



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0135966
(43) 공개일자 2017년12월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7032721
(22) 출원일자(국제) 2016년04월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년11월10일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/027253
(87) 국제공개번호 WO 2016/168275
국제공개일자 2016년10월20일
(30) 우선권주장
62/146,618 2015년04월13일 미국(US)

(71) 출원인
맥스시티 인코포레이티드
미국 메릴랜드 20878 게이썬스부르크 스위트 250
퍼스트필드 로드 22
(72) 발명자
리, 린홍
미국 메릴랜드 20878 게이썬스부르크 스위트 250
퍼스트필드 로드 22 맥스시티 인코포레이티드 (내)
페쉬와, 마드수단
미국 메릴랜드 20878 게이썬스부르크 스위트 250
퍼스트필드 로드 22 맥스시티 인코포레이티드 (내)
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 77 항

(54) 발명의 명칭 **게놈 DNA를 변형시키기 위한 방법 및 조성물**

(57) 요약

조성물 및 방법은 내인성 게놈 DNA 영역의 서열 변형에 관한 것이다. 특정 양태는 세포에서 표적 게놈 DNA 영역의 부위-특이적 서열을 변형시키는 방법으로서, 세포를 활성화 조성물과 접촉시키는 단계; 세포를 (a) 도너 DNA 및 (b) DNA 분해제를 포함하는 형질감염 조성물로 형질감염시키는 단계로서, 도너 DNA는 (i) 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동 영역; 및 (ii) 서열 변형 영역을 포함하며; 게놈 DNA 서열이 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형되는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/902 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

세포에서 표적 게놈 DNA 영역을 부위-특이적으로 서열 변형시키는 방법으로서,

세포를 활성화 조성물과 접촉시키는 단계;

세포를 (a) 도너 DNA 및 (b) DNA 분해제를 포함하는 비-바이러스성 형질감염 조성물로 형질감염시키는 단계로서,

도너 DNA는

(i) 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동 영역; 및

(ii) 서열 변형 영역을 포함하며;

게놈 DNA 서열이 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형되는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1 항에 있어서, 세포가 면역 세포인 방법.

청구항 3

제2 항에 있어서, 면역 세포가 T 세포인 방법.

청구항 4

제3 항에 있어서, T 세포가 일차 T 세포인 방법.

청구항 5

제4 항에 있어서, 활성화 조성물이 항-CD3 및 항-CD28 항체를 포함하는 방법.

청구항 6

제5 항에 있어서, 세포의 형질감염이 세포의 유동 전기천공을 포함하는 방법.

청구항 7

세포에서 표적 게놈 DNA 영역을 부위-특이적으로 서열 변형시키는 방법으로서,

세포를 활성화 조성물과 접촉시키는 단계;

세포를 (a) 도너 DNA 및 (b) DNA 분해제를 포함하는 형질감염 조성물로 형질감염시키는 단계로서,

도너 DNA는

(i) 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동 영역; 및

(ii) 서열 변형 영역을 포함하며;

게놈 DNA 서열이 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형되는 단계를 포함하는 방법.

청구항 8

제7 항에 있어서, 세포의 형질감염이 세포의 전기천공을 포함하는 방법.

청구항 9

제8 항에 있어서, 전기천공이 유동 전기천공 장치를 사용하는 유동 전기천공인 방법.

청구항 10

제7 항 내지 제9 항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포가 세포를 활성화 조성물과 접촉시킨 후 7일 이내의 기간에 형질감염되는 방법.

청구항 11

제10 항에 있어서, 세포가 세포를 활성화 조성물과 접촉시킨 후 3일 이내의 기간에 형질감염되는 방법.

청구항 12

제11 항에 있어서, 세포가 세포를 활성화 조성물과 접촉시킨 후 2일 또는 그 이내의 기간에 형질감염되는 방법.

청구항 13

제12 항에 있어서, 세포가 세포를 활성화 조성물과 접촉시킨 후 2일에 형질감염되는 방법.

청구항 14

제7 항 내지 제13 항 중의 어느 한 항에 있어서, DNA 분해제가 TALEN, 트랜스포사제, 인테그라제 및 뉴클레아제로부터 선택되는 방법.

청구항 15

제7 항 내지 제14 항 중의 어느 한 항에 있어서, DNA 분해제가 하나 이상의 RNA로 인코딩되는 방법.

청구항 16

제7 항 내지 제15 항 중의 어느 한 항에 있어서, DNA 분해제가 뉴클레아제인 방법.

청구항 17

제16 항에 있어서, DNA 분해제가 Cas9인 방법.

청구항 18

제7 항 내지 제17 항 중의 어느 한 항에 있어서, 형질감염 조성물이 가이드 RNA를 추가로 포함하는 방법.

청구항 19

제16 항에 있어서, 뉴클레아제가 부위-특이적 뉴클레아제인 방법.

청구항 20

제7 항 내지 제19 항 중의 어느 한 항에 있어서, 도너 DNA가 플라스미드인 방법.

청구항 21

제7 항 내지 제19 항 중의 어느 한 항에 있어서, 도너 DNA가 전이유전자를 포함하는 방법.

청구항 22

제7 항 내지 제19 항 중의 어느 한 항에 있어서, 도너 DNA가 올리고 DNA인 방법.

청구항 23

제7 항 내지 제19 항 중의 어느 한 항에 있어서, 도너 DNA가 단일-가닥 올리고 DNA인 방법.

청구항 24

제7 항 내지 제23 항 중의 어느 한 항에 있어서, 형질감염 조성물 중 도너 DNA의 농도가 약 10 내지 약 500 μ g/mL인 방법.

청구항 25

제7 항 내지 제24 항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포가 포유동물 세포인 방법.

청구항 26

제25 항에 있어서, 세포가 인간 세포인 방법.

청구항 27

제25 항에 있어서, 세포가 섬유모 세포인 방법.

청구항 28

제25 항에 있어서, 포유동물 세포가 말초혈 림프구인 방법.

청구항 29

제25 항에 있어서, 포유동물 세포가 일차 T 세포인 방법.

청구항 30

제25 항에 있어서, 세포가 자연 살해(NK) 세포인 방법.

청구항 31

제29 항 또는 제30 항에 있어서, 활성화 조성물이 항-CD3 및 항-CD28 항체를 포함하는 방법.

청구항 32

제25 항에 있어서, 포유동물 세포가 줄기 세포인 방법.

청구항 33

제32 항에 있어서, 줄기 세포가 조혈 줄기 세포인 방법.

청구항 34

제32 항에 있어서, 세포가 중간엽 줄기 세포인 방법.

청구항 35

제25 항에 있어서, 포유동물 세포가 일차 세포인 방법.

청구항 36

제7 항 내지 제35 항 중의 어느 한 항에 있어서, 표적 게놈 DNA 서열이 질환-관련 유전자를 포함하는 방법.

청구항 37

제7 항 내지 제36 항 중의 어느 한 항에 있어서, 도너 DNA가 질환-관련 유전자를 포함하는 방법.

청구항 38

제7 항 내지 제37 항 중의 어느 한 항에 있어서, 도너 DNA가 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하는 방법.

청구항 39

제38 항에 있어서, 도너 DNA의 서열 변형 영역이 CAR을 포함하는 방법.

청구항 40

제7 항 내지 제36 항 중의 어느 한 항에 있어서, 도너 DNA가 적어도 10개 핵산의 상동 서열을 포함하는 상동 영역을 포함하는 방법.

청구항 41

제40 항에 있어서, 도너 DNA가 적어도 20개 핵산의 상동 서열을 포함하는 상동 영역을 포함하는 방법.

청구항 42

제41 항에 있어서, 도너 DNA가 적어도 30개 핵산의 상동 서열을 포함하는 상동 영역을 포함하는 방법.

청구항 43

제7 항 내지 제42 항 중의 어느 한 항에 있어서, 서열 변형의 효율이 0.2% 초과인 방법.

청구항 44

제43 항에 있어서, 서열 변형 효율이 1%를 초과하는 방법.

청구항 45

제44 항에 있어서, 서열 변형 효율이 5%를 초과하는 방법.

청구항 46

제7 항 내지 제45 항 중의 어느 한 항에 있어서, 형질감염 후 세포 생존력이 적어도 30%인 방법.

청구항 47

제46 항에 있어서, 형질감염 후 세포 생존력이 적어도 40%인 방법.

청구항 48

제47 항에 있어서, 형질감염 후 세포 생존력이 적어도 50%인 방법.

청구항 49

제7 항 내지 제48 항 중의 어느 한 항에 있어서, DNA 서열 변형이 하나 또는 그 초과인 정지 코돈인 방법.

청구항 50

제7 항 내지 제48 항 중의 어느 한 항에 있어서, 서열 변형이 게놈 서열의 하나 또는 그 초과인 염기 쌍을 변경시키는 방법.

청구항 51

제7 항 내지 제48 항 중의 어느 한 항에 있어서, 서열 변형이 게놈 서열의 하나 또는 그 초과인 염기 쌍을 부가하는 방법.

청구항 52

제7 항 내지 제48 항 중의 어느 한 항에 있어서, 서열 변형이 게놈 서열의 하나 또는 그 초과인 염기 쌍을 결실시키는 방법.

청구항 53

제7 항 내지 제48 항 중의 어느 한 항에 있어서, DNA 서열 변형이 전이유전자의 부위-특이적 표적화된 통합인 방법.

청구항 54

제7 항 내지 제53 항 중의 어느 한 항에 있어서, 형질감염 조성물이 상이한 상보적 서열을 갖는 2개 또는 그 초과인 도너 DNA를 포함하는 방법.

청구항 55

제54 항에 있어서, 형질감염 조성물이 2개 또는 그 초과 DNA 분해제를 포함하는 방법.

청구항 56

제55 항에 있어서, 형질감염 조성물이 2개 또는 그 초과 부위-특이적 DNA 분해제를 포함하며; DNA 분해제는 상이한 게놈 부위에 대해 표적화되는 방법.

청구항 57

제7 항 내지 제56 항 중의 어느 한 항에 있어서, 클론 분리되고 선택된 세포를 확장시켜 DNA 서열 변형을 갖는 클론 세포를 생성시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 58

제57 항에 있어서, 세포가 대규모 제조를 위해 확장되는 방법.

청구항 59

제57 항 또는 제58 항에 있어서, 세포가 1L 초과의 부피로 확장되는 방법.

청구항 60

제59 항에 있어서, 세포가 3L 또는 그 초과 부피로 확장되는 방법.

청구항 61

제7 항 내지 제60 항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포가 무혈청 배지에서 배양되는 방법.

청구항 62

제7 항 내지 제61 항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포를 서열 변형에 대해 스크리닝하는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 63

제7 항 내지 제62 항 중의 어느 한 항에 있어서, 형질감염된 세포를 냉동시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 64

제7 항 내지 제63 항 중의 어느 한 항에 있어서, 사전 냉동된 형질감염된 세포를 확장시키는 것을 추가로 포함하는 방법.

청구항 65

표적 게놈 DNA 서열의 게놈 DNA 서열 변형을 포함하는 안정한 세포주를 생성하는 방법으로서, 방법이

세포를 활성화 조성물과 접촉시키는 단계;

세포를 (a) 도너 DNA 및 (b) DNA 분해제를 포함하는 형질감염 조성물로 형질감염시키는 단계로서,

도너 DNA가

(i) 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동 영역; 및

(ii) 서열 변형 영역을 포함하는 단계;

형질감염된 세포를 표적 게놈 DNA 영역에서 게놈 DNA 서열 변형에 대해 스크리닝하는 단계;

제한 희석에 의해 스크리닝된 형질감염된 세포를 분리하여 클론 세포를 수득하는 단계;

분리된 형질감염된 세포를 확장시켜 게놈 DNA 서열 변형을 포함하는 안정한 세포주를 생성시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 66

제65 항의 방법에 의해 생성된 세포주.

청구항 67

제7 항 내지 제65 항 중의 어느 한 항의 방법을 사용하여 생성된 형질감염된 세포.

청구항 68

유효량의 제67 항의 형질감염된 세포 또는 제66 항의 세포주를 투여함으로써 질환 또는 병태를 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 69

유효량의 제67 항의 형질감염된 세포 또는 제66 항의 세포주를 투여하는 것을 포함하는 임상 연구 방법.

청구항 70

암 치료가 필요한 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서,

세포를 활성화 조성물과 접촉시키는 단계;

세포를 (a) 도너 DNA 및 (b) DNA 분해제를 포함하는 형질감염 조성물로 형질감염시키는 단계로서,

도너 DNA가

(i) 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동 영역; 및

(ii) 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하며;

게놈 DNA 서열을 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형시켜 CAR을 통합시키는 단계;

세포를 환자에 투여하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 71

제70 항에 있어서, 형질감염 조성물이 비-바이러스성 조성물인 방법.

청구항 72

제70 항 또는 제71 항에 있어서, 세포가 자가 세포인 방법.

청구항 73

제70 항 또는 제72 항에 있어서, 세포가 T 세포 또는 NK 세포인 방법.

청구항 74

제70 항 내지 제73 항 중의 어느 한 항에 있어서, 암이 백혈병, B-세포 악성종양 또는 급성 림프모구 백혈병인 방법.

청구항 75

제70 항 내지 제74 항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포가 환자의 혈액으로부터 분리되는 방법.

청구항 76

제75 항에 있어서, 세포가 성분채집술에 의해 분리되는 방법.

청구항 77

제70 항 내지 제76 항 중의 어느 한 항에 있어서, 세포를 환자로부터 분리하는 것을 추가로 포함하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

1. 발명의 분야

[0001]

[0002] 본 발명은 일반적으로 생물공학 분야에 관한 것이다. 더욱 특히, 이는 게놈 DNA를 변형시키기 위한 신규한 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

2. 관련 기술의 설명

[0003]

[0004] 표적화된 게놈 변형은 질환 치료를 위한 상당한 잠재력을 갖는다. 표적화된 부위 또는 부위-특이적 전이유전자 통합에서 DNA 변형은 더욱 효과적인 유전자 치료 방법을 제공할 수 있다. 그러나, 현재 게놈 엔지니어링 방법은 매우 낮은 수복 또는 편집 효율을 제공하며, 해로운 또는 원하지 않는 DNA 서열 및 결과가 도입될 가능성을 갖는다.

[0005]

유전자 치료법으로의 새로운 치료학적 방법은 유전자 전이를 위한 바이러스 벡터의 사용을 이용한다. 그러나, 바이러스 벡터를 포함하는 유전자 치료 방법은 인간 숙주 내로의 바이러스 서열 도입의 단점을 가져, 숙주 면역 원성을 촉발시킬 수 있다. 유전자 치료법을 위한 비-바이러스 방법이 존재하나, 임상 환경에서 이들의 사용은 이들의 낮은 효율, 독성 또는 특이성의 결여 중 어느 하나로 인해 저해된다.

[0006]

게놈 엔지니어링을 위한 더욱 효율적인 접근법은 또한, 생체의 요법에서 발전을 제공할 수 있는데, 왜냐하면 환자로부터 세포를 분리하고, 게놈을 변형시켜 돌연변이를 보정하거나 전이유전자를 부위-특이적으로 통합시키고, 환자 자신의 세포를 다시 이식하여 치료 효과를 달성할 수 있기 때문이다. 현재의 방법은 이러한 결과를 달성하기에는 너무 비효율적이거나 너무 독성이다. 효율적이고, 비독성이며 안전한 부위-특이적 게놈 DNA 변형을 허용하는 기술에 대한 요구가 본 분야에 존재한다.

발명의 내용

발명의 개요

[0007]

[0008] 조성물 및 방법은 내인성 표적 게놈 DNA 서열의 서열 변형에 관한 것이다. 특정 양태는 세포에서 표적 게놈 DNA 영역을 부위-특이적으로 서열 변형시키는 방법으로서, 세포를 활성화 조성물과 접촉시키는 단계, (a) 도너 DNA 및 (b) DNA 분해제를 포함하는 형질감염 조성물로 세포를 형질감염시키는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 도너 DNA는 두 영역을 포함한다. 한 영역은 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동 영역이며, 나머지 영역은 서열 변형 영역이다. 상기 기술된 방법에서, 게놈 DNA 서열은 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형된다.

[0009]

용어 "서열 변형"은 DNA 서열에 대한 변경이며, 내인성 게놈 DNA 서열에 대한 또는 이의 부가, 변경 또는 결실을 포함할 수 있다. 부가에 있어서, 서열 변형은 표적 게놈 부위로의 전이유전자의 통합일 수 있다. 예를 들어, 표적 게놈 서열에 있어서, 도너 DNA는 표적 게놈 서열에 대해 상보적인, 동일한 또는 상동성인 서열 및 서열 변형 영역을 포함한다. 서열 변형 영역은 전형적으로 상동성 말단 사이에 위치한다. 서열 변형은 표적 게놈 서열에 대해 상보적이지 않으며, 표적 게놈 서열의 변경을 함유한다.

[0010]

본원에 기술된 도너 DNA는 표적 게놈 DNA 서열과 상동이거나, 동일하거나 상보적인 서열 및 표적 게놈 DNA 서열의 서열 변형을 포함한다.

[0011]

본원에 사용된 바와 같은 용어 "상보적"은 뉴클레오티드들 간의 왓슨-크릭 염기 쌍을 나타내며, 특히 3개의 수소 결합에 의해 연결된 시토신 및 구아닌 잔기 및 2개의 수소 결합에 의해 아데닌 잔기에 연결된 티민 또는 우라실 잔기를 갖는 서로에게 수소 결합된 뉴클레오티드를 지칭한다. 일반적으로, 핵산은 지정된 제 2 뉴클레오티드 서열에 "상보성 퍼센트"를 갖는 것으로 기술된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 예를 들어, 뉴클레오티드 서열은 지정된 제 2 뉴클레오티드 서열에 80%, 90% 또는 100% 상보성을 가질 수 있으며, 이는 10개 뉴클레오티드 서열 중 8개, 10개 뉴클레오티드 중 9개 또는 10개 뉴클레오티드 중 10개가 지정된 제 2 뉴클레오티드 서열에 상보적임을 지칭한다. 예를 들어, 뉴클레오티드 서열 3'-TCGA-5'는 뉴클레오티드 서열 5'-AGCT-3'에 100% 상보적이다. 추가로, 뉴클레오티드 서열 3'-TCGA-는 뉴클레오티드 서열 5'-TTAGCTGG-3'의 영역에 100% 상보적이다. 2개의 상보적인 뉴클레오티드 서열이 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 포함하는 당업자에게 인지될 것이다.

[0012]

"상동성" 또는 "동일성" 또는 "유사성"은 2개 펩티드 또는 2개 핵산 분자 사이의 서열 유사성을 지칭한다. 용어

"상동 영역"은 표적 게놈 DNA 서열과 특정 정도의 상동성을 갖는 도너 DNA의 영역을 지칭한다. 상동성은 비교 목적을 위해 정렬될 수 있는 각 서열에서 위치를 비교함으로써 측정될 수 있다. 비교된 서열의 위치를 동일한 염기 또는 아미노산이 차지하는 경우, 그러면 분자는 그 위치에서 상동성이다. 서열들간의 상동성 정도는 서열들에 의해 공유된 매칭 또는 상동성 위치의 수의 함수이다. "관련되지 않은" 또는 "비-상동성" 서열은 본 발명의 서열 중 하나와 40% 미만의 동일성, 비록 바람직하게는, 25% 미만의 동일성을 공유한다.

- [0013] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드 영역 (또는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드 영역)은 또 다른 서열에 대해 특정 백분율 (예를 들어, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%)의 "서열 동일성" 또는 "상동성"을 갖는다는 것은 정렬될 때, 염기 (또는 아미노산)의 백분율이 두 개의 서열을 비교에서 동일한 것을 의미한다. 이러한 정렬 및 상동성 또는 서열 동일성 퍼센트는 당해기술에 공지된 소프트웨어 프로그램 예를 들어, 문헌 [Ausubel et al. eds. (2007) Current Protocols in Molecular Biology]에 기술된 것들을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0014] 용어 "형질감염"은 생-활성 물질 예컨대, 핵산, 단백질, 효소 또는 소분자를 세포 내로 도입시키는 방법을 나타낸다. 핵산은 플라스미드 또는 올리고머로서 전달된 DNA, 및/또는 RNA 또는 이의 조합물일 수 있다.
- [0015] 용어 "전기천공"은 외부에서 가해진 전기장이 세포에 가해지는 형질감염의 방법을 지칭한다. 특정 구체예에서, 이용된 전기천공 방법은 정적 전기천공이다.
- [0016] 특정 구체예에서, 이용된 형질감염 방법은 전기천공이다. 추가의 구체예에서, 전기천공 방법은 유동 전기천공이다. 유동 전기천공은 세포 현탁액을 이동시키고 유체 챔버 또는 유체 흐름 경로를 포함하는 장치 내로 분자를 로딩하고 (상기 유체 챔버 또는 유체 흐름 경로는 유체 챔버 또는 유체 흐름 경로의 측면을 따라 배치된 전극으로 이루어지고, 유체 챔버 또는 유체 흐름 경로 내부의 생물학적 입자를 전기천공에 적합한 전기장으로 처리하도록 구성됨); 장치 밖으로 전기천공된 세포 현탁액을 이동시키는 것을 포함하는 방법을 나타낸다. 이러한 방법은 특히 대규모 부피의 세포에 효과적이다. 대조적으로 정적 전기천공은 마주하는 전극 사이의 거리 및 액체를 가로지르는 이동 전기와 관련된 제한으로 인해 한 세트의 제한된 부피의 세포의 전기천공을 포함한다.
- [0017] 특정 양태에서, 세포 내로 발현 작제물을 형질감염시키는 것은 흐름 챔버에서 전기장을 통해 세포 현탁액을 이동시키는 것을 포함하며, 전기장은 흐름 챔버를 적어도 부분적으로 규정하는 반대로 하전된 전극을 마주함으로써 생성되며, 여기에서 흐름 챔버의 내열성은 와트당 대략 10°C 미만이다. 다른 특정 양태에서, 세포를 형질감염시키는 것은 전기천공될 세포 현탁액을 함유하기 위한 챔버를 포함하는 유동 전기천공 장치를 사용하는 것을 포함하며; 챔버는 반대로 하전가능한 전극을 마주시킴으로써 적어도 부분적으로 규정되며; 챔버의 내열성은 와트당 대략 10°C 미만이다.
- [0018] 특정 양태에서, 세포 내로 발현 작제물을 형질감염시키는 것은 챔버에서 전기장으로 세포 현탁액을 전기천공시키거나 노출시키는 것을 포함하며, 전기장은 챔버를 적어도 부분적으로 규정하는 반대로 하전된 전극을 마주시킴으로써 생성되며, 여기에서 챔버의 내열성은 와트당 대략 10°C 미만이다. 다른 특정 양태에서, 세포를 형질감염시키는 것은 전기천공될 세포 현탁액을 함유하기 위한 챔버를 포함하는 전기천공 장치를 사용하는 것을 포함하며; 챔버는 반대로 하전가능한 전극을 마주시킴으로써 적어도 부분적으로 규정되며; 챔버의 내열성은 와트당 대략 10°C 미만이다.
- [0019] 특정 양태에서, 챔버의 내열성은 대략 와트당 0.1°C 내지 와트당 10°C이다. 예를 들어, 챔버의 내열성은 와트당 대략 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10°C, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 내열성일 수 있다.
- [0020] 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 적어도 1mm, 적어도 2mm, 적어도 3 mm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격 또는 범위로 이격될 수 있다. 기재된 구체예 중 임의의 구체예에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가질 수 있다. 예를 들어, 비율은 대략 1 대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값 또는 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서

로 적어도 1mm 이격되어 있다. 다른 양태에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 적어도 3mm 이격되어 있다. 더욱 추가의 양태에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 대략 3mm 내지 대략 2cm 이격되어 있다. 예를 들어, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 대략 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10mm 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격을 두고 이격될 수 있거나, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로로부터 대략 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2.0 cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격으로 이격될 수 있다. 이들 구체예의 일부 양태에서, 전기천공된 세포는 이에 의해 실질적으로 열 분해되지 않는다.

[0021] 기재된 구체예 중 임의의 구체예에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가질 수 있다. 예를 들어, 비율은 대략 1 대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값 또는 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 적어도 1mm 이격되어 있다. 다른 양태에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 적어도 3mm 이격되어 있다. 더욱 추가의 양태에서, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 대략 3mm 내지 대략 2cm 이격되어 있다. 예를 들어, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로 대략 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10mm 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격을 두고 이격될 수 있거나, 마주보는 반대로 하전가능한 전극은 서로로부터 대략 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2.0 cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격으로 이격될 수 있다. 이들 구체예의 일부 양태에서, 전기천공된 세포는 이에 의해 실질적으로 열 분해되지 않는다.

[0022] 임의의 기재된 구체예에서, 장치는 냉각 요소를 추가로 포함하여 열을 소멸시킬 수 있다. 예를 들어, 냉각 요소는 열전 냉각 요소를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 냉각 요소는 전극과 접촉해서 흐르는 냉각 유체를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 냉각 요소는 전극과 작동적으로 관련된 열 싱크를 포함할 수 있다. 챔버의 내열성은 대략 와트당 3°C 미만일 수 있다. 일부 구체예에서, 챔버의 내열성은 대략 와트당 0.5°C 내지 와트당 4°C이거나, 챔버의 내열성은 대략 와트당 1°C 내지 와트당 3°C이다. 예를 들어, 챔버의 내열성은 와트당 대략 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 또는 4.0 °C, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값일 수 있다.

[0023] 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 것을 포함하는 특정 방법에서, 상기 방법은 0.5 kV/cm 초과와 강도를 갖는 전기장에 세포 현탁액을 노출시키는 것을 포함한다. 예를 들면, 전기장은 대략 3.5 kV/cm보다 큰 강도를 가질 수 있다. 특정 양태에서, 전기장은 대략 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 또는 3.5 kV/cm 초과, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값의 강도를 갖는다.

[0024] 일부 구체예에서, 세포를 형질감염시키는 것은, 전기천공될 세포 현탁액의 연속 흐름을 수용하고 일시적으로 함유하도록 구성된 전기천공 구역에 갖는 흐름 채널을 규정하는 벽; 흐름 채널과 유체 소통하는 유입구 흐름 포털로서, 이에 의해 현탁액이 유입구 흐름 포털을 통해 흐름 채널 내로 도입될 수 있는 유입구 흐름 포털; 흐름 채널과 유체 소통하는 배출구 흐름 포털로서, 이에 의해 현탁액이 배출구 포털을 통해 흐름 채널로부터 배출될 수 있는 배출구 흐름 포털을 포함하는 유동 전기천공 장치를 사용하는 것을 포함하며; 벽은 흐름 채널의 제 1 벽의 실질적 부분을 형성하는 제 1 전극 및 제 1 벽과 마주하는 흐름 채널의 제 2 벽의 실질적인 부분을 형성하는 제 2 전극을 포함하는 전기천공 구역 내의 흐름 채널을 규정하며, 제 1 및 제 2 전극은 전기 에너지 공급원과 전기 소통하도록 위치하는 경우 이들 사이에 전기장이 형성되며 이들 사이를 통해 현탁액이 흐를 수 있게 하며, 흐름 채널의 내열성은 대략 와트당 10°C 미만이다.

[0025] 특정 이러한 구체예에서, 제 1 및 제 2 전극 또는 마주하는 반대로 하전가능한 전극은 서로 적어도 1mm 이격된다. 게다가, 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가질 수 있다. 특정 구체예에서, 챔버는 대략 1 대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41,

42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값 또는 범위의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가질 수 있다. 특정 구체예에서, 본원에 기재된 전기천공 방법에 의해 전기천공된 세포는 이에 의해 실질적으로 열분해되지 않는다. 본원에 기재된 특정 구체예에서, 챔버는 흐름 챔버이다.

[0026] 일부 양태에서, 전기천공 장치는 전기천공될 세포 현탁액을 수용하는 챔버로서, 마주하는 반대로 하전가능한 전극에 의해 적어도 부분적으로 규정되는 챔버를 포함하며, 여기에서 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 갖는다. 특정 양태에서, 상기 비율은 대략 1 대 70 cm이다. 기타 특정 양태에서, 상기 비율은 대략 1 대 50 cm이다. 예를 들어, 비율은 대략 1 대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값일 수 있다. 본원에 기재된 특정 구체예에서, 챔버는 흐름 챔버이다.

[0027] 일부 구체예에서, 유동 전기천공 장치는 전기천공될 세포 현탁액의 연속 흐름을 수용하고 일시적으로 함유하도록 구성된 흐름 채널을 규정하는 벽; 흐름 채널과 유체 소통하는 유입구 흐름 포털로서, 이에 의해 현탁액이 유입구 흐름 포털을 통해 흐름 채널 내로 도입될 수 있는 유입구 흐름 포털; 흐름 채널과 유체 소통하는 배출구 흐름 포털로서, 이에 의해 현탁액이 배출구 포털을 통해 흐름 채널로부터 배출될 수 있는 배출구 흐름 포털을 포함하며; 벽은 흐름 채널의 제 1 벽의 적어도 일부를 형성하는 제 1 전극 및 제 1 벽과 마주하는 흐름 채널의 제 2 벽의 적어도 일부를 형성하는 제 2 전극을 포함하는 흐름 채널을 규정하며, 제 1 및 제 2 전극은 전기 에너지 공급원과 전기 소통하도록 위치하는 경우 이들 사이에 전기장이 형성되며 이들 사이를 통해 현탁액이 흐를 수 있게 하며, 흐름 채널의 내열성은 대략 와트당 10°C 미만이다. 특정 양태에서, 흐름 챔버의 내열성은 대략 와트당 0.1°C 내지 와트당 10°C이다. 예를 들어, 흐름 채널의 내열성은 와트당 대략 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 또는 10°C, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 내열성일 수 있다. 제 1 및 제 2 전극은 서로 적어도 1mm, 적어도 2mm, 적어도 3 mm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격 또는 범위로 이격될 수 있다. 기재된 구체예 중 임의의 구체예에서, 흐름 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가질 수 있다. 예를 들어, 비율은 대략 1 대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값 또는 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 흐름 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 제 1 및 제 2 전극은 서로 적어도 1mm 이격되어 있다. 다른 양태에서, 흐름 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 제 1 및 제 2 전극은 서로 적어도 3mm 이격되어 있다. 더욱 추가의 양태에서, 흐름 챔버는 대략 1 대 100cm의 완충제와 접촉되는 합쳐진 전극 표면 대 전극 사이의 간격의 비율을 가지며, 제 1 및 제 2 전극은 서로 대략 3mm 내지 대략 2cm 이격되어 있다. 예를 들어, 제 1 및 제 2 전극은 서로 대략 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10mm 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격을 두고 이격될 수 있거나, 제 1 및 제 2 전극은 서로로부터 대략 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 또는 2.0 cm, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 간격으로 이격될 수 있다. 이들 구체예의 일부 양태에서, 흐름 채널에서 전기천공된 세포는 이에 의해 실질적으로 열 분해되지 않는다.

[0028] 특정 기술된 방법 및 장치에서, 챔버의 내열성은 대략 와트당 0.1°C 내지 대략 와트당 4°C이다. 일부 양태에서, 챔버의 내열성은 대략 와트당 1.5°C 내지 대략 와트당 2.5°C이다. 예를 들어, 챔버의 내열성은 대략 와트당 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 또는 4.0 °C, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 내열성일 수 있다.

[0029] 특정 기재된 방법 및 장치에서, 유동 전기천공 장치는 입자를 포함하는 현탁액의 연속 흐름을 수용하고 일시적

으로 함유하도록 구성된 흐름 채널을 규정하는 벽; 흐름 채널과 유체 소통하는 유입구 흐름 포털로서, 이에 의해 현탁액이 유입구 흐름 포털을 통해 흐름 채널 내로 도입될 수 있는 유입구 흐름 포털; 흐름 채널과 유체 소통하는 배출구 흐름 포털로서, 이에 의해 현탁액이 배출구 흐름 포털을 통해 흐름 채널로부터 배출될 수 있는 배출구 흐름 포털을 포함하며; 벽은 흐름 채널의 제 1 벽을 형성하는 제 1 전극 플레이트 및 제 1 벽과 마주하는 흐름 채널의 제 2 벽을 형성하는 제 2 전극 플레이트를 포함하는 흐름 채널을 규정하며, 현탁액과 접촉하는 전극의 영역 및 전극 사이의 간격은 흐름 채널의 내열성이 대략 와트당 4°C 미만인 되도록 선택되며; 한 쌍의 전극이 전기 에너지 공급원과 전기 소통하게 위치하며, 이에 의해 전기장이 전극 사이에 형성되며, 이에 의해 흐름 채널을 통해 흐르는 입자의 현탁액이 전극 사이에 형성된 전기장으로 처리될 수 있다. 특정 양태에서, 흐름 채널을 규정하는 전극 플레이트는 전기적으로 비전도성 물질로부터 형성되며 제 1 및 제 2 전극 플레이트 사이에 배치되어 공간 분리 관계로의 전극 플레이트를 유지시키는 가스켓을 추가로 포함하며, 가스켓은 여기에서 채널을 규정하여 흐름 채널의 마주보는 측벽을 형성한다. 가스켓은 예를 들어, 제 1 및 제 2 전극 플레이트의 각각에 대한 밀봉을 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 장치는 복수의 흐름 채널을 포함하며, 가스켓은 복수의 채널 각각의 마주보는 측벽을 형성하는 복수의 채널을 포함한다. 일부 양태에서, 유입구 흐름 포털 및 배출구 흐름 포털 중 하나는 전극 플레이트 중 하나에 형성되며 흐름 채널과 유체 소통되는 보어 (bore)를 포함한다. 유입구 흐름 포털 및 배출구 흐름 포털 중 다른 하나는 전극 플레이트 중 하나에 형성되고 흐름 채널과 유체 소통하는 보어를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 유입구 흐름 포털 및 배출구 흐름 포털은 전극 플레이트 중 다른 하나에 형성되고 흐름 채널과 유체 소통하는 보어를 포함할 수 있다. 임의의 기재된 구체예에서, 장치는 흐름 채널과 작동적으로 결합된 냉각 요소를 추가로 포함하여 열을 소멸시킬 수 있다. 예를 들어, 냉각 요소는 열 전 냉각 요소를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 냉각 요소는 전극과 접촉해서 흐르는 냉각 유체를 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 냉각 요소는 전극과 작동적으로 결합된 열 싱크를 포함할 수 있다. 흐름 채널의 내열성은 대략 와트당 3°C 미만일 수 있다. 일부 구체예에서, 흐름 채널의 내열성은 대략 와트당 0.5°C 내지 와트당 4°C이거나, 흐름 채널의 내열성은 대략 와트당 1°C 내지 와트당 3°C이다. 예를 들어, 흐름 채널의 내열성은 와트당 대략 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 또는 4.0 °C, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값일 수 있다.

[0030] 특정 기재된 방법 및 장치에서, 제 1 전극은 가늘고 긴 전기 전도성 구조를 포함할 수 있으며, 제 2 전극은 관형의 전기 전도성 구조를 포함하며; 여기에서 전극은 제 2의 관형 전극이 이격된 관계로 제 1 전극을 둘러싸도록 동심으로 정렬되며; 여기에서 흐름 채널은 제 1 및 제 2 전극 사이에 규정된 환형 공간 내에 배치된다. 전극은 흐름 채널을 규정하는 벽의 적어도 일부를 형성할 수 있다. 일부 구체예에서, 제 1 및 제 2 전극을 유지하기 위한 동심 환형 공간은 이격된 동심 관계에 있다. 특정 양태에서, 장치는 제 2의 유사 장치와 일렬로 또는 평행하게 정렬된다.

[0031] 유동 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 것을 포함하는 특정 방법에서, 흐름 채널은 대략 와트당 10°C 미만의 내열성을 갖는다. 유동 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 것을 포함하는 일부 방법에서, 방법은 흐름 채널을 통해 전기천공될 세포 현탁액을 흐르게 하고, 흐름 채널을 통해 흐르면서 현탁액을 전기장에 노출시키는 것을 포함하며, 전기장은 0.5 kV/cm보다 큰 강도를 갖는다. 예를 들면, 전기장은 대략 3.5 kV/cm보다 큰 강도를 가질 수 있다. 특정 양태에서, 전기장은 대략 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 또는 3.5 kV/cm 초과, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값의 강도를 갖는다.

[0032] 유동 전기천공 장치에 관한 기재된 구체예에서, 유동 전기천공에 대해 기술된 파라미터 및 파라미터 범위는 본원에 기술된 방법에 사용된 정적 전기천공 장치에 적용가능한 것으로 특별히 고려된다. 특정 구체예에서, 유동 전기천공이 사용되며, 정적 전기천공 또는 비-유동 전기천공은 제외된다. 추가의 특정 구체예에서, 정적 전기천공이 사용되며 유동 전기천공은 제외된다.

[0033] 본원에 기술된 방법은 또한 화학-기반 및 비-화학 기반 형질감염 방법과 같은 당업계에 공지된 기타 형질감염 방법의 이용을 포함한다. 화학-기반 형질감염 방법은 예를 들어, 칼슘 포스페이트, 덴드리머, 리포펙션, 및 양이온 폴리머 예컨대, DEAE-텍스트란 또는 폴리에틸렌이민을 포함한다. 비-화학 방법은 세포 스퀴징, 소노포레이션, 광학적 형질감염, 임팔레క్ష션(impalefection), 및 유체역학적 전달을 포함한다. 또한, 유전자 총, 자기주입법(즉, 자기-보조된 형질감염), 및 입자 폭격의 사용과 같은 입자-기반 방법이 포함된다.

[0034] 본원에 기술된 방법을 세포-활성화 단계를 이용한다. 일부 구체예에서, 이러한 세포 활성화 단계는 세포의 형질감염 전이다. 일부 구체예에서, 세포는 세포를 활성화 조성물과 접촉시킨 후 7일 이내의 기간에 형질감염된다. 일부 구체예에서, 세포는 세포를 활성화 조성물과 접촉시킨 후 3일 이내의 기간에 형질감염된다. 일부 구체예에

서, 세포는 세포를 활성화 조성물과 접촉시킨 후 2일 또는 그 이내의 기간에 형질감염된다. 일부 구체예에서, 세포는 세포를 활성화 조성물과 접촉시킨 후 2일에 형질감염된다. 일부 구체예에서, 세포는 세포를 활성화 조성물과 접촉시킨 후 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 또는 3일 이내의 기간에 형질감염된다. 일부 구체예에서, 세포는 세포를 활성화 조성물과 접촉시킨 후 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1일의 기간에 형질감염된다.

- [0035] 일부 구체예에서, DNA 분해제는 TALEN, 트랜스포사제, 인테그라제 및 뉴클레아제로부터 선택된다. 일부 구체예에서, DNA 분해제는 하나 이상의 RNA로 인코딩된다. 일부 구체예에서, DNA 분해제는 뉴클레아제이다. 일부 구체예에서, DNA 분해제는 Cas9이다. 일부 구체예에서, 형질감염 조성물은 CRISPR RNA를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 형질감염 조성물은 가이드 RNA를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 뉴클레아제는 부위-특이적 뉴클레아제이다.
- [0036] 일부 구체예에서, 도너 DNA는 플라스미드이다. 일부 구체예에서, 도너 DNA는 올리고이다. 일부 구체예에서, 도너 DNA는 단일-가닥 올리고이다. 형질감염 조성물 중의 도너 DNA의 농도는 약 10 내지 약 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 또는 약 10 내지 약 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100, 또는 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위일 수 있다.
- [0037] 임의의 기재된 방법은 형질감염된 세포의 제한 회석을 이용하여 단일 세포 콜로니를 수득하는 단계를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "제한 회석"은 각 배양에서 단일 세포를 달성하기 위한 목표로 세포 배양물을 현저하게 희석하는 공정을 지칭한다. 이러한 분리된 단일 세포가 재생성되는 경우, 생성된 배양물은 단지 원래 세포의 클론만을 함유할 것이다. 예를 들어, 다중-웰 플레이트를 사용하여 단일 세포 배양물 또는 콜로니를 수득할 수 있다. 예를 들어, 제한 회석은 환자 세포 유래된 iPS 연구 (예를 들어, 낮적혈구 환자의 회복)에 사용될 수 있다. 제한 회석 방법을 이용하는 iPS 세포는 보정된 헤모글로빈-발현 세포에 대해 변형되고, 분리되고 환자로의 투여를 위해 확장될 수 있다.
- [0038] 임의의 기재된 방법에서, 분리되고 선택된 클론 세포를 확장시켜 특정 게놈 DNA 서열 변형을 갖는 클론 세포를 생성시키는 것을 포함하는 단계가 이용될 수 있다.
- [0039] 분리된 클론 세포의 확장을 포함하는 기재된 방법에서, 확장은 대규모 제조를 위한 것일 수 있다. 예를 들어, 세포는 1L 초과 부피로 확장될 수 있거나, 세포는 3L 초과 부피로 확장될 수 있다. 특정 양태에서, 세포는 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 또는 3.0 L 초과, 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 값의 부피로 확장된다.
- [0040] 임의의 기재된 방법에서, 냉동 형질감염되고 선택되거나 스크리닝된 세포를 포함하는 추가의 단계가 이용될 수 있다. 심지어 사전에 냉동된 형질감염되고 선택되고/스크리닝된 세포를 확장시키는 추가의 단계가 또한 이용될 수 있다.
- [0041] 기재된 방법에서, 세포 배양물은 당업자에게 공지된 임의의 추가적인 성분을 포함할 수 있으며, 이는 배양되는 세포의 유형을 기반으로 하여 당업자에 의해 용이하게 선택될 것이다. 예를 들어, 세포는 소듐 부티레이트 또는 유사한 염에서 배양될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포는 무혈청 배지에서 배양된다.
- [0042] 기재된 방법에서, 분리되고 선택되거나 스크리닝된 클론 세포를 확장시켜 게놈 DNA 서열 변형을 갖는 클론 세포를 생성하는 것을 포함하는 추가의 단계가 이용될 수 있다.
- [0043] 추가의 양태는, 표적 게놈 DNA 서열의 DNA 서열 변형을 포함하는 안정한 세포주를 생성하는 방법으로서, 방법이 세포를 활성화 조성물과 접촉시키는 단계; (a) 도너 DNA 및 (b) DNA 분해제를 포함하는 형질감염 조성물로 세포를 형질감염시키는 단계로서, 도너 DNA는 (i) 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동 영역; 및 (ii) 서열 변형 영역을 포함하는 단계; 표적 게놈 DNA 영역에서 게놈 DNA 서열 변형에 대해 형질감염된 세포를 스크리닝하는 단계; 제한 회석에 의해 스크리닝된 형질감염 세포를 분리하여 클론 세포를 수득하는 단계; 분리된 형질감염 세포를 확장시켜 게놈 DNA 서열 변형을 포함하는 안정한 세포주를 생성시키는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0044] 본 기재내용은 또한 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 세포주 또는 형질감염된 세포를 제공한다.
- [0045] 추가의 양태는 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 유효량의 세포주 또는 형질감염된 세포를 투여함으로써 질환 또는 병태를 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0046] 또 다른 양태는 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 형질감염된 세포 또는 세포주를 유효량으로 투여하는 것을

포함하는 임상 연구 방법에 관한 것이다.

- [0047] 본원에 기술된 구체예가 배제될 수 있음이 특히 고려된다. 범위가 기술된 경우, 특정 범위가 배제될 수 있음이 추가로 고려된다.
- [0048] 추가의 양태는 암 치료가 필요한 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 세포를 활성화 조성물과 접촉시키는 단계; 세포를 (a) 도너 DNA 및 (b) DNA 분해제를 포함하는 형질감염 조성물로 형질감염시키는 단계로서, 도너 DNA 가 (i) 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동 영역; 및 (ii) 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하며; 게놈 DNA 서열을 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형시켜 CAR을 통합시키는 단계; 세포를 환자에 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 형질감염 조성물은 비-바이러스성이다.
- [0049] 일부 구체예에서, 세포는 자가 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 T 세포 또는 NK 세포이다. 대안적으로, 세포는 본 출원 전반에 걸쳐 규정된 바와 같은 숙주 세포일 수 있다. 일부 구체예에서, 암은 B-세포 악성종양이다. 일부 구체예에서, 암은 백혈병이다. 일부 구체예에서, 암은 급성 림프모구 백혈병이다. 일부 구체예에서, 세포는 환자의 혈액으로부터 분리된다. 일부 구체예에서, 세포는 유전적으로 매칭되는 도너로부터 분리된다. 일부 구체예에서, 세포는 도너 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 성분채집술에 의해 분리된다. 일부 구체예에서, 본 방법은 환자로부터의 세포를 분리하는 것을 추가로 포함한다.
- [0050] 추가의 양태는 세포에서 표적 게놈 DNA 영역을 부위-특이적으로 서열 변형시키는 방법으로서, 세포를 활성화 조성물과 접촉시키는 단계; 세포를 (a) 도너 DNA 및 (b) DNA 분해제를 포함하는 비-바이러스 형질감염 조성물로 형질감염시키는 단계로서, 도너 DNA는 (i) 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동 영역; 및 (ii) 서열 변형 영역을 포함하며; 게놈 DNA 서열이 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형되는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 세포는 면역 세포이다. 일부 구체예에서, 면역 세포는 T 세포이다. 일부 구체예에서, T 세포는 일차 T 세포이다. 일부 구체예에서, 활성화 조성물은 항-CD3 및 항-CD28 항체를 포함한다. 일부 구체예에서, 세포의 형질감염은 세포의 유동 전기천공을 포함한다.
- [0051] 하나 이상의 조성물의 사용은 본원에 기술된 방법을 기반으로 하여 사용될 수 있다. 하나 이상의 조성물의 사용은 본원에 기술된 방법에 따라 치료를 위한 의약 제조에 사용될 수 있다. 기타 구체예가 본 출원 전반에 걸쳐 논의된다. 본 발명의 한 양태에 관해 논의된 임의의 구체예가 또한 본 발명의 다른 양태에 적용되며, 그 반대도 가능하다. 실시예 부분의 구체예는 본원에 기술된 기법의 모든 양태에 적용가능한 구체예인 것으로 이해된다.
- [0052] 본원의 명세서에 사용된 바와 같은, 단수 형태는 하나 이상을 의미할 수 있다. 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단어 "포함하는"과 함께 사용되는 경우 단수형태의 단어는 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다.
- [0053] 본 기재내용의 방법은 언급된 요소 또는 단계를 포함하는 것으로 본원에 기술되나, 또한 언급된 요소 또는 단계로 구성될 수 있다. 방법이 언급된 요소 또는 단계로 구성되는 경우, 방법은 언급되지 않은 요소 또는 단계를 배제한다. 본 기재내용의 방법은 또한 언급된 요소 또는 단계로 "필수적으로 구성"될 수 있다. 방법이 언급된 요소 또는 단계로 "필수적으로 구성"되는 경우, 방법은 방법의 결과를 변경시키는 조성물 또는 단계의 성질을 변화시키는 요소 또는 활성 성분을 배제한다.
- [0054] 청구범위에서 용어 "또는"의 사용은, 비록 본 명세서는 양자 중 하나 및 "및/또는" 만을 의미하는 정의를 지지하지만, 양자 중 하나만 또는 양자가 서로 배타적임을 나타내는 것으로 명백히 지정되지 않는 경우 "및/또는"의 의미로 사용된다. 본원에 사용된 바와 같은 "또 다른"은 적어도 제 2의 또는 그 초과를 의미할 수 있다.
- [0055] 본 출원에 전반에 걸쳐, 용어 "약"은 값이 장치에 대한 여러의 고유의 변화를 포함함을 나타내는데 사용되며, 방법은 연구 대상 중에서 존재하는 값 또는 변화를 측정하는데 사용된다.
- [0056] 본 발명의 기타 목적, 특징 및 이점은 하기 상세한 설명으로부터 자명해질 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 특정 실시예는, 본 발명의 바람직한 구체예를 나타내면서, 단지 예시로서 제공됨이 이해되어야 하는데, 왜냐하면 본 발명의 사상 및 범위 내에 다양한 변경 및 변형이 본 상세한 설명으로부터 당업자에게 자명하게 될 것이기 때문이다.

도면의 간단한 설명

- [0057] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하며, 본 발명의 특정 양태를 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 제시된 특정 구체예의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조하여 더욱 잘 이해될 수 있다.

도 1: mRNA-CRISPR (gRNA/Cas9 - AAVS1) 및 플라스미드 GFP DNA에 의한 K562에서 GFP의 표적화된 통합. 도 1은 AAVS1 부위 (DNA+CRISPR) 내로의 통합을 표적으로 하는 플라스미드 GFP DNA (DNA-CRISPR) 또는 플라스미드 GFP DNA와 gRNA/Cas9 CRISPR 착물로의 전기천공 (또는 전기천공 부재의 대조군 (-EP))에 의한 형질감염 후 1, 5 및 12일에 GFP (R2)를 발현하는 세포의 백분율을 보여준다. 도 1에 도시된 바와 같이, DNA+CRISPR로 형질감염된 세포의 37%는 형질감염 후 12일에 GFP의 발현을 유지한 반면, DNA-CRISPR로 형질전환된 세포의 단지 0.8%만이 형질감염 후 12일에 GFP의 발현을 유지하였다.

도 2a-c: DNA 플라스미드는 전기천공 전 10일 동안 확장된 T 세포의 현저한 세포독성을 유도하였다. 도 2는 플라스미드 GFP DNA, mRNA-GFP, 또는 Cas9/gRNA로의 전기천공에 의해 형질감염된 세포 또는 형질감염되지 않은 대조군 세포 (-EP)의 생존력 (도 2a), 증식 (도 2b) 및 GFP 발현 (도 2c)을 보여준다. 도 2는 플라스미드 DNA의 형질감염이 확장된 T 세포에서 세포독성을 유도함을 입증한다.

도 3a-c: 활성화 후 확장된 T 세포의 형질감염 윈도우. T 세포는 DYNABEADS® Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies로부터 시중에서 입수가 가능함)에 의해 활성화되었으며 이어서 활성화 후 1일, 2일 또는 3일 중 어느 하나에서 플라스미드 DNA로의 전기천공에 의해 형질감염되었다. 도 3은 활성화 후 1일(도 3a), 2일(도 3b) 및 3일(도 3c)에서 형질감염된 세포의 생존력을 보여준다.

도 4a-c: 활성화 후 확장된 T 세포의 형질감염 윈도우. T 세포는 DYNABEADS® Human T-Activator CD3/CD28에 의해 활성화되었으며 이어서 활성화 후 1일, 2일 또는 3일 중 어느 하나에서 플라스미드 DNA로의 전기천공에 의해 형질감염되었다. 도 4는 활성화 후 1일(도 4a), 2일(도 4b) 및 3일(도 4c)에서 형질감염 후 GFP를 발현하는 세포의 백분율을 보여준다.

도 5: T 세포는 DYNABEADS® Human T-Activator CD3/CD28에 의해 활성화되었으며 이어서 활성화 후 1일, 2일 또는 3일 중 어느 하나에서 플라스미드 DNA로의 전기천공에 의해 형질감염되었다. 도 5는 활성화 후 1일(도 5a), 2일(도 5b) 및 3일(도 5c)에서 형질감염된 세포의 평균 형광 강도(MFI)를 보여준다.

도 6a-c: 활성화 후 확장된 T 세포의 형질감염 윈도우. T 세포는 DYNABEADS® Human T-Activator CD3/CD28에 의해 활성화되었으며 이어서 활성화 후 1일, 2일 또는 3일 중 어느 하나에서 플라스미드 DNA로의 전기천공에 의해 형질감염되었다. 도 6은 활성화 후 1일(도 6a), 2일(도 6b) 및 3일(도 6c)에서 형질감염 후 세포의 증식(결과는 3개의 독립적인 형질감염 실험 및 플라스미드 DNA를 사용하지 않은 하나의 대조군 실험으로부터 유도됨)을 보여준다.

도 7: mRNA-CRISPR (gRNA/Cas9 - AAVS1) 및 플라스미드 GFP DNA에 의한 확장된 T 세포에서 GFP의 표적화된 통합. 확장된 T 세포는 종래 기술된 방법에 따라 활성화되고 활성화 후 2일에 전기천공되었다. 도 7은 플라스미드 GFP DNA(DNA-CRISPR) 또는 플라스미드 GFP DNA와 AAVS1 부위로의 통합을 표적으로 하는 gRNA/Cas9 CRISPR 착물(DNA+CRISPR)로의 전기천공 (또는 전기천공 부재의 대조군 (-EP))에 의한 형질감염 후 1, 4 및 11일에 GFP (R2)를 발현하는 세포의 백분율을 보여준다. 도 7에 도시된 바와 같이, DNA+CRISPR로 형질감염된 세포의 4%는 형질감염 후 11일에 GFP의 발현을 유지한 반면, DNA-CRISPR로 형질감염된 세포의 단지 0.3%만이 형질감염 후 11일에 GFP의 발현을 유지하였다.

도 8: mRNA-CRISPR (gRNA/Cas9 - AAVS1) 및 플라스미드 GFP DNA에 의한 확장된 T 세포에서 GFP의 표적화된 통합. 확장된 T 세포는 종래 기술된 방법에 따라 활성화되고 활성화 후 2일에 전기천공되었다. 도 8은 플라스미드 GFP DNA(DNA-CRISPR) 또는 플라스미드 GFP DNA와 AAVS1 부위로의 통합을 표적으로 하는 gRNA/Cas9 CRISPR 착물(DNA+CRISPR)로의 전기천공 (또는 전기천공 부재의 대조군 (-EP))에 의한 형질감염 후 6일에 GFP (R2)를 발현하는 세포의 백분율을 보여준다. 도 8에 도시된 바와 같이, DNA+CRISPR로 형질감염된 세포의 2.3%는 형질감염 후 6일에 GFP의 발현을 유지한 반면, DNA-CRISPR로 형질감염된 세포의 단지 0%가 형질감염 후 6일에 GFP의 발현을 유지하였다.

도 9a-d: GFP 플라스미드 DNA (도너 DNA) 및 AAVS1 부위를 표적으로 하는 mRNA-CRISPR (gRNA/Cas9)에 의해 확장된 T 세포에서 GFP의 표적화된 통합. 세포는 종래 기술된 바와 같이 활성화되고 활성화 후 1, 2, 3 및 4일에 형질감염되었다. 50, 100, 또는 200 µg/ml의 GFP 플라스미드 DNA는 이들 실험에 대해 지시된 바와 같이 사용되었다. 증식(도 9a), GFP-발현 세포의 백분율(도 9b), 통합된 사건의 상대수(도 9c), 및 세포 생존력(도 9d)은 활성화 후 3, 6, 10, 및 14일에 형질감염된 세포에 대해 측정되었다. 통합된 사건의 상대수는 세포 수 곱하기 GFP-양성 세포의 백분율로서 계산된다.

도 10a-b: 서열 변형 영역 (대문자 및 음영 없음) 및 상동 영역 (소문자 및 음영 처리)을 갖는 예시적인 도너

DNA 올리고. 도 10a는 표적 게놈 DNA 내로의 부가로서 정지 코돈이 삽입되는 곳의 예를 보여준다. 도 10b는 표적 게놈 DNA에서 단일 염기가 변경된 곳의 예를 보여준다.

도 11: 표적화된 전이유전자 통합의 예: 도너 DNA가 소문자 및 음영의 서열로 묘사한 상동영역과 2000 bp 전이 유전자 X의 서열 변형 영역을 갖는 이중-가닥 플라스미드인 예 (단순화를 위해 단지 하나의 서열 가닥만 묘사함)를 묘사한다. 플라스미드는 또한, 추가적인 플라스미드 서열 예컨대, 마커, 복제 기점, 및 기타 등등을 함유할 수 있다.

도 12: mRNA-CRISPR 및 도너 플라스미드 DNA(선택 없이)에 의한 인간 일차 섬유모세포의 AAVS1 부위에서 PGK-eGFP-PolyA의 표적화된 통합: mRNA-CRISPR 시스템 함유(+Cas9/gRNA) 또는 비함유(-Cas9/gRNA)의 PGK-eGFP-PolyA로 형질감염된 인간 일차 섬유모세포의 FACS 분석이 도시된다. 본 도면에 도시된 바와 같이, 도너 플라스미드 DNA 및 CRISPR 시스템으로 형질감염된 세포만이 형질감염 후 15일 이후 안정한 GFP 발현을 보여주었다 (비교 열 4; 형질감염 후 23일에 GFP의 발현에 대한 제 1 플롯 대 제 2 플롯, 및 열 4; 형질감염 후 26일에 GFP의 발현에 대한 제 3 플롯 대 제 4 플롯).

도 13a-c: mRNA-CRISPR 및 도너 플라스미드 DNA (선택 없이)에 의한 K562의 AAVS1 부위에서 SA-2A-eGFP-PolyA의 표적화된 통합: K562 세포의 AAVS1 부위로의 통합을 표적으로 하는 (+) 또는 (-) CRISPR 시스템 및 도너 플라스미드 DNA (SA-2A-eGFP-PolyA)로 형질감염된 세포의 생존력(도 13a), GFP 발현(도 13b), 및 평균 형광 강도(도 13c)의 분석이 도시된다. 도너 DNA 및 CRISPR 시스템으로 형질감염된 세포만이 형질감염 후 연장된 기간에 안정한 GFP 발현 및 평균 형광 강도를 나타내었다.

도 14: mRNA-CRISPR 및 도너 플라스미드 DNA (선택 없이)에 의한 K562의 AAVS1 부위에서 PGK-eGFP-PolyA의 표적화된 통합: mRNA-CRISPR 시스템 함유(+ CRISPR, 제 2 및 제 4 열) 또는 비함유(-CRISPR, 제 1 및 제 3 열)의 PGK-eGFP-PolyA로 형질감염된 K562 세포의 FACS 분석이 도시된다. FACS 분석은 형질감염 후 1, 5, 6, 11, 14, 19, 23, 및 29일에 세포에서 수행되었다. 본 도면에서 도시된 바와 같이, 도너 플라스미드 DNA 및 CRISPR 시스템으로 형질감염된 세포만이 형질감염 후 6일 또는 11일 이후에 안정한 GFP 발현을 나타냈다.

도 15: mRNA-CRISPR 및 도너 플라스미드 DNA (선택 없이; 활성화 후 2d에 EP, 100ug/ml 플라스미드 DNA)에 의한 확장된 T 세포의 AAVS1 부위에서 PGK-eGFP-PolyA의 표적화된 통합: mRNA-CRISPR 시스템 함유(+ CRISPR, 제 2 및 제 4 열) 또는 비함유(-CRISPR, 제 1 및 제 3 열)의 PGK-eGFP-PolyA로 형질감염된 인간 확장된 T 세포의 FACS 분석이 도시된다. 세포는 세포의 활성화 후 2일에 전기천공되고 (종래 기술된 바와 같이), FACS 분석은 형질감염 후 1, 4, 6, 7, 9, 10, 12, 및 14일에 세포에서 수행되었다. 본 도면에 도시된 바와 같이, 도너 플라스미드 DNA 및 CRISPR 시스템으로 형질감염된 세포만이 형질감염 후 4일 또는 6일 이후에 안정한 GFP 발현을 나타냈다.

도 16: mRNA-CRISPR 및 도너 플라스미드 DNA (선택 없이)에 의한 K562의 AAVS1 부위에서 PGK-CAR-aCD19BBz-PolyA의 표적화된 통합. AAVS1 부위로의 전이유전자를 표적으로 하는 mRNA-CRISPR 시스템 함유(+ CRISPR) 또는 비함유(-CRISPR)의 PGK-CAR-aCD19BBz-PolyA로 형질감염된 K562 세포의 FACS 분석이 도시된다. FACS 분석은 형질감염 후 1일 및 8일에 세포에서 수행되었다. 본 도면에 도시된 바와 같이, 도너 플라스미드 DNA 및 CRISPR 시스템으로 형질감염된 세포만이 형질감염 후 8일에 현저한 양의 GFP 발현(44%)을 나타냈다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 조성물 및 방법은 내인성 표적 게놈 DNA 서열의 서열 변형에 관한 것이다. 특정 양태는 세포에서 표적 게놈 DNA 영역을 부위-특이적으로 서열 변형시키는 방법으로서, 세포를 활성화 조성물과 접촉시키는 단계; (a) 도너 DNA 및 (b) DNA 분해제를 포함하는 형질감염 조성물로 세포를 형질감염시키는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 도너 DNA는 2개의 영역을 포함한다. 하나의 영역은 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동 영역이며, 나머지 영역은 서열 변형 영역이다. 상기 기술된 방법에서, 게놈 DNA 서열은 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형된다.

[0059] 본 출원인은 세포 형질감염 전 활성화 단계 추가가 전통적인 게놈 엔지니어링 방법에서 플라스미드 DNA의 전달과 관련된 독성을 극복하였음을 발견하였다. 본 방법에 대한 추가적인 한 이점은 전이유전자 서열의 무작위 통합의 결여이다. 표적 서열의 무작위 통합은 통합 부위 제어 불능으로 인한 요망되지 않은 효과를 초래할 수 있다. 이들 요망되지 않은 효과는 숙주 유전자의 불활성화, 전이유전자의 적절한 발현의 침묵 또는 결여, 및 전이유전자의 통합 부위를 결정하기 위한 과도한 스크리닝 절차의 필요를 포함한다. 본 방법은 플라스미드 DNA에 독성을 나타내는 세포에 대한 독특한 유전자 치료 방법으로서 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 이러한 세포는 일

차 세포, 줄기 세포, 일차 T 세포, 조혈 전구 세포, 및 형질감염시키기 어려운 세포로서 본원에 기술되고 당업계에 공지된 기타 세포를 포함한다.

[0060] **핵산**

[0061] **B. 도너 DNA**

[0062] 구체에는 도너 DNA 및 DNA 분해제를 포함하는 조성물의 세포의 형질감염에 의한 표적 게놈 DNA 서열의 서열 변형에 관한 것이다.

[0063] 용어 "내인성 게놈 DNA"는 세포의 크로모솜 DNA를 지칭한다. 용어 "표적 게놈 DNA 서열"은 DNA 서열 변형이 유도되는 내인성 게놈 DNA 부위를 지칭한다. DNA 서열 변형은 하나의 특이적 부위 또는 다중의 특이적 부위에서 표적 게놈 DNA 서열의 하나 이상의 염기를 변경시키는 것일 수 있다. 변경은 표적 게놈 DNA 서열의 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40개 또는 그 초과와 염기쌍을 상이한 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40개 또는 그 초과와 염기쌍으로 변경하는 것을 포함할 수 있다. 결실은 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 300, 400 또는 500개 염기쌍의 결실일 수 있다. 첨가는 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40개 또는 그 초과와 염기쌍의 첨가일 수 있다. 서열 변형은 서열 변경이 다중 방식으로 표적 게놈 DNA를 변경시키는 경우, 변화 및 결실, 변화 및 부가, 등으로서 분류될 수 있다. 한 구체예에서, 서열 변형은 정지 코돈이다. 추가의 구체예에서, DNA 서열 변형은 하나 이상의 정지 코돈이다. 추가의 구체예에서, DNA 서열의 변형은 1, 2, 3, 4, 5개 또는 10개 정지 코돈이다. 서열 변형이 정지 코돈인 경우, 유전자 편집의 효율성 및/또는 신뢰성이 증가될 수 있다.

[0064] 서열 변형이 전이유전자의 통합인 경우, 전이유전자는 유전자의 코딩 영역의 전형적인 길이 또는 전형적인 유전자 서열의 길이일 수 있다. 일부 구체예에서, 서열 변형 영역에서 전이유전자는 100-10000개 핵산 길이이다. 추가 구체예에서, 전이유전자는 500-5000개 핵산 길이이다. 일부 구체예에서, 전이유전자는 1000-3000개 또는 1000-5000개 핵산 길이이다.

[0065] DNA 서열 변형은 또한 전이유전자의 부위-특이적 통합일 수 있다. 용어 전이유전자는 숙주 게놈 내로의 유전자 엔지니어링에 의해 전달된 유전자 또는 유전자 물질을 지칭한다. 전이유전자는 숙주에서 변이되거나 결핍된 치료학적 유전자의 발현일 수 있다. 전이유전자는 또한 생체내 또는 생체외에서 형질감염된 세포의 추적을 허용하는 세포 표면 마커 또는 GFP와 같은 마커를 포함할 수 있다.

[0066] 도너 DNA는 플라스미드 DNA, 선형화된 DNA 단편, 또는 올리고일 수 있다. 플라스미드 DNA는 DNA의 원형 조각을 지칭한다. 플라스미드는 하나 이상의 전이유전자를 함유할 수 있다. 예를 들어, 플라스미드는 게놈 DNA 내로 또는 파괴점 근처로 통합된 전이유전자 및 내인성 게놈 DNA에서 부위-특이적으로 파괴하는 DNA 분해제를 인코딩할 수 있다.

[0067] 용어 "올리고" 또는 "올리고뉴클레오타이드"는 폴리뉴클레오타이드 예컨대, 데옥시리보핵산(DNA), 및 적절한 경우, 리보핵산(RNA)을 지칭한다. 본 용어는 또한, 동등물로서 뉴클레오타이드 유사체로부터 제조된 RNA 또는 DNA 중 어느 하나의 유도체, 변이체 및 유사체 및 기술된 구체예에 적용가능한 것으로서, 단일 (센스 또는 안티센스) 및 이중-가닥 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 데옥시리보뉴클레오타이드는 데옥시아데노신, 데옥시시티딘, 데옥시구아노신 및 데옥시티미딘을 포함한다. 명료성을 위해서, 본원에서 DNA 또는 RNA일 수 있는 핵산의 뉴클레오타이드를 언급할 경우, 용어 "아데노신", "시티딘", "구아노신" 및 "티미딘"이 사용된다. 핵산이 RNA인 경우, 우라실 염기를 갖는 뉴클레오타이드는 우리딘인 것으로 이해된다. 일부 구체예에서, 용어 올리고는 150개 또는 그 미만의 염기를 갖는 핵산을 규정하는데 사용된다. 일부 구체예에서, 용어 올리고는 100개 또는 50개 또는 25개 또는 그 미만의 염기를 갖는 핵산을 규정하는데 사용된다.

[0068] 용어 "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용되며 폴리머 형태의 임의의 길이의 뉴클레오타이드, 즉 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 또는 이의 유사체 중 어느 하나를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 임의의 3-차원 구조를 가질 수 있으며, 공지된 또는 비공지된 임의의 기능을 수행할 수 있다. 하기는 폴리뉴클레오타이드의 비제한적 예이다: 유전자 또는 유전자 단편 (예를 들어, 프로브, 프라이머, EST 또는 SAGE 태그), 엑손, 인트론, 메신저 RNA (mRNA), 트랜스퍼 RNA, 리보솜 RNA, 리보자임, cDNA, dsRNA, siRNA, miRNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지된 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 분리된 DNA, 임의의 서열의 분리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 폴리뉴클레오타이드의 애셈블리 전 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비-뉴클레오타이드 성분에 의해

중단될 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 중합 후 예컨대, 라벨링 성분과의 컨주게이션에 의해 추가로 변형될 수 있다. 본 용어는 또한 이중- 및 단일-가닥 분자 둘 모두를 지칭한다. 달리 명시되거나 요구되는 않는 한, 폴리뉴클레오티드인 본 발명의 임의의 구체예는 이중-가닥 형태 및 이중-가닥 형태를 구성하는 것으로 공지되거나 예측되는 각각의 2개의 상보적인 단일-가닥 형태 둘 모두를 포함한다.

[0069] 생물학적으로 동등한 폴리뉴클레오티드는 동일하거나 유사한 생물학적 활성을 갖는 폴리펩티드를 인코딩하고 특정 백분율의 상동성을 갖는 것들이다.

[0070] 특정 구체예에서, 도너 DNA의 상동 영역은 100% 상동성이다. 추가의 구체예에서, 도너 DNA의 상동 영역은 85, 90, 95, 또는 99% 상동성이다.

[0071] 특정 구체예에서, 도너 DNA는 표적 게놈 DNA 서열에 상동인 서열의 적어도 약 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1200, 1400, 또는 1600개 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)의 핵산을 포함한다. 일부 구체예에서, 도너 DNA는 게놈 DNA 서열과 동일한 적어도 약 20개 핵산 서열을 포함한다. 이러한 맥락에서, 용어 "동일한 서열"은 게놈 DNA의 서열과 정확하게 매칭되는 서열을 지칭한다. 동일한 서열은 DNA 서열 변형의 5' 말단인 영역 및 DNA 서열 변형의 3' 말단인 영역에 존재할 수 있다. 예시적인 실례로서, 도너 DNA가 적어도 20개 핵산의 상동 서열을 포함하는 경우, 도너 DNA는 예를 들어, 서열 변형의 각 측면에 10개 핵산의 상동 서열을 포함할 수 있다. 유사하게는, 10개 핵산의 상동 서열을 포함하는 도너 DNA는 예를 들어, 서열 변형의 각 측면에 5개 핵산의 상보적 서열을 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 상동 영역은 표적 게놈 서열에 상동인 1600개 핵산을 포함한다. 일부 구체예에서, 도너 DNA는 서열 변형 영역의 5' 말단에서 800개 핵산의 상동 영역 및 서열 변형 영역의 3' 말단에서 800개 핵산의 상동 영역을 포함한다.

[0072] 도너 DNA가 단일 가닥 DNA 올리고인 경우, 이는 약 10, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 또는 600개 핵산 내지 약 50, 75, 100, 125, 또는 150개 핵산 길이, 또는 이의 추론가능한 임의의 범위일 수 있다. 특정 구체예에서, 올리고는 20개 초과 핵산, 또는 21, 22, 23, 24, 25, 30, 또는 40개 초과 핵산이다. 특정 구체예에서, 올리고는 약 30 내지 150개 핵산, 약 25 내지 약 150개 핵산, 약 25 내지 약 100개 핵산, 또는 약 40 내지 약 100개 핵산이다.

[0073] 형질감염 절차 동안 도너 DNA 농도는 형질감염 조성물 및/또는 형질감염 샘플 용기에서 도너 DNA의 최종 농도일 수 있다. 도너 DNA 농도는 약 10, 20, 30, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 내지 약 350, 400, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 또는 5000 µg/mL 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위일 수 있다. 특정 구체예에서, 도너 DNA의 농도는 적어도 30 µg/mL이다. 추가의 구체예에서, 도너 DNA의 농도는 적어도 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 또는 200 µg/mL이다.

[0074] **C. DNA 분해제**

[0075] 본 발명은 도너 DNA 및 DNA 분해제로의 형질감염에 의해 세포를 형질감염시킴으로써 표적 게놈 DNA 서열을 변형시키는 방법을 제공한다. 용어 "DNA 분해제"는 핵산의 뉴클레오티드 서브유닛 간의 결합 (즉, 포스포디에스테르 결합)을 절단할 수 있는 제제를 지칭한다. 특정 구체예에서, DNA 분해제는 RNA로 인코딩된다. 다른 구체예에서, DNA 분해제는 단백질, 효소 또는 효소 활성을 갖는 소분자 모방체이다. 일부 구체예에서, DNA 분해제는 DNA로 인코딩된다. 특정 구체예에서, DNA 분해제는 플라스미드 DNA로 인코딩된다. 일부 구체예에서, DNA 분해제 및 도너 DNA는 동일한 플라스미드로 인코딩된다.

[0076] 한 구체예에서, DNA 분해제는 트랜스포사제이다. 예를 들어, 규정된 DNA 서열을 척추동물의 크로모솜으로 정확하게 도입시키도록 설계된 합성 DNA 트랜스포손 (예를 들어, "슬립핑 뷰티" 트랜스포손 시스템)이 사용될 수 있다. 슬립핑 뷰티 트랜스포손 시스템은 척추동물 게놈으로 DNA의 특이적 서열을 삽입하도록 설계된 트랜스포손 및 슬립핑 뷰티 (SB) 트랜스포사제로 구성된다. DNA 트랜스포손은 단순한 잘라 붙이기 방식으로 한 DNA 부위로부터 다른 부위로 전위된다. 전위는 규정된 DNA 세그먼트가 한 DNA 분자로부터 절제되어 동일하거나 상이한 DNA 분자 또는 게놈의 또 다른 부위로 이동되는 정밀한 과정이다.

[0077] 모든 다른 Tc1/마리너-유형 트랜스포사제가 작용하는 바와 같이, SB 트랜스포사제는 트랜스포손을 수령체 DNA 서열의 TA 디뉴클레오티드 염기 쌍으로 삽입시킨다. 삽입 부위는 동일한 DNA 분자의 또 다른 부위 또는 또 다른 DNA 분자 (또는 크로모솜)일 수 있다. 인간을 포함하는 포유동물 게놈에서, 대략 20억 개 TA 부위가 존재한다. TA 삽입 부위는 트랜스포손 통합 과정에서 증폭된다. TA 서열의 이러한 증폭은 전위의 특징이며 일부 실험에서 메카니즘을 확인하는데 사용된다. 트랜스포사제는 트랜스포손 내부에서 인코딩될 수 있거나 트랜스포사제는 또

다른 공급원에 의해 공급될 수 있으며, 이 경우 트랜스포손은 비-자율적 요소가 된다. 비-자율적 트랜스포손이 유전자 도구로서 가장 유용한데 왜냐하면 삽입 후 이들은 독립적으로 계속해서 절제 및 재삽입될 수 없기 때문이다. 인간 계놈 및 기타 포유동물 계놈에서 확인된 DNA 트랜스포손 모두는 비-자율적인데, 왜냐하면 이들이 트랜스포사제 유전자를 함유함에도 불구하고, 유전자는 비-작용성이며 트랜스포손을 이동시킬 수 있는 트랜스포사제를 생성할 수 없기 때문이다.

[0078] 추가의 구체예에서, DNA 분해제는 인테그라제이다. 예를 들어, phiC31 인테그라제는 박테리오파지 phiC31의 계놈 내부에 인코딩된 서열-특이적 재조합효소이다. phiC31 인테그라제는 부착 부위 (att)로 불리는 2개의 34개 염기쌍 서열 사이의 재조합을 매개한다 (하나는 과아지에서 발견되고, 다른 하나는 박테리아 숙주에서 발견됨). 이러한 세린 인테그라제는 포유동물 세포를 포함하는 많은 다양한 세포 유형에서 효과적으로 작용하는 것으로 밝혀졌다. phiC31 인테그라제의 존재하에, attB-함유 도너 플라스미드는 천연 attP 부위 (슈도-attP 부위로 불림)에 대한 서열 유사성을 갖는 부위에서의 재조합을 통해 표적 계놈으로 단방향적으로 통합될 수 있다. phiC31 인테그라제는 임의의 크기의 플라스미드를 단일 복사체로서 통합시킬 수 있으며, 보조인자를 필요로 하지 않는다. 통합된 전이유전자는 안정하게 발현되고 유전된다.

[0079] 특정 구체예에서, DNA 분해제는 뉴클레아제이다. 뉴클레아제는 핵산을 가수분해하는 효소이다. 뉴클레아제는 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로서 분류될 수 있다. 엔도뉴클레아제는 DNA 또는 RNA 분자 내부의 핵산 사이의 결합의 가수분해를 촉매하는 임의의 효소 군이다. 엑소뉴클레아제는 DNA 또는 RNA 사슬의 말단으로부터 단일 뉴클레오티드의 가수분해를 촉매하는 임의의 효소 군이다. 뉴클레아제는 또한 DNA 또는 RNA를 특이적으로 분해하는 지의 여부에 따라 분류될 수 있다. DNA의 가수분해를 특이적으로 촉매하는 뉴클레아제는 데옥시리보뉴클레아제 또는 DNase로서 언급될 수 있는 반면, RNA의 가수분해를 특이적으로 촉매하는 뉴클레아제는 리보뉴클레아제 또는 RNase로서 언급될 수 있다. 일부 뉴클레아제는 단일-가닥 또는 이중-가닥 핵산 서열 중 어느 하나에 특이적이다. 일부 효소는 엑소뉴클레아제 및 엔도뉴클레아제 특성 둘 모두를 갖는다. 또한, 일부 효소는 DNA 및 RNA 서열 둘 모두를 분해할 수 있다. 용어 "뉴클레아제"는 핵산 서열을 가수분해하는 임의의 효소를 일반적으로 지칭하는데 본원에서 사용된다.

[0080] 최적의 반응 조건은 다양한 뉴클레아제에 따라 다르다. 고려되어야 하는 요소는 온도, pH, 효소 보조인자, 염 조성, 이온 강도 및 안정화제를 포함한다. 시중에서 입수가 가능한 뉴클레아제의 공급업체 (예를 들어, Promega Corp.; New England Biolabs, Inc.)는 각 효소에 대한 최적 조건에 대한 정보를 제공한다. 대부분의 뉴클레아제는 인큐베이션 온도에서 측정될 때 pH 7.2 내지 pH 8.5에서 사용된다. 또한, 대부분의 뉴클레아제는 37°C에서 최대 활성을 보여준다; 그러나, 소수개의 효소는 최적의 활성을 위해 더 높거나 낮은 온도를 필요로 한다 (예를 들어, Taq I, 65°C; Sma I, 25°C). DNA 농도 또한 요인이 될 수 있는데, 높은 DNA 농도는 효소 활성을 감소시킬 수 있으며, 너무 희석된 DNA 농도는 효소의 K_m 아래로 떨어뜨려 효소 활성에 또한 영향을 끼칠 수 있기 때문이다.

[0081] 뉴클레아제의 비제한적인 예로는 DNase I, 벤조나제, 엑소뉴클레아제 I, 엑소뉴클레아제 III, 녹두 뉴클레아제, 뉴클레아제 BAL 31, RNase I, S1 뉴클레아제, 람다 엑소뉴클레아제, RecJ 및 T7 엑소뉴클레아제를 포함한다. DNase I는 비특이적으로 DNA를 절단하여 5'-포스포릴화 및 3'-하이드록실화 말단을 갖는 디-, 트리- 및 올리고 뉴클레오티드 생성물을 방출시키는 엔도뉴클레아제이다. DNase I는 단일- 및 이중-가닥 DNA, 크로마틴, 및 RNA:DNA 하이브리드에 작용한다. 엑소뉴클레아제 I은 3'에서 5' 방향으로 단일-가닥 DNA로부터 뉴클레오티드 제거를 촉매한다. 엑소뉴클레아제 III는 이중 DNA의 3'-하이드록실 말단으로부터 모노뉴클레오티드의 단계적 제거를 촉매한다. 엑소뉴클레아제 III는 또한, 단일-가닥 겹을 생성하기 위해 이중 DNA의 닉(nick)에서 작용한다. 단일 가닥 DNA는 엑소뉴클레아제 III에 내성이다. 녹두 뉴클레아제는 DNA의 말단으로부터 단일-가닥 연장을 저하시킨다. 녹두 뉴클레아제는 또한 RNA 엔도뉴클레아제이다. 뉴클레아제 BAL 31은 이중 DNA의 3' 및 5' 말단 둘 모두를 분해한다. 뉴클레아제 BAL 31은 또한 이중 DNA 및 RNA의 닉, 겹 및 단일-가닥 영역에서 절단시키는 고도로 특이적인 단일-가닥 엔도뉴클레아제이다. RNase I은 모든 RNA 디뉴클레오티드에서 절단될 단일 가닥 특이적 RNA 엔도뉴클레아제이다. S1 뉴클레아제는 단일-가닥 DNA와 RNA를 엔도뉴클레아제로 분해하여 5'-포스포릴-말단 생성물을 생성시킨다. 이중-가닥 핵산 (DNA:DNA, DNA:RNA 또는 RNA:RNA)은 극도로 높은 농도의 효소를 사용하는 것을 제외하고 S1 뉴클레아제 분해에 대해 내성이다. 람다 엑소뉴클레아제는 이중 DNA로부터 5' 모노뉴클레오티드의 제거를 촉매한다. 이의 바람직한 기질은 5'-포스포릴화된 이중 가닥 DNA이지만, 람다 엑소뉴클레아제는 또한 매우 감소된 비율로 단일-가닥 및 비-포스포릴화된 기질을 분해할 것이다. 람다 엑소뉴클레아제는 닉 또는 겹에서 DNA 분해를 개시할 수 없으며, RecJ는 5'으로부터 3' 방향으로 DNA로부터 데옥시-뉴클레오티드 모노포스페이트의 제거를 촉매하는 단일-가닥 DNA 특이적 엑소뉴클레아제이다. T7 엑소뉴클레아제는 이중 DNA의

5' 모노뉴클레오티드의 제거를 촉매한다. T7 엑소뉴클레아제는 이중 가닥 DNA의 5' 말단으로부터 또는 갭 및 너에서 뉴클레오티드 제거를 촉매한다.

[0082] 제한 엔도뉴클레아제는 본 발명의 방법과 관련하여 사용될 수 있는 뉴클레아제의 또 다른 예이다. 제한 엔도뉴클레아제 및 이들의 인식 서열의 비제한적 예는 표 1에 제공되어 있다.

[0083] 표 1. 제한 엔도뉴클레아제에 대한 인식 서열

[0084]

효소	인식 서열	SEQ ID NO.	효소	인식 서열	SEQ ID NO.
AatII	GACGTC		Fnu4HI	GCNGC	
Acc65 I	GGTACC		Fok I	GGATG	
Acc I	GTMKAC		Fse I	GGCCGGCC	

효소	인식 서열	SEQ ID NO.	효소	인식 서열	SEQ ID NO.
Aci I	CCGC		Fsp I	TGCGCA	
Acl I	AACGTT		Hae II	RGCGCY	
Afe I	AGCGCT		Hae III	GGCC	
Afl II	CTTAAG		Hga I	GACGC	
Afl III	ACRYGT		Hha I	GCGC	
Age I	ACCGGT		Hinc II	GTYRAC	
Ahd I	GACNNNNNGTC	1	Hind III	AAGCTT	
Alu I	AGCT		Hinf I	GANTC	
Alw I	GGATC		HinP1 I	GCCG	
AlwNI	CAGNNNCTG		Hpa I	GTTAAC	
Apa I	GGGCCC		Hpa II	CCGG	
ApaL I	GTGCAC		Hph I	GGTGA	
Apo I	RAATTY		Kas I	GGCGCC	
Asc I	GGCGCGCC		Kpn I	GGTACC	
Ase I	ATTAAT		Mbo I	GATC	
Ava I	CYCGRG		Mbo II	GAAGA	
Ava II	GGWCC		Mfe I	CAATTG	
Avr II	CCTAGG		Mlu I	ACGCGT	
Bac I	NACNNNNGTAPyCN	2	Mlv I	GAGTCNNNNN	11
BamHI	GGATCC		Mnl I	CCTC	
Ban I	GGYRCC		Msc I	TGGCCA	
Ban II	GRGCYC		Mse I	TTAA	
Bbs I	GAAGAC		Msl I	CAYNNNNRTG	12
Bbv I	GCAGC		MspA1 I	CMGCKG	
BbvC I	CCTCAGC		Msp I	CCGG	
Bcg I	CGANNNNNNTGC	3	Mwo I	GCNNNNNNNGC	13
BciV I	GTATCC		Nae I	GCCGGC	
Bcl I	TGATCA		Nar I	GGCGCC	
Bfa I	CTAG		Nci I	CCSGG	
Bgl I	GCCNNNNNGGC	4	Nco I	CCATGG	
Bgl II	AGATCT		Nde I	CATATG	
Blp I	GCTNAGC		NgoMI V	GCCGGC	
Bmr I	ACTGGG		Nhe I	GCTAGC	
Bpm I	CTGGAG		Nla III	CATG	
BsaA I	YACGTR		Nla IV	GGNNCC	
BsaB I	GATNNNNATC	5	Not I	GCGGCCGC	
BsaH I	GRCGYC		Nru I	TCGCGA	
Bsa I	GGTCTC		Nsi I	ATGCAT	
BsaL I	CCNNGG		Nsp I	RCATGY	
BsaW I	WCCGGW		Pac I	TTAATTAA	
BseR I	GAGGAG		PaeR7 I	CTCGAG	
Bsg I	GTGCAG		Pci I	ACATGT	
BsiE I	CGRYCG		PfiI	GACNNNGTC	
BsiHKA I	GWGCWC		PfiM I	CCANNNNNTGG	14
BsiW I	CGTACG		PleI	GAGTC	
Bsl I	CCNNNNNNNGG	6	Pme I	GTTAAAC	
BsmA I	GTCTC		Pml I	CACGTG	
BsmB I	CGTCTC		PpuM I	RGGWCCY	
BsmF I	GGGAC		PshA I	GACNNNGTC	15
Bsm I	GAATGC		Psi I	TTATAA	
BsoB I	CYCGRG		PspG I	CCWGG	
Bsp1286 I	GDGCHC		PspOM I	GGGCC	
BspD I	ATCGAT		Pst I	CTGCAG	
BspE I	TCCGGA		Pvu I	CGATCG	
BspH I	TCATGA		Pvu II	CAGCTG	
BspM I	ACCTGC		Rsa I	GTAC	

[0085]

효소	인식 서열	SEQ ID NO.	효소	인식 서열	SEQ ID NO.
BsrB I	CCGCTC		Rsr II	CGGWCCG	
BsrD I	GCAATG		Sac I	GAGCTC	
BsrF I	RCCGGY		Sac II	CCGCGG	
BsrG I	TGTACA		Sal I	GTCGAC	
Bsr I	ACTGG		Sap I	GCTCTTC	
BssH II	GCGCGC		Sau3A I	GATC	
BssK I	CCNGG		Sau96 I	GGNCC	
Bst4C I	ACNGT		Sbf I	CCTGCAGG	
BssS I	CACGAG		Sca I	AGTACT	
BstAP I	GCANNNNTGC	7	ScrF I	CCNGG	
BstB I	TTCGAA		SexA I	ACCWGGT	
BstE II	GGTNACC		SfaN I	GCATC	
BstF5 I	GGATGNN		Sfc I	CTRYAG	
BstN I	CCWGG		Sfi I	GGCCNNNNNGGCC	16
BstU I	CGCG		Sfo I	GGCGCC	
BstX I	CCANNNNTGG	8	SgrA I	CRCCGGYG	
BstY I	RGATCY		Sma I	CCCGGG	
BstZ17 I	GTATAC		Sml I	CTYRAG	
Bsu36 I	CCTNAGG		SnaB I	TACGTA	
Btg I	CCPuPyGG		Spe I	ACTAGT	
Btr I	CACGTG		Sph I	GCATGC	
Cac8 I	GCNNGC		Ssp I	AATATT	
Cla I	ATCGAT		Stu I	AGGCCT	
Dde I	CTNAG		Sty I	CCWWGG	
Dpn I	GATC		Swa I	ATTTAAAT	
Dpn II	GATC		Taq I	TCGA	
Dra I	TTTAAA		Tfi I	GAWTC	
Dra III	CACNNNGTG		Tli I	CTCGAG	
Drd I	GACNNNNNGTC	9	Tse I	GCWGC	
Eac I	YGGCCR		Tsp45 I	GTSAC	
Eag I	CGGCCG		Tsp509 I	AATT	
Ear I	CTCTC		TspR I	CAGTG	
Eci I	GGCGGA		Tth111 I	GACNNNGTC	
EcoN I	CCTNNNNNAGG	10	Xba I	TCTAGA	
EcoO109 I	RGGNCCY		Xcm I	CCANNNNNNNNTGG	17
EcoR I	GAATTC		Xho I	CTCGAG	
EcoR V	GATATC		Xma I	CCCGGG	
Fau I	CCCGCNNNN		Xmn I	GAANNNTTC	18

[0086]

[0087]

여기에서, R = A 또는 G, K = G 또는 T, S = G 또는 C, Y = C 또는 T, M = A 또는 C, W = A 또는 T, B = A가 아님 (C, G 또는 T), H = G가 아님 (A, C 또는 T), D = C가 아님 (A, G 또는 T), V = T가 아님 (A, C 또는 G), 및 N = 임의의 뉴클레오티드.

[0088]

당업자는 표적 게놈 서열 및 도너 DNA의 특징에 따라 적절한 뉴클레아제를 선택할 수 있을 것이다. 한 구체예에서, 뉴클레아제는 부위-특이적 뉴클레아제이다. 관련된 구체예에서, 뉴클레아제는 적어도 8, 적어도 10, 적어도 12, 적어도 14, 적어도 16, 적어도 18, 적어도 20, 또는 적어도 25개의 염기 쌍의 인식 서열을 갖는다.

[0089]

한 구체예에서, 부위-특이적 뉴클레아제는 Cas 뉴클레아제이다. 관련된 구체예에서, Cas 뉴클레아제는 Cas9이다. 추가의 구체예에서, 뉴클레아제는 cas9이며, 조성물은 가이드 RNA를 추가로 포함한다. 본원에 기술된 방법 및 조성물과 이용될 수 있는 서열-특이적 뉴클레아제 시스템의 또 다른 예는 Cas9/CRISPR 시스템을 포함한다 (Wiedenheft, B. et al. Nature 482, 331-338 (2012); Jinek, M. et al. Science 337, 816-821 (2012); Mali, P. et al. Science 339, 823-826 (2013); Cong, L. et al. Science 339, 819-823 (2013)). Cas9/CRISPR (Clustered Regularly interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템은 표적 DNA의 RNA-안내된 DNA-결합 및 서열-특이적 절단을 이용한다. 가이드 RNA/Cas9 조합은 뉴클레아제에 부위 특이성을 부여한다. 가이드 RNA (gRNA)는 게놈 PAM (프로토스페이서 인접 모티프) 부위 (NNG)의 표적 게놈 DNA 서열 업스트림에 상보적인 약 20 개 뉴클레오티드 및 RNA 스캐폴드 불변 영역을 함유한다. Cas (CRISPR-관련된)9 단백질은 gRNA 및 gRNA가 결합하는 표적 DNA에 결합하며, PAM 부위의 업스트림의 규정된 위치에서 이중-가닥 파괴를 도입한다. Cas9에는 HNH 및 RuvC 엔도뉴클레아제에 상동인 2개의 독립적인 뉴클레아제 도메인이 내재되어 있으며, 두 도메인중 어느 하나를 돌연변이시킴으로써, Cas9 단백질이 단일-가닥 파괴를 도입하는 니카제로 전환될 수 있다 (Cong, L. et al. Science 339, 819-823 (2013)). 특히, Cas9의 단일- 또는 이중-가닥-유도 버전은 물론 기타 RNA-가이드된

DNA 뉴클레아제 예컨대, 기타 박테리아 Cas9-유사 시스템을 사용한 본 발명의 방법 및 조성물이 이용될 수 있는 것으로 여겨진다. 본원에 기재된 방법 및 조성물의 서열-특이적 뉴클레아제는 엔지니어링될 수 있거나, 키메라일 수 있거나 유기체로부터 분리될 수 있다. 서열-특이적 뉴클레아제는 서열-특이적 뉴클레아제를 인코딩하는 RNA 예컨대, mRNA 형태로 세포 내로 도입될 수 있다.

[0090] 한 구체예에서, DNA 분해제는 아연 핑거 뉴클레아제와 같은 부위-특이적 뉴클레아제이다. 아연 핑거 뉴클레아제는 일반적으로, DNA 결합 도메인 (즉, 아연 핑거) 및 절단 도메인 (즉, 뉴클레아제)를 포함한다. 아연 핑거 결합 도메인은 선택된 임의의 핵산 서열을 인식하고 이에 결합하도록 엔지니어링될 수 있다. 예를 들어, 하기 문헌 [Beerli et al. (2002) Nat. Biotechnol. 20:135-141; Pabo et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340; Isalan et al. (2001) Nat. Biotechnol. 19:656-660; Segal et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637; Choo et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416; Zhang et al. (2000) J. Biol. Chem. 275(43):33850-33860; Doyon et al. (2008) Nat. Biotechnol. 26:702-708; 및 Santiago et al. (2008) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:5809-5814] 참조. 엔지니어링된 아연 핑거 결합 도메인은 자연-발생 아연 핑거 단백질과 비교하여 신규한 결합 특이성을 가질 수 있다. 엔지니어링 방법은 비제한적으로, 합리적인 설계 및 다양한 선택 유형을 포함한다. 합리적인 설계는 예를 들어, 이중, 삼중 및/또는 사중 뉴클레오티드 서열 및 개별적인 아연 핑거 아미노산 서열을 포함하는 데이터베이스를 사용하는 것을 포함하며, 여기에서 각 이중, 삼중 또는 사중 뉴클레오티드 서열은 특정 삼중 또는 사중 서열에 결합하는 아연 핑거의 하나 이상의 아미노산 서열과 관련된다. 예를 들어, 그 전체 기재내용이 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,453,242 및 6,534,261 참조. 예로서, 미국 특허 6,453,242에 기술된 알고리즘이 사전 선택된 서열을 표적으로 하기 위해 아연 핑거 결합 도메인을 설계하는데 이용될 수 있다.

[0091] 대안적 방법 예컨대, 정상적인 인식 코드표를 사용한 합리적인 설계가 또한 특이적 서열을 표적으로 하기 위해 아연 핑거 결합 도메인을 설계하는데 이용될 수 있다 (Sera et al. (2002) Biochemistry 41 :7074-7081). DNA 서열에서 가능한 표적 부위를 확인하고 아연 핑거 결합 도메인을 설계하기 위한 공개적으로 입수가능한 웹-기반 도구는 각각 <http://www.zincfingertools.org> 및 <http://bindr.gdcb.iastate.edu/ZiFiT/>에서 찾아볼 수 있다 (Mandell et al. (2006) Nuc. Acid Res. 34:W516-W523; Sander et al. (2007) Nuc. Acid Res. 35:W599-W605).

[0092] 아연 핑거 결합 도메인은 약 3개 뉴클레오티드 내지 약 21개 뉴클레오티드 길이, 또는 바람직하게는, 약 9개 내지 약 18개 뉴클레오티드 길이 범위의 DNA 서열을 인식하고 이에 결합하도록 설계될 수 있다. 일반적으로, 아연 핑거 결합 도메인은 적어도 3개의 아연 핑거 인식 영역 (즉, 아연 핑거)을 포함한다. 한 구체예에서, 아연 핑거 결합 도메인은 4개의 아연 핑거 인식 영역을 포함할 수 있다. 또 다른 구체예에서, 아연 핑거 결합 도메인은 5개의 아연 핑거 인식 영역을 포함할 수 있다. 여전히 또 다른 구체예에서, 아연 핑거 결합 도메인은 6개의 아연 핑거 인식 영역을 포함할 수 있다. 아연 핑거 결합 도메인은 임의의 적당한 표적 DNA 서열에 결합하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 그 기재내용 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,607,882; 6,534,261 및 6,453,242 참조.

[0093] 아연 핑거 인식 영역을 선택하는 예시적인 방법은 파지 디스플레이 및 2-하이브리드 시스템을 포함할 수 있으며, 각각은 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759; 및 6,242,568; 뿐만 아니라 WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197 및 GB 2,338,237에 기재되어 있다. 또한, 아연 핑거 결합 도메인에 대한 결합 특이성의 향상은 예를 들어, WO 02/077227에 기술되어 있다.

[0094] 아연 핑거 결합 도메인 및 융합 단백질 (및 이를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드)의 설계 및 작제를 위한 방법은 당업자에게 공지되어 있으며, 그 전체가 본원에 참조로 각각 통합된 미국 특허 출원 공개 번호 20050064474 및 20060188987에 상세히 기술된다. 아연 핑거 인식 영역 및/또는 다중-핑거화된 아연 핑거 단백질이 예를 들어, 5개 이상의 아미노산 길이의 링커를 포함하는 적합한 링커 서열을 사용하여 함께 연결될 수 있다. 6개 이상의 아미노산 길이의 링커 서열의 비제한적 예에 있어서는 본원에 그 기재내용 전체가 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,479,626; 6,903,185; 및 7,153,949를 참조하십시오. 본원에 기술된 아연 핑거 결합 도메인은 단백질의 개별 아연 핑거 사이의 적합한 링커들의 조합을 포함할 수 있다.

[0095] 일부 구체예에서, 아연 핑거 뉴클레아제는 핵 위치 신호 또는 서열 (NLS)을 추가로 포함할 수 있다. NLS는 핵로의 아연 핑거 뉴클레아제 단백질을 표적화시키는 것을 촉진하여 크로모솜의 표적 서열에 이중 가단 파괴를 도입하는 아미노산 서열이다. 핵 위치 신호는 당해 기술에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Makkerh et al. (1996) Current Biology 6:1025-1027] 참조.

- [0096] 아연 핑거 뉴클레아제는 또한 절단 도메인을 포함한다. 아연 핑거 뉴클레아제의 절단 도메인 부분은 임의의 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로부터 유득될 수 있다. 절단 도메인이 유도될 수 있는 엔도뉴클레아제의 비제한적 예는 제한 엔도뉴클레아제 및 호밍 엔도뉴클레아제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌 [2002-2003 Catalog, New England Biolabs, Beverly, Mass.; and Belfort et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388 or www.neb.com] 참조. DNA를 절단하는 추가적인 효소가 공지되어 있다 (예를 들어, S1 뉴클레아제; 녹두 뉴클레아제; 췌장 DNase I; 마이크로코컬 뉴클레아제; 효모 HO 엔도뉴클레아제). 또한, 문헌 [Linn et al. (eds.) *Nucleases*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1993] 참조. 이들 효소 (또는 이의 작용성 단편) 중 하나 이상이 절단 도메인의 소스로서 사용될 수 있다.
- [0097] 절단 도메인은 또한, 절단 활성을 위한 다이머화를 필요로 하는 상기 기술된 바와 같은 효소 또는 이의 일부로부터 유도될 수 있다. 2개의 아연 핑거 뉴클레아제가 절단에 필요할 수 있는데, 각 뉴클레아제는 활성 효소 다이머의 모노머를 포함하기 때문이다. 대안적으로, 단일 아연 핑거 뉴클레아제가 두 모노머 모두를 포함하여 활성 효소 다이머를 생성할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이 "활성 효소 다이머"는 핵산 분자를 절단할 수 있는 효소 다이머이다. 2개의 절단 모노머는 동일한 엔도뉴클레아제 (또는 이의 작용성 단편)로부터 유도될 수 있거나, 각 모노머는 상이한 엔도뉴클레아제 (또는 이의 작용성 단편)로부터 유도될 수 있다.
- [0098] 2개의 절단 모노머가 활성 효소 다이머를 형성하는데 사용되는 경우, 2개의 아연 핑거 뉴클레아제에 대한 인식 부위는 바람직하게는, 2개의 아연 핑거 뉴클레아제의 이들의 각 인식 부위로의 결합이 절단 모노머를 서로에 대한 공간 배향으로 위치시키도록 배치되어, 절단 모노머가 예를 들어, 다이머화에 의해 활성 효소 다이머를 형성하게 한다. 그 결과, 인식 부위의 근처 가장자리는 약 5 내지 약 18개 뉴클레오티드로 분리될 수 있다. 예를 들어, 근처의 가장자리는 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개 뉴클레오티드에 의해 분리될 수 있다. 그러나, 임의의 정수개의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 쌍이 두 인식 부위 (예를 들어, 약 2 내지 약 50개 또는 그 초과 뉴클레오티드 쌍) 사이에 개입될 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 본원에 상세히 기술된 것과 같은 아연 핑거 뉴클레아제의 인식 부위의 근처 가장자리는 6개 뉴클레오티드에 의해 분리될 수 있다. 일반적으로, 절단 부위는 인식 부위 사이에 위치한다.
- [0099] 제한 엔도뉴클레아제 (제한 효소)는 많은 종에 존재하며, (인식 부위에서) DNA에 서열-특이적 결합하여 결합 부위에서 또는 결합 부위 근처에서 DNA를 절단할 수 있다. 특정 제한 효소 (예를 들어, 타입 IIS)는 인식 부위로부터 제거된 부위에서 DNA를 절단하며 분리가능한 결합 및 절단 도메인을 갖는다. 예를 들어, 타입 IIS 효소 FokI는 한 가닥의 이의 인식 부위로부터 9개 뉴클레오티드 및 또 다른 가닥의 이의 인식 부위로부터 13개 뉴클레오티드에서 DNA의 이중-가닥 절단을 촉매한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5356802; 5,436,150 및 5,487,994; 뿐만 아니라 문헌 [Li et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279; Li et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:2764-2768; Kim et al. (1994a) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:883-887; Kim et al. (1994b) *J. Biol. Chem.* 269:31, 978-31, 982] 참조. 따라서, 아연 핑거 뉴클레아제는 적어도 하나의 타입 IIS 제한 효소로부터의 절단 도메인 및 하나 이상의 아연 핑거 결합 도메인을 포함할 수 있으며, 이는 엔지니어링될 수 있거나 없다. 예시적인 타입 IIS 제한 효소는 예를 들어, 그 기재내용 전체가 본원에 참조로서 통합된 국제 공개 WO 07/014,275에 기술되어 있다. 추가적인 제한 효소는 또한 분리가능한 결합 및 절단 도메인을 함유하며, 또한 본 기재내용에 의해 고려된다. 예를 들어, 문헌 [Roberts et al. (2003) *Nucleic Acids Res.* 31 :418-420] 참조.
- [0100] 또 다른 구체예에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 메가뉴클레아제일 수 있다. 메가뉴클레아제는 큰 인식 부위를 특징으로 하는 엔도테옥시리보뉴클레아제이며 즉, 인식 부위는 일반적으로 약 12개 염기쌍 내지 약 40개 염기쌍의 범위이다. 이러한 요구의 결과로서, 인식 부위는 일반적으로 임의의 주어진 게놈에서 단지 1회 발생한다. 자연-발생 메가뉴클레아제는 15-40개 염기-쌍 절단 부위를 인식하며, 보통 4개의 패밀리로 그룹화된다: LAGLIDADG 패밀리, GIY-YIG 패밀리, His-Cyst 박스 패밀리 및 HNH 패밀리. 메가뉴클레아제는 당업자에게 널리 공지된 기법을 사용하여 이들의 인식 서열을 변형시킴으로써 특이적 크로모솜 서열에 표적화될 수 있다.
- [0101] 추가의 구체예에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 전사 활성인자-유사 이펙터 (TALE) 뉴클레아제일 수 있다. TALE는 신규한 DNA 표적에 결합하도록 용이하게 조작될 수 있는 식물 병원체 크산토모나스로부터의 전사 인자이다. TALE 또는 이의 절두된 버전은 FokI과 같은 엔도뉴클레아제의 촉매 도메인에 연결되어 TALE 뉴클레아제 또는 TALEN으로 불리는 표적화 엔도뉴클레아제를 발생시킨다.
- [0102] 여전히 또 다른 구체예에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 부위-특이적 뉴클레아제일 수 있다. 특히, 부위-특이적 뉴클레아제는 "회귀-커터" 엔도뉴클레아제일 수 있으며, 이의 인식 서열은 게놈에서 거의 발생하지 않는다. 바

람직하게는, 부위-특이적 뉴클레아제의 인식 서열은 게놈에서 단지 한번 발생한다.

[0103] 여전히 또 다른 구체예에서, 표적화 엔도뉴클레아제는 인공 표적 DNA 이중 가닥 파괴 유도제 (또한 소위 인공 제한 DNA 커터로 불림)일 수 있다. 예를 들어, 인공 표적화된 DNA 이중 가닥 파괴 유도제는 표적화된 절단 부위에 상보적인 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드 및 DNA를 절단하는 금속/킬레이트 착물을 포함할 수 있다. 따라서, 인공 표적화된 DNA 이중 가닥 파괴 유도제는 어떠한 단백질도 함유하지 않는다. 금속/킬레이트 착물의 금속은 세륨, 카드뮴, 코발트, 크롬, 구리, 철, 마그네슘, 망간, 아연 및 기타 등등일 수 있다. 금속/킬레이트 착물의 킬레이트는 EDTA, EGTA, BAPTA, 및 기타 등등이 있을 수 있다. 바람직한 구체예에서, 금속/킬레이트 착물은 Ce(IV)/EDTA일 수 있다. 다른 바람직한 구체예에서, 인공 표적화된 DNA 이중 가닥 파괴 유도제는 Ce(IV)/EGTA의 착물 및 슈도-상보적 펩티드 핵산 (PNA)의 2 가닥을 포함할 수 있다 (Katada et al., Current Gene Therapy, 2011, 11 (1):38-45).

[0104] 추가의 구체예에서, 뉴클레아제는 호밍 뉴클레아제일 수 있다. 호밍 엔도뉴클레아제는 1-5'cel, 1-Ceul, 1-PspI, VI-Sce, 1-SceIV, I-Csml, 1-PanI, 1-Scell, 1-Ppol, 1-ScellI, 1-Crel, 1-TevI, 1-Tev 및 I-7evIII를 포함한다. 이들의 인식 서열은 공지되어 있다. 또한, 미국 특허 번호 5,420,032; 미국 특허 번호 6,833,252; 문헌 [Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Ou on et al. (1989) Gene 82: 115-118; Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125- 1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263: 163-180; Argast et al. (1998) J Mol. Biol. 280:345-353 및 the New England Biolabs catalogue] 참조.

[0105] 특정 구체예에서, 뉴클레아제는 조작된 (비-천연 발생) 호밍 엔도뉴클레아제 (메가뉴클레아제)를 포함한다. 호밍 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제 예컨대, 1-Scel, 1-Ceul, VI- PspI, VI-Sce, 1-ScelN, 1-Csml, 1-PanI, 1-Scell, 1-Ppol, 1-ScellI, 1-Crel, 1-TevI, 1-TevII 및 I-7evIII의 인식 서열은 공지되어 있다. 또한, 미국 특허 번호 5,420,032; 미국 특허 번호 6,833,252; 문헌 [Belfort et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388; Dujon et al. (1989) Gene 82: 115-118; Perler et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127; Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228; Gimble et al. (1996) J. Mol. Biol. 263: 163-180; Argast et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353 및 the New England Biolabs catalogue] 참조. 또한, 호밍 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 DNA-결합 특이성은 비-천연 표적 부위에 결합하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Chevalier et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905; Epinat et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962; Ashworth et al. (2006) Nature 441:656-659; Paques et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66]; 미국 특허 공개 번호 20070117128 참조. 호밍 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 DNA-결합 도메인은 전체로서 (즉, 뉴클레아제가 동족 절단 도메인을 포함하도록) 뉴클레아제의 맥락이 변경될 수 있거나 이중성 절단 도메인에 융합될 수 있다.

[0106] 한 구체예에서, DNA 분해제는 오메가, 아연 핑거, TALE 및 CRISPR/Cas9로 구성된 군으로부터 선택되거나 이들 군의 부위-특이적 뉴클레아제이다.

[0107] **D. 마커**

[0108] 본 발명의 특정 구체예에서, 본 발명의 조성물로 형질감염된 세포 또는 게놈 DNA 서열 변형을 함유하는 세포는 조성물에 마커를 포함시킴으로써 시험관내 또는 생체내에서 확인될 수 있다. 마커는 도너 DNA와 동일한 플라스미드 또는 선형화된 DNA에 있을 수 있거나 마커는 별도의 DNA 조각에 있을 수 있다. 이러한 마커는 세포에 식별 가능한 변형을 부여하여 조성물로 형질감염된 세포의 용이한 식별을 허용할 것이다. 일반적으로, 선택가능한 마커는 선택을 허용하는 특성을 부여하는 것이다. 양성 선택성 마커는 마커의 존재가 이의 선택을 허용하는 것인 반면, 음성 선택성 마커는 이의 존재가 이의 선택을 방지하는 것이다. 양성 선택성 마커의 예는 약물 내성 마커 또는 항생제 내성 유전자/마커이다.

[0109] 일반적으로, 형질전환주 예를 들어, 네오마이신, 퓨로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신, G418, 플레오마이신, 블라스티시딘 및 히스티딘올에 대한 내성을 부여하는 유전자의 클로닝 및 식별에서 약물 선택 마커 보조제의 포함은 유용한 선택성 마커이다. 조건의 구현을 기반으로 하는 형질전환주의 구별을 허용하는 표현형을 부여하는 마커 이외에, 기본이 비색 분석인 GFP와 같은 스크린가능한 마커를 포함하는 다른 유형의 마커가 또한 고려된다. 대안적으로, 스크린가능한 효소 예컨대, 헤르페스 심플렉스 바이러스 티미딘 키나제(tk) 또는 클로르암페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (CAT)가 사용될 수 있다. 당업자는 또한 가능하게는 FACS 분석과 함께 면역학적 마커를 어떻게 사용하는지 알고 있을 것이다. 선택가능하고 스크리닝 가능한 마커의 추가의 예는 당업자에게 널리 공지되어 있다. 특정 구체예에서, 마커는 형광 마커, 효소 마커, 발광 마커, 광활성 마커, 광변환

마커, 또는 비색 마커이다. 형광 마커는 예를 들어, GFP 및 변이체 예컨대, YFP, RFP 등등, 및 기타 형광 단백질 예컨대, DsRed, mPlum, mCherry, YPet, Emerald, CyPet, T-Sapphire, 및 Venus를 포함한다. 광활성 마커는 예를 들어, KFP, PA-mRFP, 및 Dronpa를 포함한다. 광변환 마커는 예를 들어, mEosFP, KikGR, 및 PS-CFP2를 포함한다. 발광 단백질은 예를 들어, Neptune, FP595, 및 피알리딘을 포함한다. 스크리닝 마커의 비제한적 예가 포함된다.

[0110] 본 발명에 사용된 마커는 RNA 또는 DNA로 인코딩될 수 있다. 특정 구체예에서, 마커는 플라스미드 DNA로 인코딩된다. 일부 구체예에서, 마커 및 도너 DNA는 동일한 플라스미드에 존재한다.

[0111] 특정 양태에서, 전기천공 후, 전기천공된 조성물이 내부화된 세포가 음성 선택에 의해 선택된다. 또 다른 양태에서, 전기천공 후, 전기천공된 작제물이 내부화된 세포는 양성 선택에 의해 선택된다. 일부 양태에서, 선택은 전기천공 동안 선택 내성 유전자를 흡수하거나 선택 내성 유전자를 발현하지 않았던 세포의 생존력을 절충시키는 농도의 선택제에 세포를 노출시키는 것을 포함한다. 일부 양태에서, 선택은 조건부로 치사시키는 농도의 선택제에 세포를 노출시키는 것을 포함한다. 특정 양태에서, 선택제 또는 선택 화합물은 항생제이다. 기타 양태에서, 선택제는 단독의 또는 조합된 G418 (또한, 제네티신 및 G418 설페이트로서 공지됨), 퓨로마이신, 제오신, 하이그로마이신, 플레오마이신 또는 블라스티시딘이다. 특정 양태에서, 선택제의 농도는 0.1 μ g/L 내지 0.5 μ g/L, 0.5 μ g/L 내지 1 μ g/L, 1 μ g/L 내지 2 μ g/L, 2 μ g/L 내지 5 μ g/L, 5 μ g/L 내지 10 μ g/L, 10 μ g/L 내지 100 μ g/L, 100 μ g/L 내지 500 μ g/L, 0.1mg/L 내지 0.5mg/L, 0.5mg/L 내지 1mg/L, 1mg/L 내지 2mg/L, 2mg/L 내지 5mg/L, 5mg/L 내지 10mg/L, 10mg/L 내지 100mg/L, 100mg/L 내지 500mg/L, 0.1g/L 내지 0.5g/L, 0.5g/L 내지 1g/L, 1g/L 내지 2g/L, 2g/L 내지 5g/L, 5g/L 내지 10g/L, 10g/L 내지 100g/L, 또는 100g/L 내지 500g/L의 범위 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위이다. 특정 양태에서, 선택제의 농도는 (y)g/L이며, 여기에서 'y'는 비제한적으로, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 또는 여기에 속하는 임의의 추론가능한 범위를 포함하는 임의의 값일 수 있다. 일부 구체예에서, 선택제는 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 또는 10 g/L 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위의 조건부 치사 농도로 배양 배지에 존재한다.

[0112] 특정 구체예에서, 코딩 서열 자체의 길이에 상관없이 핵산 세그먼트는 다른 핵산 서열 예컨대, 프로모터, 폴리 아데닐화 신호, 추가적인 제한 효소 부위, 다중 클로닝 부위, 기타 코딩 세그먼트, 및 기타 등등과 조합될 수 있어, 이들의 전체 길이는 상당히 변화될 수 있다.

[0113] **E. 벡터**

[0114] 예를 들어, 도너 DNA와 같은 폴리펩티드는 조성물 중의 핵산 분자에 의해 인코딩될 수 있다. 특정 구체예에서, 핵산 분자는 핵산 벡터 형태로 존재할 수 있다. 용어 "벡터"는 담체 핵산 분자를 지칭하는데 사용되는데, 이중성 핵산 서열이 복제되고 발현될 수 있는 세포로의 도입을 위해 이중성 핵산 서열이 이러한 담체 핵산 분자 내로 삽입될 수 있다. 핵산 서열은 "이중성"일 수 있으며, 이는 벡터가 도입될 세포에 또는 도입될 핵산에 이중인 상황임을 의미하며, 이는 세포 또는 핵산의 서열에 상동성인 서열을 포함하나 정상적으로는 발견되지 않는 핵산 또는 숙주 세포 내부의 위치에서 포함한다. 벡터는 DNA, RNA, 플라스미드, 코스미드, 바이러스 (박테리오파지, 동물 바이러스 및 식물 바이러스), 및 인공 크로모좀 (예를 들어, YAC)를 포함한다. 당업자는 표준 재조합 기법을 통해 벡터를 작제할 실력이 갖춰져 있을 것이다 (예를 들어, 둘 모두 참조로서 본원에 통합된 문헌 [Sambrook et al., 2001; Ausubel et al., 1996]). 벡터는 항체를 생성하기 위해 숙주 세포에 이용될 수 있다.

[0115] 용어 "발현 벡터"는 숙주 세포 계놈으로 전사되거나 안정하게 통합되고 후속하여 전사될 수 있는 유전자 생성물의 적어도 일부를 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 벡터를 지칭한다. 일부 경우에, RNA 분자는 이어서 단백질, 폴리펩티드 또는 펩티드로 번역된다. 발현 벡터는 다양한 "제어 서열"을 함유할 수 있으며, 이는 특정 숙주 유기체에서 작동적으로 연결된 코딩 서열의 전사 및 가능하게는 번역에 필요한 핵산 서열을 지칭한다. 전사 및 번역을 지배하는 제어 서열 이외에, 벡터 및 발현 벡터는 또한 다른 기능을 제공할 뿐만 아니라 본원에 기술된 핵산 서열을 함유할 수 있다. 마커를 발현하는 발현 벡터가 본 발명에 유용할 수 있음이 고려된다. 기타 구체예에서, 마커는 mRNA로 인코딩되며 발현 벡터에는 존재하지 않는다.

- [0116] "프로모터"는 제어 서열이다. 프로모터는 전형적으로, 전사의 개시 및 비율이 제어되는 핵산 서열의 영역이다. 이는 RNA 폴리머라제 및 기타 전사 인자와 같은 조절 단백질 및 분자가 결합할 수 있는 유전자 요소를 함유할 수 있다. 문구 "작동적으로 위치한다", "작동적으로 연결된다", "제어 하의" 및 "전사 제어 하의"는 프로모터가 핵산 서열과 관련하여 올바른 작용 위치 및/또는 방향으로 존재하여 그러한 서열의 전사 개시 및 발현을 제어함을 의미한다. 프로모터는 핵산 서열의 전사 활성화와 관련된 시스-작용 조절 서열을 지칭하는 "인핸서"와 함께 이용될 수 있거나 없다.
- [0117] 랩티드 또는 단백질 인코딩 폴리뉴클레오티드의 발현을 제어하는데 사용되는 특정 프로모터가 표적화된 세포 바람직하게는, 박테리아 세포에서 폴리뉴클레오티드를 발현할 수 있는 한 중요한 것으로서 간주되지 않는다. 인간 세포를 표적으로 하는 경우, 인간 세포에서 발현될 수 있는 프로모터의 제어 하에 그리고 이러한 프로모터에 인접한 폴리뉴클레오티드 코딩 영역을 위치시키는 것이 바람직하다. 일반적으로 말해서, 이러한 프로모터는 박테리아, 인간 또는 바이러스 프로모터 중 어느 하나를 포함할 수 있다.
- [0118] 특이적 개시 신호는 또한, 코딩 서열의 효과적인 번역에 필요할 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 또는 인접한 서열을 포함한다. ATG 개시 코돈을 포함하는 외인성 번역 제어 신호가 제공되어야 할 수 있다. 당업자는 용이하게 신호를 결정하고 필요한 신호를 제공할 수 있을 것이다.
- [0119] 벡터는 다중의 제한 효소 부위를 함유하는 핵산 영역인 다중 클로닝 부위 (MCS)를 포함할 수 있으며, 다중 제한 효소 부위 중 일부는 벡터를 분해하기 위해 표준 재조합 기법과 함께 이용될 수 있다 (참조로서 본원에 통합된 문헌 [Carbonelli *et al.*, 1999, Levenson *et al.*, 1998, and Cocea, 1997] 참조).
- [0120] 대부분의 전사된 진핵생물 RNA 분자는 RNA 스플라이싱되어 1차 전사체로부터 인트론을 제거할 것이다. 게놈 진핵생물 서열을 함유하는 벡터는 단백질 발현을 위한 전사의 적절한 프로세싱을 보장하기 위해 도너 및/또는 어셉터 스플라이싱 부위를 필요로 할 수 있다 (본원에 참조로서 통합된 문헌 [Chandler *et al.*, 1997] 참조).
- [0121] 벡터 또는 작제물은 적어도 하나의 말단 신호를 일반적으로 포함할 것이다. "종결 신호" 또는 "말단화제"는 RNA 중합효소에 의한 RNA 전사체의 특정 말단화에 관련된 DNA 서열로 구성된다. 따라서, 특정 구체예에서, RNA 전사체의 생성을 종료하는 종결 신호가 고려된다. 종결화제는 바람직한 메시지 수준을 달성하기 위해 생체내에서 필요할 수 있다. 진핵생물 시스템에서, 종결화제 영역은 또한, 폴리아데닐화 부위를 노출하도록 새로운 전사체의 부위-특이적 절단을 허용하는 특이적 DNA 서열을 포함할 수 있다. 이는 특정화된 내인성 중합효소에 신호를 보내 전사체의 3' 말단에 약 200개 A 잔기 (폴리아)의 스트레치를 부가한다. 이러한 폴리A 테일로 변형된 RNA 분자는 더욱 안정적인 것으로 보이며 더욱 효율적으로 번역된다. 따라서, 진핵 생물을 포함하는 기타 구체예에서, 종결화제가 RNA의 절단을 위한 신호를 포함하는 것이 바람직하며, 종결화제 신호가 메시지의 폴리아데닐화를 촉진하는 것이 더욱 바람직하다.
- [0122] 발현 특히, 진핵생물 발현에서, 전형적으로 폴리아데닐화 신호를 포함시켜 전사체의 적절한 폴리아데닐화를 수행할 것이다.
- [0123] 숙주 세포에서 벡터를 증식시키기 위해, 이는 복제 부위의 하나 이상의 기점 (종종 "ori"로 불림)을 함유할 수 있으며, 이는 복제가 개시되는 특정 핵산 서열이다. 대안적으로, 숙주 세포가 효모인 경우, 자가 복제 서열 (ARS)이 사용될 수 있다.
- [0124] 일부 벡터는 벡터가 진핵 및 원핵 세포 둘 모두에서 복제되고/거나 발현되게 하는 제어 서열을 사용할 수 있다. 당업자는 상기 기술된 숙주 세포 모두를 인큐베이션하여 이들을 유지하고 벡터의 복제를 허용하는 조건을 추가로 이해할 것이다. 또한, 벡터의 대규모 생성을 허용하며, 뿐만 아니라 벡터 및 이들의 동족 폴리랩티드, 단백질 또는 랩티드에 의해 인코딩된 핵산의 생성을 허용하는 조건 및 기법이 또한 이해되고 공지되어 있다.
- [0125] 어떤 특정 구체예에서, 전기천공에 의해 세포 내로 형질감염된 조성물은 비-바이러스성이다 (즉, 어떠한 바이러스 성분도 함유하지 않음). 비-바이러스 방법은 독성을 감소시키고/거나 방법의 안전성을 향상시킬 것으로 여겨진다. RNA로서 제공된 DNA 분해제 및 작은 단일 가닥 DNA 올리고의 사용의 조합은 게놈 DNA 서열 변형의 감소된 세포독성 및 증가된 효율의 이점을 제공하는 것으로 여겨진다.
- [0126] **F. 핵산 서열 변형**
- [0127] 본 기재내용의 문맥에서, 용어 "비변형된 도너 DNA"는 일반적으로 리보핵산 (RNA) 또는 데옥시리보핵산 (DNA)의 올리고머 또는 폴리머를 지칭한다. 일부 구체예에서, 핵산 분자는 비변형된 DNA를 포함한다. 이러한 용어는 자연 발생 뉴클레오베이스, 당 및 뉴클레오시드간 공유 결합으로 구성된 DNA를 포함한다. 용어 "DNA 유사체"는 올

리고뉴클레오티드와 유사한 방식으로 작용하는 하나 이상의 비-자연 발생 부분을 갖는 DNA를 지칭한다. 이러한 비-자연 발생 올리고뉴클레오티드는 예를 들어, 향상된 세포 흡수, 다른 올리고뉴클레오티드 또는 핵산 표적에 대한 향상된 친화성 및 뉴클레아제의 존재하에서의 증가된 안정성과 같은 바람직한 특성으로 인해 자연 발생 형태 대비 종종 선택된다. 용어 "올리고뉴클레오티드"는 비변형된 올리고뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드 유사체를 지칭하는데 사용될 수 있다.

- [0128] 핵산 분자의 특정 예는 변형된 즉, 비-자연 발생 뉴클레오티드간 결합을 함유하는 핵산 분자를 포함한다. 이러한 비-자연적 뉴클레오티드간 결합은 예를 들어, 향상된 세포 흡수, 다른 올리고뉴클레오티드 또는 핵산 표적에 대한 향상된 친화성 및 뉴클레아제의 존재하에서의 증가된 안정성과 같은 바람직한 특성으로 인해 자연 발생 형태에 비해 종종 선택된다. 특정 구체예에서, 변형은 메틸기를 포함한다.
- [0129] 핵산 분자는 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드간 결합을 가질 수 있다. 본 명세서에 규정된 바와 같이, 변형된 뉴클레오티드간 결합을 갖는 올리고뉴클레오티드는 인 원자를 갖지 않는 뉴클레오티드간 결합 및 인 원자를 보유하는 뉴클레오티드간 결합을 포함한다. 본 명세서의 목적에 있어서, 그리고 당해 기술에 때때로 언급된 바와 같이, 이들의 뉴클레오티드간 백본에 인 원자를 갖지 않는 변형된 올리고뉴클레오티드는 또한 올리고뉴클레오티드인 것으로 간주될 수 있다.
- [0130] 핵산 분자에 대한 변형은 하나 또는 둘 모두의 말단 뉴클레오티드가 변형된 변형을 포함할 수 있다.
- [0131] 하나의 적합한 인-함유 변형된 뉴클레오티드간 결합은 포스포로티오에이트 뉴클레오티드간 결합이다. 많은 다른 변형된 올리고뉴클레오티드 백본(뉴클레오티드간 결합)은 당해분야에 공지되어 있으며 본 구체예의 내용에 유용할 수 있다.
- [0132] 인-함유 뉴클레오티드간 결합의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 비제한적으로, 미국 특허 번호 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243, 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 5,194,599; 5,565,555; 5,527,899; 5,721,218; 5,672,697 5,625,050, 5,489,677, 및 5,602,240을 포함하며, 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다.
- [0133] 백본에 인 원자를 포함하지 않는 변형된 DNA 백본(뉴클레오티드간 결합)은 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오티드간 결합, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 사이클로알킬 뉴클레오티드간 결합, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로사이클릭 뉴클레오티드간 결합에 의해 형성되는 뉴클레오티드간 결합을 갖는다. 이들에는 아미드 백본을 갖는 것들; 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분을 갖는 것을 포함하는 기타의 것을 포함한다.
- [0134] 상기 인-비함유 올리고뉴클레오티드의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 비제한적으로, 미국 특허 번호 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 5,792,608; 5,646,269 및 5,677,439를 포함하며, 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다.
- [0135] DNA 화합물은 또한 모방체를 포함할 수 있다. DNA에 적용될 때 용어 모방체는 단지 푸라노스 고리만 또는 푸라노스 고리와 뉴클레오티드간 결합 둘 모두가 신규한 그룹으로 대체되는 DNA 화합물을 포함하는 것으로 의도되며, 단지 푸라노스 고리의 예를 들어, 모르폴리노 고리로의 대체는 또한 당 대응물인 것으로 또한 당해 기술에 언급된다. 헤테로사이클릭 염기 모이어티 또는 변형된 헤테로사이클릭 염기 모이어티는 적절한 표적 핵산과의 하이브리드화를 위해 유지된다.
- [0136] DNA 모방체는 펩티드 핵산(PNA) 및 사이클로헥세닐 핵산(CeNA로서 공지됨, 문헌 [Wang *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 8595-8602] 참조)과 같은 화합물을 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오티드 모방체의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 비제한적으로, 미국 특허 번호 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262를 포함하며, 이의 각각은 참조로서 본원에 통합된다. 또 다른 부류의 모방체는 포스포노모노에스테르 핵산으로서 언급되며, 백본에 인기를 혼입시킨다. 이러한 부류의 모방체는 분자 생물학에 사용하기 위한 보조체로서 및 핵산 검출을 위한 프로브로서 유전자 발현 억제 영역(안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임, 센스 올리고뉴클레오티드 및 트리플렉스-형성 올리고뉴클레오티드)에서 유용한 물리적 및 생물학적 및 약물학적 특성을 갖는 것으로 보고된다. 푸라노실 고리가 사이클로부틸 모이어티에 의해 대체된 또 다른 모방체가 보고되었다.

- [0137] 핵산 분자는 또한 하나 이상의 변형되거나 치환된 당 모이어티를 함유할 수 있다. 염기 모이어티는 적절한 핵산 표적 화합물과의 하이브리드화를 위해 유지된다. 당 변형은 올리고머 화합물에 뉴클레아제 안정성, 결합 친화성 또는 일부 기타 이로운 생물학적 특성을 부여할 수 있다.
- [0138] 대표적인 변형된 당은 카르보시클릭 또는 비고리형 (acyclic) 당, 2', 3' 또는 4' 위치 중 하나 이상에서 치환기를 갖는 당, 당의 하나 이상의 수소 원자 대신에 치환기를 갖는 당, 및 당에서 임의의 2개의 다른 원자 사이에 결합을 갖는 당을 포함한다. 많은 당 변형은 당해분야에 공지되어 있으며, 2' 위치에서 변형된 당 및 당의 임의의 2개 원자 사이의 브릿지(당이 바이사이클릭이 되도록)를 갖는 당이 특히 본 구체예에 유용하다. 본 구체예에 유용한 당 변형의 예는 비제한적으로, 하기로부터 선택된 당 치환기를 포함하는 화합물을 포함한다: OH; F; O-, S-, 또는 N-알킬; 또는 O-알킬-O-알킬 (여기에서, 알킬, 알케닐 및 알키닐은 치환되거나 비치환된 C1 내지 C10 알킬 또는 C2 내지 C10 알케닐 및 알키닐일 수 있다). 특히 적합한 것은 다음과 같다: 2-메톡시에톡시 (또한, 2'-O-메톡시에틸, 2'-MOE, 또는 2'-OCH₂CH₂OCH₃로서 공지됨), 2'-O-메틸 (2'-O--CH₃), 2'-플루오로 (2'-F), 또는 4' 탄소 원자를 2' 탄소 원자에 연결시키는 브릿지기를 갖는 바이사이클릭 당 변형된 뉴클레오시드 (여기에서, 예시적인 브릿지기는 -CH₂--O--, --(CH₂)₂--O-- 또는 --CH₂-N(R₃)--O이며, 여기서 R₃은 H 또는 C1-C12 알킬임).
- [0139] 뉴클레오티드에 대한 매우 높은 결합 친화성 및 증가된 뉴클레아제 내성을 부여하는 한 변형은 2'-MOE 측쇄이다 (Baker *et al.*, J. Biol. Chem., 1997, 272, 11944-12000). 2'-MOE 치환의 즉각적인 이점 중 하나는 결합 친화성의 향상이며, 이는 O-메틸, O-프로필, 및 O-아미노프로필과 같은 많은 유사한 2' 변형보다 더 크다. 2'-MOE 치환기를 갖는 올리고뉴클레오티드는 또한 생체내 사용을 위한 유망한 특징을 갖는 유전자 발현의 안티센스 억제제인 것으로 입증되었다 (Martin, P., Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504; Altmann *et al.*, Chimia, 1996, 50, 168-176; Altmann *et al.*, Biochem. Soc. Trans., 1996, 24, 630-637; and Altmann *et al.*, Nucleosides Nucleotides, 1997, 16, 917-926).
- [0140] 2'-당 치환기는 아라비노 (위) 위치 또는 리보 (아래) 위치에 있을 수 있다. 한 2'-아라비노 변형은 2'-F이다. 유사한 변형이 또한 올리고머 화합물 상의 다른 위치 특히, 3' 말단 뉴클레오시드 상의 또는 2'-5' 연결된 올리고뉴클레오티드에서 당의 3' 위치 및 5' 말단 뉴클레오티드의 5' 위치에서 이루어질 수 있다. 올리고머 화합물은 또한 펜토프라노실 당 대신에 사이클로부틸 모이어티와 같은 당 모방체를 가질 수 있다. 이러한 변형된 당 구조의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허는 비제한적으로, 미국 특허 번호 4,981,957; 5,118,800; 5,319,080; 5,359,044; 5,393,878; 5,446,137; 5,466,786; 5,514,785; 5,519,134; 5,567,811; 5,576,427; 5,591,722; 5,597,909; 5,610,300; 5,627,053; 5,639,873; 5,646,265; 5,658,873; 5,670,633; 5,792,747; 및 5,700,920를 포함하며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로서 통합된다.
- [0141] 대표적인 당 치환기는 그 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,172,209 (제목 "Capped 2'-Oxyethoxy Oligonucleotides")에 기재되어 있다.
- [0142] 대표적인 사이클릭 당 치환기는 그 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,271,358 (제목 "RNA Targeted 2'-Oligomeric compounds that are Conformationally Preorganized")에 기재되어 있다.
- [0143] 대표적인 구아니디노 치환기는 그 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,593,466 (제목 "Functionalized Oligomers")에 기재되어 있다.
- [0144] 대표적인 아세트아미도 치환기는 그 전체가 본원에 참조로서 통합된 미국 특허 번호 6,147,200에 기재되어 있다.
- [0145] 핵산 분자는 또한 자연 발생 또는 합성의 비변형된 뉴클레오베이스와 구조적으로 구별가능한 그러나, 작용적으로 상호교환가능한 하나 이상의 뉴클레오베이스 (종종 당해기술에서 단순히 "염기"로 언급됨) 변형 또는 치환을 함유할 수 있다. 이러한 뉴클레오베이스 변형은 뉴클레아제 안정성, 결합 친화성 또는 일부 기타 유익한 생물학적 특성을 올리고머 화합물에 부여할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "비변형된" 또는 "천연" 뉴클레오베이스는 퓨린 염기 아데닌 (A) 및 구아닌 (G), 및 피리미딘 염기 티민 (T), 시토신 (C) 및 우라실 (U)을 포함한다. 헤테로사이클릭 염기 모이어티로서 본원에서 또한 언급된 변형된 뉴클레오베이스는 기타 합성 및 천연 뉴클레오베이스를 포함하며, 이의 많은 예 예컨대, 특히, 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌을 포함한다.
- [0146] 헤테로사이클릭 염기 모이어티는 또한, 퓨린 또는 피리미딘 염기가 기타 헤테로사이클로 대체된 것들 예를 들어, 7-데아자-아데닌, 7-데아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈을 포함할 수 있다. 일부 뉴클레오베이스

스는 미국 특허 번호 3,687,808에 기재된 것들, 문헌 [The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, pages 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990]에 기재된 것들, 문헌 [Englisch et al., Angewandte Chemie, International Edition, 1991, 30, 613]에 기재된 것들, 문헌 [Sanghvi, Y. S., Chapter 15, Antisense Research and Applications, pages 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993]에 기재된 것들을 포함한다. 특정한 이들 뉴클레오베이스는 특히, 올리고머 화합물의 결합 친화성을 증가시키는데 유용하다. 이들은 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 O-6 치환된 퓨린을 포함하며, 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 포함한다.

[0147] 핵산 분자에 대한 추가적인 변형은 참조로서 본원에 통합된 미국 특허 공개 2009/0221685에 기재되어 있다. 핵산 분자에 대한 추가적인 적합한 권주게이트가 또한 본원에 기술된다.

[0148] **II. 세포 배양**

[0149] **A. 숙주 세포**

[0150] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호교환적으로 사용될 수 있다. 이들 용어 모두는 또한, 새로 분리된 세포 및 생체외의 배양되거나 활성화되거나 확장된 세포 둘 모두를 포함한다. 이들 용어 모두는 또한 이들의 후손을 포함하며, 이는 임의의 및 모든 후속 세대이다. 모든 후손은 의도적인 또는 비의도적인 돌연변이로 인해 동일하지 않을 수 있는 것으로 이해된다. 이중성 핵산 서열을 발현하는 상황에서, "숙주 세포"는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 지칭하며, 이는 벡터를 복제할 수 있거나 벡터에 의해 인코딩된 이중성 유전자를 발현할 수 있는 임의의 형질변형가능한 유기체를 포함한다. 숙주 세포는 벡터 또는 바이러스에 대한 수령체로서 사용될 수 있으며 사용되었다. 숙주 세포는 "형질감염" 또는 "형질변형"될 수 있으며, 이는 외인성 핵산 예컨대, 재조합 단백질-인코딩 서열이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. 형질변형된 세포는 일차 대상 세포 및 이의 후손을 포함한다.

[0151] 특정 구체예에서, 형질감염은 임의의 원핵 또는 진핵 세포에서 수행될 수 있다. 일부 양태에서, 전기천공은 인간 세포의 형질감염을 포함한다. 기타 양태에서, 전기천공은 동물 세포의 형질감염을 포함한다. 특정 양태에서, 형질감염은 세포주 또는 하이브리드 세포 유형의 형질감염을 포함한다. 일부 양태에서, 형질감염되는 세포 또는 세포들은 암 세포, 종양 세포 또는 불멸화된 세포이다. 일부 경우에, 종양, 암, 불멸화된 세포 또는 세포주가 유도되며, 다른 경우에 종양, 암, 불멸화된 세포 또는 세포주는 자연적으로 이들의 각 상황 또는 상태가 된다. 특정 양태에서, 세포 또는 세포주는 A549, B-세포, B16, BHK-21, C2C12, C6, CaCo-2, CAP/, CAP-T, CHO, CHO2, CHO-DG44, CHO-K1, COS-1, Cos-7, CV-1, 수지상 세포, DLD-1, 배아 줄기 (ES) 세포 또는 유도체, H1299, HEK, 293, 293T, 293FT, Hep G2, 조혈 줄기 세포, HOS, Huh-7, 유도된 다능성 줄기 (iPS) 세포 또는 유도체, Jurkat, K562, L5278Y, LNCaP, MCF7, MDA-MB-231, MDCK, 중간엽 세포, Min-6, 단핵 세포, Neuro2a, NIH 3T3, NIH3T3L1, K562, NK-세포, NSO, Panc-1, PC12, PC-3, 말초혈 세포, 혈장 세포, 일차 섬유모세포, RBL, Renca, RLE, SF21, SF9, SH-SY5Y, SK-MES-1, SK-N-SH, SL3, SW403, 자극 야기성 다능성 획득 (Stimulus-triggered Acquisition of Pluripotency (STAP)) 세포 또는 유도체형 SW403, T-세포, THP-1, 종양 세포, U2OS, U937, 말초혈 림프구, 확장된 T 세포, 조혈 줄기 세포, 또는 Vero 세포일 수 있다. 특정 구체예에서, 세포는 말초혈 림프구, 확장된 T 세포, 자연 살해 세포 (NK 세포), 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 또는 일차 세포이다. 특정 구체예에서, 세포는 조혈 줄기 세포이다. 추가의 특정 구체예에서, 세포는 말초혈 림프구이다.

[0152] 특정 구체예에서, 세포는 형질감염시키기 어려운 것으로 당업자에게 공지된 것이다. 이러한 세포는 당해기술에 공지되어 있으며, 예를 들어, 일차 세포, 곤충 세포, SF9 세포, Jurkat 세포, CHO 세포, 줄기 세포, 느리게 분화하는 세포, T 세포, 및 비-분화 세포를 포함한다. 일부 구체예에서, 세포는 T 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 일차 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 줄기 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 골수 및 림프구 전구 세포를 포함하는 조혈 줄기 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 중간엽 줄기 세포이다. 일부 구체예에서, 세포는 배세포 예컨대, 난세포 또는 정자이다. 일부 구체예에서, 세포는 수정 배아이다. 일부 구체예에서, 세포는 인간 수정 배아이다.

[0153] 일부 구체예에서, 세포는 세포의 클론 군집의 확장을 가능하게 하는 제한 희석 방법으로 처리될 수 있다. 제한 희석 클로닝 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 이러한 방법은 예를 들어, 하이브리도마를 위해 기술되었으나 임의의 세포에 적용될 수 있다. 이러한 방법은 문헌 (Cloning hybridoma cells by limiting dilution, Journal of tissue culture methods, 1985, Volume 9, Issue 3, pp 175-177, by Joan C. Renner, Bruce L. Brown, and Roland M. Nardone)에 기술되어 있으며, 이는 본원에 참조로 통합된다.

[0154] 일부 구체예에서, 세포는 형질감염 전에 또는 형질감염 후에 배양된다. 기타 구체예에서, 세포는 형질감염 후 선택 단계 동안 배양된다. 여전히 기타 구체예에서, 세포는 유지 및 클론 선택 및 개시 확장 단계 동안 배양된다. 여전히 기타 구체예에서, 세포는 스크리닝 단계 동안 배양된다. 기타 구체예에서, 세포는 대규모 생산 단계 동안 배양된다. 현탁 및 접촉 세포 배양 방법은 당업자에게 널리 공지되어 있다. 일부 구체예에서, 세포는 시중에서 입수가 가능한 세포-배양 용기 및 세포 배양 배지를 이용하여 현탁액에서 배양된다. 일부 구체예에서 사용될 수 있는 시중에서 입수가 가능한 배양 용기의 예는 ADME/TOX 플레이트, 셀 챔버 슬라이드(Cell Chamber Slide) 및 커버슬립(Coverslip), 셀 카운팅 이큅먼트(Cell Counting Equipment), 셀 컬처 설페이스(Cell Culture Surfaces), 코닝 HYPERFlask 셀 컬처 베슬(Corning HYPERFlask Cell Culture Vessel), 코팅된 컬처웨어(Coated Cultureware), 날젠 크리오웨어(Nalgene Cryoware), 컬처 챔버(Culture Chamber), 컬처 디쉬(Culture Dish), 글래스 컬처 플라스크(Glass Culture Flask), 플라스틱 컬처 플라스크(Plastic Culture Flask), 3D 컬처 포맷(3D Culture Format), 컬처 멀티웰 플레이트(Culture Multiwell Plate), 컬처 플레이트 인서트(Culture Plate Insert), 글래스 컬처 튜브(Glass Culture Tube), 플라스틱 컬처 튜브(Plastic Culture Tube), 스택어블 셀 컬처 베슬(Stackable Cell Culture Vessel), 하이폭식 컬처 챔버(Hypoxic Culture Chamber), 페트리 디쉬(Petri dish) 및 플라스크 캐리어, 퀵핏 컬처 베슬(Quickfit culture vessel), 롤러 보틀(Roller Bottle)을 사용한 스케일-업 셀 컬처(Scale-Up Cell Culture), 스피너 플라스크(Spinner Flask), 3D 셀 컬처(3D Cell Culture), 또는 세포 배양 백을 포함한다.

[0155] 기타 구체예에서, 배지는 당업자에게 널리 공지된 구성요소를 사용하여 포물레이션될 수 있다. 세포를 배양하기 위한 포물레이션 및 방법은 하기 참고문헌에 상세히 기술되어 있다: Short Protocols in Cell Biology J. Bonifacino, et al., ed., John Wiley & Sons, 2003, 826 pp; Live Cell Imaging: A Laboratory Manual D. Spector & R. Goldman, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004, 450 pp.; Stem Cells Handbook S. Sell, ed., Humana Press, 2003, 528 pp.; Animal Cell Culture: Essential Methods, John M. Davis, John Wiley & Sons, Mar 16, 2011; Basic Cell Culture Protocols, Cheryl D. Helgason, Cindy Miller, Humana Press, 2005; Human Cell Culture Protocols, Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 806, Mitry, Ragai R.; Hughes, Robin D. (Eds.), 3rd ed. 2012, XIV, 435 p. 89, Humana Press; Cancer Cell Culture: Method and Protocols, Cheryl D. Helgason, Cindy Miller, Humana Press, 2005; Human Cell Culture Protocols, Series: Methods in Molecular Biology, Vol. 806, Mitry, Ragai R.; Hughes, Robin D. (Eds.), 3rd ed. 2012, XIV, 435 p. 89, Humana Press; Cancer Cell Culture: Method and Protocols, Simon P. Langdon, Springer, 2004; Molecular Cell Biology. 4th edition., Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al., New York: W. H. Freeman; 2000., Section 6.2 Growth of Animal Cells in Culture (이들 모두는 참조로서 본원에 통합됨).

[0156] 일부 구체예에서, 스크리닝 및 확장 단계 동안 및/또는 대규모 생산 단계 (또한, 유가 & 비교로서 언급됨) 동안, 선택 또는 스크리닝으로부터 발생하는 확장된 전기천공 세포는 변형된 게놈 DNA 서열을 포함할 수 있다.

[0157] **B. 활성화 조성물**

[0158] 본원에 기술된 방법은 세포의 형질감염 전에 세포를 활성화 조성물과 접촉시키는 것에 관한 것이다. 세포는 당업계에 공지되고/거나 본원에 기술된 방법에 따라 활성화될 수 있다. 예를 들어, T 세포는 하기에 따라 활성화될 수 있다:

T 세포 서브셋	Th1	Th1/Th2	Th1	Th17	Treg	Th2/Th9
활성화시키는 물질	항-CD3/CD28; PMA; 피바나데이트	항-CD3/CD28; PMA; 피바나데이트	IFN- α	IL6; IL-21	IL-2; IL-7; IL-15	IL-4

[0159]

[0160] T 세포의 활성화를 위한 키트는 또한 시중에서 입수가 가능하다. 예시적인 키트는 인간 CD2, CD3, 및 CD28에 대한 항-바이오틴 입자 (예를 들어, MACSiBead 또는 DYNABEADS®) 및 바이오티닐화된 항체를 포함한다. 바이오티닐화된 항체가 로딩된 항-바이오틴 입자는 항원-제시 세포를 모방하고 PBMC로부터의 휴지 T 세포는 물론 정제된 T 세포를 활성화시키는데 사용된다. T 세포 확장은 배양 14일에 배양 및 재활성화에 의해 달성된다.

[0161] T 세포는 또한 예를 들어, ConA, PHA, 및 PWM과 같은 미토겐에 의해 활성화될 수 있다.

[0162] **III. 치료학적 및 약물 전달 적용**

[0163] 특정 구체예에서, 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 세포 및 세포주는 게놈 DNA의 변형시, 치료학적 효과를 제공하는 것이다. 일차 세포는 분리되고, 본원에 기술된 방법에 의해 변형될 수 있으며 처리될 대상체로의 재도입을 위해 생체 외에서 사용될 수 있다. 적합한 일차 세포는 말초혈 단핵 세포 (PBMC), 말초혈 림프구 (PBL) 및 기타 혈액 세포 서브셋 예컨대, 비제한적으로, CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포를 포함한다. 기타 적합한 일차 세포는 전구 세포 예컨대, 골수 또는 림프구 전구 세포를 포함한다. 적합한 세포는 또한 줄기 세포 예컨대, 예로서 배아 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포, 조혈 줄기 세포, 신경 줄기 세포, 중간엽 줄기 세포, 근육 줄기 세포 및 피부 줄기 세포를 포함한다. 예를 들어, iPSC는 관련된 공지된 유전자 돌연변이로 고통받는 환자로부터 생체외에서 유도될 수 있으며, 이러한 돌연변이는 본원에 기술된 방법을 이용하여 야생형 대립유전자로 변형될 수 있다. 변형된 iPSC는 이어서 도파민 뉴런으로 분화될 수 있으며 환자로 재이식될 수 있다. 또 다른 생체의 치료학적 적용에서, 조혈 줄기 세포는 공지된 유전자 돌연변이에 의해 고통받는 환자로부터 분리될 수 있으며, 이는 이어서 유전자 돌연변이를 보정하도록 변형될 수 있다. 이어서, HSC는 치료학적 효과를 위해 환자로 다시 투여될 수 있거나 환자로의 투여 전에 더욱 성숙한 조혈 세포로 배양물에서 분화될 수 있다.

[0164] 일부 구체예에서, 변형된 게놈 DNA 서열 및/또는 도너 DNA는 질환-관련 유전자를 포함한다. 일부 구체예에서, 서열 변형 영역은 질환-관련 유전자를 포함한다. 질환-관련 유전자는 당해기술에 공지되어 있다. 질환 관련 유전자는 genecards.org/cgi-bin/listdiseasecards.pl?type=full&no_limit=1의 월드 와이드 웹에 기재된 것이 고려된다. 유전자의 완전한 목록은 물론 이들의 관련 질환은 그 전체가 본원에 참조로서 통합된다.

[0165] 한 구체예에서, 본 방법은 조혈 줄기 세포 (a.k.a. 혈구모세포) 또는 골수 전구 세포에서 게놈 DNA를 변형시키는 것을 포함한다.

[0166] 기재된 방법이 치료학적으로 사용될 수 있는 또 다른 예는 키메라 항원 수용체(CAR)의 부위-특이적 통합이다. 용어 "키메라 항원 수용체" 또는 "CAR"은 면역 이펙터 세포 상으로 임의의 특이성을 이식하는 엔지니어링된 수용체를 지칭한다. 이들 수용체는 T 세포 상으로 모노클로날 항체의 특이성을 이식하는데 사용된다. 수용체는 키메라로 불리는데, 왜냐하면 이들은 상이한 공급원으로부터의 부분으로 구성되기 때문이다. 이들 분자의 가장 공통된 형태는 CD3-제타 트랜스멤브레인 및 엔도도메인; CD28 또는 41BB 세포내 도메인, 또는 이들의 조합물에 융합된, 모노클로날 항체로부터 유래된 단일-사슬 가변 단편(scFv)의 융합물이다. 이러한 분자는 이의 표적의 scFv에 의한 인식에 대한 반응으로 신호의 전달을 유도한다. 이러한 작제물의 예는 14g2a-제타이며, 이는 하이브리도마 14g2a (이는 디시알로강글리오시드 GD2를 인식함)로부터 유래된 scFv의 융합물이다. T 세포는 이러한 분자를 발현하는 경우, 이들은 GD2(예를 들어, 신경아세포)를 발현하는 표적 세포를 인식하고 치사시킨다. 악성 종양 B 세포를 표적으로 하기 위해, 연구자들은 B-리니지 분자 CD19에 특이적인 키메라 면역수용체를 사용하여 T 세포의 특이성을 전용하였다. 면역글로불린 중쇄 및 경쇄의 가변부는 가요성 링커에 의해 융합되어 scFv를 형성한다. 신호 펩티드가 이러한 scFv보다 선행되어 신생 단백질을 세포질그물 및 후속 표면 발현(이는 절단됨)으로 향하게 한다. 가요성 스페이서는 scFv가 다양한 방향으로 배향되게 하여 항원 결합을 가능하게 한다. 트랜스멤브레인 도메인은 세포 내로 돌출되고 요망되는 신호를 전달하는 시그널링 엔도도메인의 원래 분자로부터 일반적으로 유래된 전형적인 소수성 알파 헬릭스이다. CAR은 T 세포가 종양 세포 상의 특이적 단백질(항원)을 인식하게 하는 단백질이다. CAR은 면역 이펙터 세포 상으로 임의적인 특이성을 이식하는 엔지니어링된 수용체이다. 전형적으로, 이들 수용체는 T 세포 상으로 모노클로날 항체의 특이성을 이식하는데 사용된다.

[0167] 인공 T 세포 수용체는 암 요법으로서 연구중에 있으며, 입양 세포 전달로 불리는 기법을 사용한다. T 세포는 환자로 부터 분리되고 변형되어 이들은 특정 형태의 암에 특이적인 수용체를 발현한다. 그 후, 암 세포를 인식하고 치사시킬 수 있는 T 세포가 환자 내에 재도입된다. 환자 이외의 도너로부터 공급된 T-세포의 변형 또한 연구중에 있다.

[0168] 이러한 엔지니어링된 CAR T 세포는 시험관내에서 확장될 수 있으며, CAR T 세포의 확장된 군집은 이어서 환자 내로 주입될 수 있다. 주입 후, T 세포는 환자의 체내에서 증대되고 이들의 엔지니어링된 수용체로부터의 안내에 따라 표면에서 항원을 지니는 암 세포를 인식하고 치사시킨다. 현 치료학적 방법은 바이러스 감염에 의한 CAR의 도입을 포함한다. 그러나, 치료학적 방법에서 바이러스 감염을 이용할 경우 항상 안전성 문제가 존재하게 된다. 따라서, 본원에 기술된 방법은 유전자 요법 및 게놈 엔지니어링에 대한 비-바이러스성 접근법이다. 종래에는, 플라스미드 DNA로 면역학적 세포를 형질감염시키는 것이 불가능하였는데, 왜냐하면 이는 세포의 독성으로 이어지기 때문이다. 출원인은 세포 형질감염 전의 활성화 단계가 생존력 문제를 극복하고 긴 DNA 조각 (및/또는 고통도)이 고수준의 생존력을 유지하면서 세포 내로 형질감염되게 한다는 것을 발견하였다. 본원에 기술된 방법

을 이용하여, CAR은 면역학적 세포의 특이적 부위 내로 통합될 수 있다. 일부 구체예에서, 세포는 자가 면역 세포이다. T 또는 자연 살해(NK) 세포에서 CAR의 장기간 발현은 특정 항원과 관련된 종양의 치료 또는 백혈병 치료에 사용될 수 있다. 비-선택 또는 선택은 CAR의 부위-특이적 통합을 이용하여 세포에 대해 이용될 수 있다. 선택 접근법에 있어서, 선택 가능한 마커는 동일한 부위에 통합되어 동일한 플라즈미드에 존재할 수 있는데, CAR 또는 선택가능한 마커가 또 다른 부위-특이적 위치에 통합될 수 있기 때문이다. 비-선택 접근법에서, 항원(종양)의 존재는 천연 선택 압력으로서 작용할 것이며, 따라서 CAR-양성 세포 군집이 추가로 자극되어 생체내에서 확장될 것인 반면, CAR-음성 세포는 활성화가 존재하지 않기 때문에 자연적으로 고갈될 것으로 여겨진다. 치료학적 목적을 위한 T 또는 NK 세포는 정제와 함께 또는 정제 없이 성분채집을 통해 수득될 수 있다. 이어서, 세포는 본 기재내용의 방법에 기술된 바와 같이 활성화되고 형질감염되어 환자 내로 다시 주입될 수 있다. 도 16에 도시된 바와 같이, 본원에 기술된 데이터는 CAR의 K562 세포로의 성공적인 부위-특이적 통합을 입증한다.

[0169] 어떻게 기재된 방법이 치료학적으로 사용될 수 있는지의 추가의 예는 CFTR(낭포성 섬유증 트랜스멤브레인 전도도 조절인자) 기능의 손실로 인해 낭포성 섬유증을 갖는 환자의 상피 세포에서 CFTR 전이유전자의 발현 하에 있다. 유전자 요법이 낭포성 섬유증에 대한 잠재적인 치유법으로서 연구되었다. 이상적으로는, 유전자 요법은 CFTR 유전자의 정상적인 복사체를 발명 세포 내에 위치시킨다. 정상적인 CFTR 유전자를 발명 상피 세포 내로 전달하는 것은 유해 반응 또는 염증 반응의 부재하에 모든 표적 세포에서 기능성 CFTR의 생성을 유도할 것이다. 연구는 낭포성 섬유증의 폐 증상을 방지하기 위해, 단지 5-10% 즉, 정상적인 양의 CFTR 유전자 발현이 필요하다는 것을 입증하였다. 유전자 전달을 위한 많은 접근법 예컨대, 동물 모델 및 임상 시험에서 리포솜 및 바이러스 벡터가 평가되었다. 그러나, 이 두 방법 모두는 비교적 비효율적인 치료 옵션인 것으로 밝혀졌다. 주된 이유는 매우 소수의 세포만이 벡터를 흡수하고 유전자를 발현하여, 치료 효과가 거의 없기 때문이다. 기능성 CFTR 전이유전자는 도너 DNA의 형질감염 전에 활성화되었던 상피 세포 또는 장 줄기 세포 유기관 내로 부위-특이적으로 통합될 수 있는 것으로 여겨진다. 이어서, 세포는 환자의 기도 내로 이식될 수 있으며, 여기에서 이들은 CFTR 유전자의 정상적인 기능을 수행할 것이다.

[0170] 추가의 예에서, 본원에 기술된 방법은 혈우병 환자를 치료하는데 사용될 수 있다. 혈우병 환자는 혈액 응고를 유도할 수 없어 생명을 위협할 수 있는 외출혈 및 내출혈로 고통받는다. 부위-특이적 표적화된 게놈 통합은 도너 DNA로서 인자 VIII 또는 인자 IX 전이유전자를 사용하여 수행될 수 있다. 일차 간, 근육 또는 혈관 세포 또는 전구 간, 근육 또는 혈관 세포는 환자 또는 도너 숙주로부터 분리될 수 있다. 이어서, 세포는 활성화될 수 있으며, 세포의 활성화 후, 세포는 이어서 통합된 인자 VIII 또는 인자 IX의 전이유전자 발현을 위해 환자 내로 이식될 수 있다.

[0171] 추가의 예에서, 표적화된 전이유전자 통합은 세포주 개발에 사용될 수 있다. 출원인은 실시예에서 본원에 기술된 방법을 사용하여 세포에서 전이유전자의 발현이 전이유전자의 거의 40% 발현을 유도함을 입증하였으며, 이는 이 방법의 높은 효율을 나타낸다. 따라서, 본 방법은 무작위된 통합 및 콜로니 선택의 전통적인 방법을 대체할 수 있다. 본원에 기술된 방법은 치료학적 또는 임상전 사용을 위한 다양한 사이토킨 또는 항체를 발현시키기 위한 외부 프로모터와 전이 유전자를 통합시킴으로써 단백질 분비를 위한 세포주 최적화에 이용될 수 있다.

[0172] 특정 양태에서, 본원에 기술된 방법은 생체의 요법을 위한 개선된 방법에 관한 것이다. 세포 군집은 대상체로부터 분리될 수 있으며, 이어서 세포는 당업계에 공지된 및/또는 본원에 기술된 방법에 의해 활성화될 수 있으며, 세포의 게놈 DNA는 결함을 보정하거나 표적 유전자를 부위-특이적으로 통합시키는 방식으로 변형될 수 있다. 이어서 세포 군집은 치료학적 용도를 위해 대상체로 이식될 수 있다. 특정의 경우, 분리된 세포 군집은 예를 들어, 특정한 시험관내 조작 예컨대, 전통적인 형질감염 및/또는 전기천공 방법에 민감한 세포의 서브셋을 포함할 수 있거나, 세포의 서브셋은 전통적인 형질감염 및/또는 전기천공 방법 또는 게놈 DNA 조작에 내성일 수 있다. 본원에 기술된 방법으로 게놈 DNA를 변형시키는 것은 이러한 군집에서 서열 변형의 더 큰 효율을 유도할 것으로 여겨진다.

[0173] 본 기재내용의 한 양태는 대상체로부터 분리된 세포에서 표적 게놈 DNA 영역을 부위-특이적으로 서열 변형시키는 방법으로서, 대상체로부터 세포를 분리하는 단계; 세포를 활성화 조성물로 활성화시키는 단계; (a) 도너 DNA 및 (b) DNA 분해제를 포함하는 형질감염 조성물로 세포를 형질감염시키는 단계로서, 도너 DNA는 (i) 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동 영역; 및 (ii) 서열 변형 영역을 포함하며; 게놈 DNA 서열이 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형되는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0174] 추가적으로, 본원에 사용된 방법에 의해 생성된 세포 및 세포주는 약물 개발 및/또는 역유전자 연구에 유용할 수 있다. 이러한 세포 및 동물은 특정 돌연변이 또는 이의 서열 변형과 관련된 표현형을 드러낼 수 있으며, 해

당 돌연변이(들) 또는 변이 단백질과 특정하게 상호작용하거나 발병 동물에서 질환 치료에 유용한 약물을 스크리닝하는데 이용될 수 있다. 이들 세포주는 또한, 특이적 돌연변이의 효과를 조사하기 위한 도구를 제공할 수 있는데, 왜냐하면 세포주 및 이의 상응하는 "변형된" 세포주는 "유전적으로 동일한" 제어를 나타내며, 따라서 질환-특이적 돌연변이의 회복, 약물 스크리닝 및 발견, 및 질환 기작 연구를 위한 강력을 도구를 제공하기 때문이다. 또한, 이러한 기술은 예를 들어, RNAi 및 shRNA와 같은 현 유전자-넉다운 기법에 대한 과학적으로 탁월한 대안을 제공할 수 있는 것으로 여겨진다. 한 예에서, DNA 서열 변형은 치료학적 적용을 위한 또는 발달 또는 질환 기작 연구를 위해 관심 유전자로 도입되는 정지 코돈이다.

[0175] 본 기재내용의 조성물은 생체내, 시험관내, 또는 생체의 투여를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 본 기재내용의 조성물은 암 백신으로서 유용할 수 있다.

[0176] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 시험관내 투여는 대상체로부터 분리되거나 대상체의 외부의 세포로서 비제한적으로, 배양 세포를 포함하는 세포에서 수행된 조작을 나타낸다. 용어 생체의 투여는 시험관내에서 조작되고 후속하여 대상체에 투여된 세포를 나타낸다. 용어 생체내 투여는 투여를 포함하여 대상체 내에서 수행된 모든 조작을 포함한다.

[0177] 본 기재내용의 특정 양태에서, 조성물은 시험관내, 생체의 또는 생체내 중 어느 하나로 투여될 수 있다. 특정 시험관내 구체예에서, 자가 T 세포는 본 기재내용의 조성물과 인큐베이션된다. 그 후, 세포는 시험관내 분석, 또는 대안적으로 생체의 투여에 사용될 수 있다.

[0178] 본 기재내용의 방법 양태는 또한, 세포를 활성화 조성물과 접촉시키는 단계; (a) 도너 DNA 및 (b) DNA 분해제를 포함하는 형질감염 조성물로 세포를 형질감염시키는 단계로서, 도너 DNA는 (i) 표적 게놈 DNA 영역에 대해 상동성인 핵산 서열을 포함하는 상동 영역; 및 (ii) 키메라 항원 수용체(CAR)를 포함하며, 게놈 DNA 서열이 표적 게놈 DNA 영역에서 특이적으로 변형되어 CAR를 통합시키는 단계; 및 세포를 환자에 투여하는 단계를 포함하는 방법에 의해 특정 암을 치료하기 위한 및/또는 대상체를 백신화시키기 위한 방법에 관한 것이다. 일부 구체예에서, 면역 세포는 자가 세포이다. 일부 구체예에서, 면역 세포는 항원과 접촉되었다. 일부 구체예에서, 항원은 대상체의 암 세포에 의해 발현된 항원이다. 일부 구체예에서, 항원은 세포 비함유이다. 용어 "세포 비함유"는 어떠한 세포 성분도 갖지 않는 조성물을 나타낸다. 일부 구체예에서, 항원은 환자 종양으로부터의 추출물이다. 일부 구체예에서, 항원은 폴리펩티드이다. 일부 구체예에서, 항원은 종양 세포 용해물, 아포토시스 종양 세포, 종양-관련 항원, 및 종양-유래된 mRNA 중 하나 이상을 포함한다.

[0179] 일부 구체예에서, 면역 세포는 항원 제시 세포이다. 항원-제시 세포의 예로는 T 세포 자극 인자 (예를 들어, B7 또는 4-1 BBL) 및 기타 등등이 예를 들어, 유전자 전달에 의해 강제로 발현되는 수지상 세포, 대식세포, B 세포, 및 종양 세포(위장 항원-제시 세포)를 포함한다. 일부 구체예에서, 항원 제시 세포는 수지상 세포이다.

[0180] 면역 세포의 투여 경로는 예를 들어, 종양내, 피내, 피하, 정맥내, 림프내, 및 복강내 투여될 수 있다. 일부 구체예에서, 투여는 종양내 및 림프내이다. 일부 구체예에서, 면역 세포는 암 조직 또는 림프절 내로 직접 투여된다.

[0181] 일부 구체예에서, 면역 세포는 T 세포이다. T 세포는 항원 또는 항원-제시 세포와 접촉된 것일 수 있다. 예를 들어, APC는 환자의 암에 특이적인 종양 항원과 배양되어 이들을 예를 들어, CD8-양성 세포독성 T 림프구(CTL) 또는 CD4-양성 헬퍼 T 세포로 분화시킬 수 있다. 이렇게 확립된 T 세포는 암을 갖는 개체에 투여될 수 있다.

[0182] 천연 T 세포의 기원은 특별히 제한되지 않으며, 이는 예를 들어, 척추 동물의 말초혈로부터 유래될 수 있다. 사용된 천연 T 세포는 PBMC 분획으로부터 분리된 CD8-양성 세포 또는 CD4-양성 세포일 수 있다. 일부 구체예에서, 천연 T 세포는 CTL 유도 효율에 있어서 PBMC 분획으로부터 분리되지 않으면서 기타 세포 및 성분과 혼합된 CD8-양성 세포 또는 CD4-양성 세포이다. 예를 들어, PBMC 분획의 세포가 혈청 및 종양 항원이 보충된 매질에서 배양되는 경우, PBMC는 수지상 세포 전구체로 분화된다. 이어서, 수지상 세포 전구체는 펩티드에 결합하고, 이러한 펩티드/종양 항원을 제시하는 항원-제시 세포로서 수지상 세포로 분화된다. 항원-제시 세포는 PBMC에서 CD8-양성 T 세포를 자극하여 이들을 CTL로 분화시킨다. 따라서, 부가된 펩티드를 인식할 수 있는 CTL이 획득될 수 있다. 이렇게 획득된 CTL이 분리되어 암 백신으로서 그대로 사용될 수 있다. 대안적으로, 이들은 암 백신으로서 사용되기 전에 인터류킨 예컨대, IL-2, 항원-제시 세포, 및 종양 항원의 존재하에 추가로 배양될 수 있다. 이들의 투여 경로는 특별히 제한되지 않으며, 예로는 피내, 피하, 정맥내 및 종양내 투여를 포함한다.

[0183] **IV. 형질감염**

[0184] 형질감염은 핵산을 세포 내로 의도적으로 도입시키는 과정이다. 특정 구체예에서, 형질감염은 비-바이러스성이

며, 이는 플라스미드 배경에 사용된 서열이 비-바이러스성이며, DNA는 바이러스 메카니즘을 통해 세포로 유입되지 않음을 나타낸다. 동물 세포의 형질감염은 전형적으로 세포 막에 일시적인 포어 또는 "구멍"을 개방하여 물질의 흡수를 허용하는 것을 포함한다. 형질감염은 당업계에 공지되고 하기 기술된 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0185] **형질감염의 비-화학적 방법**

[0186] **2. 전기천공**

[0187] 특정 구체에는 숙주 세포로의 하나 이상의 핵산 분자의 유입을 촉진하기 위해 전기천공의 사용을 포함한다.

[0188] 본원에 사용된 바와 같이, "전기천공" 또는 "전기로딩"은 세포 내로의 핵산 분자의 유입을 촉진하기 위해 세포로의 전류 또는 전기장의 적용을 지칭한다. 당업자는 전기천공의 임의의 방법 및 기법이 본 발명에 의해 고려됨을 이해할 것이다.

[0189] 본 발명의 특정 구체예에서, 전기로딩은 미국 특허 번호 5,612,207 (특히 참조로서 본원에 통합됨), 미국 특허 번호 5,720,921 (특히 참조로서 본원에 통합됨), 미국 특허 번호 6,074,605 (특히 참조로서 본원에 통합됨); 미국 특허 번호 6,090,617 (특히 참조로서 본원에 통합됨); 미국 특허 번호 6,485,961 (특히 참조로서 본원에 통합됨); 미국 특허 번호 7,029,916 (특히 참조로서 본원에 통합됨), 미국 특허 번호 7,141,425 (특히 참조로서 본원에 통합됨), 미국 특허 번호 7,186,559 (특히 참조로서 본원에 통합됨), 미국 특허 번호 7,771,984 (특히 참조로서 본원에 통합됨), 및 미국 공개 번호 2011/0065171 (특히 참조로서 본원에 통합됨)에 기술된 바와 같이 수행될 수 있다.

[0190] 본 발명의 상황에서 이용될 수 있는 전기로딩을 위한 기타 방법 및 장치는 또한 예를 들어, 공개 PCT 출원 번호 WO 03/018751 및 WO 2004/031353; 미국 특허 출원 번호 10/781,440, 10/080,272, 및 10/675,592; 및 미국 특허 번호 6,773,669, 6,090,617, 6,617,154에 기술되어 있으며, 이들 모두는 참조로서 통합된다.

[0191] 본 발명의 특정 구체예에서, 전기천공은 2002년 8월 21일 출원된 미국 특허 출원 일련 번호 10/225,446에 기술된 바와 같이 수행될 수 있으며, 이의 전체 기재내용은 특히 참조로서 본원에 통합된다.

[0192] 본 발명의 추가의 구체예에서, 유동 전기천공은 MaxCyte STX®, MaxCyte VLX® 또는 MaxCyte GT® 유동 전기천공 장치를 사용하여 수행된다. 특정 구체예에서, 정적 또는 유동 전기천공이 기재내용 전반에 걸쳐 기술된 파라미터로 이용된다.

[0193] 전기천공 바람직하게는, 유동 전기천공에 의해 세포를 형질감염시키는 청구된 방법은 40% 초과, 50% 초과 및 60%, 70%, 80% 또는 90% (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위) 초과 형질감염 효율을 달성할 수 있다. 형질감염 효율은 유전자에 의해 발현된 생성물의 분비 수준 또는 유전자의 생성물을 발현하는 세포의 백분율에 의해 측정될 수 있다. 세포는 전기천공 과정 동안 및 전기천공 과정 후 높은 생존력을 유지한다. 생존력은 일정하게 50% 또는 그 초과 보다 높다. 전기천공된 세포의 생존력은 출발의 비전기천공된 군집 또는 대조군 작제물로 형질감염된 전기천공된 군집의 생존력의 최대 또는 적어도 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다.

[0194] 일부 구체예에서, 현 방법은 입자 현탁액의 전기적 자극을 위한, 하나 이상의 유입구 흐름 포트, 하나 이상의 배출구 흐름 포트, 및 하나 이상의 흐름 채널을 갖는 유동 전기천공 셀 어셈블리 및 흐름 채널에 관하여 각각의 전극이 흐름 채널의 적어도 하나의 벽을 형성하도록 배치된 쌍을 이룬 전극을 포함하는 유동 전기천공 장치를 사용하며, 여기서 흐름 채널은 두 개 이상의 벽을 포함하고, 이러한 흐름 채널은 추가로 유입구 흐름 포트로부터 현탁액 중의 입자의 연속적인 입자 흐름을 수용하고 일시적으로 함유하도록 구성되며; 상기 전극은 전기 에너지원과 전기적으로 소통하도록 전극을 배치하는 것을 추가로 포함함으로써, 채널을 통과하여 흐르는 입자 현탁액이 전극 사이에 형성된 전기장으로 처리될 수 있다.

[0195] 일부 구체예에서, 현 방법은 유동 전기천공을 사용하여 샘플 크기의 제한을 극복한다. 이러한 방법을 이용하여, 세포 현탁액은 바람직하게는 배치가능한 유동 셀에 함유된 평행한 바 전극을 가로질러 지나가게 된다.

[0196] 추가의 구체예에서, 본원에 기술된 유동 또는 정적 전기천공 방법은 샘플의 열 분해를 극복하기 위해 이용된다. 다양한 구성의 세포가 현 방법에 사용될 수 있음이 이해되어야 한다. 전기천공 동안, 세포는 소정의 특징을 갖는 전기 펄스로 처리된다. 예를 들어, 샘플 세포 제조를 위한 특정 설정은 다음과 같다: 전압, 750V; 펄스 폭, 650 μsec; 펄스간 시간, 100 μsec; 파열시 2 이상성 펄스; 파열간 시간, 12 sec; 유속, 0.05 mL/sec. 관심

분자 또는 분자들이 이어서 농도 및/또는 전기 구배에 따라 세포 내로 분산될 수 있다. 본 발명은 전기장 강도 범위로 세포를 선택적으로 처리할 수 있다.

[0197] 현 유동 전기천공 방법의 또 다른 이점은 많은 군집의 세포가 형질감염될 수 있는 속도이다. 예를 들어, 림프구 군집은 5시간 미만, 바람직하게는, 4시간 미만 및 가장 바람직하게는, 3시간 미만 및 가장 바람직하게는, 2시간 미만으로 샘플을 전기천공시킴으로써 전기천공에 의해 형질감염될 수 있다. 전기천공 시간은 샘플이 유동 전기천공 공정에 의해 처리되는 시간이다. 특정 구체예에서, 1E10 세포는 유동 전기천공을 이용하여 30분 또는 그 미만으로 형질감염된다. 추가의 구체예에서, 2E11 세포는 유동 전기천공을 이용하여 30분 또는 60분 또는 그 미만으로 형질감염된다.

[0198] 유동 전기천공에 있어서, 공정은 유동 세포를 필요한 유체 및 샘플을 갖는 용기에서 용액 및 세포 현탁액과 부착시킴으로써 개시된다. 프라이밍 용액 (염수) 및 세포 현탁액은 전기천공 시스템에 요구되는 명령을 제공함으로써 도입되며, 이는 펌프 및 핀치 밸브의 작동을 제어한다. 세포가 전극 사이의 유동 경로를 통과하기 때문에, 선택된 전압의 전기 펄스, 기간 및 진동수가 적용된다. 생성물 및 폐 유체가 분해된 용기에서 수집된다.

[0199] 사용자는 요망되는 전압 및 기타 파라미터를 본 발명의 유동 전기천공 시스템에 입력한다. 상기 주지된 바와 같이, 세팅 범위가 선택적으로 이용가능하다. 컴퓨터는 타워에서 전자 장치와 소통하여 요망되는 전압으로 컴퓨터 배크를 하전시킨다. 이어서, 유동 경로로 전달되어 전기장을 발생시키기 전에 적절한 스위치는 전압을 조작한다 (스위치는 교대의 펄스 또는 파열을 제공하여 전기장으로의 연장된 노출에 의해 초래된 전극 마모를 최소화시킨다). 전압은 작업자에 의해 본 발명의 유동 전기천공 시스템으로 설정된 기간 및 진동수 파라미터에 따라 전달된다. 본 발명의 유동 전기천공 시스템이 이제 더욱 상세히 기술된다.

[0200] 유동 전기천공 공정은 예를 들어, 용기 내의 세포 현탁액 및 용액과 (예를 들어, 튜브를 통해) 유체 소통하게 전기천공 챔버를 위치시킴으로써 개시될 수 있으며, 이는 멸균 또는 무균 환경에서 수행될 수 있다. 세포 현탁액 및/또는 기타 시약은 하나 이상의 펌프, 진공, 밸브, 전기천공 챔버 내부의 공기압 또는 부피를 변경시키는 기타 기계적 장치, 및 이들의 조합을 이용하여 전기천공 챔버로 도입될 수 있으며, 이는 세포 현탁액 및/또는 기타 시약이 요망되는 시간 및 요망되는 속도로 전기천공 챔버 내로 흐르게 할 수 있다. 세포 현탁액 및/또는 기타 시약의 일부가 전기천공 챔버에 위치하는 경우, 요망되는 전압의 전기 펄스, 기간 및/또는 간격이 세포 현탁액 및/또는 기타 시약에 적용된다. 전기천공 후, 처리된 세포 현탁액 및/또는 기타 시약은 하나 이상의 펌프, 진공, 밸브, 전기천공 챔버 내부의 배출량, 압력 또는 부피를 변경시키는 기타 전기적, 물리적, 공압 또는 미세 유체 장치, 또는 이들의 조합을 이용하여 전기천공 챔버로부터 제거될 수 있다. 특정 구체예에서, 중력 또는 수동 전달이 전기천공 챔버 안으로 또는 밖으로 샘플을 이동시키거나 샘플을 처리하는데 이용될 수 있다. 요망에 따라, 새로운 세포 현탁액 및/또는 기타 시약이 전기천공 챔버 내로 도입될 수 있다. 전기천공된 샘플은 아직 전기천공되지 않은 샘플과는 별도로 수집될 수 있다. 선행되는 일련의 사건은 예를 들어, 전자 회로 (예를 들어, 전기 펄스를 제공함), 펌프, 진공, 밸브, 이들의 조합, 및 전기천공 챔버의 내부로 및 밖으로의 샘플의 흐름에 영향을 끼치며 이를 제어하는 기타 요소에 결합된 컴퓨터에 의해 일시적으로 편성될 수 있다. 예로서, 전기천공 공정은 컴퓨터에 의해 실행될 수 있으며, 모니터 및/또는 키보드에 대해 그래픽 사용자 인터페이스를 통해 오퍼레이터에 의한 것을 포함한다. 적합한 밸브의 예는 핀치 밸브, 버터플라이 밸브, 및/또는 볼 밸브를 포함한다. 적합한 펌프의 예는 원심분리 또는 양성 변위 펌프를 포함한다.

[0201] 예로서, 유동 전기천공 장치는 스페이서에 의해 분리된 적어도 2개의 전극을 포함할 수 있으며, 여기에서 스페이서 및 적어도 2개의 전극은 챔버를 규정한다. 일부 구체예에서, 전기천공 챔버는 스페이서를 가로지르는 적어도 3개의 포트를 추가로 포함할 수 있으며, 여기에서 제 1 포트는 챔버 내로의 샘플 흐름을 위한 것이며, 제 2 포트는 챔버 밖으로의 처리된 샘플 흐름을 위한 것이며, 제 3 포트는 챔버 내로 또는 챔버 밖으로의 비-샘플 유체 흐름을 위한 것이다. 일부 구체예에서, 비-샘플 유체는 샘플이 챔버로 흐를 때 챔버 밖으로 흘러 나오며, 처리된 샘플이 챔버 밖으로 흘러나올 때 비-샘플 유체는 챔버내로 흐른다. 또 다른 예로서, 유동 전기천공 장치는 적어도 2개의 평행한 전극을 포함하는 상단 및 바닥 부분을 갖는 전기천공 챔버를 포함할 수 있으며, 챔버는 2개의 전극 사이에 형성되며, 전기천공 챔버의 바닥 부분에서 2개의 챔버 포트 및 전기천공 챔버의 상단 부분에서 2개의 챔버 포트를 갖는다. 이러한 장치는 챔버의 바닥 부분에서 제 1 챔버 포트를 통하여 전기천공 챔버와 유체 소통하는 적어도 하나의 샘플 용기를 추가로 포함할 수 있으며, 전기천공 챔버는 챔버의 상단 부분에서 제 2 챔버 포트를 통해 샘플 용기와 유체 소통될 수 있으며, 이는 제 1 유체 경로를 형성한다. 추가로, 적어도 하나의 생성물 용기는 챔버의 바닥 부분에서 제 3 챔버 포트를 통해 전기천공 챔버와 유체 소통될 수 있으며, 전기천공 챔버는 챔버의 상단 부분에서 제 4 챔버 포트를 통해 생성물 용기와 유체 소통될 수 있으며, 이는 제 2 유체 경로를 형성한다. 일부 구체예에서, 단일 포트 전기천공 챔버가 사용될 수 있다. 다른 구체예에서, 전극,

스페이스, 포트 및 용기의 다양한 기타 적합한 조합이 사용될 수 있다. 전기천공 챔버는 약 1-10 mL의 내부 부피를 포함할 수 있다; 그러나, 기타 구체예에서, 전기천공 챔버는 더 작은 내부 부피 (예를 들어, 0.75 mL, 0.5 mL, 0.25 mL, 또는 그 미만) 또는 더 큰 내부 부피 (예를 들어, 15 mL, 20 mL, 25 mL, 또는 그 초과)를 포함할 수 있다. 일부 구체예에서, 전기천공 챔버 및 관련된 요소 예컨대, PVC 백, PVC 튜브, 커넥터, 실리콘 펌프 튜브 및 기타 등등이 배치될 수 있다 (예를 들어, 의료용 등급 클래스 VI 물질).

[0202] 임의의 수의 용기 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6개 또는 그 초과)가 전기천공 챔버와 유체 소통할 수 있다. 용기는 접을 수 있거나, 확장가능하거나 고정된 부피의 용기일 수 있다. 예를 들어, 제 1 용기 (예를 들어, 샘플 공급원 또는 샘플 용기)는 세포 현탁액을 포함할 수 있으며, 전기천공 동안 세포 현탁액 중의 세포 내로 통과할 물질을 포함할 수 있거나 없다. 그러한 물질이 포함되지 않는 경우, 이러한 물질을 포함하는 제 2 용기가 물질이 전기천공 챔버 내로 유입되기 전에 또는 전기천공 챔버에서 인라인으로 혼합될 수 있도록 포함될 수 있다. 추가적인 구성에서, 또 다른 용기가 부착될 수 있으며, 이는 배출될 유체를 유지할 수 있다. 하나 이상의 추가적인 용기는 처리된 샘플 또는 생성물 용기로서 사용될 수 있다. 처리된 샘플 또는 생성물 용기는 전기천공 공정으로부터 생성된 세포 또는 기타 생성물을 유지할 것이다. 게다가, 하나 이상의 추가적인 용기는, 별개의 부피 또는 유닛 부피로 샘플을 분리하는데 사용될 수 있는 다양한 비-샘플 유체 또는 가스를 포함할 수 있다. 비-샘플 유체 또는 가스 용기는 제 3 및/또는 제 4 포트를 통해 전기천공 챔버와 유체 소통될 수 있다. 비-샘플 유체 또는 가스 용기는 처리된 샘플 용기 또는 샘플 용기로 통합될 수 있다 (예를 들어, 비-샘플 유체 용기는 처리된 샘플 용기 또는 샘플 용기의 일부를 포함할 수 있다); 따라서, 비-샘플 유체 또는 가스는 샘플의 처리 동안 처리된 샘플 용기로부터 또 다른 용기 (이는 샘플 용기를 포함할 수 있음)로 이송될 수 있다. 비-샘플 유체 또는 가스 용기는 비-샘플 유체 또는 가스의 압축이 전기천공에 영향을 끼치지 않는 한 챔버내로 통합될 수 있다. 본 발명의 추가의 양태는 샘플 용기에 커플링되는 기타 용기를 포함할 수 있으며 시약 또는 다른 샘플을 챔버에 공급할 수 있다.

[0203] 추가의 구체예에서, 전기천공 장치는 정적 전기천공이며, 세포 흐름을 포함하지 않으며, 대신 단일 챔버에서 세포 현탁액을 포함한다. 이러한 장치가 사용되는 경우, 유동 전기천공에 대해 기술된 파라미터가 열 분해를 제한하고, 세포 생존력을 향상시키고, 서열 변형 혼입의 효율을 향상시키고, 형질감염 효율을 증가시키고, 그리고 기타 등등을 위해 사용될 수 있다. 이러한 파라미터는 예를 들어, 본 출원 전반에 걸쳐 기술된 유동 전기천공 파라미터 및 챔버의 내열성, 전극 간격, 완충제와 접촉되는 합친 전극 표면 대 전극 간의 간격의 비율, 및 전기장을 포함한다.

[0204] 특정 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 제어된 변수이다. 전기천공 동안 세포의 세포 밀도는 비제한적으로, 세포 유형, 요망되는 전기천공 효율 또는 생성된 전기천공 세포의 요망되는 생존력에 따라 다양할 수 있거나 변화될 수 있다. 특정 양태에서, 세포 밀도는 전기천공에 걸쳐 일정하다. 기타 양태에서, 세포 밀도는 전기천공 공정 동안 변화된다. 특정 양태에서, 전기천공 전 세포 밀도는 1×10^4 세포/mL 내지 $(y) \times 10^4$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 수 있다. 또 다른 양태에서, 전기천공 전의 세포 밀도는 1×10^5 세포/mL 내지 $(y) \times 10^5$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)이다. 여전히 기타 양태에서, 전기천공 전 세포 밀도는 1×10^6 세포/mL 내지 $(y) \times 10^6$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 전 세포 밀도는 1×10^7 세포/mL 내지 $(y) \times 10^7$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위일 수 있다. 여전히 기타 양태에서, 전기천공 전 세포 밀도는 1×10^7 세포/mL 내지 1×10^8 세포/mL, 1×10^8 세포/mL 내지 1×10^9 세포/mL, 1×10^9 세포/mL 내지 1×10^{10} 세포/mL, 1×10^{10} 세포/mL 내지 1×10^{11} 세포/mL, 또는 1×10^{11} 세포/mL 내지 1×10^{12} 세포/mL의 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 전 세포 밀도는 $(y) \times 10^6$ 일 수 있으며, 여기에서 y 는 임의의 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 전 세포 밀도는 $(y) \times 10^{10}$ 일 수 있으며, 여기에서 y 는 임의의 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다.

[0205]

특정 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 제어된 변수이다. 전기천공 동안 세포의 세포 밀도는 비제한적으로, 세포 유형, 요망되는 전기천공 효율 또는 생성된 전기천공 세포의 요망되는 생존력에 따라 다양할 수 있거나 변화될 수 있다. 특정 양태에서, 세포 밀도는 전기천공에 걸쳐 일정하다. 기타 양태에서, 세포 밀도는 전기천공 공정 동안 변화된다. 특정 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 1×10^4 세포/mL 내지 $(y) \times 10^4$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다. 기타 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 1×10^5 세포/mL 내지 $(y) \times 10^5$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다. 여전히 기타 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 1×10^6 세포/mL 내지 $(y) \times 10^6$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 1×10^7 세포/mL 내지 $(y) \times 10^7$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다. 여전히 기타 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 1×10^7 세포/mL 내지 1×10^8 세포/mL, 1×10^8 세포/mL 내지 1×10^9 세포/mL, 1×10^9 세포/mL 내지 1×10^{10} 세포/mL, 1×10^{10} 세포/mL 내지 1×10^{11} 세포/mL, 또는 1×10^{11} 세포/mL 내지 1×10^{12} 세포/mL의 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 $(y) \times 10^6$ 일 수 있으며, 여기에서 y 는 임의의 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 동안 세포 밀도는 $(y) \times 10^{10}$ 일 수 있으며, 여기에서 y 는 임의의 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다.

[0206]

특정 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 1×10^4 세포/mL 내지 $(y) \times 10^4$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다. 기타 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 1×10^5 세포/mL 내지 $(y) \times 10^5$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다. 여전히 기타 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 1×10^6 세포/mL 내지 $(y) \times 10^6$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 1×10^7 세포/mL 내지 $(y) \times 10^7$ 의 범위일 수 있으며, 여기에서 y 는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다. 여전히 기타 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 1×10^7 세포/mL 내지 1×10^8 세포/mL, 1×10^8 세포/mL 내지 1×10^9 세포/mL, 1×10^9 세포/mL 내지 1×10^{10} 세포/mL, 1×10^{10} 세포/mL 내지 1×10^{11} 세포/mL, 또는 1×10^{11} 세포/mL 내지 1×10^{12} 세포/mL (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)의 범위일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 $(y) \times 10^6$ 일 수 있으며, 여기에서 y 는 임의의 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다. 특정 양태에서, 전기천공 후 세포 밀도는 $(y) \times 10^{10}$ 일 수 있으며, 여기에서 y 는 임의의 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 또는 1000 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다.

[0207]

특정 구체예에서, 전기천공은 임의의 원핵 또는 진핵 세포에 대해 수행될 수 있다. 일부 양태에서, 전기천공은 인간 세포의 전기천공을 포함한다. 기타 양태에서, 전기천공은 동물 세포의 전기천공을 포함한다. 특정 양태에서, 전기천공은 세포주 또는 하이브리드 세포 유형의 전기천공을 포함한다. 일부 양태에서, 전기천공될 세포 또는 세포들은 암 세포, 종양 세포 또는 불멸화된 세포이다. 일부 경우에, 종양, 암, 불멸화된 세포 또는 세포주가 유도되며, 다른 경우에, 종양, 암, 불멸화된 세포 또는 세포주는 이들의 각 상태 또는 조건으로 자연적으로 유입된다. 특정 양태에서, 전기천공된 세포 또는 세포주는 A549, B-세포, B16, BHK-21, C2C12, C6, CaCo-2, CAP/, CAP-T, CHO, CHO2, CHO-DG44, CHO-K1, CHO-DUXB11 COS-1, Cos-7, CV-1, 수지상 세포, DLD-1, 배아 줄기

(ES) 세포 또는 유도체, H1299, HEK, 293, 293T, 293FT, Hep G2, 조혈 줄기 세포, HOS, Huh-7, 유도된 다능성 줄기 (iPS) 세포 또는 유도체, Jurkat, K562, L5278Y, LNCaP, MCF7, MDA-MB-231, MDCK, 중간엽 세포, Min-6, 단핵 세포, Neuro2a, NIH 3T3, NIH3T3L1, NK-세포, NS0, Panc-1, PC12, PC-3, 말초혈 세포, 혈장 세포, 일차 섬유모세포, RBL, Renca, RLE, SF21, SF9, SH-SY5Y, SK-MES-1, SK-N-SH, SL3, SW403, 자극 야기성 다능성 획득 (STAP) 세포 또는 유도체성 SW403, T-세포, THP-1, 종양 세포, U2OS, U937, 또는 Vero 세포일 수 있다.

[0208] 특정 구체예에서, 세포는 형질감염이 어려운 것으로 당업자에게 공지된 것이다. 이러한 세포는 당해 기술에 공지되어 있으며, 예를 들어, 일차 세포, 곤충 세포, SF9 세포, Jurkat 세포, CHO 세포, 줄기 세포, 느리게 분화 되는 세포, 및 비-분화 세포를 포함한다.

[0209] 일부 구체예에서, 세포는 조혈 줄기 또는 전구 세포이다. 조혈 줄기 및 전구 세포의 상당한 의학적 잠재력으로 인해, 배아 줄기 세포로부터 조혈 전구 세포의 분화를 위한 방법을 개선하기 위한 실질적인 작업이 이루어져왔다. 성인에서, 주로 골수에 존재하는 조혈 줄기 세포는 혈액계의 모든 세포로 분화되는, 활발히 분열하는 조혈 (CD34+) 전구 세포의 이중 군집을 생성한다. 성인에서, 조혈 전구체는 증식되고 분화되어 매일 수천억개의 성숙한 혈액 세포 생성을 발생시킨다. 조혈 전구 세포 또한 제대혈에 존재한다. 시험관내에서, 인간 배아 줄기 세포는 조혈 전구 세포로 분화될 수 있다. 조혈 전구 세포는 또한 말초 혈액 샘플로부터 확장되거나 풍부화될 수 있다. 조혈 세포는 인간 기원, 쥐와 기원 또는 임의의 다른 포유동물 종일 수 있다.

[0210] 일부 경우에, 특정 수의 세포는 특정 양의 시간에 전기천공될 수 있다. 기술된 플랫폼의 가요성, 일관성 및 재현성을 고려하여, 약 $(y) \times 10^4$, $(y) \times 10^5$, $(y) \times 10^6$, $(y) \times 10^7$, $(y) \times 10^8$, $(y) \times 10^9$, $(y) \times 10^{10}$, $(y) \times 10^{11}$, $(y) \times 10^{12}$, $(y) \times 10^{13}$, $(y) \times 10^{14}$, 또는 $(y) \times 10^{15}$ 이하 또는 초과 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)의 세포가 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100초 미만 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)으로 전기천공될 수 있으며, 여기에서 y는 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다. 기타의 경우에서, 약 $(y) \times 10^4$, $(y) \times 10^5$, $(y) \times 10^6$, $(y) \times 10^7$, $(y) \times 10^8$, $(y) \times 10^9$, $(y) \times 10^{10}$, $(y) \times 10^{11}$, $(y) \times 10^{12}$, $(y) \times 10^{13}$, $(y) \times 10^{14}$, 또는 $(y) \times 10^{15}$ 이하 또는 초과 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)의 세포가 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 또는 120분 미만 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)으로 전기천공될 수 있으며, 여기에서 y는 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다. 여전히 기타 양태에서, 약 $(y) \times 10^4$, $(y) \times 10^5$, $(y) \times 10^6$, $(y) \times 10^7$, $(y) \times 10^8$, $(y) \times 10^9$, $(y) \times 10^{10}$, $(y) \times 10^{11}$, $(y) \times 10^{12}$, $(y) \times 10^{13}$, $(y) \times 10^{14}$, 또는 $(y) \times 10^{15}$ 이하 또는 초과 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)의 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 또는 24시간 미만 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)으로 전기천공될 수 있으며, 여기에서 y는 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9 (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위)일 수 있다.

[0211] 표현 ' $(y) \times 10^e$ '는 임의의 수치 값을 취할 수 있는 변화가능한 'y'에 지수 값 e까지 증가되는 10을 곱한 것을 의미하는 것으로 이해된다. 예를 들어, $(y) \times 10^4$ 는 y가 2인 경우, 2×10^4 을 의미하는 것으로 이해되며, 이는 $2 \times 10,000$ 에 상응하며, 20,000와 동일하다. $(y) \times 10e4$ 는 또한 $(y) \times 10e4$ 또는 $(y) \times 10^4$ 또는 $(y) \times 10^4$ 로서 쓰일 수 있다.

[0212] 세포 또는 배지의 부피는 전기천공될 세포의 양, 스크리닝될 세포의 수, 스크리닝될 세포의 유형, 생성될 단백질의 유형, 요망되는 단백질의 양, 세포 생존력, 및 바람직한 세포 농도와 관련된 특정 세포 특징에 따라 변화될 수 있다. 방법 및 조성물에 이용될 수 있는 부피의 예는 비제한적으로, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 441, 450, 460, 470, 480,

490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 ml 또는 L (또는 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위), 및 여기에 속하는 추론가능한 임의의 범위를 포함한다. 이러한 부피를 유지할 수 있는 용기는 본원에 기술된 구체예에 사용하기 위한 것으로 간주된다. 이러한 용기는 비제한적으로, 세포 배양 디쉬, 페트리 디쉬, 플라스크, 바이오백, 바이오용기, 바이오반응기 또는 통을 포함한다. 10L 또는 그 초과 보다 높게 유지할 수 있는 것과 같은 대규모 부피를 위한 용기가 특히 고려된다. 특정 구체예에서, 100L 또는 그 초과 부피가 이용된다.

[0213] 본원에 기술된 방법에 의한 세포의 전기천공은 증가된 효율 및/또는 감소된 독성의 이점을 제공하는 것으로 특별히 여겨진다. 이러한 측정은 게놈 DNA 서열 변형을 혼입시킨 세포의 양을 측정하고/거나 마커를 발현하는 세포의 양을 측정하고/거나 전기천공 후 세포의 생존력을 측정함으로써 이루어질 수 있다.

[0214] 일부 구체예에서, 서열 변형의 효율은 약 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 또는 50% 보다 크다. 서열 변형의 효율은 서열 변형을 갖는 세포의 수를 측정하고 전체 세포 수로 나눔으로써 측정될 수 있다. 게놈 DNA 서열 변형의 혼입은 당해기술에 공지된 방법 예컨대, 직접 게놈 DNA 시퀀싱, 다양한 제한 분해 (서열 변형이 제한 효소 부위를 부가하거나, 제거하거나 변경하는 경우), 겔 전기영동, 모세관 어레이 전기천공, MALDI-TOF MS, 동적 대립형질-특이적 하이브리디제이션, 분자 비콘 (molecular beacon), 제한 단편 길이 다형체, 프라이머 연장, 온도 구배 겔 전기영동, 및 기타 등등에 의해 측정될 수 있다.

[0215] 기타 구체예에서, 전기영동 후 세포 생존력은 적어도 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 또는 85%이다. 세포 생존력은 당해기술에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 세포는 세포 계수 장치에 의해 전기천공 전 및 후에 계수될 수 있다. 기타 구체예에서, 아포토시스가 측정된다. 다량의 핵산 도입은 아포토시스를 유도할 수 있는 것으로 간주된다. 본원에 기술된 방법은 당해기술의 다른 방법보다 아포토시스를 덜 유도할 것으로 여겨진다. 특정 구체예에서, 전기천공 후 아포토시스를 나타내는 세포의 양은 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 또는 5% 미만이다. 아포토시스는 프로그래밍된 세포 치사의 특정 과정을 지칭하며, 당해 기술에 공지된 방법에 의해 측정될 수 있다. 예를 들어, 아포토시스는 Annexin V 검정, 활성화된 카스파제 3/7 검출 검정, 및 Vybrant® Apoptosis Assay (Life Technologies)에 의해 측정될 수 있다.

[0216] 추가의 구체예에서, 마커를 인코딩하는 핵산을 발현하는 세포의 백분율은 약 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 또는 90% 초과이다.

[0217] 본 기재내용의 특정 구체예가 본원에 기술된 바와 같은 범위 또는 특정 값을 포함하는 경우, 범위 및 특정 값 (즉, 핵산의 농도, 길이 및 백분율)은 본 발명의 구체예에서 배제될 수 있는 것으로 특별히 간주된다. 본 기재내용이 요소 (예를 들어, 세포 유형)의 목록을 포함하는 경우, 본 발명의 구체예는 목록의 하나 이상의 요소를 구체적으로 제외시킬 수 있음이 또한 고려된다.

[0218] **3. 기타 비-화학적 방법**

[0219] 세포 스퀴징은 세포 막을 부드럽게 눌러서 세포 내로 분자의 전달을 가능하게 하는 형질감염 방법이다. 이는 세포내 전달을 위한 고처리량 무-벡터 미세유체 플랫폼이다. 이는 외인성 물질 또는 전기장에 의존적이지 않다.

[0220] 소노포레이션은 세포 막에서 기공 형성을 유도하기 위해 고강도 초음파를 사용한다. 이러한 기공 형성은 근처 세포 막과 상호작용하는 가스 버블의 캐비테이션에 주로 기여하는데, 왜냐하면 초음파 조영제 즉, 캐비테이션 핵의 근원의 첨가에 의해 강화되기 때문이다.

[0221] 광학적 형질감염은 미세한 (~1µm 직경) 구멍이 고도로 집속된 레이저를 사용하여 세포의 혈장 막에서 일시적으로 생성되는 방법이다. 이 기법에서, 한번에 하나의 세포가 처리되어 단일 세포 분석에 특히 유용하게 한다.

[0222] 마우스 및 쥐, 그러나 더 큰 동물에서 더 적은 정도로의 유체역학 전달에 있어서, 트랜스포손을 포함하는 가장 흔히 플라스미드 중의 DNA가 10초 이내에 혈액에서 비교적 큰 부피 주입을 포함하는 유체역학적 주입을 이용하여 간에 전달될 수 있으며; DNA의 거의 대부분이 이러한 절차에 의해 간에서 발현된다.

[0223] **B. 화학-기반 형질감염 방법**

[0224] 화학-기반 형질감염은 수개의 종류로 나누어질 수 있다: 사이클로덱스트린, 폴리머, 리포솜 또는 나노입자 (화학적 또는 바이러스 기능화 존재 또는 부재하에).

- [0225] 가장 저렴한 방법중 하나는 칼슘 포스페이트를 사용한다. 포스페이트 이온을 함유하는 HEPES-완충된 염수 용액 (HeBS)은 형질감염될 DNA를 함유하는 칼슘 클로라이드 용액과 조합된다. 2개가 조합되는 경우, 양으로 하전된 칼슘 및 음으로 하전된 포스페이트의 미세한 침전물이 형성될 것이며, 형질감염될 DNA를 이의 표면 상에 결합시킨다. 이어서, 침전물 현탁액이 형질감염될 세포에 첨가된다 (일반적으로 단일층에서 성장한 세포 배양물). 완전히 이해되지 않은 공정에 의해, 세포는 침전물의 일부 및 이와 함께 DNA를 흡수한다.
- [0226] 기타 방법은 고도로 분지된 유기 화합물 소위, 덴드리머를 사용하여 DNA에 결합하고 이를 세포 내에 들어가게 한다.
- [0227] 매우 효율적인 방법은 리포좀 즉, 어떤 면에서는 세포의 구조와 유사하며 세포 막과 실제로 융합되어 DNA를 세포 내로 방출시킬 수 있는 작은 막-결합된 바디 내에 형질감염된 DNA를 포함시키는 것이다. 진핵 세포의 경우, 형질감염은 양이온 리포좀 (또는 혼합물)을 사용하여 더욱 우수하게 달성되는데, 왜냐하면 세포가 더욱 민감하기 때문이다.
- [0228] 또 다른 방법은 양이온 폴리머 예컨대, DEAE-텍스트란 또는 폴리에틸렌이민의 사용이다. 음으로 하전된 DNA는 폴리양이온에 결합하고 복합물은 세포내이입을 통해 세포에 의해 흡수된다.
- [0229] **C. 입자-기반 방법**
- [0230] 형질감염에 대한 직접적인 접근법은 유전자 총이며, 여기에서 DNA는 불활성 고형물 (일반적으로 금)의 나노입자에 커플링되고 이어서 표적 세포의 핵에 직접 "발사"된다.
- [0231] 자기주입법, 또는 자석 보조된 형질감염은 DNA를 표적 세포 내로 전달하는데 자기력을 사용하는 형질감염 방법이다. 핵산은 먼저 자기 나노입자와 회합된다. 이어서, 자력을 가하면 핵산 입자 복합물이 표적 세포 쪽으로 그리고 그 안으로 이동하게 되고, 여기에서 내용물이 방출된다.
- [0232] 임팔렉션은 플라스미드 DNA로 기능화된 긴 나노구조 및 이러한 나노구조의 어레이 예컨대, 카본 나노섬유 또는 실리콘 나노와이어에 의해 세포를 찌름으로써 수행된다.
- [0233] 형질감염의 또 다른 입자-기반 방법은 입자 폭격으로 공지되어 있다. 일반적으로 미세발사체에 연결된 핵산이 막 침투를 통해 고속으로 전달된다.
- [0234] **V. 실시예**
- [0235] 본 발명의 바람직한 구체예를 입증하기 위해 하기 실시예가 포함된다. 하기의 실시예에 기술된 기술은 본 발명의 실시에서 잘 작용하도록 본 발명자에 의해 발견된 기술을 대표하며, 이에 따라 본 발명의 실시를 위한 바람직한 방법을 구성하는 것으로 간주될 수 있음을 당업자는 이해해야 한다. 그러나, 본 기재내용에 비추어 당업자는 기술된 특정 구체예에서 다수의 변형이 이루어질 수 있고, 본 발명의 사상 및 범위에 벗어남이 없이 동일하거나 유사한 결과가 여전히 수득됨을 이해해야 한다.
- [0236] **실시예 1: 특이적 뉴클레아제 및 플라스미드 도너 DNA의 도움으로 게놈 DNA에서 전이유전자의 표적화된 통합**
- [0237] 치료학적 잠재력으로 인해, 세포 게놈 DNA에서 전이유전자의 효율적인-표적화된 통합에 대한 요구가 높다. 치료학적 잠재력 이외에도, 전이유전자의 효율적이고 표적화된 통합은 단백질 생산(예를 들어, 항체 생산)에도 적용 가능하다. 전이유전자의 표적화된 통합에 있어서, 전이유전자는 전형적으로 큰 조각의 DNA 또는 플라스미드에 전달되며, 이는 특정 세포 예컨대, 일차 세포, 줄기 세포, 조혈 세포, 또는 면역 세포에서 독성을 가질 수 있다. 따라서, 치료학적으로 관련이 있는 전이유전자의 표적화된 통합을 위해, 본 방법은 치료학적 관련 세포의 표적 게놈 DNA에서 높은 통합 효율 및 특이성을 제공해야 한다.
- [0238] 세포 예컨대, 조혈 세포 또는 면역 세포는 활성화 공정 동안 플라스미드 DNA로의 형질감염에 대해 상이한 감도를 가질 수 있다는 가설이 세워졌다. 확장된 조혈 세포는 플라스미드 DNA 형질감염에 대한 감소된 독성 및 증가된 내성을 나타낼 수 있다는 시간 윈도우일 수 있는 것으로 간주되었다.
- [0239] 이 가설을 평가하기 위해, 표적화된 통합을 K562 및 인간 T 세포에서 수행하였다. 가이드 RNA(gRNA) Cas9를 사용하였다. gRNA 주형은 T7 프로모터로 컨주게이팅된 프라이머로의 PCR 증폭에 의해 제조하였다. 사용된 프라이머는 다음과 같다: SM285.AAVS1.g2.F: ttaatacgaactcactataGGGGCCACTAGGGACAGGAT (SEQ ID NO:19) 및 SM212.sgRNA.R: aaaagcaccgactcgggtgcc (SEQ ID NO:20). Cas9 주형은 Cas9 플라스미드의 엔도뉴클레아제-선형화 (XhoI 1)에 의해 수득되었다. 이어서, mRNA는 mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA Kit (Ambion으로부터 시중에서

입수가능)에 의해 제조하였다. 사용된 도너 DNA는 GFP를 포함하는 플라스미드 DNA이다.

[0240] A. K562로의 GFP 전이유전자의 표적화된 통합

[0241] 도 1은 GFP가 전기천공에 의해 형질감염 후 1, 5 및 12일에 세포의 27%, 32% 및 37%에서 발현됨을 보여주었다. 예상한 바와 같이, 전기천공을 거치지 않은 세포(-EP)에서는 현저한 GFP 발현이 관찰되지 않았으나, 표적화된 통합을 제공하는 가이드 RNA 및 Cas9를 포함하지 않은 형질감염에서 세포의 35%가 GFP를 발현하였다. 그러나, 이러한 발현은 일시적이었으며, 따라서 현저한 양의 GFP 발현이 5 및 12일의 후속 평가 시점에서 관찰되었다. CRISPR 시스템으로 형질감염된 세포만이 1일 지난 시점에서 현저한 수준의 GFP 발현을 유지하였다 (도 1). 이는 PGK-eGFP-PolyA 플라스미드가 CRISPR 시스템을 사용하여 K562 세포의 AAVS1 부위로 표적화된 추가의 실험에서 추가로 확인되었다. 도 14에 도시된 바와 같이, 표적화된 통합(+CRISPR)은 형질감염 후 최소 29일의 시점에서 GFP의 안정한 발현을 허용한다(도 14, 제 2 및 제 4 열).

[0242] 형질감염된 K562 세포를 생존력, 발현, 및 평균 형광 강도에 대해 평가하였다 (도 13). K562 세포 내로 형질감염된 플라스미드는 세포 생존력에서 어떠한 감소도 나타내지 않았다 (도 13a). 도 13b-13c에 도시된 바와 같이, CRISPR 시스템으로 형질감염된 K562 세포만이 형질감염 후 5일 이후에도 상당량의 GFP 발현을 유지하였다. 이는 CRISPR 시스템과 전이유전자의 공동-형질감염이 전이유전자의 안정하고 부위-특이적 통합을 허용하기 때문인 것으로 예측된다. 전이유전자의 발현은 선택 압력 없이 이들 세포에서 유지된다.

[0243] 요약하면, 플라스미드 DNA는 K562 세포의 현저한 세포독성을 유도하지 않았으며, 효율적인 표적화된 통합이 세포 선택 없이 관찰되었다 (30-40%).

[0244] B. 섬유모세포 내로의 GFP 전이유전자의 표적화된 통합

[0245] GFP 전이유전자(PGK-eGFP-PolyA)의 표적화된 통합이 섬유모세포 내로 통합될 수 있는지의 여부를 평가하기 위해, 인간 섬유모세포를 CRISPR 시스템 함유 (+Cas0/gRNA) 또는 비함유 (-Cas9/gRNA)의 GFP 플라스미드 DNA (PGK-eGFP-PolyA)로 전기천공시켰다. 형질감염 후 15일까지는 두 실험에서 유사한 수준의 GFP 발현이 관찰되었으나, 형질감염 후 23 및 26일에는 CRISPR 시스템으로 형질감염된 세포만이 현저한 GFP 발현을 유지하였다(도 12).

[0246] C. 인간 T 세포 내로의 GFP 전이유전자의 표적화된 통합

[0247] 도 2에 도시된 바와 같이, 인간 T 세포는 플라스미드 DNA로 형질감염 후 감소된 생존력(도 2a), 감소된 증식(도 2b), 및 감소된 GFP 발현(도 2c)을 나타냈다. 그러나, 이들 부정적 효과는 mRNA-GFP로 형질감염된 세포에서 극복되었으며, 이는 플라스미드 DNA가 독성의 원천임을 시사한다.

[0248] 그 후, 세포의 활성화 후 다양한 시점에서 플라스미드 DNA로 형질감염된 세포가 세포 생존력에 영향을 미치는지의 여부를 평가하였다. DYNABEADS® Human T-Activator CD3/CD28 (Life Technologies로부터 시중에서 입수가능)에 의한 활성화 후 1일에 전기천공된 T 세포는 대조군과 비교하여 현저한 생존력 감소를 나타내지 않았다(도 3a). 활성화 후 2일에서의 형질감염은 활성화 후 1일과 비교하여 세포 생존력의 감소를 발생시켰으나 (도 3b), 세포 생존력은 각 평가된 샘플에서 여전히 40%를 초과하였다. 3일에, 세포 생존력의 추가 감소가 있었다(도 3c). 이들 데이터는 세포의 활성화가 플라스미드 DNA 형질감염과 관련된 독성을 감소시킴을 나타낸다. 동일한 세포를 GFP 발현(도 4a-c) 및 평균 형광 강도(MFI, 도 5a-c)에 대해 평가할 때, 가장 높은 수준의 GFP 발현이 세포를 활성화 후 2일에 형질감염시킨 경우 관찰되었다(도 4b 및 도 5b).

[0249] 형질감염 원도우를 확장된 T 세포에서 추가로 연구하였다. T 세포를 종래 기술된 바와 같이 활성화시키고, 활성화 후 1일, 2일 또는 3일 중 어느 하나에서 전기천공시켰다. 도 6은 상이한 시점에서 전기천공된 세포의 증식을 보여준다. 활성화 후 1일에서 전기천공된 세포는 가장 많은 세포 증식을 나타내었으며(도 6a), 활성화 후 3일에서 전기천공된 세포는 가장 적은 양의 세포 증식을 나타냈다. 이러한 데이터는 형질감염 전 세포의 활성화가 플라스미드 DNA의 더 나은 내성을 허용함을 입증한다.

[0250] 다음에 전이유전자의 표적화된 통합이 활성화 후 T 세포의 전기천공에 의해 수행될 수 있는지의 여부를 평가하였다. 확장된 T 세포를 종래 기술된 바와 같이 활성화시키고, 이어서 활성화 후 2일에 100 µg/ml의 GFP 플라스미드 DNA로 전기천공시켰다. 도 7에 도시된 바와 같이, 비-전기천공 대조군(-EP)은 낮은 수준의 배경 형광을 나타냈다. GFP 플라스미드 DNA로는 형질감염되나, AAVS1 부위에서 부위-특이적 통합을 허용하는 CRISPR 시스템 (gRNA/Cas9)로는 형질감염되지 않은 세포의 3%가 형질감염 후 1일에 GFP 형광을 나타냈다. 그러나, 이들 세포에서 GFP의 발현은 일시적이었으며, 형질감염 후 4일에 2%로 감소하였으며 형질감염 후 11일에 0.3%로

감소하였다. 대조적으로, CRISPR 시스템을 갖는 세포는 형질감염 후 11일에 GFP 발현을 유지하였다. 이들 세포의 4, 5, 및 4%는 각각 형질감염 후 1일, 4일 및 11일에 GFP 발현을 나타냈다. 이 실험을 반복하였으며, 결과는 GFP 플라스미드 DNA와 CRISPR 복합물로 형질감염된 세포가 형질감염 후 6일에 GFP 발현을 유지한 반면 (세포의 2.3%), GFP 플라스미드 DNA 단독으로 형질감염된 세포는 형질감염 후 6일에 GFP를 발현하지 않았음(도 8)을 확인시켜주었다.

[0251] 도 9는 세포의 활성화 후 1, 2, 3, 또는 4일 중 어느 하나에서 형질감염된 세포의 결과를 보여준다. 도 9a는 CRISPR 시스템 없이 50, 100, 또는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 플라스미드 DNA 또는 CRISPR 시스템을 갖는 50, 100, 또는 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 플라스미드 DNA 중 하나로 형질감염된 세포의 증식을 보여준다. 도 9a에 도시된 바와 같이, 세포가 형질감염 후 3일 또는 그 후에 형질감염되었을 때 세포 증식은 감소하였다. 추가로, 증식은 DNA 농도에 의존적인 것으로 보이지 않았다. 도 9d는 세포의 생존력을 보여준다. 도 9d에 도시된 바와 같이, 세포가 형질감염 후 3일 또는 그 후에 형질감염되었을 때 세포 생존력이 또한 감소하였으며, 생존력은 DNA 농도에 의존적인 것으로 보이지 않았다. 도 9b는 가장 높은 백분율의 GFP-발현 세포가 세포를 활성화 후 2일에 형질감염시켰을 때 수득되었음을 보여준다. 도 9c는 통합 사건의 상대적 수 (세포 수 X GFP-양성 세포의 백분율로 계산됨)가 활성화 후 2일에 세포가 형질감염되었을 때 가장 높았음을 보여준다.

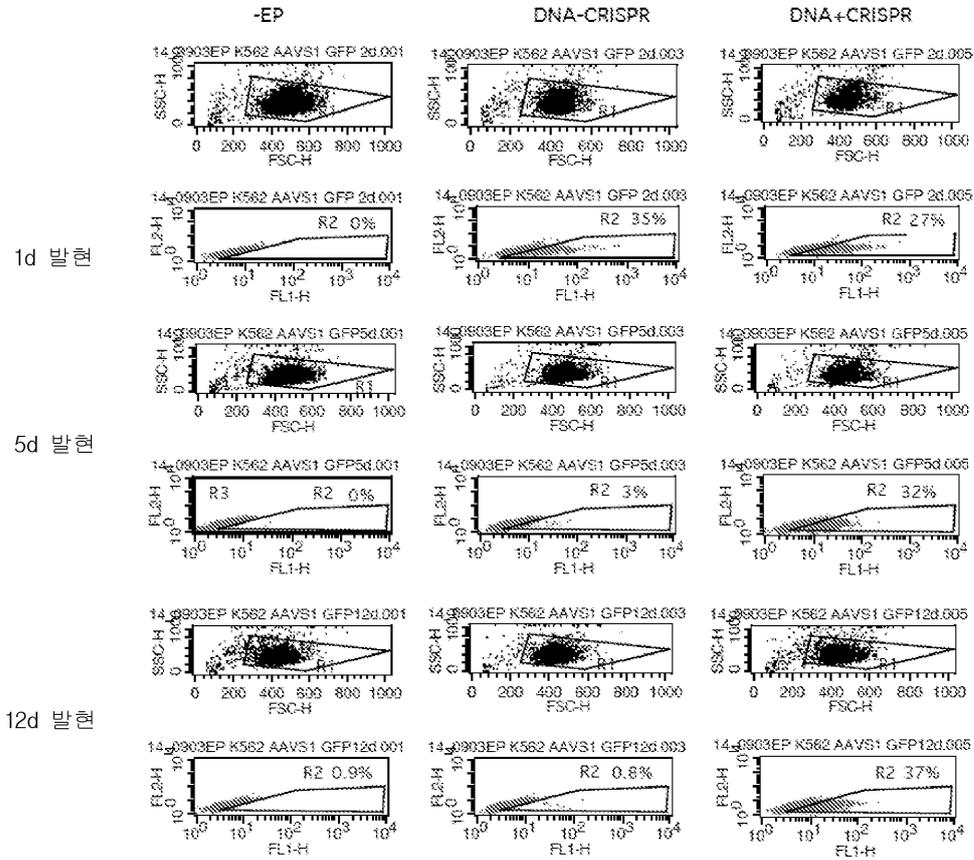
[0252] 이들 실험은 종래 기술된 바와 같이 활성화되고, 활성화 후 2일에 -CRISPR(도 15, 제 1 및 제 3 열) 또는 +CRISPR (도 15, 제 2 및 제 4 열) 및 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 플라스미드 DNA로 전기천공된 확장된 T 세포의 FACS 분석에 의해서 추가로 확인되었다. 도 15에 도시된 바와 같이, CRISPR로 형질감염된 세포만이 4 또는 6-일 시점 이후에도 안정한 전이유전자 발현을 나타냈다.

[0253] 결론적으로, 플라스미드 DNA로의 형질감염 전 T 세포의 활성화는 이들 세포에서 플라스미드 DNA와 관련된 독성 및 효율성 손실을 극복하였다.

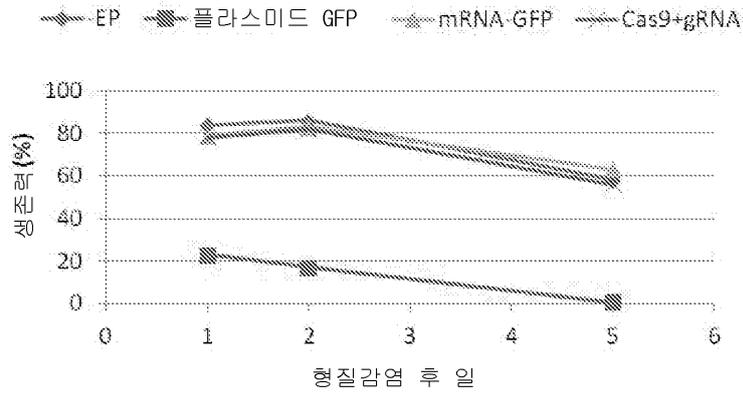
[0254] 본원에 기술되고 청구된 모든 조성물 및 방법은 본 기재내용에 비추어 과도한 실험 없이 이루어지고 실시될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 구체예로 기술되었으나, 본 발명의 개념, 사상 및 범위로부터 벗어남이 없이 변형이 본 방법 및 본원에 기술된 방법의 단계 또는 단계의 순서에 적용될 수 있음이 당업자에게 명백할 것이다. 더욱 특히, 화학적 및 생리학적 둘 모두로 관련된 특정 작용제가 본원에 기술된 작용제를 대체될 수 있으면서, 동일하거나 유사한 결과가 달성될 수 있음이 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 모든 이러한 유사한 치환 및 변형은 첨부된 청구의 범위에 규정된 바와 같이 본 발명의 사상, 범위 및 개념에 해당되는 것으로 간주된다.

도면

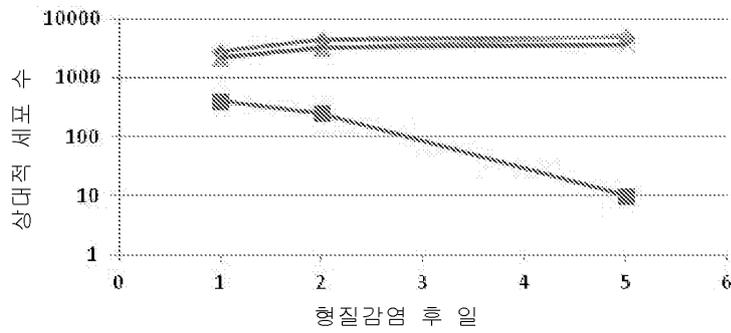
도면1



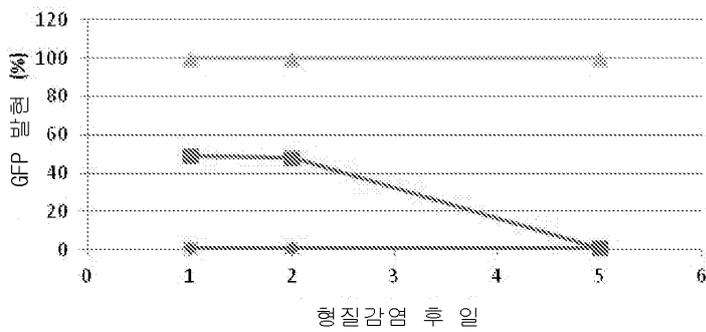
도면2



도 2a

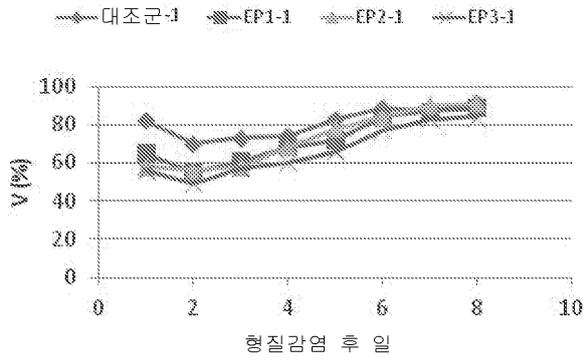


도 2b

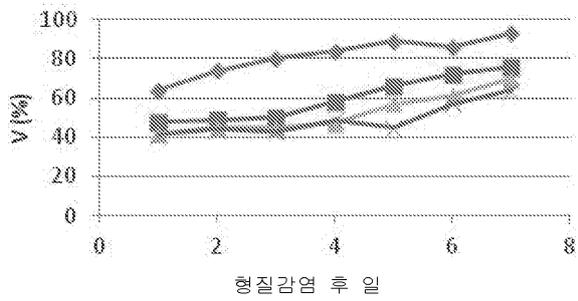


도 2c

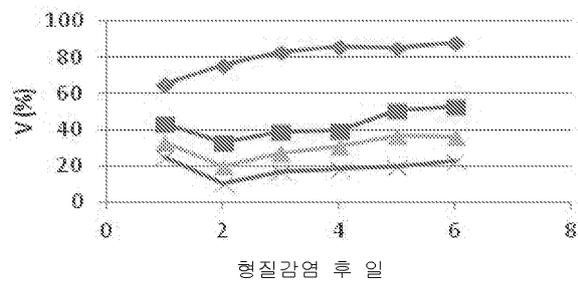
도면3



도3a

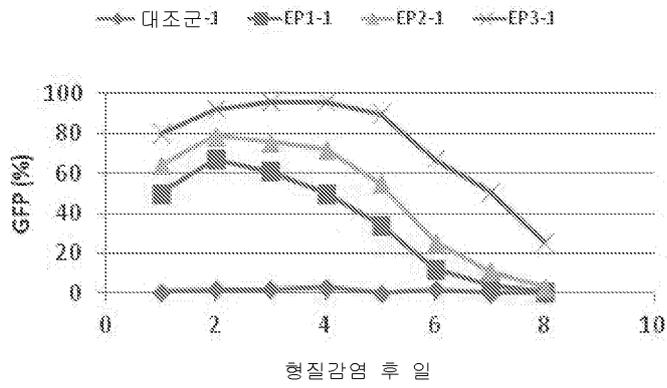


도3b

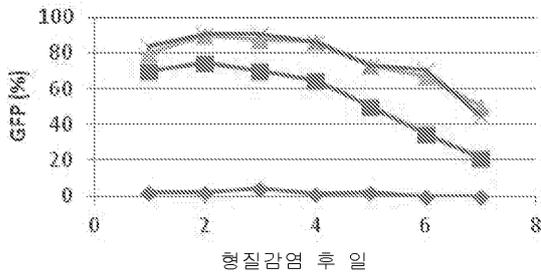


도3c

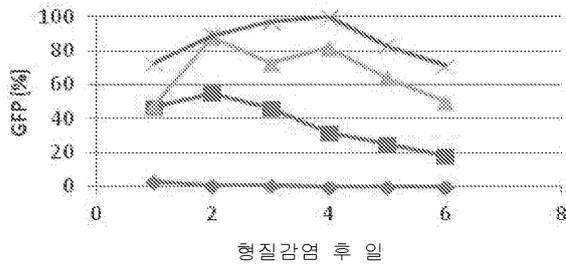
도면4



도 4a

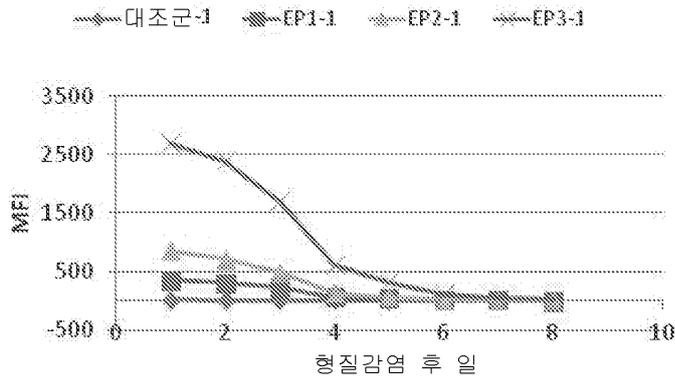


도 4b

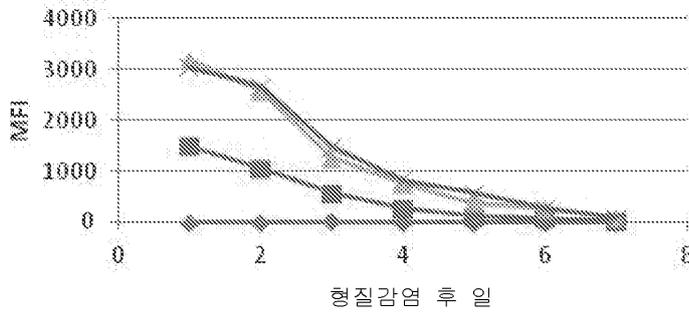


도 4c

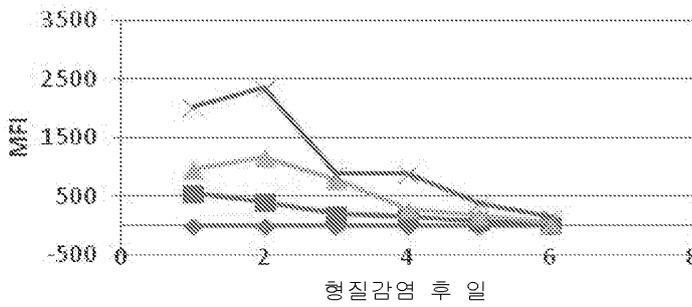
도면5



도 5a

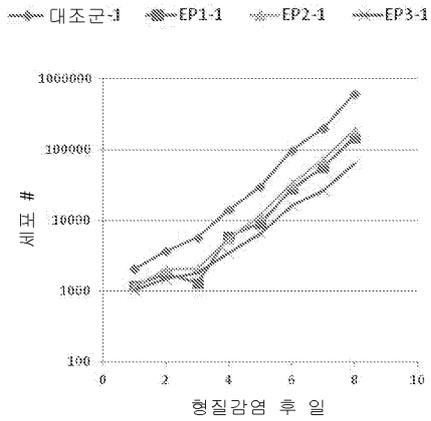


도 5b

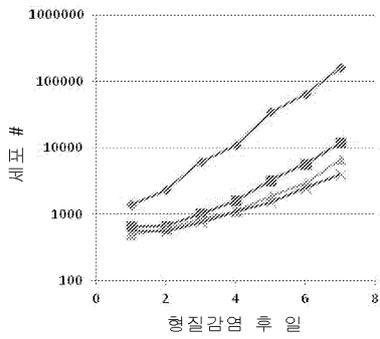


도 5c

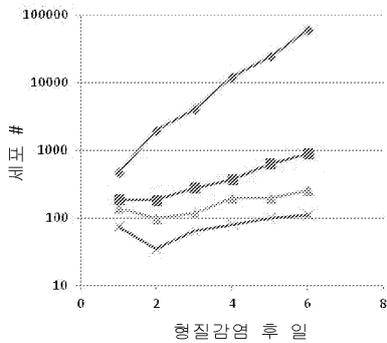
도면6



도 6a

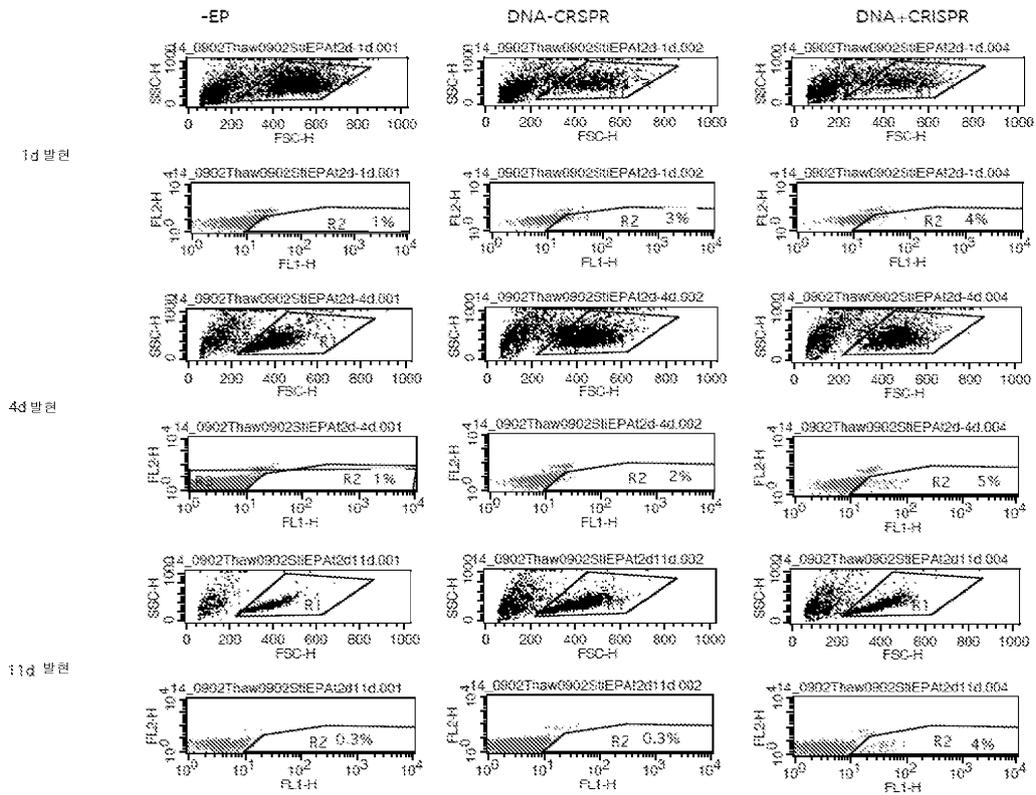


도 6b

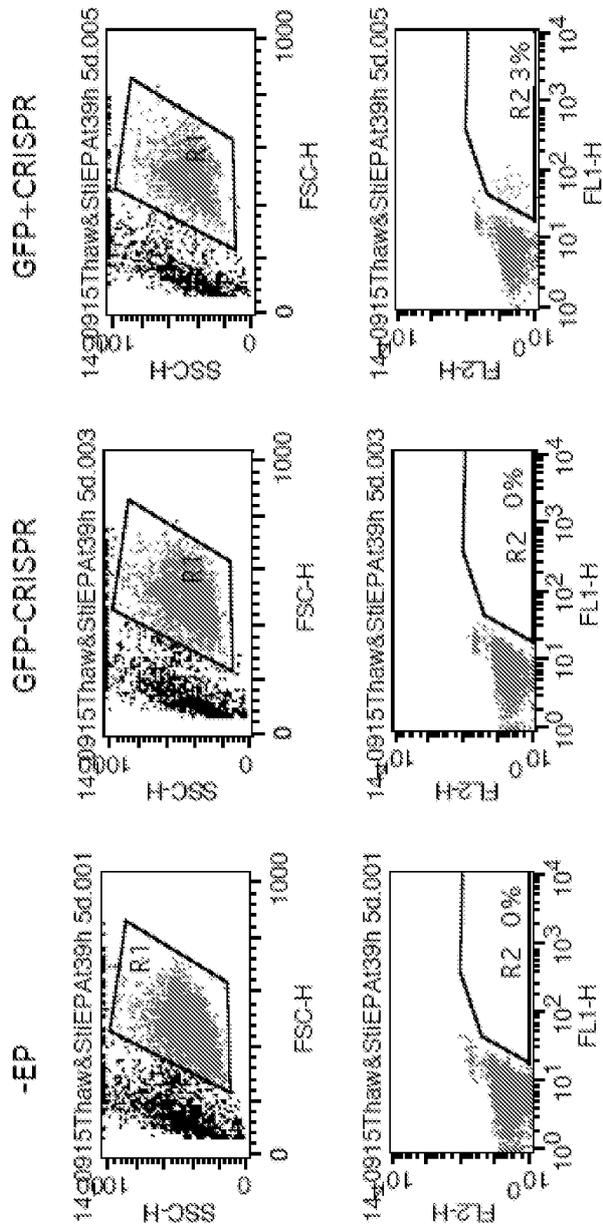


도 6c

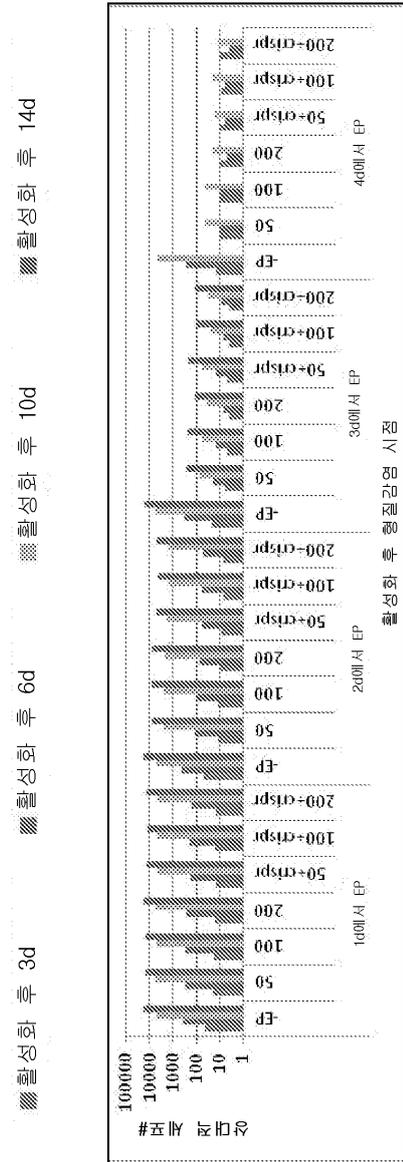
도면7



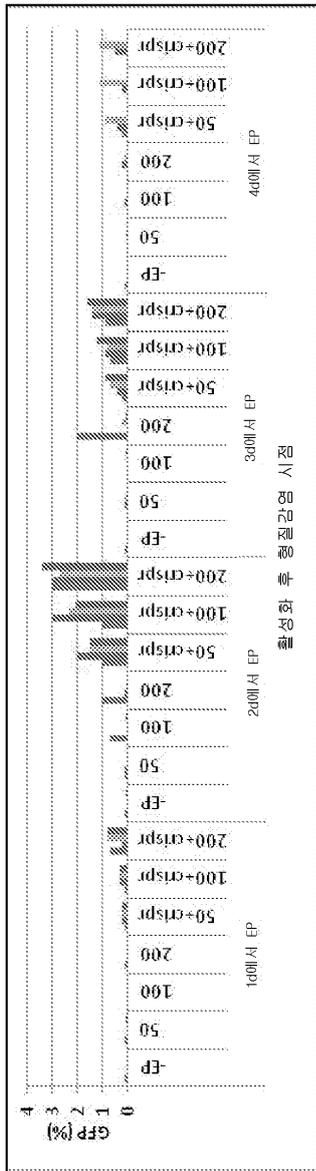
도면8



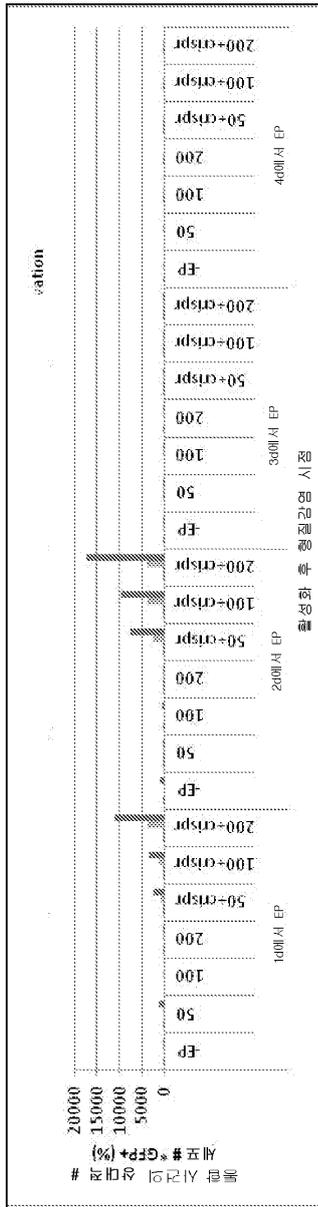
도면9a



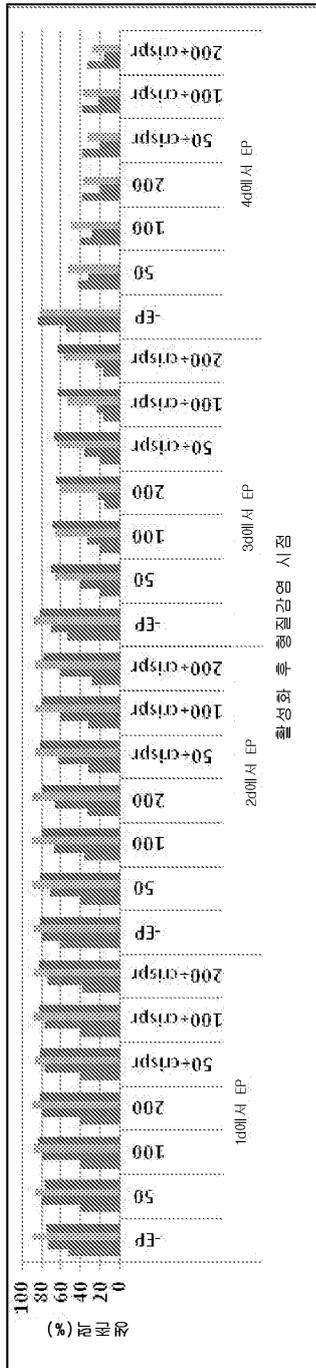
도면9b



도면9c



도면9d



도면10a

도너 DNA :

atgggtgcatctgactcctgTAGTggagaagtctgccgttact

표적 게놈 DNA:

atgggtgcatctgactcctgtggagaagtctgccgttact

taccacgtagactgaggacacctcttcagacggcaatga

도면10b

도너 DNA :

atggtgcatctgactcctgAggagaagtctgccgttact

표적 게놈 DNA:

atggtgcatctgactcctgtggagaagtctgccgttact

taccacgtagactgaggacacctcttcagacggcaatga

도면11

이중 가닥 도너 플라스미드 DNA:

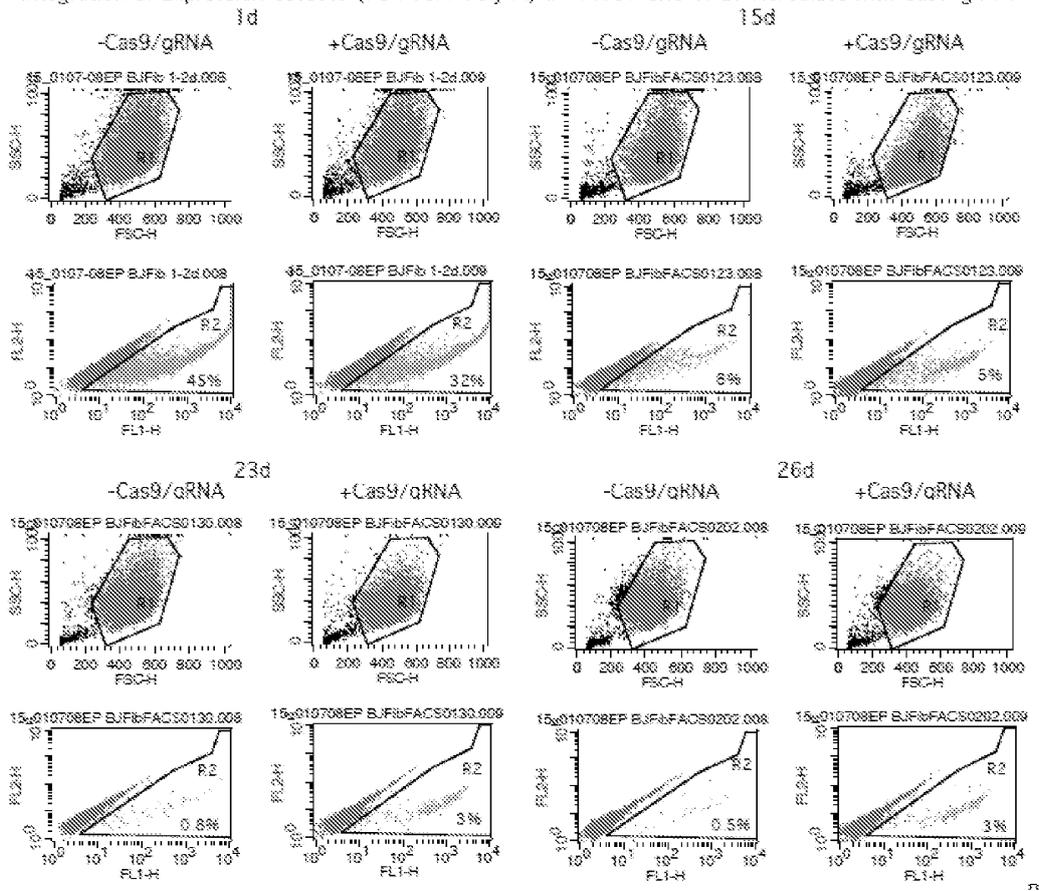
atggtgcatctgactcctg...2000 BASEPAIR TRANSGENE X...tggagaagtctgccgttact

추가적인 플라스미드 서열

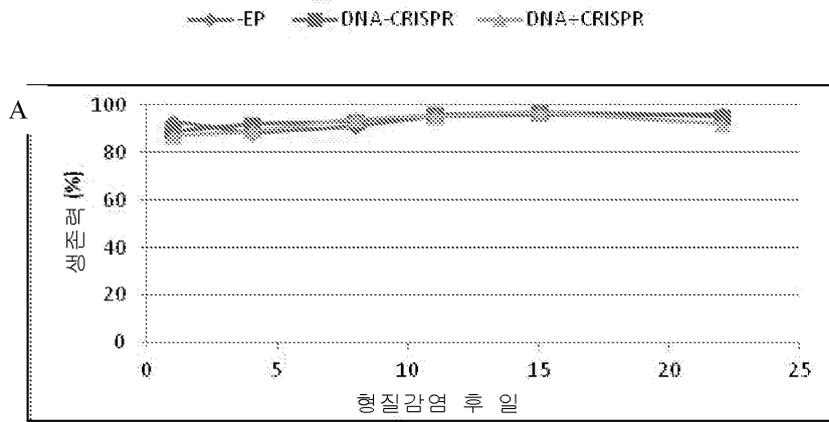
표적 게놈 DNA:

atggtgcatctgactcctgtggagaagtctgccgttact
taccacgtagactgaggacacctcttcagacggcaatga

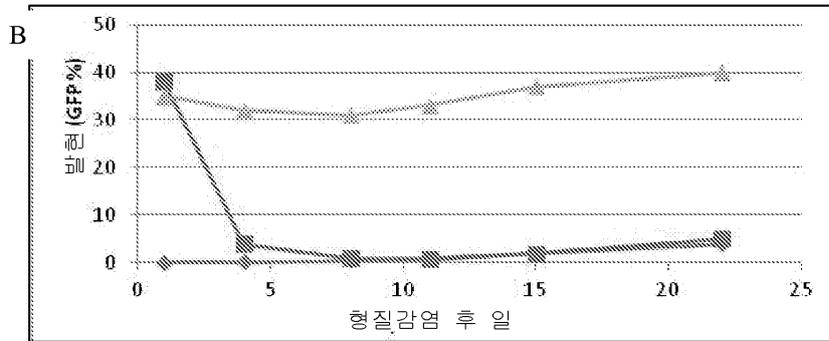
도면12



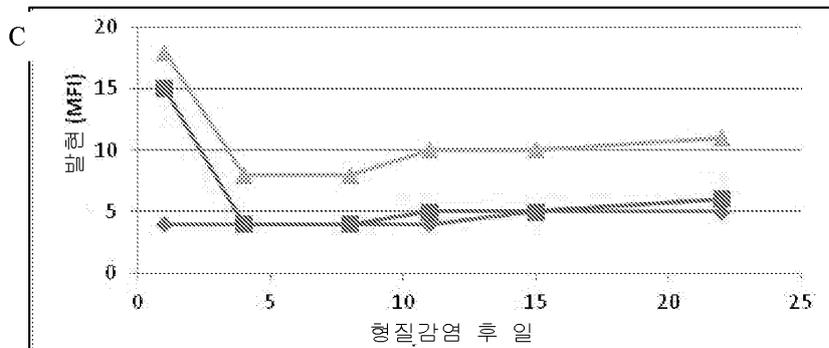
도면13



도 13a

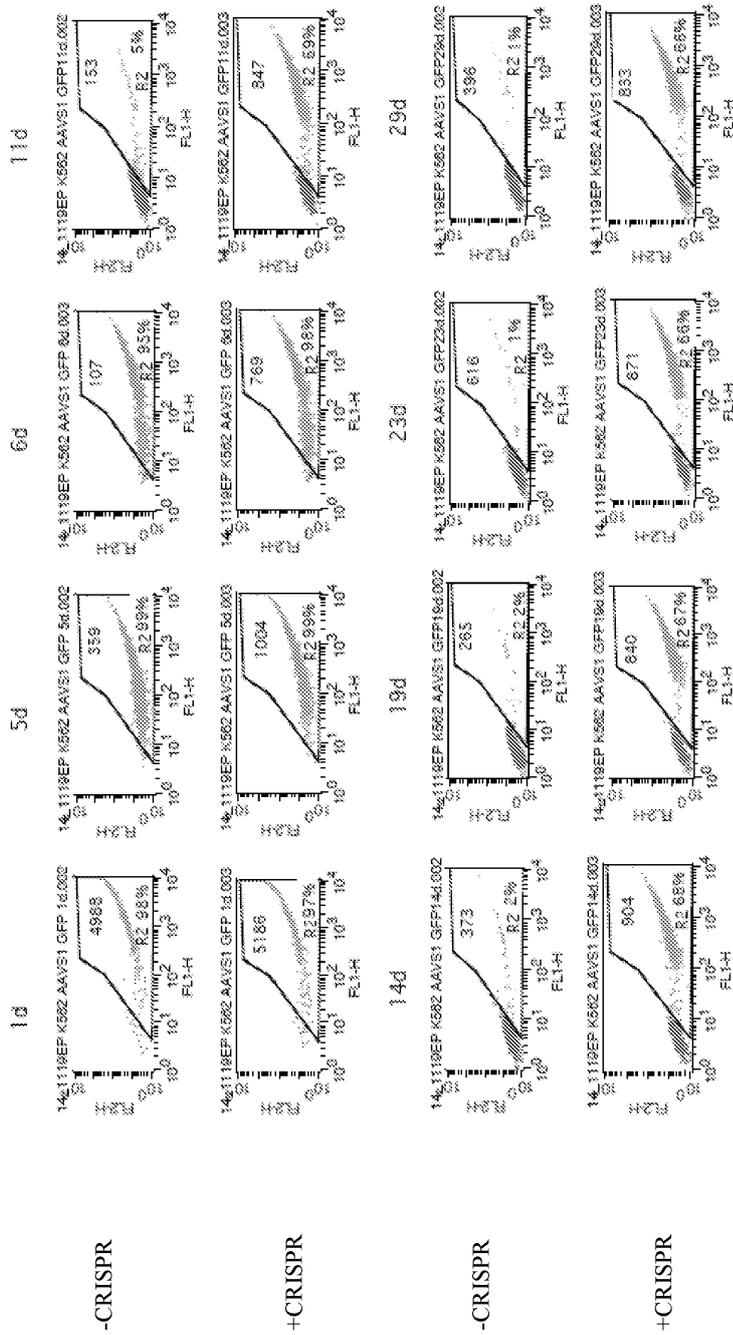


도 13b

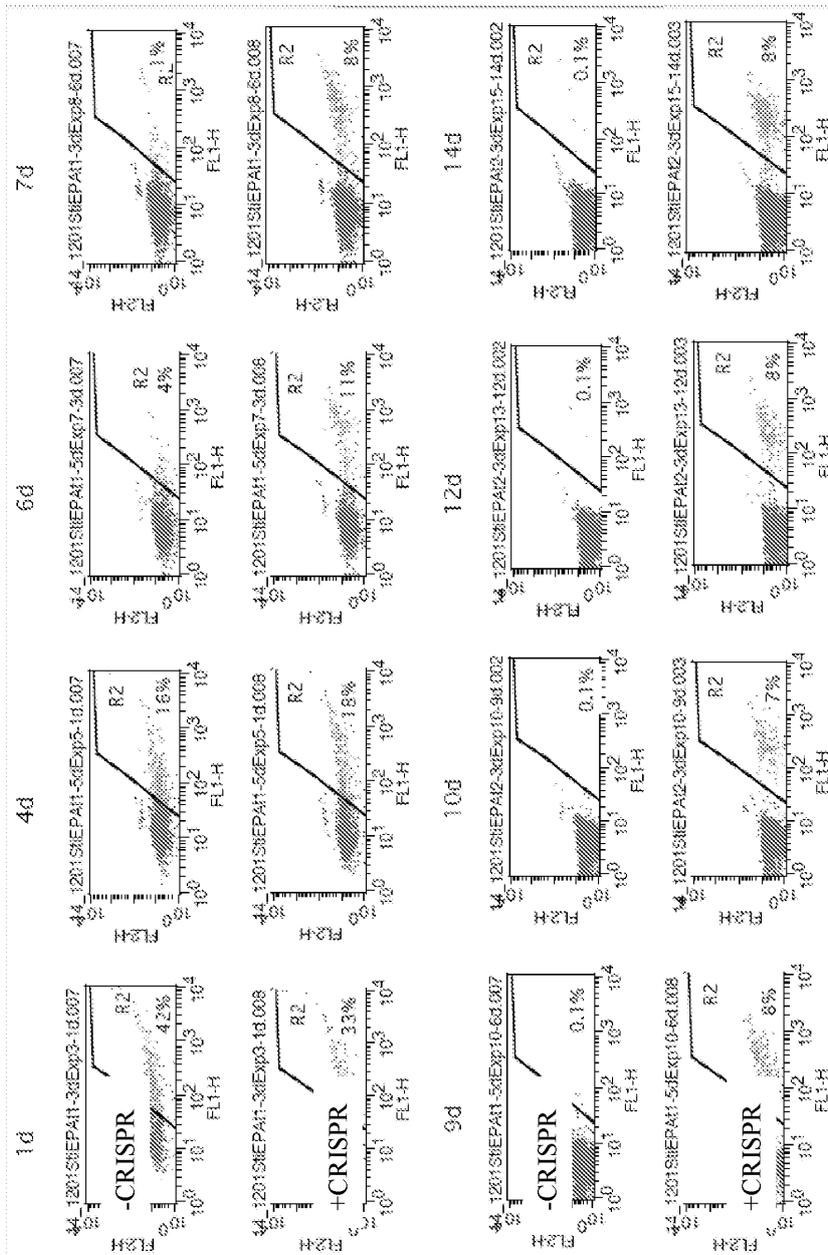


도 13b

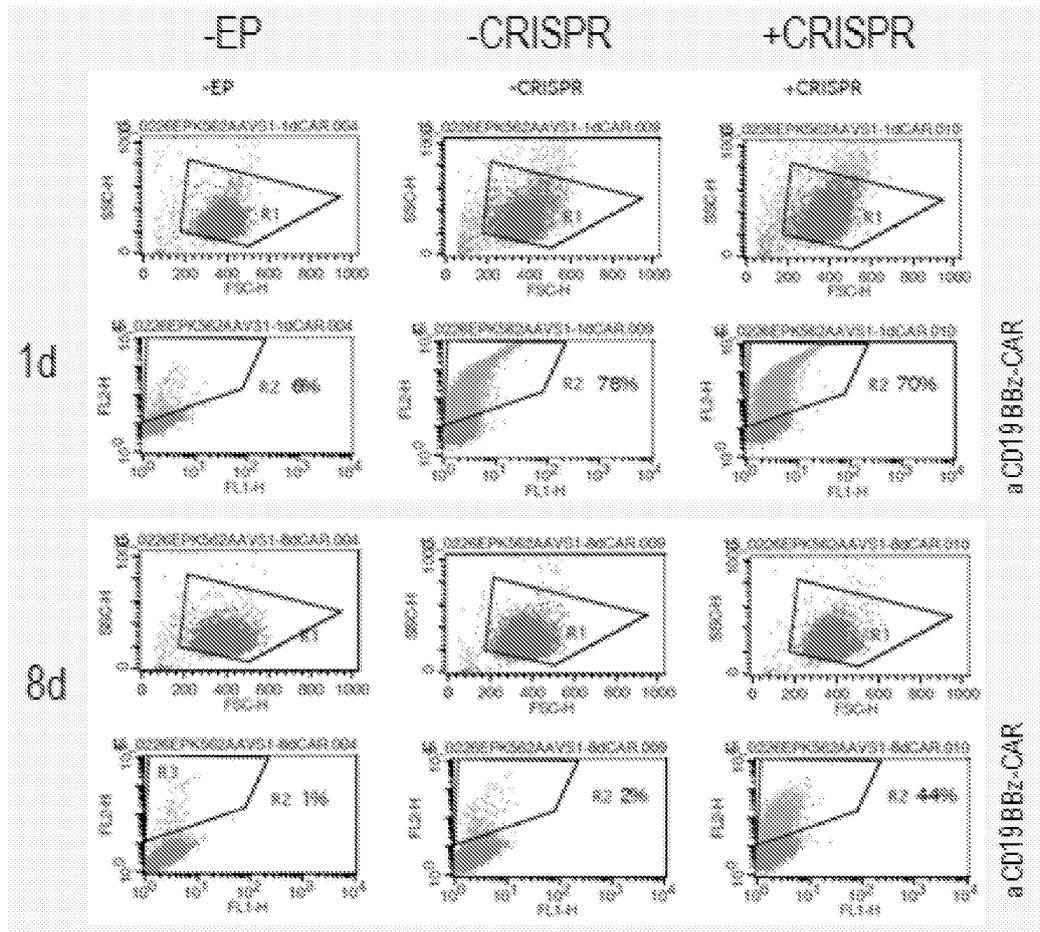
도면14



도면15



도면16



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> LI, Linhong
PESHA, Madhusudan
- <120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR MODIFYING GENOMIC DNA
- <130> MAXC.P0039W0
- <140> PCT/US2016/027253
- <141> 2016-04-13
- <150> 62/146,618
- <151> 2015-04-13
- <160> 20
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 11
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(8)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 1
 gacnnnnngt c

11

<210> 2
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(7)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (11)..(11)
 <223> Y is C or T
 <220><221> misc_feature
 <222> (13)..(13)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 2
 nacnnngta ycn

13

<210> 3
 <211> 12
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(9)

<223> n is a, c, g, or t
 <400> 3
 cgannnnnt gc 12
 <210> 4
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(8)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 4
 gccnnnngg c 11
 <210> 5
 <211> 10
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(7)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 5
 gatnnnatc 10
 <210> 6
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(9)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 6
 ccnnnnnng g 11
 <210> 7

<211> 11
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(8)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 7
 gcannnntg c 11
 <210> 8
 <211> 12
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(9)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 8
 ccannnnnt gg 12
 <210> 9
 <211> 12
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(9)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 9
 gacnnnnng tc 12
 <210> 10
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(8)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 10
 cctnnnnnag g 11
 <210> 11
 <211> 10
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (6)..(10)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 11
 gagtcnnnn 10
 <210> 12
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(3)
 <223> Y is C or T
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(7)
 <223> n is a, c, g, or t
 <220><221> misc_feature
 <222> (8)..(8)
 <223> R is A or G

 <400> 12
 caynnnr t g 10
 <210> 13

<211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (3)..(9)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 13
 gcnnnnnng c 11
 <210> 14
 <211> 11
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(8)
 <223> n is a, c, g, or t

 <400> 14
 ccannnntg g 11
 <210> 15
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(7)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 15
 gacnnnngtc 10
 <210> 16
 <211> 13
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer

<220><221> misc_feature
 <222> (5)..(9)
 <223> n is a, c, g, or t

 <400> 16
 ggccnnnnng gcc 13
 <210> 17
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(12)
 <223> n is a, c, g, or t
 <400> 17
 ccannnnnnn nmtgg 15
 <210> 18
 <211> 10
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <220><221> misc_feature
 <222> (4)..(7)
 <223> n is a, c, g, or t

 <400> 18
 gaannnttc 10
 <210> 19
 <211> 38
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Primer
 <400> 19
 ttaatacgac tcactatagg ggccactagg gacaggat 38
 <210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Primer

<400> 20

aaaagcaccg actcgggtgcc

20