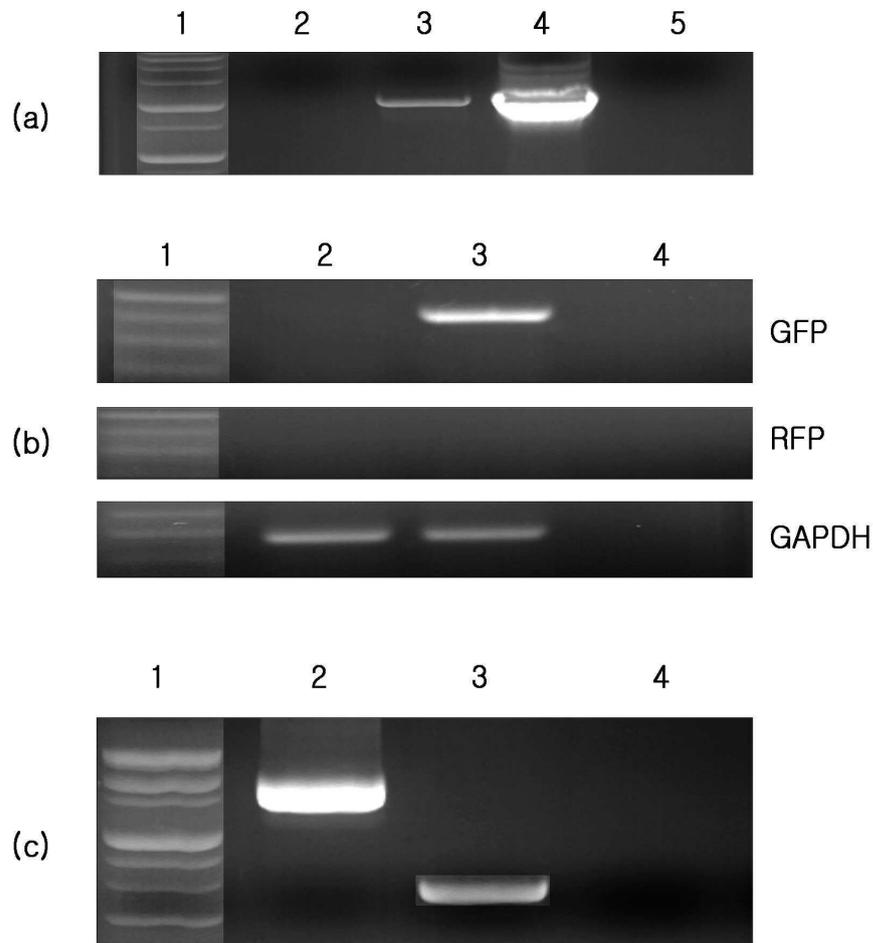
도면30



도면31



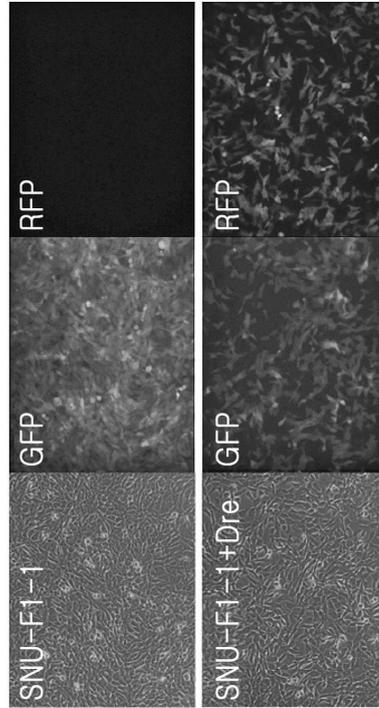
도면32



도면33

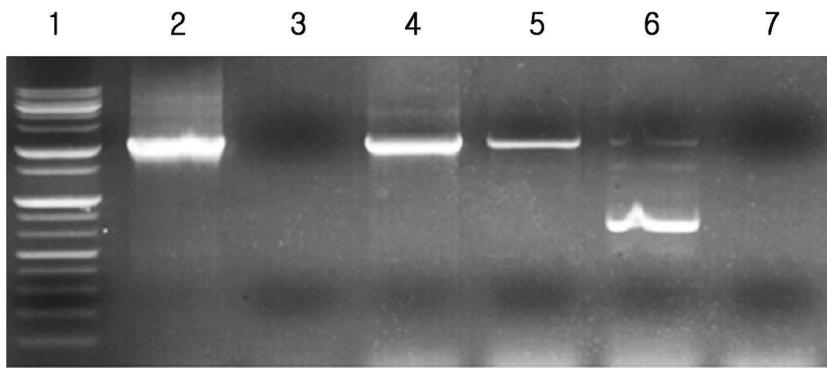


(a)

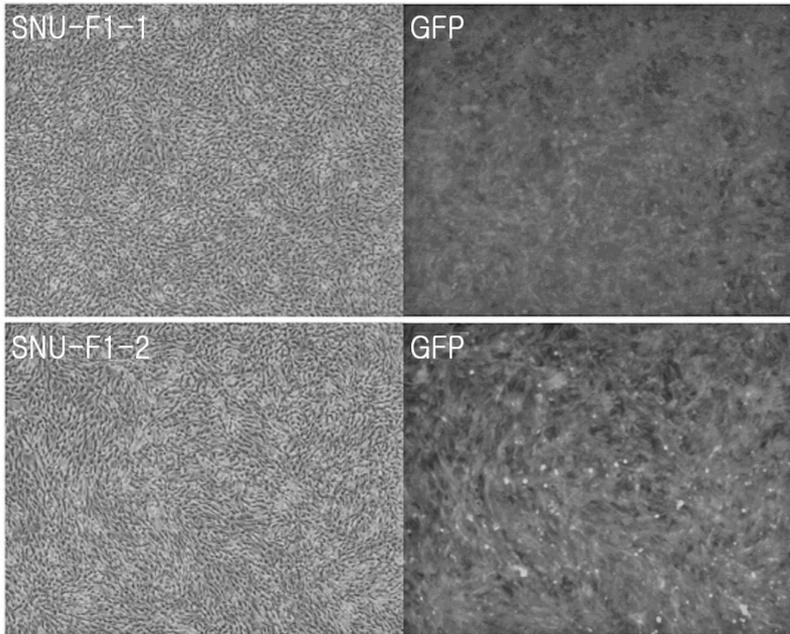


(b)

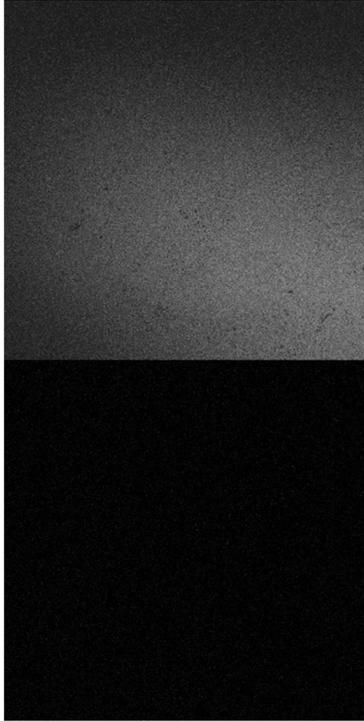
도면34



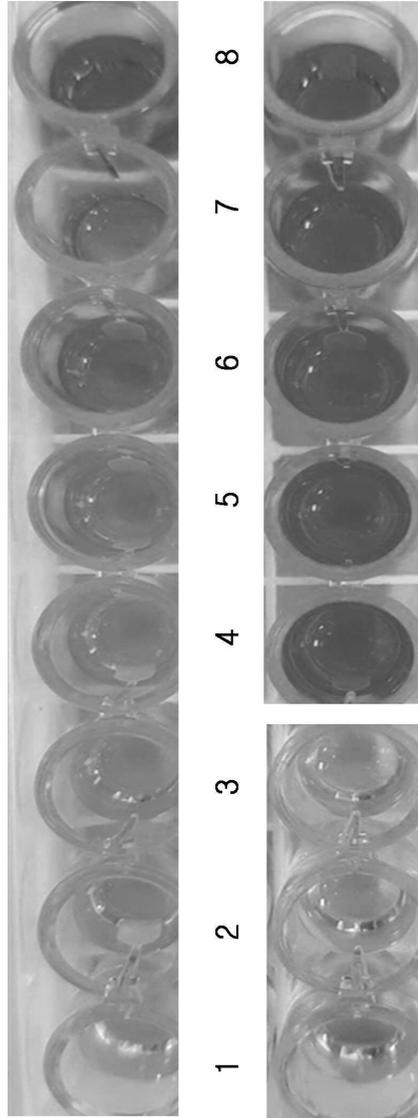
도면35



도면36

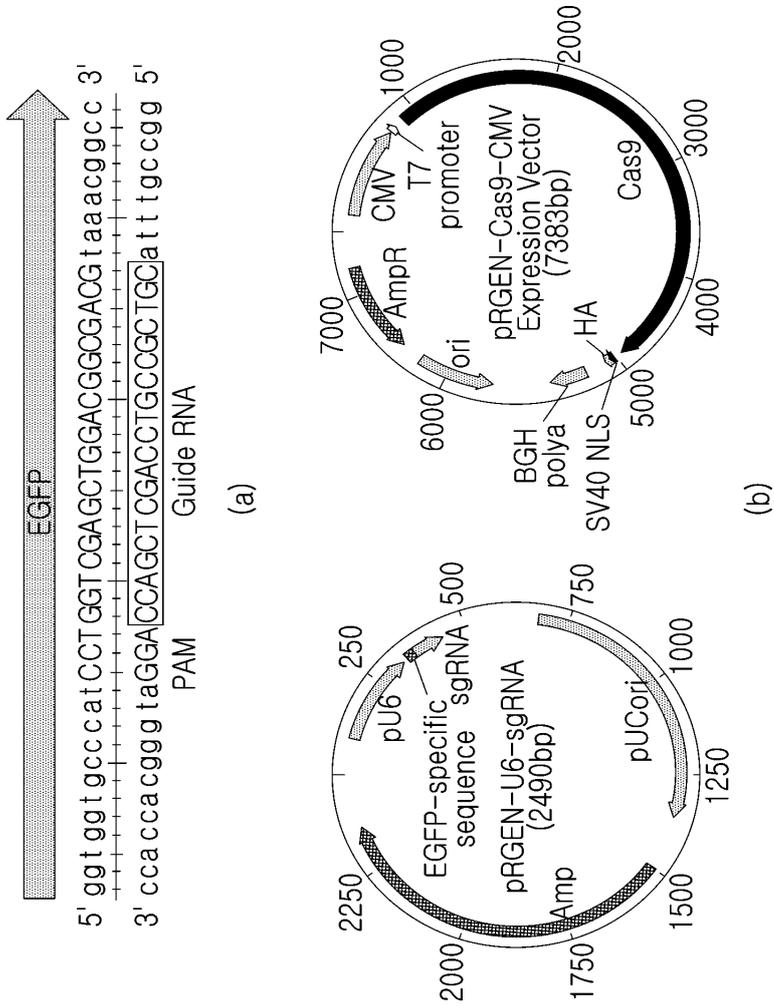


(a)

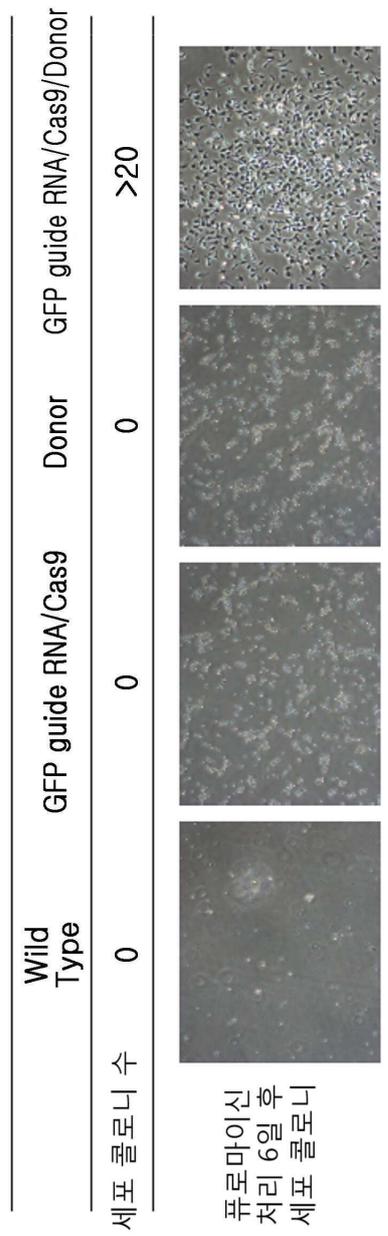


(b)

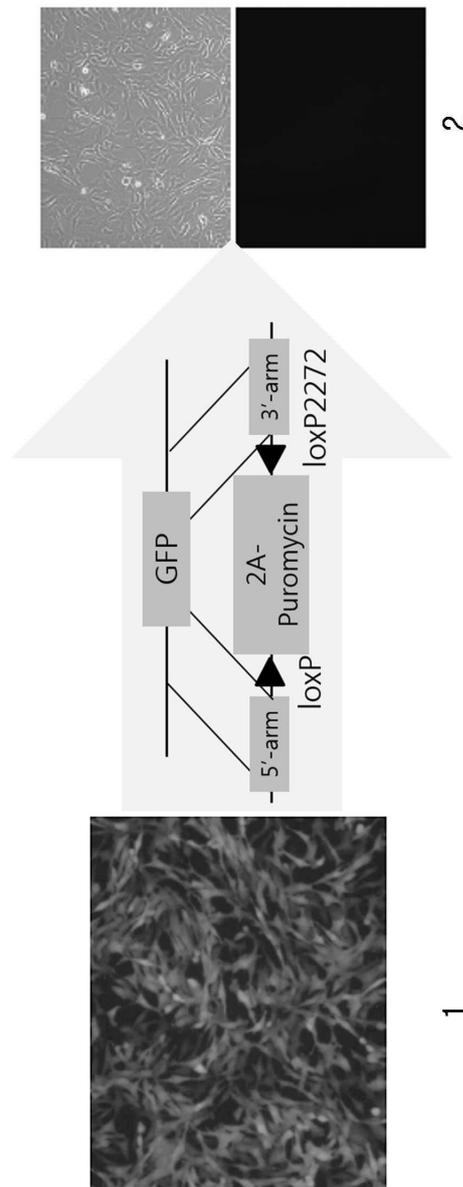
도면37



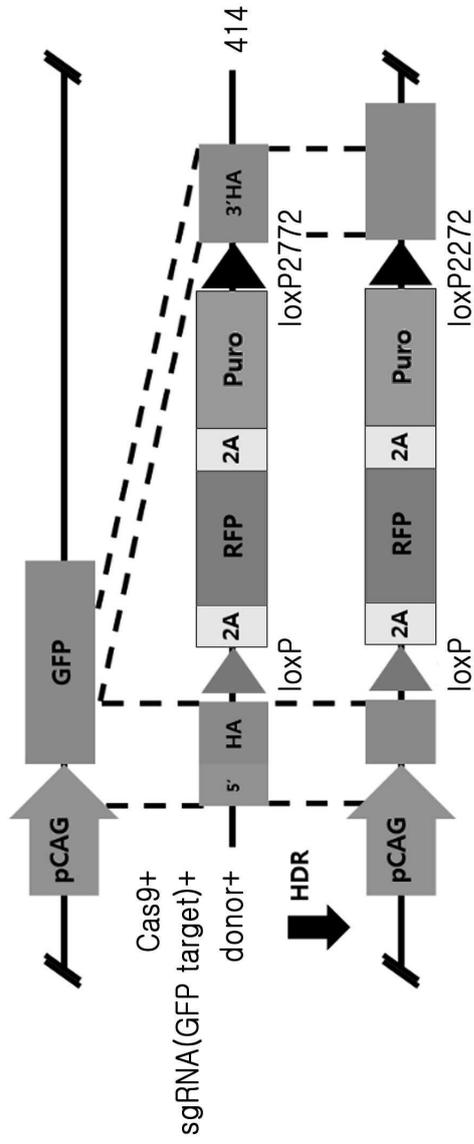
도면39



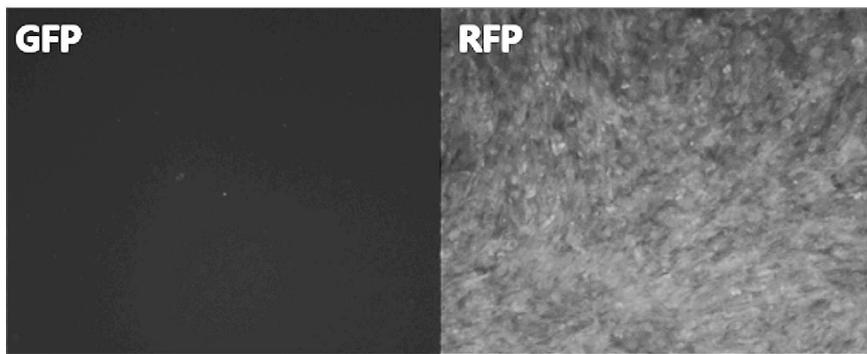
도면40



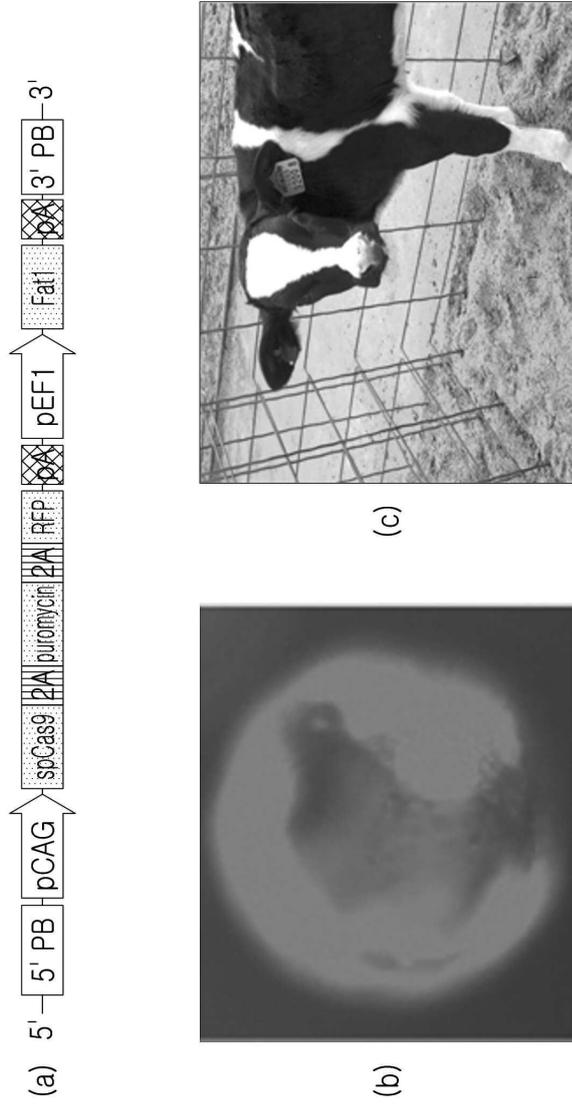
도면41



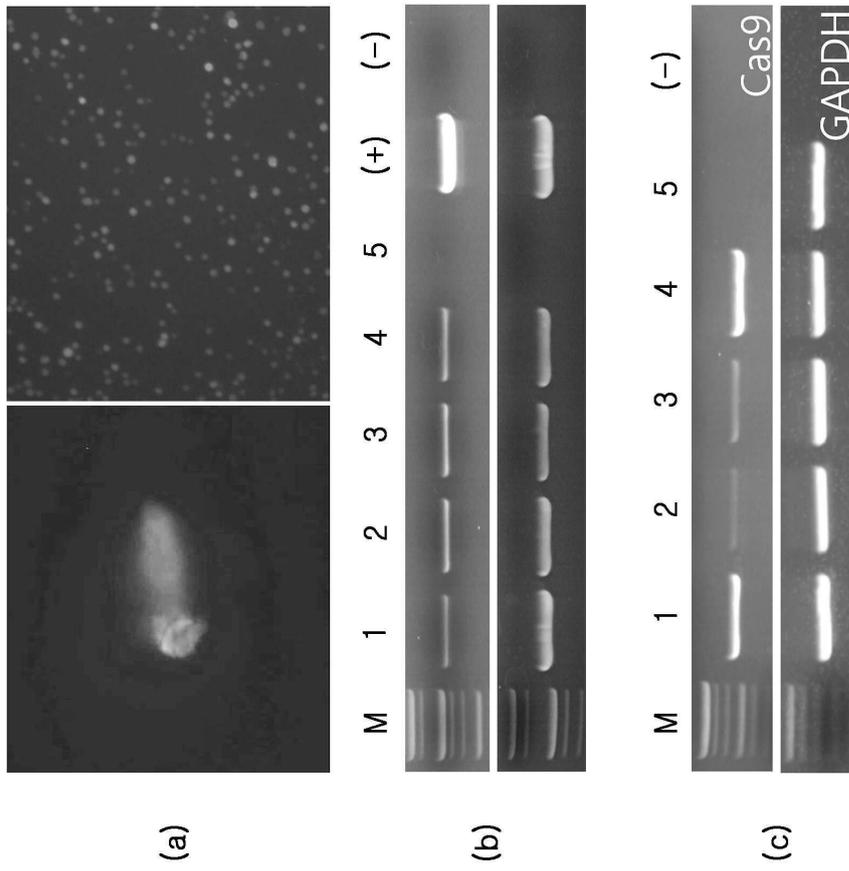
도면42



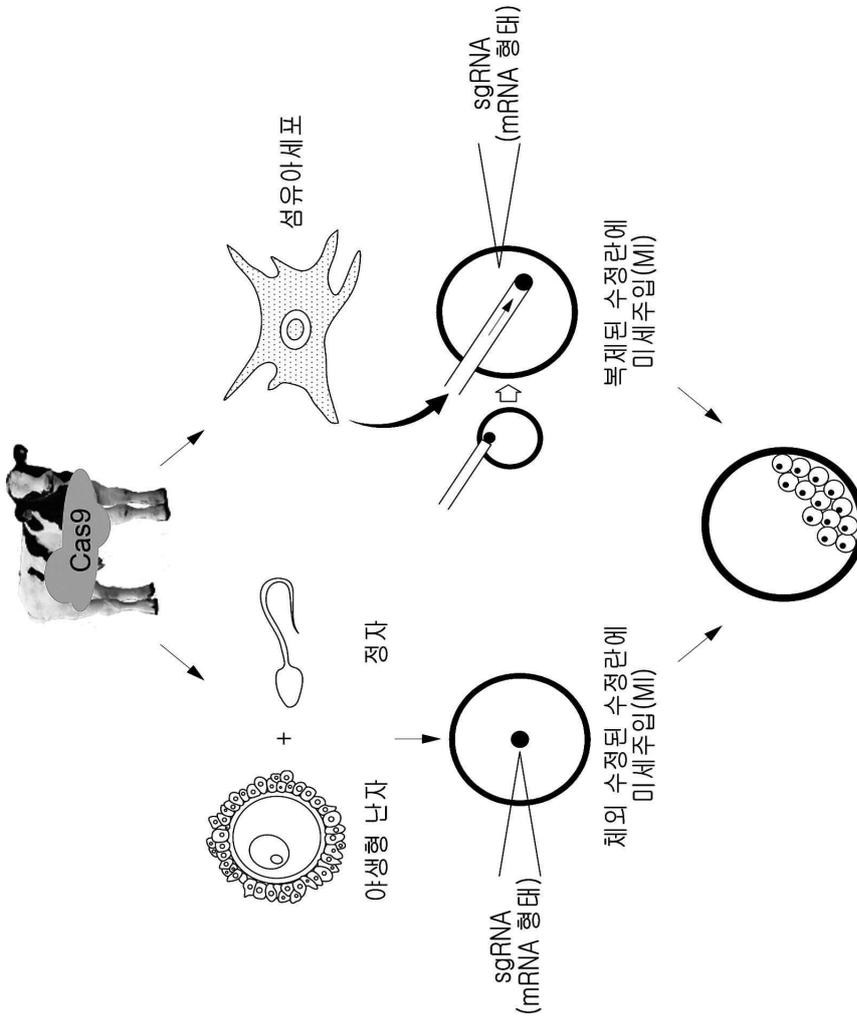
도면43

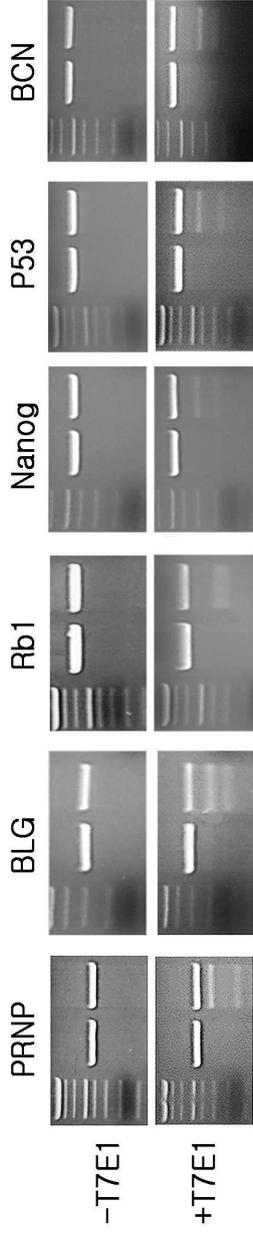


도면44



도면45



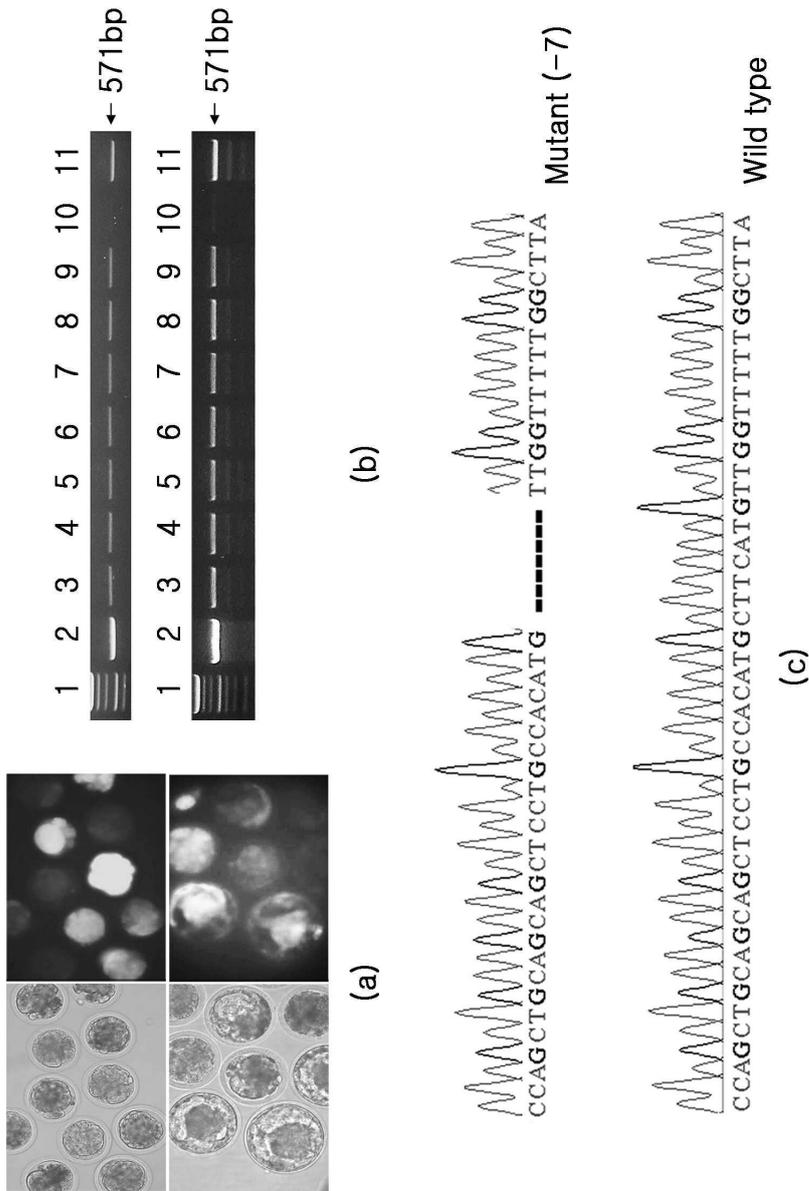


(a)

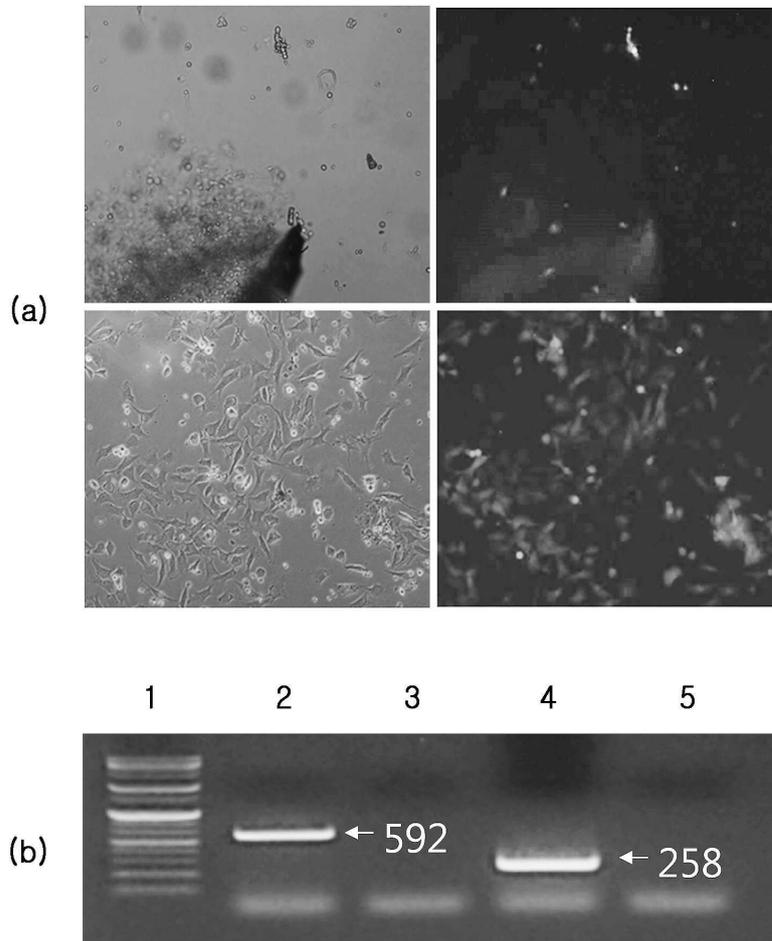
GCCACCCCGCCCGGCACCCGGTCCGGCCATGGCCATC KO(-)
 GCCACCCCGCCC-GCACCCGGTCCGGCCATGGCCATC KO (1bp)
 GCCA-----CGCCATGGCCATC KO (23bp)

(b)

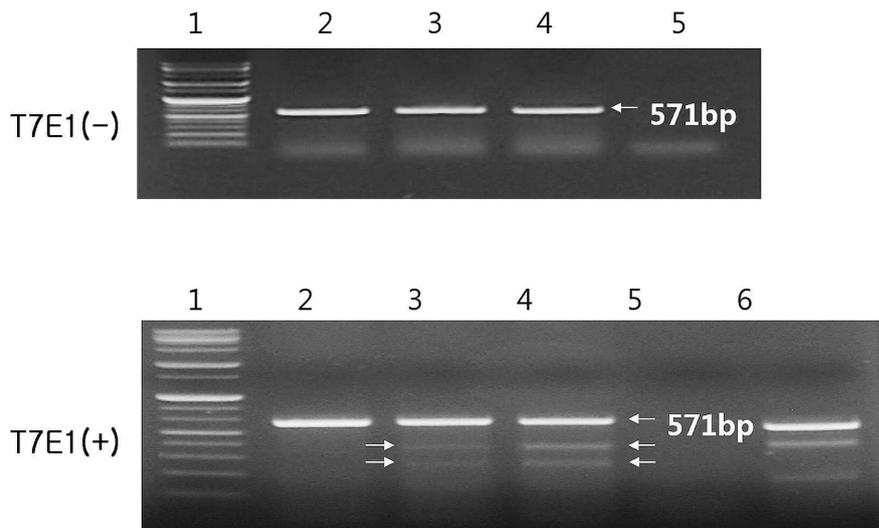
도면47



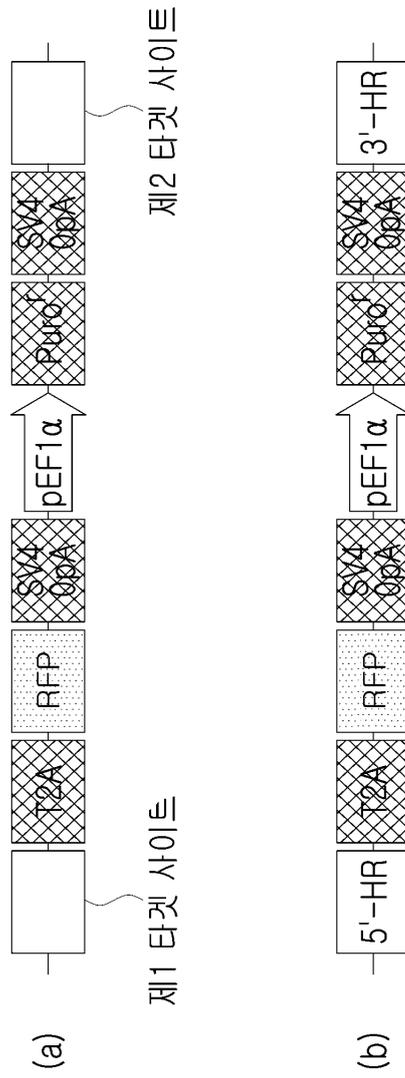
도면48



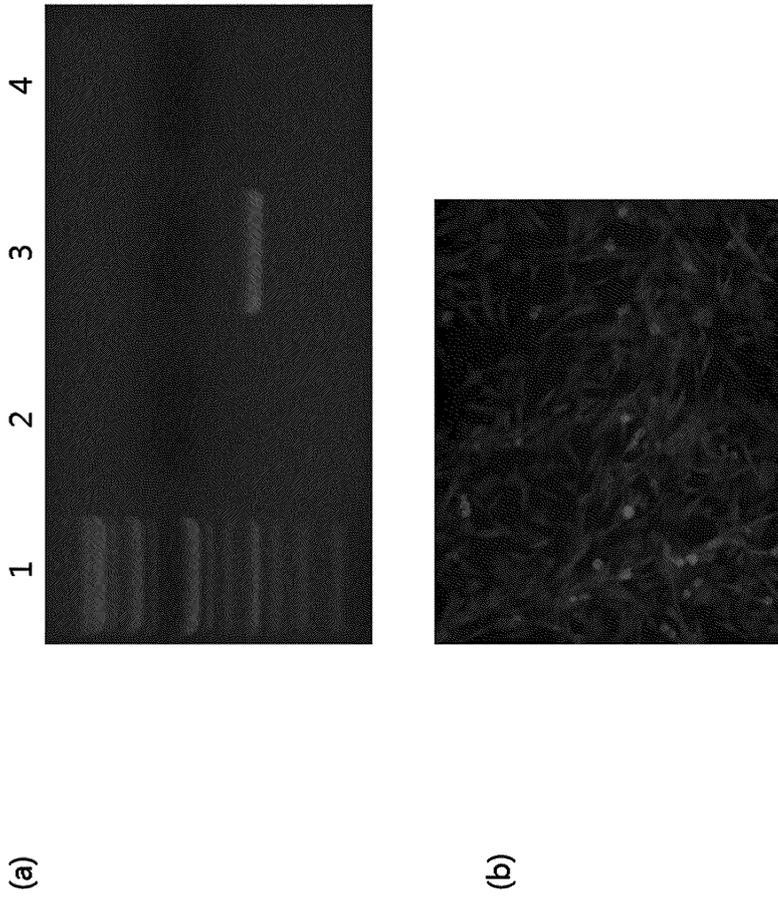
도면49



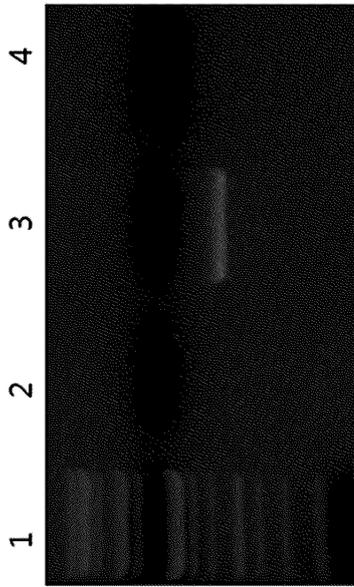
도면50



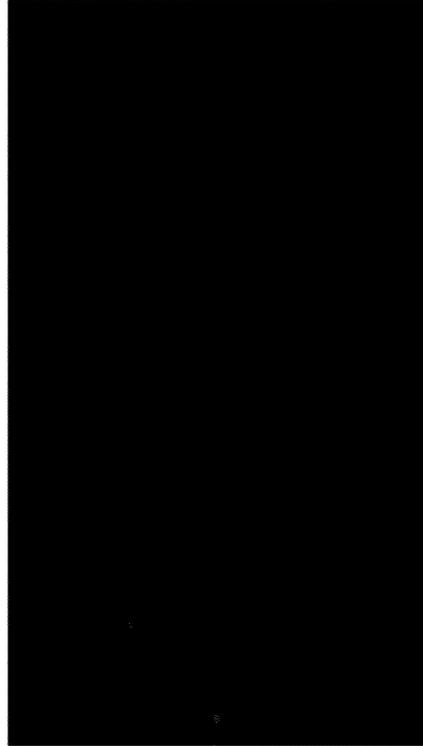
도면51



도면52

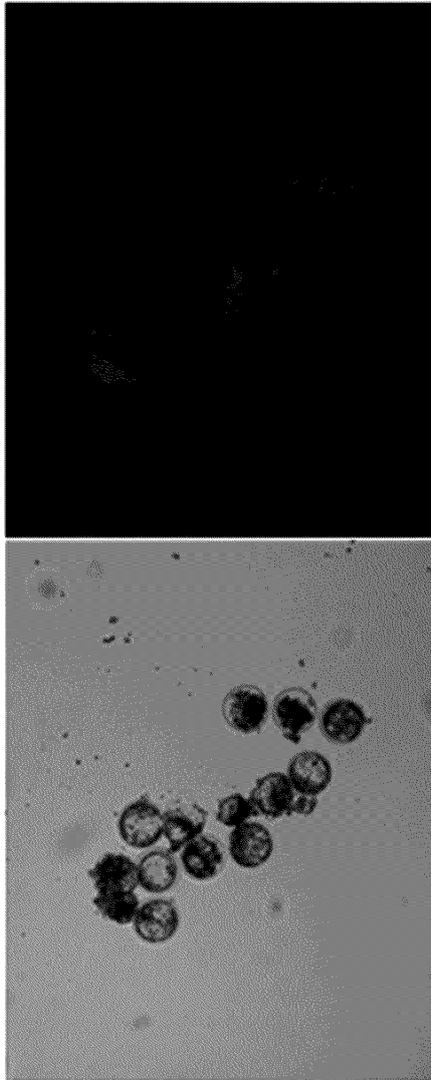


(a)



(b)

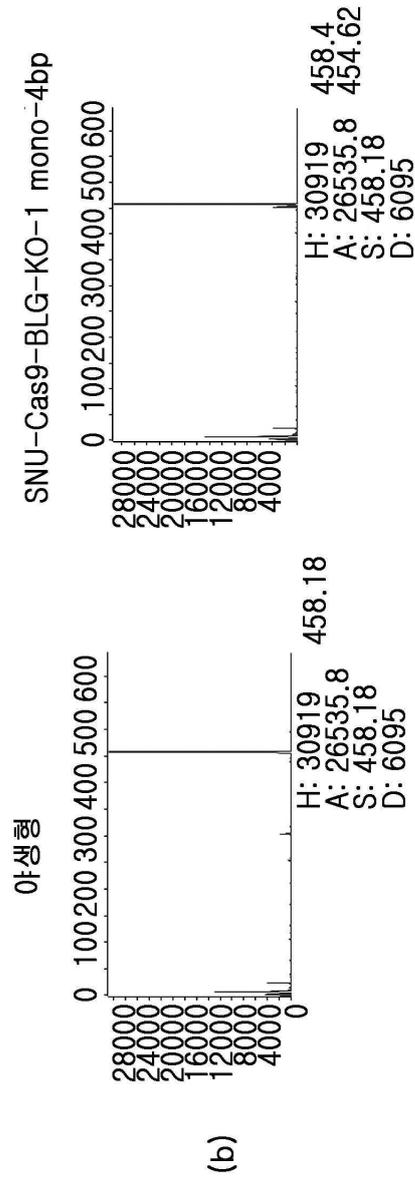
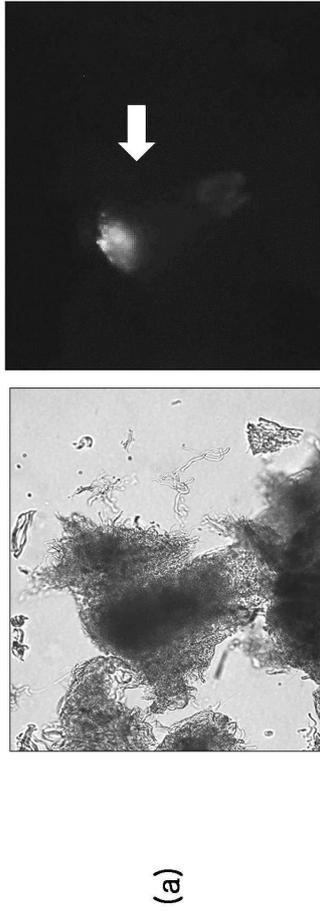
도면53



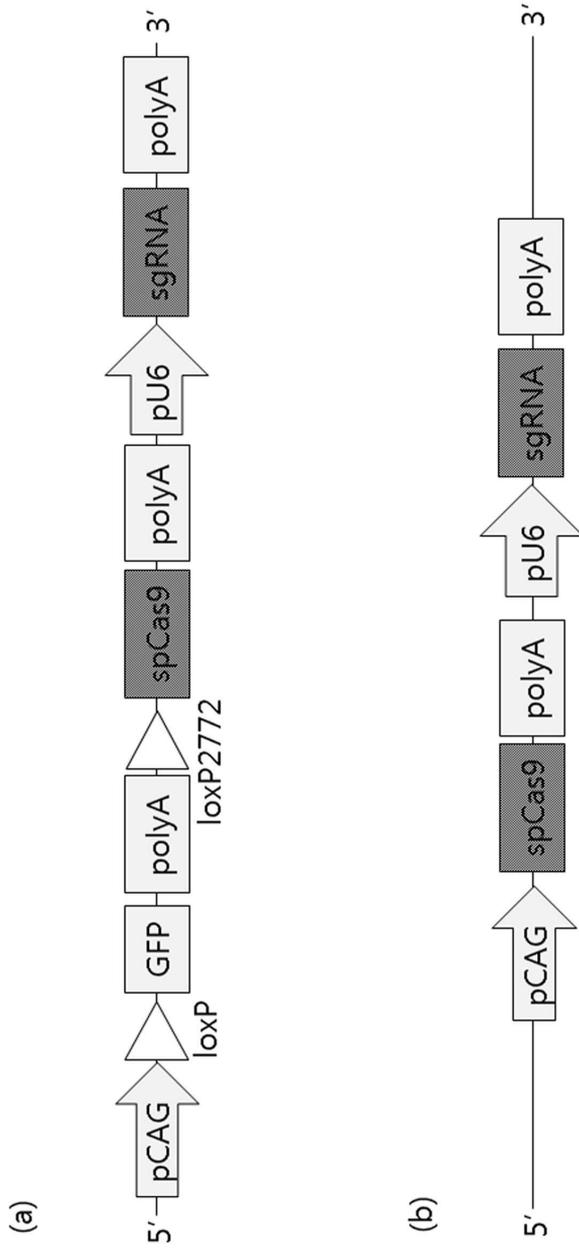
도면54



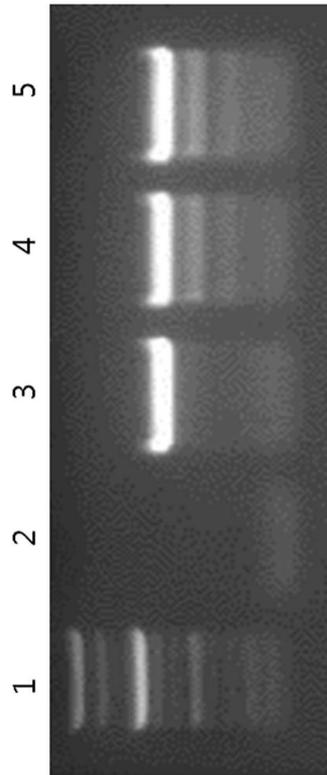
도면55



도면56



도면57



<211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_GFP_F_1 (primer)
 <400> 1
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccatggcc agcaaaggag aagaactt 58
 <210> 2
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_GFP_R_1 (primer)
 <400> 2
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ttattttag agctcatcca tgcc 54
 <210> 3
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_RFP_F_1 (primer)
 <400> 3
 ggggacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt caccatggat agcactgaga acgtcat 57
 <210> 4
 <211> 50
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_RFP_R_1 (primer)
 <400> 4
 ggggaccact ttgtacaaga aagctgggtc ctactggaac aggtggtggc 50
 <210> 5
 <211> 313
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> tp_PB_1 (transposon sequence)
 <400> 5

ttaacctag aaagatagtc tgcgtaaaat tgacgcatgc attcttgaaa tattgctctc 60
 tctttctaaa tagcgcaaat ccgtcgctgt gcatttagga catctcagtc gccgcttga 120
 gctcccgtga ggcgtgcttg tcaatgcggt aagtgtcact gattttgaac tataacgacc 180
 gcgtgagtca aaatgacgca tgattatctt ttacgtgact ttaagattt aactcatacg 240
 ataattatat tgttatttca tgttctactt acgtgataac ttattatata tatattttct 300
 tgttatagat atc 313

<210> 6

<211> 235

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> tp_PB_2 (transposon sequence)

<400> 6

tttgttactt tatagaagaa attttgagtt tttgtttttt ttaataaat aaataaacat 60
 aaataaattg tttgttgaat ttattattag tatgtaagtg taaatataat aaaacttaat 120
 atctattcaa attaataaat aaacctgat atacagaccg ataaaacaca tgcgtcaatt 180
 ttacgcatga ttatctttaa cgtacgtcac aatatgatta tctttctagg gttaa 235

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pr_GFP_F_2 (primer)

<400> 7

cacatgaagc agcagcactt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> pr_GFP_R_2 (primer)

<400> 8

agttcacctt gatgccgttc 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_RFP_F_2 (primer)
 <400> 9
 ccccgtaatg cagaagaaga 20

 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_RFP_R_2 (primer)
 <400> 10
 ggtgatgtcc agcttggagt 20

 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_GAPDH_F_1 (primer)
 <400> 11
 ggcgtgaacc acgagaagta 20

 <210> 12
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_GAPDH_R_1(primer)

 <400> 12
 ccctccacga tgccaaagt 19

 <210> 13
 <211> 292
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> tp_SB_1
 <400> 13
 atacagttga agtcggaagt ttacatacac ttaagttgga gtcattaaaa ctcgtttttc 60
 aactactcca caaatttctt gttacaaaac aatagttttg gcaagtcagt taggacatct 120

actttgtgca tgacacaagt catttttcca acaattgttt acagacagat tatttcactt 180
 ataattcact gtatcacaat tccagtgggt cagaagtta catacactaa gttgactgtg 240

cctttaaaca gcttggaaaa ttccagaaaa tgatgtcatg gctttagaag ct 292

<210> 14
 <211> 315
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> tp_SB_2 (transposon sequence)
 <400> 14

gtggaaggct actcgaaatg tttgaccaa gttaaacaat ttaaaggcaa tgctaccaa 60
 tactaattga gtgtatgtaa acttctgacc cactgggaat gtgatgaaag aaataaaagc 120
 tgaaatgaat cattctctct actattattc tgatattca cattcttaa ataaagtgg 180
 gatcctaact gacctaagac agggaat ttt tactaggatt aaatgtcagg aattgtgaaa 240

aagtgagttt aaatgtat ttt ggctaagggtg tatgtaaact tccgacttca actgtatagg 300
 gatcctctag ctaga 315

<210> 15
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_GFP_F_1 (primer)
 <400> 15

ggacttcctt tgtcccaaat ct 22

<210> 16
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_GFP_R_1 (primer)
 <400> 16

tagcggctga agcactgc 18

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_spCas9_F_1 (primer)
 <400> 17
 gacaagaagt acagcatcgg 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_spCas9_R_1 (primer)
 <400> 18
 caaccagctg ttcgaggaga 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_Fat1_F_1 (primer)
 <400> 19
 aaacacgaaa caggcgacca 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_Fat1_R_1 (primer)
 <400> 20
 tttgtcgttg gccacgattg 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_GAPDH_F_2 (primer)
 <400> 21
 ggcgtgaacc acgagaagta 20
 <210> 22

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_GAPDH_R_2 (primer)
 <400> 22
 ccctccacga tgccaaagt 19
 <210> 23
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gn_PRNP_1 (sgRNA)
 <400> 23
 aaaaaccaac atgaagcatg tgg 23
 <210> 24
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gn_BLG_1 (sgRNA)
 <400> 24

 ccccctgaga gtgtatgtgg agg 23
 <210> 25
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gn_Rb1_1 (sgRNA)
 <400> 25
 tgacctgcc ttggtgttcg agg 23
 <210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gn_Nanog_1 (sgRNA)
 <400> 26
 accactgtcc ccgtctgtgg agg 23

<210> 27
 <211> 23
 <212>
 > DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gn_TP53_1 (sgRNA)
 <400> 27
 gcgcgacgc gggtgccggg cgg 23
 <210> 28
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gn_IFNT_1 (sgRNA)
 <400> 28
 agtggagagt ctgttcattt ggg 23
 <210> 29
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> gn_BCN_1 (sgRNA)
 <400> 29
 ttgcaagggc cagagccacc agg 23

 <210> 30
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_PRNP_F_1 (primer)
 <400> 30
 gcaagaagcg accaaaacct 20
 <210> 31
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_PRNP_R_1 (primer)

<400> 31
 ggtgcatggt ttcacgatag 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_BLG_F_1 (primer)

<400> 32
 ttaaaggccg tgtctccagt 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_BLG_R_1 (primer)

<400> 33
 gaaagccctg gataagcagc 20
 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_Rb1_F_1 (primer)

<400> 34
 cccccaccaa ctgagtagaa 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_Rb1_R_1 (primer)

<400> 35
 gattccagaa tgaggagct 20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_Nanog_F_1 (primer)
 <400> 36
 acctaccatc tcgctctgag 20
 <210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_Nanog_R_1 (primer)
 <400> 37
 accaagaatc gaaccaggc 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_TP53_F_1 (primer)
 <400> 38
 cttcagcctt tgctttttg 20
 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_TP53_R_1 (primer)
 <400> 39
 ttccggtcgt ccaaatactc 20
 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_IFNT_F_1 (primer)
 <400> 40
 tcttcccat ggcttttgtg 20
 <210> 41

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_IFNT_R_1 (primer)
 <400> 41
 tggagatgat aagagccctc 20
 <210> 42
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_BCN_F_1 (primer)
 <400> 42
 tggctggcag tgaacatta 20
 <210> 43
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_BCN_R_1 (primer)
 <400> 43
 agggattgat ggtacagatg g 21
 <210> 44
 <211> 1996
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HITI_RFP donor_1
 <400> 44
 cgtcgcgctc cagctcgacc aggcataatgt ggccaattcg gaagcgggca gtcaccaac 60
 tacgccctgc tgaagctggc cggcgacgtg gagagcaacc cgggccccgg atccatggtg 120
 tctaaggcgc aagagctgat taaggagaac atgcacatga agctgtacat ggagggcacc 180
 gtgaacaacc accacttcaa gtgcacatcc gagggcgaag gcaagcccta cgagggcacc 240
 cagaccatga gaatcaaggt ggtcgagggc ggcctctctc ccttcgcctt cgacatcctg 300
 gctaccagct tcatgtacgg cagcagaacc ttcatcaacc acaccaggg catccccgac 360
 ttctttaage agtccttccc tgagggcttc acatgggaga ggtcaccac atacaggac 420

gggggcgtgc tgaccgctac ccaggacacc agcctccagg acggctgcct catctacaac 480
 gtcaagatca gaggggtgaa cttcccatcc aacggcctg tgatgcagaa gaaaacactc 540

 ggctgggagg ccaacaccga gatgetgtac cccgctgacg gggcctgga aggcagaagc 600
 gacatggccc tgaagctcgt gggcgggggc cacctgatct gcaacttcaa gaccacatac 660
 agatccaaga aaccgctaa gaacctcaag atccccggcg tctactatgt ggaccacaga 720
 ctggaagaa tcaaggaggc cgacaaagag acctacgtcg agcagcacga ggtggctgtg 780
 gccagatact gcgacctccc tagcaaactg gggcacaaac ttaatggctc cgagggcaga 840
 ggaagccttc taacatgcgg tgacgtggag gagaatcccg gcccttccgg gatgaccgag 900
 tacaagccca cggctgcgct cgccaccgc gacgacgtcc ccagggccgt acgcacctc 960

 gccgccgct tcgccacta ccccgccag cgccacaccg tcgatccaga ccgccacatc 1020
 gagcgggtca ccgagctgca agaactcttc ctcacgcgcg tcgggctcga catcggaag 1080
 gtgtgggtcg cggacgacgg cgcccggtg gcggtctgga ccacgccga gagcgtcga 1140
 gcggggcgcg tgttcgccga gatcgccccg cgcattggccg agttgagcgg ttccccgctg 1200
 gccgcgcage aacagatgga aggtctctcg gcgccgcacc ggccaagga gcccgctgg 1260
 ttcttgcca ccgtcgcgct ctcgcccgac caccaggga agggctctggg cagcgcctc 1320
 gtgctccccg gactggaggc ggccgagcgc gccgggtgc ccgccttct ggagacctc 1380

 gcgccccga acctccctt ctacgagcgg ctcggttca ccgtcaccgc cgacgtcgag 1440
 gtgccgaag gaccgcgac ctggtgcatg acccgcaagc ccggtgctg aagatctttt 1500
 tcctctgcc aaaaattatg gggacatcat gaagccctt gagcatctga ctcttgcta 1560
 ataaaggaaa ttiattttca ttgcaatagt gtgttgaat tttttgtgc tctcactcgg 1620
 aaggacatat gggagggcaa atcatttaa acatcagaat gactatttg ttagagttt 1680
 ggcaacatat gccatatgct ggctgcatg aacaaagggt gctataaaga ggtcatcagt 1740
 atatgaaca gccccctgct gtccattct tattccatag aaaagccttg acttgaggtt 1800

 agatTTTTT tatTTTTgt tttgtttat tttttcttt aacatcccta aaatttctt 1860
 tacatgtttt actagccaga ttttctctc tctctgact actcccagtc atagctgtcc 1920
 ctcttcttt atgaagatcc ctgacctgc agcccaagct tggatccctc gagcgtcgcc 1980
 gtccagctcg accagg 1996

 <210> 45
 <211> 3984
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> HDR_RFP donor_1

<400> 45

cagccattgc cttttatggt aatcgtgcga gagggcgag ggacttcctt tgtcccaaat 60

ctggcggagc cgaatctgg gaggcgccg cgaccccct ctagcgggcg cgggcgaagc 120

ggtgcggcgc cggcaggaag gaaatgggcg gggaggcct tcgtgcgtcg ccgcgccgc 180

gtccccttct ceatctccag cctcggggct gccgcagggg gacggctgcc ttcggggggg 240

acggggcagg gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa 300

ccatgttcat gccttcttct ttttctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttgttgtgct 360

gtctcatcat ttggcaaag aattcgccac catggtgagc aaggcgagg agctgttcac 420

cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgactg aacggccaca agttcagcgt 480

gtccggcgag ggcgaggcg atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcactatagg 540

gcgaattggg cccgacgtcg catgcgtgaa acagactttg aattttgacc ttctcaagtt 600

ggcgggagac gtggagtcca acccagggcc cataacttcg tataatgtat gctatacгаа 660

gttattacce gggatggtga gcaagggcga ggaggataac atggccatca tcaaggagtt 720

catgccttc aaggtgcaca tggagggtc cgtgaacggc cacgagttcg agatcgaggg 780

cgaggcgag gcccgccct acgaggcac ccagaccgcc aagctgaagg tgaccaaggg 840

tggccccctg ceettegctt gggacatect gtcccctcag tteatgtacg gctccaaggc 900

ctacgtgaag caccgcccg acatccccga ctacttgaag ctgtccttc ccgagggtt 960

caagtgggag cgcgtgatga acttcgagga cggcggcgtg gtgaccgtga cccaggactc 1020

ctccctgcag gacggcgagt tcatctaaa ggtgaagctg cgcggcacca acttccctc 1080

cgacgcccc gtaatgcaga agaagacat gggctgggag gcctcctcg agcggatgta 1140

ccccaggac ggcgcctga agggcgagat caagcagagg ctgaagctga aggacggcgg 1200

ccactacgac gctgaggtca agaccaccta caaggccaag aagcccgtgc agctgcccgg 1260

cgctacaac gtcaacatca agttggacat cacctcccac aacaggact acaccatcgt 1320

ggaacagtac gaacgcgccg agggccgcca ctccaccggc ggcatggacg agctgiacia 1380

ggctagcgag ggcagaggaa gccttctaac atgcggtgac gtggaggaga atcccggccc 1440

ttccgggatg accgagtaca agcccagggt gcgcctcgcc acccgcgacg acgtcccag 1500

ggccgtacgc accctcgccg ccgcgttcgc cgactaccc gccacgcgcc acaccgtcga 1560

tccagaccgc cacatcgagc gggtcaccga gctgcaagaa ctcttctca cgcgcgtcgg 1620

gctcgacatc ggcaaggtgt gggtcgaggc cgacggcgcc gcggtggcgg tetggaccac 1680

gccggagagc gtcgaagcgg gggcgggtgtt cgccgagatc ggcccgcgca tggccgagtt 1740

gagcggttcc cgctggccg cgcagcaaca gatggaaggt ctctggcgc cgcaccggcc 1800

caaggagccc gcgtggttcc tggccaccgt eggcgtctcg cccgaccacc agggcaaggg 1860

tctgggcagc gccgtcgtgc tccccggagt ggaggcggcc gagcgcgccg gggtgcccgc 1920

cttctggag acctccgcgc cccgcaacct ccccttctac gagcggctcg gcttcaccgt 1980

caccgccgac gtcgaggtgc ccgaaggacc gcgcacctgg tgcatgacce gcaagcccgg 2040

tgctgagat cttttccct ctgcaaaaa ttatggggac atcatgaagc cccttgagca 2100

tctgacttct ggctaataaa ggaaatttat tttcattgca atagtgtgtt ggaatttttt 2160

gtgtctctca ctcggaagga catatgggag ggcaaatcat ttaaacatc agaatgagta 2220

tttggtttag agtttgcaa catatgcat atgctggctg ccatgaacaa aggtggctat 2280

aaagggtca tcagtatatg aaacagcccc ctgctgtcca ttccttattc catagaaaag 2340

ccttgacttg aggttagatt tttttatat ttgtttgt gttatTTTT tctttaacat 2400

ccctaaaatt ttccttacat gttttactag ccagattttt cctcctctcc tgactactcc 2460

cagtcatage tgcctctct ctcttatgaa gatccctcga cctgcagccc aagcttggat 2520

ccctcgagtt ataacttctg ataggatact ttatacgaag ttatcatatg ggagagctcc 2580

caaccacatg aagcagcacg acttcttcaa gtcgccatg cccgaaggct acgtccagga 2640

gcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgagg tgaagttcga 2700

gggcgacacc ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcac gacttcaagg aggacggcaa 2760

catcctgggg cacaagetgg agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga 2820

caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg aggacggcag 2880

cgtcagctc gccgaccact accagcagaa caccctcgc ggcgacggcc ccgtgctgct 2940

gcccgacaac cactacctga gcaccagtc cgcctgagc aaagaccca acgagaagcg 3000

cgatcacatg gtctgctgg agttcgtgac cgccgccggg atcactcacg gcatggacga 3060

gctgtacaag taagaattca ctctcaggt gcaggctgcc tatcagaagg tgggtgctgg 3120

tgtggccaat gcctggctc acaaatacca ctgagatctt tttcctctg ccaaaaatta 3180

tggggacatc atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc taataaagga aatttatTTT 3240

cattgcaata gtgtgttga atttttgtg tctctcactc ggaaggacat atgggagggc 3300

aatcattta aaacatcaga atgagtattt ggttttaggt ttggcaacat atgccatatg 3360

ctggctgcca tgaacaaagg tggctataaa gaggtcatca gtatatgaaa cagccccctg 3420

ctgtccattc cttattccat agaaaagcct tgacttgagg ttagatTTTT tttatatttt 3480
 gttttgtgtt atttttttct ttaacatccc taaattttc cttacatggt ttactagcca 3540
 gatTTTTcct cctctcctga ctactcccag tcatagctgt ccctcttctc ttatgaagat 3600
 ccctcgacct gcagcccaag cttggatccc tcgagttaat taacgagagc ataatattga 3660
 tatgtgcca agttgtttct gactgactaa taagtataat ttgtttctat tatgtatagg 3720
 ttaagctaat tacttttttt ataatacaac atgactgttt ttaaagtaca aaataagttt 3780
 atttttgtaa aagagagaat gtttaaaagt tttgttactt tatagaagaa attttgagtt 3840

tttgtttttt ttaataaat aaataaacat aaataaattg tttgttgaat ttattattag 3900
 tatgtaagtg taaatataat aaaacttaat atctattcaa attaataaat aaacctcgat 3960
 atacagaccg ataaaacaca tgcg 3984

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HITI_pr_RFP_F_1(primer)

<400> 46

tctgctaacc atgttcatgc 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HITI_pr_RFP_R_1(primer)

<400> 47

caggaagga ctgcttaaag 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HDR_pr_RFP_F_1(primer)

<400> 48

tctgctaacc atgttcatgc 20

<210> 49

<211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HDR_pr_RFP_R_1(primer)
 <400> 49
 ttcacgtagg ccttgagc 19

<210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_spCas9_F_2 (primer)
 <400> 50
 gacaagaagt acagcatcgg 20

<210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_spCas9_R_2 (primer)
 <400> 51
 caaccagctg ttcgaggaga 20

<210> 52
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_GAPDH_F_3 (primer)
 <400> 52
 ggcgtgaacc acgagaagta 20

<210> 53
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> pr_GAPDH_R_3 (primer)
 <400> 53
 ccctccacga tgccaaagt 19

<210> 54
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_BLG_F_1 (primer)
 <400> 54
 ttaaaggccg tgtctccagt 20
 <210> 55

 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> in_pr_BLG_R_1 (primer)
 <400> 55
 gaaagccctg gataagcagc 20