



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0017783
(43) 공개일자 2023년02월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/078 (2010.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/86 (2006.01)
C12N 15/88 (2017.01) C12N 15/90 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0634 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7041443
(22) 출원일자(국제) 2021년04월27일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년11월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/029446
(87) 국제공개번호 WO 2021/222287
국제공개일자 2021년11월04일
- (30) 우선권주장
63/016,913 2020년04월28일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (71) 출원인
인텔리아 테라퓨틱스, 인크.
미국 02139 매사추세츠주 캠프리지 스위트 130 이
리 스트리트 40
- (72) 발명자
나렌드라, 푸자 카츠산드라
미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트
40
번스, 셀 마이클
미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트
40
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
양영준, 이상남

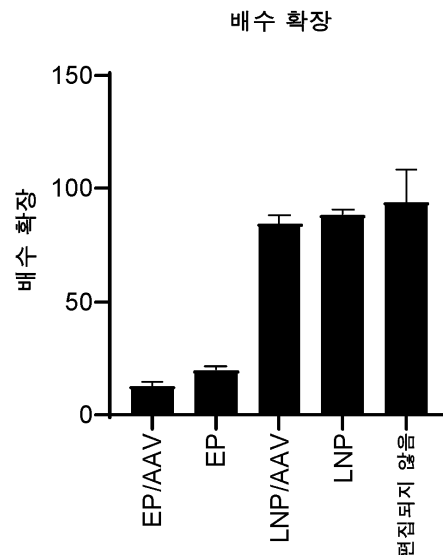
전체 청구항 수 : 총 175 항

(54) 발명의 명칭 시험관내 세포 전달 방법

(57) 요약

시험관내 다중 전달 및 유전자 편집을 위한 조성물 및 방법이 제공된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 15/88 (2013.01)
C12N 15/902 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2510/00 (2013.01)

(72) 발명자

구티에레스 마르티네스, 파울라

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트 40

칸줄리아, 아티 마헨드라 프라카시

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트 40

몬티, 앤서니

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트 40

프로데우스, 아론

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트 40

아레두아니, 모하메드 시모

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트 40

클르치, 외즈권

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트 40

라리비에르, 리드 워커

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트 40

샤르마, 팔락 수실

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트 40

스탐포울로글로우, 엘레니

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트 40

장, 칭잔

미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트 40

(30) 우선권주장

63/121,781	2020년12월04일	미국(US)
63/124,058	2020년12월11일	미국(US)
63/130,100	2020년12월23일	미국(US)
63/165,619	2021년03월24일	미국(US)
63/176,221	2021년04월17일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

세포 당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군으로서, 상기 세포 개체군내 세포의 적어도 50%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서: (i) 세포 개체군내 세포의 1% 미만, 0.5% 미만, 0.2% 미만, 또는 0.1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖거나; 또는 (ii) 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는, 세포 개체군.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 또는 50배 확장될 수 있는, 세포 개체군.

청구항 3

세포 당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군으로서, 상기 세포 개체군내 세포의 적어도 50%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 상기 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 50배 확장될 수 있는, 세포 개체군.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 세포의 1% 미만, 0.5% 미만, 0.2% 미만, 또는 0.1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖거나; 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는, 세포 개체군.

청구항 5

청구항 1 내지 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중 게놈 편집의 적어도 하나의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되며, 여기서 RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제인, 세포 개체군.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 다중 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체에 의해 생성되고, 상기 RNA-가이드 DNA 결합체는 클레아바제, 선택적으로 Cas9인, 세포 개체군.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 단일 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체에 의해 생성되고, 상기 RNA-가이드 DNA 결합체는 클레아바제, 선택적으로 Cas9인, 세포 개체군.

청구항 8

청구항 1 내지 7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중 게놈 편집은 외인성 핵산의 삽입을 포함하고, 여기서 삽입은 선택적으로 표적화된 삽입인, 세포 개체군.

청구항 9

청구항 1 내지 8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 적어도 20배, 30배, 40배, 또는 50배 확장되는, 세포 개체군.

청구항 10

청구항 1 내지 9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 인간 세포인, 세포 개체군.

청구항 11

청구항 1 내지 10 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 중간엽 줄기 세포; 조혈모 세포(HSC); 단핵 세포; 내피 전구 세포(EPIC); 신경 줄기 세포(NSC); 윤부 줄기 세포(LSC); 조직-특이적 1차 세포 또는 그로부터 유래된 세포 (TSC), 유도 만능 줄기 세포(iPSC); 안구 줄기 세포; 만능 줄기 세포(PSC); 배아 줄기 세포(ESC); 장기 또는 조직 이식용 세포, 및 선택적으로 ACT 요법에 사용하기 위한 세포로부터 선택되는, 세포 개체군.

청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 면역 세포인, 세포 개체군.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 면역 세포는 림프구(예를 들어, T 세포, B 세포, 자연 살해 세포("NK 세포", 및 NKT 세포, 또는 iNKT 세포)), 단핵구, 대식세포, 비만 세포, 수지상 세포, 과립구(예를 들어, 호중구, 호산구, 및 호염기구), 1차 면역 세포, CD3+ 세포, CD4+ 세포, CD8+ T 세포, 조절 T 세포(Tregs), B 세포, NK 세포, 및 수지상 세포(DC))로부터 선택되는, 세포 개체군.

청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 면역 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 림프구, T 세포, 선택적으로 CD4+ 세포, CD8+ 세포, 기억 T 세포, 나이브(naïve) T 세포, 줄기-세포 기억 T 세포; 또는 B 세포, 선택적으로 기억 B 세포, 나이브 B 세포; 및 1차 세포로부터 선택되는, 세포 개체군.

청구항 15

청구항 14에 있어서, 상기 세포는 T 세포인, 세포 개체군.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 T 세포는 중앙 침윤 림프구(TIL), 알파-베타 TCR을 발현하는 T 세포, 감마-델타 TCR을 발현하는 T 세포, 조절 T 세포(Treg), 기억 T 세포, 및 초기 줄기 세포 기억 T 세포(Tscm, CD27+/CD45+)로부터 선택되는, 세포 개체군.

청구항 17

청구항 13에 있어서, 상기 세포 개체군은 편집 전 인간 공여자 PBMC 또는 류코팩으로부터 단리된, 세포 개체군.

청구항 18

청구항 1 내지 17 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 개체군은 편집 전 전구 세포로부터 유래된, 세포 개체군.

청구항 19

청구항 15에 있어서, 상기 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 내인성 T 세포 수용체(TCR) 서열의 게놈 편집을 포함하는, 세포 개체군.

청구항 20

청구항 15 내지 19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 게놈 편집은 표적화 리간드 또는 대체 항원 결합 모이어티를 암호화하는 외인성 핵산의 삽입을 포함하고, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 70%는 외인성 핵산의 표적 서열로의 삽입을 포함하는, 세포 개체군.

청구항 21

청구항 15 내지 20 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포 개체군은 편집된 T 세포를 포함하고, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%는 기억 표현형(CD27+, CD45RA+)을 갖는, 세포 개체군.

청구항 22

청구항 1 내지 21 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 비-활성화된 면역 세포인, 세포 개체군.

청구항 23

청구항 1 내지 22 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 활성화된 면역 세포인, 세포 개체군.

청구항 24

청구항 1 내지 23 중 어느 한 항에 있어서, 다중 게놈 편집을 포함하는 상기 세포가 적어도 3개의 게놈 편집을 포함하는, 세포 개체군.

청구항 25

청구항 1 내지 24 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 인간 대상체로의 전달을 위한, 세포 개체군.

청구항 26

시험관내-배양된 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 방법으로서,

a. 세포를 시험관 내에서 적어도 제1 지질 나노입자(LNP) 조성물 및 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제1 LNP 조성물이 제1 표적 서열에 대한 제1 가이드 RNA(gRNA) 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하고, 제2 LNP 조성물이 제1 표적 서열과 상이한 제2 표적 서열에 대한 제2 gRNA 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계; 및

b. 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계;

에 의해 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 27

생체외-배양된 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 방법으로서,

a. 세포를 시험관 내에서 적어도 제1 지질 나노입자(LNP) 조성물 및 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제1 LNP 조성물이 제1 표적 서열에 대한 제1 가이드 RNA(gRNA) 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하고, 제2 LNP 조성물이 제1 표적 서열과 상이한 제2 표적 서열에 대한 제2 gRNA 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계; 및

b. 세포를 생체 외에서 배양하는 단계

에 의해 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 28

청구항 26 또는 27에 있어서, 상기 세포는 게놈 편집 도구를 포함하는 적어도 하나의 LNP 조성물과 접촉되는, 방법.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 상기 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제를 암호화하는 핵산을 포함하는, 방법.

청구항 30

청구항 26 내지 29 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 표적 서열에 삽입하기 위해 공여자 핵산과 추가로 접촉되는, 방법.

청구항 31

청구항 26 내지 30 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 순차적으로 투여되는, 방법.

청구항 32

청구항 26 내지 31 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 동시에 투여되는, 방법.

청구항 33

지질 나노입자(LNP) 조성물을 시험관내-배양된 세포의 개체군에 전달하기 위한 방법으로서,

- a. 세포의 개체군을 시험관 내에서 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 LNP 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포의 개체군을 생성하는 단계;
- b. 상기 접촉된 세포의 개체군을 시험관 내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포의 개체군을 생성하는 단계;
- c. 세포의 개체군 또는 배양된 접촉된 세포의 개체군을 시험관 내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계로서, 상기 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및
- d. 세포의 개체군을 시험관 내에서 확장하는 단계

를 포함하고,

상기 확장된 세포의 개체군은 적어도 70%의 생존율을 나타내는, 방법.

청구항 34

청구항 33에 있어서, 상기 확장된 세포의 개체군은 확장 24시간에 적어도 70%, 80%, 90% 또는 95%의 생존율을 갖는, 방법.

청구항 35

지질 나노입자(LNP) 조성물을 시험관내-배양된 세포의 개체군에 전달하는 방법으로서,

- a. 세포의 개체군을 시험관 내에서 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 LNP 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포의 개체군을 생성하는 단계;
- b. 상기 접촉된 세포의 개체군을 시험관 내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포의 개체군을 생성하는 단계; 및
- c. 세포의 개체군 또는 배양된 접촉된 세포의 개체군을 시험관 내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계로서, 상기 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계

를 포함하고,

상기 세포의 개체군 내 세포의 적어도 70%, 80%, 90%, 또는 95%가 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있는, 방법.

청구항 36

청구항 26 내지 35 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 2~12개의 LNP 조성물, 2~8개의 LNP 조성물, 2~6개의 LNP 조성물, 3~8개의 LNP 조성물, 3~6개의 LNP 조성물, 4~6개의 LNP 조성물, 6~12개의 LNP 조성물 또는 3, 4, 5, 또는 6개의 LNP 조성물과 접촉되는, 방법.

청구항 37

청구항 26 내지 36 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 개체군이 LNP 조성물과 동시에 접촉되는, 방법.

청구항 38

청구항 26 내지 37 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 개체군이 6개 이하의 LNP 조성물과 동시에 접촉되는, 방법.

청구항 39

청구항 26 내지 38 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포의 개체군이 2개 이하의 LNP 조성물과 동시에 접촉되는, 방법.

청구항 40

세포의 개체군에서 유전자 편집을 위한 방법으로서,

- a. 세포의 개체군을 시험관 내에서 제1 게놈 편집 도구를 포함하는 제1 지질 나노입자(LNP) 조성물 및 제2 게놈

편집 도구를 포함하는 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계; 및

b. 세포의 개체군을 시험관 내에서 확장하는 단계

에 의해 세포의 개체군을 편집하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 41

세포의 개체군에서 유전자 편집을 위한 방법으로서,

a. 세포의 개체군을 시험관 내에서 제1 게놈 편집 도구를 포함하는 제1 지질 나노입자(LNP) 조성물 및 제2 게놈 편집 도구를 포함하는 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계; 및

b. 세포의 개체군을 시험관 내에서 배양하는 단계로서, 세포의 개체군내 세포의 적어도 70%, 80%, 90%, 또는 95%가 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있는 단계

에 의해, 세포의 개체군을 편집하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 42

청구항 40 또는 41에 있어서, 상기 제1 게놈 편집 도구는 가이드 RNA를 포함하는, 방법.

청구항 43

청구항 40 내지 42 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 시험관 내에서 게놈 편집 도구를 포함하는 제3 LNP 조성물과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 적어도 2개의 LNP 조성물은 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 44

청구항 40 내지 43 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 LNP 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함하는, 방법.

청구항 45

청구항 44에 있어서, 상기 RNA-가이드 DNA 결합제가 Cas9인, 방법.

청구항 46

청구항 40 내지 45 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포를 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 47

청구항 40 내지 46 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 게놈 편집 도구가 RNA-가이드 DNA 결합제, 예컨대 스트렙 토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*) Cas9인, 방법.

청구항 48

청구항 26 내지 47 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 면역 세포, 선택적으로 중간엽 줄기 세포; 조혈모 세포(HSC); 단핵 세포; 내피 전구 세포(EPC); 신경 줄기 세포(NSC); 운부 줄기 세포(LSC); 조직-특이적 1차 세포 또는 그로부터 유래된 세포(TSC), 유도 만능 줄기 세포(iPSC); 안구 줄기 세포; 만능 줄기 세포(PSC); 배아 줄기 세포(ESC); 장기 또는 조직 이식용 세포, 및 선택적으로 ACT 요법에 사용하기 위한 세포인, 방법.

청구항 49

청구항 26 내지 48 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 림프구, 선택적으로 T 세포, B 세포, 자연 살해 세포("NK 세포", 및 NKT 세포, 또는 iNKT 세포)), 단핵구, 대식세포, 비만 세포, 수지상 세포, 과립구(예를 들어, 호중구, 호산구, 및 호염기구), 1차 면역 세포, CD3+ 세포, CD4+ 세포, CD8+ T 세포, 조절 T 세포(Tregs), B 세포, NK 세포, 및 수지상 세포(DC)인, 방법.

청구항 50

청구항 26 내지 49 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 T 세포인, 방법.

청구항 51

청구항 26 내지 50 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 비-활성화된 세포인, 방법.

청구항 52

청구항 26 내지 50 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 활성화된 세포인, 방법.

청구항 53

청구항 26 내지 50 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (a)의 세포는 적어도 하나의 LNP 조성물과 접촉된 후 활성화되는, 방법.

청구항 54

청구항 40 내지 53 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 단일 게놈 편집을 생성하는, 방법.

청구항 55

시험관내-배양된 T 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 방법으로서,

- a. T 세포를 시험관 내에서 (i) 제1 표적 서열에 대한 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 제1 지질 나노입자(LNP) 조성물 및 선택적으로 (ii) 1 또는 2개의 추가적인 LNP 조성물과 접촉시키는 단계로서, 각각의 추가의 LNP 조성물이 제1 표적 서열 및/또는 게놈 편집 도구와 상이한 표적 서열에 대한 gRNA를 포함하는, 단계;
- b. T 세포를 시험관 내에서 활성화시키는 단계;
- c. 활성화된 T 세포를 시험관 내에서 (i) (a)의 표적 서열(들)과 상이한 표적 서열에 대한 추가의 가이드 RNA를 포함하는 추가의 LNP 조성물 및 선택적으로 (ii) 하나 이상의 LNP 조성물과 접촉시키는 단계로서, 각각의 LNP 조성물이 (a)의 표적 서열(들)과 상이하고, 서로 상이한 표적 서열에 대한 가이드 RNA 및/또는 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계;
- d. 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계

에 의해 T 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 56

청구항 26 내지 55 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포 또는 T 세포를 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11개의 LNP 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 57

청구항 26 내지 56 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포 또는 T 세포를 4~12 또는 4~8개의 LNP 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 58

청구항 55 내지 57 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 세포 또는 T 세포는 2개의 LNP 조성물과 접촉되며, 여기서 LNP 조성물은 순차적으로 또는 동시에 투여되는, 방법.

청구항 59

청구항 55 내지 58 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (a)의 세포 또는 T 세포는 3개의 LNP 조성물과 접촉되며, 여기서 LNP 조성물은 (i) 순차적으로; (ii) 동시에; 또는 (iii) 동시에 (2개의 조성물) 및 순차적으로 (전 또는 후에 투여되는 1개의 조성물) 투여되는, 방법.

청구항 60

청구항 55 내지 59 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (c)의 세포 또는 T 세포는 1~8개의 LNP 조성물, 선택적

으로 1~4개의 LNP 조성물과 접촉되며, 여기서 LNP 조성물은 (i) 순차적으로; (ii) 동시에; 또는 (iii) 동시에 (2개의 조성물) 및 순차적으로 (전 또는 후에 투여되는 1개의 조성물) 투여되는, 방법.

청구항 61

청구항 26 내지 60 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 2~8 또는 2~6개의, 선택적으로, 2~5, 3~5 또는 3~6개의 LNP 조성물과 동시에 접촉되는, 방법.

청구항 62

1차 세포를 유전적으로 변형시키는 방법으로서,

- a. 세포 배양 배지에서 1차 세포를 배양하는 단계;
- b. 핵산을 포함하는 지질 나노입자(LNP) 조성물을 제공하는 단계;
- c. 시험관 내에서 (a)의 1차 세포를 (b)의 LNP 조성물과 조합하는 단계;
- d. 선택적으로, 1차 세포가 유전적으로 변형되었는지 확인하는 단계; 및
- e. 선택적으로, 1차 세포를 증식시키는 단계

를 포함하는, 방법.

청구항 63

청구항 62에 있어서, 상기 1차 세포는 1차 면역 세포인, 방법.

청구항 64

청구항 63에 있어서, 비-활성화된 면역 세포에서 조합 단계 (c)를 수행하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 65

청구항 62 또는 63에 있어서, 활성화된 면역 세포에서 조합 단계 (c)를 수행하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 66

청구항 64에 있어서, 단계 (c) 후에 면역 세포를 활성화시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 67

청구항 62 또는 63에 있어서,

- (b2) 제2 핵산을 포함하는 제2 LNP 조성물을 제공하는 단계;
 - (c2) 단계 (c)의 유전적으로 변형된 세포를 제2 LNP 조성물과 시험관 내에서 조합하는 단계;
 - (d2) 선택적으로, 유전적 변형을 위한 제2 핵산을 사용하여, 세포가 유전적으로 변형되었는지 확인하는 단계; 및
 - 선택적으로, 세포를 증식시키는 단계
- 를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 68

청구항 67에 있어서,

- (b3) 제3 핵산을 포함하는 제3 LNP 조성물을 제공하는 단계;
- (c3) 단계 (c2)의 유전적으로 변형된 세포를 제3 LNP 조성물과 시험관 내에서 조합하는 단계;
- (d2) 선택적으로, 유전적 변형을 위한 제3 핵산을 사용하여, 세포가 유전적으로 변형되었는지 확인하는 단계; 및

(e) 선택적으로, 세포를 증식시키는 단계
를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 69

청구항 67 또는 68에 있어서, 단계 (c) 및 (c2), 및 존재하는 경우 단계 (c3)가 순차적으로 수행되는, 방법.

청구항 70

청구항 67 또는 68에 있어서, 단계 (c) 및 (c2), 및 존재하는 경우 단계 (c3)가 동시에 수행되는, 방법.

청구항 71

청구항 62 내지 70 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 72

청구항 62 내지 71 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 핵산 게놈 편집 도구를 포함하는, 방법.

청구항 73

청구항 72에 있어서, 상기 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제, 선택적으로 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 핵산을 포함하는, 방법.

청구항 74

청구항 26 내지 73 중 어느 한 항에 있어서, 상기 시험관내 배양된 세포가 인간 세포인, 방법.

청구항 75

청구항 26 내지 74 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 배양되거나, 확장되거나, 생체외에서 증식되는, 방법.

청구항 76

청구항 26 내지 75 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 2개의 LNP 조성물이 순차적으로 투여되고, 여기서 순차적 투여가 투여로부터 10시간, 12시간, 24시간, 48시간, 또는 72시간을 포함하는 시간 동안 세포를 배양하는 단계, 또는 LNP 조성물을 세포에 제공하고 후속 LNP 조성물을 세포에 제공하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 77

청구항 26 내지 76 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 적어도 20배, 30배, 40배 또는 50배 증식 또는 확장되고, 선택적으로 여기서 확장 또는 증식이 편집 개시 후 배양에서 14일 이내인, 방법.

청구항 78

청구항 26 내지 77 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 2% 미만 전좌, 1% 미만 전좌, 0.5% 미만 전좌, 또는 0.1% 미만 전좌를 포함하고, 상기 전좌는 선택적으로 표적-표적 전좌; 또는 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만인, 방법.

청구항 79

청구항 26 내지 78 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 적어도 70%, 80%, 또는 90%가 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있는, 방법.

청구항 80

청구항 26 내지 79 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구 또는 gRNA가 RNA를 포함하는, 방법.

청구항 81

청구항 26 내지 80 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 가이드 RNA(gRNA)를 포함하

는, 방법.

청구항 82

청구항 26 내지 81 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구 또는 gRNA는 sgRNA를 포함하는, 방법.

청구항 83

청구항 26 내지 82 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구 또는 gRNA는 dgRNA를 포함하는, 방법.

청구항 84

청구항 26 내지 83 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 mRNA를 포함하는, 방법.

청구항 85

청구항 26 내지 84 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 게놈 편집 도구를 암호화하는 mRNA를 포함하는, 방법.

청구항 86

청구항 26 내지 85 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 공여자 핵산을 포함하는, 방법.

청구항 87

청구항 26 내지 86 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함하는, 방법.

청구항 88

청구항 26 내지 87 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함하고, 그리고 RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas 뉴클레아제인, 방법.

청구항 89

청구항 26 내지 88 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함하고, 그리고 RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas9인, 방법.

청구항 90

청구항 26 내지 89 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함하고, 그리고 RNA-가이드 DNA 결합제는 스트렙토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*) Cas9인, 방법.

청구항 91

청구항 26 내지 90 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함하고, 그리고 RNA-가이드 DNA 결합제는 Cpf1인, 방법.

청구항 92

청구항 87 내지 91 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA-가이드 DNA 결합제는 닉카제인, 방법.

청구항 93

청구항 92에 있어서, 상기 닉카제는 데아미나제인, 방법.

청구항 94

청구항 87 내지 91 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA-가이드 DNA 결합제는 클레아바제인, 방법.

청구항 95

청구항 94에 있어서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 클레아바제 및 2개 이하의 가이드 RNA와 동시에 접촉되는, 방법.

청구항 96

청구항 26 내지 95 중 어느 한 항에 있어서, 세포를 DNA-의존성 단백질 키나제 억제제(DNA-PKi)와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 97

청구항 96에 있어서, 상기 DNA-PKi는 화합물 1 및 화합물 4로부터 선택되는, 방법.

청구항 98

청구항 26 내지 97 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 99

청구항 26 내지 98 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 여기서, 하나 이상의 공여자 핵산은 벡터를 포함하는, 방법.

청구항 100

청구항 26 내지 99 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 여기서, 하나 이상의 공여자 핵산은 바이러스 벡터를 포함하는, 방법.

청구항 101

청구항 26 내지 100 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 여기서, 하나 이상의 공여자 핵산은 렌티바이러스 벡터 또는 선택적으로 레트로바이러스 벡터를 포함하는, 방법.

청구항 102

청구항 26 내지 101 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 여기서, 하나 이상의 공여자 핵산은 AAV를 포함하는, 방법.

청구항 103

청구항 26 내지 102 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 여기서, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 LNP 조성물에 제공되는, 방법.

청구항 104

청구항 26 내지 103 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 상동성 재조합에 의해 통합되는, 방법.

청구항 105

청구항 26 내지 104 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 표적 서열의 전부 또는 일부에 대해 상동성인 측접 핵산 영역을 포함하는, 방법.

청구항 106

청구항 26 내지 105 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 평활 말단 삽입에 의해 통합되는, 방법.

청구항 107

청구항 26 내지 106 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 비-상동성 말단 결합에 의해 통합되는, 방법.

청구항 108

청구항 26 내지 107 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산이 세이프 하버 유전자좌에 삽입되는, 방법.

청구항 109

청구항 26 내지 108 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 T 세포 수용체 서열의 상응하는 영역과 상동성을 갖는 영역을 포함하는, 방법.

청구항 110

청구항 26 내지 109 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 TRAC 유전자좌, B2M 유전자좌, AAVS1 유전자좌, 및/또는 CIITA 유전자좌, 또는 선택적으로 TRBC 유전자좌의 상응하는 영역과 상동성을 갖는 영역을 포함하는, 방법.

청구항 111

청구항 26 내지 110 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA를 포함하는, 방법.

청구항 112

청구항 111에 있어서, 상기 LNP 조성물은 2~6개의 가이드 RNA, 선택적으로 2~5개, 2~4개, 또는 3~5개의 가이드 RNA를 포함하는, 방법.

청구항 113

청구항 26 내지 112 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 적어도 하나는 RNA-가이드 DNA 결합제, 예컨대 Cas9, 선택적으로 스트렙토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*) Cas9를 암호화하는 mRNA를 포함하는, 방법.

청구항 114

청구항 26 내지 113 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합제, 예컨대 Cas9, 선택적으로 스트렙토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*) Cas9를 암호화하는 mRNA를 포함하는, 방법.

청구항 115

청구항 26 내지 114 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 116

청구항 26 내지 115 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 117

청구항 26 내지 116 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 MHC 클래스 I의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 118

청구항 26 내지 117 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함하는,

방법.

청구항 119

청구항 26 내지 118 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 HLA-A의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 120

청구항 26 내지 119 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 HLA-A를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 121

청구항 120에 있어서, 상기 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성인, 방법.

청구항 122

청구항 26 내지 121 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 MHC 클래스 II의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 123

청구항 26 내지 122 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 124

청구항 26 내지 123 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, LNP 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 125

청구항 26 내지 124 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, LNP 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 LNP 조성물은 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 126

청구항 26 내지 125 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, LNP 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 LNP 조성물은 HLA-A를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 127

청구항 26 내지 126 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, LNP 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 LNP 조성물은 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함하고, 그리고 추가의 LNP 조성물은 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 128

청구항 26 내지 127 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, LNP 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 LNP 조성물은 HLA-A를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 그리고 추가의 LNP 조성물은 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 129

청구항 26 내지 128 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 T 세포이고, 여기서 개체군 내 세포의 적어도 95%가 내인성 T 세포 수용체(TCR) 서열의 게놈 편집을 포함하는, 방법.

청구항 130

청구항 26 내지 129 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 T 세포이고, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 30%, 40%, 선택적으로 50%, 55%, 60%, 65%는 기억 표현형(CD45+/CD27+)을 갖는, 방법.

청구항 131

청구항 26 내지 130 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 T 세포이고, 세포가 편집 후 반복 자극에 반응하는, 방법.

청구항 132

청구항 26 내지 131 중 어느 한 항에 있어서, 상기 게놈 편집은 개체군 세포의 70%, 75%, 80%, 또는 85%에서 표적화 리간드 또는 대체 항원 결합 모이어티를 암호화하는 이중 서열의 삽입을 포함하는, 방법.

청구항 133

청구항 26 내지 132 중 어느 한 항에 있어서, 퍼센트 편집 효율은 각 표적 부위에서 적어도 60%, 70%, 선택적으로 적어도 80%, 90%, 또는 95%인, 방법.

청구항 134

청구항 26 내지 133 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 선택 단계를 포함하지 않는, 방법.

청구항 135

청구항 26 내지 133 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법은 선택 단계를 포함하고, 상기 선택 단계는 선택적으로 물리적 분류 단계 또는 생화학적 선택 단계를 포함하는 방법.

청구항 136

청구항 26 내지 135 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP는 1~250 nm, 10~200 nm, 20~150 nm, 50~150 nm, 50~100 nm, 50~120 nm, 60~100 nm, 75~150 nm, 75~120 nm, 또는 75~100 nm의 직경을 갖는, 방법.

청구항 137

청구항 26 내지 136 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 약 10~200 nm, 약 20~150 nm, 약 50~150 nm, 약 50~100 nm, 약 50~120 nm, 약 60~100 nm, 약 75~150 nm, 약 75~120 nm, 또는 약 75~100 nm의 평균 직경을 갖는 LNP의 개체군을 포함하는, 방법.

청구항 138

청구항 26 내지 137 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP는 100 nm 미만의 직경을 갖는, 방법.

청구항 139

청구항 26 내지 138 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 이온화가능한 지질을 포함하는, 방법.

청구항 140

청구항 26 내지 139 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이온화가능한 지질은 생분해성 이온화가능한 지질을 포함하는, 방법.

청구항 141

청구항 26 내지 140 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이온화가능한 지질은 약 5.1 내지 약 7.4, 예컨대 약 5.5 내지 약 6.6, 약 5.6 내지 약 6.4, 약 5.8 내지 약 6.2, 또는 약 5.8 내지 약 6.5의 범위의 pKa 범위의 PK 값을 갖는, 방법.

청구항 142

청구항 26 내지 141 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 아민 지질을 포함하는, 방법.

청구항 143

청구항 26 내지 142 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 아민 지질을 포함하고, 아민 지질은 지질 A 또는 그의 아세탈 유사체 또는 지질 D인, 방법.

청구항 144

청구항 26 내지 143 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 헬퍼 지질을 포함하는, 방법.

청구항 145

청구항 26 내지 144 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물의 N/P 비율은 약 6인, 방법.

청구항 146

청구항 26 내지 145 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 아민 지질, 헬퍼 지질, 및 PEG 지질을 포함하는, 방법.

청구항 147

청구항 26 내지 146 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 아민 지질, 헬퍼 지질, 중성 지질, 및 PEG 지질을 포함하는, 방법.

청구항 148

청구항 26 내지 147 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은 약 50~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 8~10 mol% 중성 지질; 및 약 2.5~4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 LNP 조성물의 N/P 비율은 약 3~7인, 방법.

청구항 149

청구항 26 내지 148 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은 약 25~45 mol% 아민 지질, 예컨대 지질 A; 약 10~30 mol% 중성 지질; 약 25~65 mol% 헬퍼 지질; 및 약 1.5~3.5 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 LNP 조성물의 N/P 비율은 약 3~7인, 방법.

청구항 150

청구항 149에 있어서, 상기 아민 지질의 양은 지질 성분의 약 29~38 mol%이고; 지질 성분의 약 30~43 mol%이고; 또는 지질 성분의 약 25~34 mol%이고; 선택적으로 지질 성분의 약 33 mol%인, 방법.

청구항 151

청구항 149 또는 150에 있어서, 상기 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 11~20 mol%이고, 선택적으로 지질 성분의 약 15 mol%인, 방법.

청구항 152

청구항 149 내지 151 중 어느 한 항에 있어서, 상기 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 43~65 mol%이고; 또는 지질 성분의 약 43~55 mol%이고; 선택적으로 지질 성분의 약 49 mol%인, 방법.

청구항 153

청구항 149 내지 152 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 2.0~3.5 mol%이고; 지질 성분의 약 2.3~3.5 mol%이고; 또는 지질 성분의 약 2.3~2.7 mol%이고; 지질 성분의 약 2.7 mol%인, 방법.

청구항 154

청구항 149 내지 153 중 어느 한 항에 있어서,

- a. 아민 지질의 양은 지질 성분의 약 29~44 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 11~28 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 28~55 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 2.3~3.5 mol%이거나;
- b. 아민 지질의 양은 지질 성분의 약 29~38 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 11~20 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 43~55 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 2.3~2.7 mol%이거나;
- c. 아민 지질의 양은 지질 성분의 약 25~34 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10~20 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 45~65 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 2.5~3.5 mol%이거나; 또는
- d. 아민 지질의 양은 지질 성분의 약 30~43 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10~17 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 43.5~56 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1.5~3 mol%인, 방법.

청구항 155

청구항 26 내지 154 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은 약 25~50 mol% 아민 지질, 예컨대 지질 D; 약 7~25 mol% 중성 지질; 약 39~65 mol% 헬퍼 지질; 및 약 0.5~1.8 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 LNP 조성물의 N/P 비율은 약 3~7인, 방법.

청구항 156

청구항 155에 있어서, 상기 아민 지질의 양은 지질 성분의 약 30~45 mol%이거나; 또는 지질 성분의 약 30~40 mol%이거나; 선택적으로 지질 성분의 약 30 mol%, 40 mol%, 또는 50 mol%인, 방법.

청구항 157

청구항 155 또는 156에 있어서, 상기 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10~20 mol%이고; 또는 지질 성분의 약 10~15 mol%이고; 선택적으로 지질 성분의 약 10 mol% 또는 15 mol%인, 방법.

청구항 158

청구항 155 내지 157 중 어느 한 항에 있어서, 상기 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 50~60 mol%이고; 지질 성분의 약 39~59 mol%이고; 또는 지질 성분의 약 43.5~59 mol%이고; 선택적으로 지질 성분의 약 59 mol%이고; 지질 성분의 약 43.5 mol%이고; 또는 지질 성분의 약 39 mol%인, 방법.

청구항 159

청구항 155 내지 158 중 어느 한 항에 있어서, 상기 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 0.9~1.6 mol%이고; 또는 지질 성분의 약 1~1.5 mol%이고; 선택적으로 지질 성분의 약 1 mol% 또는 지질 성분의 약 1.5 mol%인, 방법.

청구항 160

청구항 155 내지 159 중 어느 한 항에 있어서,

- a. 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 27~40 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10~20 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 50~60 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 0.9~1.6 mol%이거나;
- b. 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 30~45 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10~15 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 39~59 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1~1.5 mol%이거나;
- c. 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 30 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 59 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1 mol%이거나;
- d. 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 40 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 15 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 43.5 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1.5 mol%이거나; 또는
- e. 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 50 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 39 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1 mol%인, 방법.

청구항 161

청구항 142 내지 161 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아민 지질은 지질 A인, 방법.

청구항 162

청구항 141 내지 161 중 어느 한 항에 있어서, 상기 아민 지질은 지질 D인, 방법.

청구항 163

청구항 147 내지 162 중 어느 한 항에 있어서, 상기 중성 지질은 DSPC인, 방법.

청구항 164

청구항 146 내지 163 중 어느 한 항에 있어서, 상기 스텔스 지질이 PEG2k-DMG인, 방법.

청구항 165

청구항 144 내지 164 중 어느 한 항에 있어서, 상기 헬퍼 지질이 콜레스테롤인, 방법.

청구항 166

청구항 26 내지 165 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 세포와 접촉하기 전에 혈청 인자로 전처리되고, 선택적으로 혈청 인자는 영양류 혈청 인자, 선택적으로 인간 혈청 인자인, 방법.

청구항 167

청구항 26 내지 166 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 세포와 접촉하기 전에 인간 혈청으로 전처리되는, 방법.

청구항 168

청구항 26 내지 167 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 세포와 접촉하기 전에 ApoE로 전처리되고, 선택적으로 ApoE는 인간 ApoE인, 방법.

청구항 169

청구항 26 내지 168 중 어느 한 항에 있어서, 상기 LNP 조성물은 세포와 접촉하기 전에 재조합 ApoE3 또는 ApoE4로 전처리되고, 선택적으로 ApoE3 또는 ApoE4는 인간 ApoE3 또는 ApoE4인, 방법.

청구항 170

청구항 26 내지 169 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조되거나 수득가능한 세포 개체군.

청구항 171

청구항 170에 있어서, 세포 또는 세포의 개체군을 제2 LNP 조성물과 접촉시킨 후 24시간 후에 세포의 적어도 70%가 생존하는, 세포 개체군.

청구항 172

치료 방법 또는 약제학적 조성물에 있어서의 청구항 1 내지 25 또는 170 내지 171 중 어느 한 항의 세포 개체군의 용도.

청구항 173

청구항 172에 있어서, 치료 방법 또는 약제학적 조성물이 암 치료 또는 자가면역 치료법을 위한 것인, 세포 개체군의 용도.

청구항 174

청구항 173에 있어서, 상기 치료 방법 또는 약제학적 조성물이 입양 세포 전달 요법을 위한 것인, 세포 개체군의 용도.

청구항 175

청구항 26 내지 169 중 어느 한 항에 따른 방법을 사용하여, 세포, 선택적으로, 면역 세포를 유전적으로 변형하여, 유전적으로 변형된 세포 개체군을 얻는 단계 및 상기 유전적으로 변형된 세포를 세포 은행에 전달하는 단계를 포함하는, 세포 은행의 생성 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 시험관내 세포 내로 다중 유전자 편집을 도입하는 능력은 유전자 편집 및 임상 치료 적용을 위한 관심대상이다. 예를 들어, 유전적으로 변형된 면역 세포를 사용하는 입양 세포 치료 접근법은 세포 계통과 면역 체계 방어를 재구성하기 위해 암을 비롯한 다양한 병태와 질환을 치료하는 매력적인 방식이 되었다. 그러나, 세포 제품 요법의 임상 적용은 부분적으로 복잡한 유전 공학 요건으로 인해 도전적이었다. 여러 속성을 단일 세포로 조작하는 능력은 생존력과 원하는 세포 표현형을 유지하면서 녹아웃 및 유전자좌 삽입을 포함하여 여러 표적화된 유전자에서 편집을 효율적으로 수행하는 능력에 달려 있다.
- [0002] CRISPR/Cas9 게놈 편집은 매우 효율적인 것으로 입증되었지만, 상이한 유전자좌에서의 동시 편집은 더 불량한 세포 생존, 증가된 전위를 초래하여, 세포 생성물의 품질 및 안전성을 잠재적으로 손상시키고 편집 횟수가 증가함에 따라 유전자 편집 효율성이 증가한다. 전기천공법을 포함한 기존의 세포 조작 기술은, 세포에 대한 누적 독성으로 인해 순차적 편집 공정을 사용하여 필요한 세포 품질 및 수율을 제공하는 데 한계가 있다. 더욱이, 예를 들어, T 세포를 포함하는 특정 세포 유형은 시험관내 영구 다중 편집에 특히 어려운 것으로 입증되었다.
- [0003] 따라서, 다중 게놈 편집 도구를 세포에 전달하고 유전자 편집을 수행하기 위한 보다 안전한 방법이 필요하다.
- [0004] 본원에 제공된 방법은 게놈 편집 도구의 보다 안전한 전달 및 전통적인 방법에 비해 실질적인 이점을 제공하는 다중 게놈 편집 적용을 위해 지질 핵산 어셈블리 조성물(예를 들어, 지질 나노입자("LNP"))을 사용하는 것을 포함한다.
- [0005] 일부 구현예에서, 방법은 더 낮은 독성 프로파일, 더 적은 전위, 더 큰 생존 및 확장을 갖는 세포를 생성함으로써 제조에 필요한 시간을 단축하고 수율을 증가시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 시험관내 T 세포에서 매우 효율적인 다중 편집을 제공하여 내인성 T 세포 수용체(TCR)를 치료용 TCR로 대체하여, 증가된 사이토카인 생산, 유리한 초기-줄기 세포 기억 표현형, 및 항원-특이적 자극을 통한 지속적인 증식을 갖는 조작된 T 세포를 생성한다.
- 도면의 간단한 설명**
- [0006] 도 1은 편집 후 배양물에서 10일 후 AAV가 있거나 없는, 전기천공(EP) 또는 지질 나노입자(LNP)로 처리된 T 세포의 배수 확장을 나타낸다.
- 도 2는 편집 후 7일째에 AAV가 있거나 없는, 전기천공(EP) 또는 지질 나노입자(LNP)로 처리된 CD3+Vb8+ TCR T 세포(CD8+ 및 CD4+에 게이팅됨)의 백분율을 나타낸다.
- 도 3은 편집 후 7일째에 AAV가 있거나 없는, 전기천공(EP) 또는 지질 나노입자(LNP)로 처리된 잔류 내인성 TCR 발현(CD3+Vb8-) T 세포(CD8+ 및 CD4+에 게이팅됨)의 백분율을 나타낸다.
- 도 4는 EP-처리된 T 세포 및 LNP-처리된 T 세포에서 유세포 분석법(CD27+, CD45RA+)에 의한 초기 줄기-세포 기억 표현형 CD8+ T 세포에 대한 염색을 나타낸다.
- 도 5는 VLD 펩티드로 펄스된 OCI-AML2 세포와의 공동-배양에서 WT1 TCR 조작된 T 세포(EP-처리 대 LNP-처리)의 IL-2 분비를 나타낸다.
- 도 6은 K562 HLA-A*02:01 양성 세포와의 공동-배양에서 WT1 TCR 조작된 T 세포(EP-처리 대 LNP-처리)의 IFN γ 분비를 나타낸다.
- 도 7은 K562 HLA-A*02:01 양성 세포의 WT1 TCR 조작된 T 세포(EP-처리 대 LNP-처리)에 의한 특이적 용해를 나타낸다.

도 8은 VLD 펩티드로 펄스된 OCI-AML3 표적 세포와 공동-배양될 때 EP-처리 대 LNP-처리 WT1 TCR 조작된 T 세포에 대한 반복된 자극 후 증식(누적 배수 변화로서)을 나타낸다.

도 9는 전기천공("EP"), 동시 LNP("SIM"), 순차 공정 1(2.5 μ g/ml LNP)("BF2.5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 2(5 μ g/ml LNP)("BF5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 3(2.5 μ g/ml LNP)("AF"; TRAC 표적화, 그 다음 TRBC 표적화)에 의한 편집 후 T 세포의 확장을 나타낸다.

도 10은 전기천공("EP"), 동시 LNP("SIM"), 순차 공정 1(2.5 μ g/ml LNP)("BF2.5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 2(5 μ g/ml LNP)("BF5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 3(2.5 μ g/ml LNP)("AF"; TRAC 표적화, 그 다음 TRBC 표적화)에 의한 편집 후 이식유전자 TCR(tgTCR) 삽입율(%Vb8+, CD3+)을 나타낸다.

도 11은 전기천공("EP"), 동시 LNP("SIM"), 순차 공정 1(2.5 μ g/ml LNP)("BF2.5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 2(5 μ g/ml LNP)("BF5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 3(2.5 μ g/ml LNP)("AF"; TRAC 표적화, 그 다음 TRBC 표적화)에 의한 편집 후 내인성 TCR을 보유하는 CD8+ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 12는 전기천공("EP"), 동시 LNP("SIM"), 순차 공정 1(2.5 μ g/ml LNP)("BF2.5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 2(5 μ g/ml LNP)("BF5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 3(2.5 μ g/ml LNP)("AF"; TRAC 표적화, 그 다음 TRBC 표적화)에 의한 편집 후 기억 표현형(CD27+)과 관련된 조작된 T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 13a-b는 전기천공("EP"), 동시 LNP("SIM"), 순차 공정 1(2.5 μ g/ml LNP)("BF2.5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 2(5 μ g/ml LNP)("BF5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 3(2.5 μ g/ml LNP)("AF"; TRAC 표적화, 그 다음 TRBC 표적화)에 의한 편집 후 조작된 T-세포내 TRAC-TRBC 전좌된 세포 및 TRBC 유전자좌로의 TCR 삽입된 세포의 백분율을 나타내며; TRAC 프로브로 검출된 전좌는 도 13a에 나타나 있고, TRBC 프로브로 검출된 전좌는 도 13b에 나타나 있다.

도 14a-b는 전기천공("EP"), 동시 LNP("SIM"), 순차 공정 1(2.5 μ g/ml LNP)("BF2.5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 2(5 μ g/ml LNP)("BF5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 3(2.5 μ g/ml LNP)("AF"; TRAC 표적화, 그 다음 TRBC 표적화)에 의한 편집 후 조작된 T-세포내 TRBC-TRAC 전좌된 세포 및 TRBC 유전자좌로의 TCR 삽입된 세포의 백분율을 나타내며; TRAC 프로브로 검출된 전좌는 도 14a에 나타나 있고, TRBC 프로브로 검출된 전좌는 도 14b에 나타나 있다.

도 14c-d는 전기천공("EP"), 동시 LNP("SIM"), 순차 공정 1(2.5 μ g/ml LNP)("BF2.5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 2(5 μ g/ml LNP)("BF5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 3(2.5 μ g/ml LNP)("AF"; TRAC 표적화, 그 다음 TRBC 표적화)에 의한 편집 후 조작된 T-세포내 TRAC-TRBC 전좌된 세포의 백분율을 나타내며; TRAC 프로브로 검출된 전좌는 도 14c에 나타나 있고, TRBC 프로브로 검출된 전좌는 도 14d에 나타나 있다.

도 14e-f는 전기천공("EP"), 동시 LNP("SIM"), 순차 공정 1(2.5 μ g/ml LNP)("BF2.5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 2(5 μ g/ml LNP)("BF5"; TRBC 표적화, 그 다음 TRAC 표적화), 순차 공정 3(2.5 μ g/ml LNP)("AF"; TRAC 표적화, 그 다음 TRBC 표적화)에 의한 편집 후 조작된 T-세포내 TRBC-TRAC 전좌된 세포의 백분율을 나타내며; TRAC 프로브로 검출된 전좌는 도 14e에 나타나 있고, TRBC 프로브로 검출된 전좌는 도 14f에 나타나 있다.

도 15a-f는 루시퍼라제-기반 표적 세포 사멸 검정에 의해 평가된 WT1 TCR 조작된 T 세포의 T 세포 매개 세포독성을 나타낸다. 조작된 T 세포는 K562 세포(도 15a 및 도 15d), K562-A2.1 세포(도 15b 및 도 15e), 697-luc 세포(도 15c 및 도 15f)와 공동-배양되었다.

도 16은 유세포 분석법(EP-처리 대 LNP-처리)에 의해 평가된 바와 같은, 조작된 T 세포에 대한 tgTCR 삽입(Vb8+, CD3+) 비율을 나타낸다.

도 17은 유세포 분석법(EP-처리 대 LNP-처리)에 의해 평가된 바와 같은, 편집 후 삽입된 GFP(CD3-, GFP+)를 갖거나, 내인성 TCR(CD3+)을 보유하는 CD8+ T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 18은 편집 후(EP-처리 대 LNP-처리) 기억 표현형(CD27+, CD45RO-)과 관련된 조작된 T 세포의 백분율을 나타

낸다.

도 19는 조작된 T 세포로 처리한 후 NOG-hIL-2 마우스에서의 액상 종양 부담을 나타내며; 생물발광은 백혈병 종양 부담의 척도로 사용되었다.

도 20은 조작된 T 세포로 처리한 후 NOG-hIL-2 마우스의 생존율을 나타낸다.

도 21은 LNP 투여량에 대한 반응으로 유세포 분석법에 의한 β -2 마이크로글로불린(B2M) 음성 세포의 백분율(도 21a) 및 NGS에 의한 B2M 편집 퍼센트(도 21b)를 나타낸다.

도 22는 LNP 투여량에 대한 반응으로 유세포 분석법에 의한 TRAC 음성 세포의 백분율(도 22a) 및 NGS에 의한 TRAC 인델의 퍼센트(도 22b)를 나타낸다.

도 23은 MACS 처리 전(도 23a) 및 MACS 처리 후(도 23b) NGS에 의한 편집 백분율을 나타낸다.

도 24는 MACS 처리 전(도 24a) 및 MACS 처리 후(도 24b) 유세포 분석법에 의한 조작된 T 세포의 단백질 발현을 나타낸다.

도 25는 KromaTiD dGH 검정에 의한 조작된 세포에서의 염색체 구조 변이를 나타낸다.

도 26은 상이한 이온화가능한 지질 제형을 갖는 mRNA 및 gRNA 전달을 사용하여 편집된 T 세포에 대한 평균 편집 백분율(%인델로 표현됨)을 나타낸다.

도 27은 상이한 이온화가능한 지질 제형을 갖는 mRNA 및 gRNA 전달을 사용하여 편집된 T 세포에서 편집 고원에 도달하는 시간을 나타낸다.

도 28은 LNP 및 상이한 혈청 인자로 처리된 T 세포에서 유세포 분석법에 의한 CD3⁻ 세포의 백분율을 나타낸다.

도 29는 유세포 분석법에 의한 B2M 음성 T 세포(리포플렉스로 처리됨)의 빈도를 나타낸다.

도 30은 리포플렉스-처리된 T 세포의 편집 빈도(인델)를 나타낸다.

도 31은 LNP에 의한 Cas9 mRNA 및 gRNA의 전달을 나타내는, 활성화된 T 세포에서 퍼센트 편집에 대한 배지 조성의 효과를 나타낸다.

도 32는 LNP에 의한 Cas9 mRNA 및 gRNA의 전달을 나타내는, 비-활성화된 T 세포에서 퍼센트 편집에 대한 배지 조성의 효과를 나타낸다.

도 33은 RNA-가이드된 DNA 결합제 mRNA 및 gRNA를 전달하는 LNP로 처리된 림프아구성 세포에서의 편집 빈도를 나타낸다.

도 34는 RNA-가이드된 DNA 결합제 mRNA 및 gRNA를 전달하는 LNP로 처리된 B2M 음성 림프아구성 세포의 백분율을 나타낸다.

도 35는 LNP와의 동시 전달 후 유세포 분석법에 의한 다중 삼입(TCR 삼입 및 GFP 삼입)을 갖는 조작된 T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 36은 LNP와의 동시 전달 후 유세포 분석법에 의한 잔류 TCR 또는 잔류 HLA-ABC 발현을 갖는 조작된 T 세포의 백분율을 나타낸다.

도 37은 조작된 T 세포에 대한 전사 수준의 열 지도를 나타낸다.

도 38a-d는 조작된 WT1 T 세포 및 대조군으로 처리된 마우스에 대한 실험 도식 및 백혈병아세포 수준을 나타낸다. 도 38a는 생체내 실험의 타임라인 및 개략도를 나타낸다. 도 38b는 관련없는 MART1-TCR로 형질도입된 T 세포, 또는 어떠한 처리도 하지 않은 또 다른 대조군(백혈병아세포 단독)과 비교하여, 전기천공 공정 또는 LNP 공정으로 생성된 조작된 WT1-T 세포로 마우스를 처리할 때 AML 백혈병아세포가 성장했음을 나타낸다. 백혈병 발생은 시간 경과에 따라 혈액 마이크로리터당 세포로 측정되었다. 도 38c는 마우스 그룹의 치료 시 골수에서 총 살아있는 세포당 AML 세포의 백분율을 나타낸다. 도 38d는 마우스 그룹의 치료시 비장에서 총 살아있는 세포당 AML 세포의 백분율을 나타낸다.

도 39a-d는 다양한 수준의 BC22n(본원에 사용된 바와 같은 "BC22n"은 UGI가 없는 BC22를 의미함) mRNA 및 Cas9 mRNA로 처리될 때 T 세포의 편집 프로파일을 나타낸다. 세포는 개별 가이드 RNA G015995(도 39a), G016017(도 39b), G016206(도 39c), 및 G018117(도 39d)로 편집되었다.

도 40a-d는 다양한 수준의 BC22n mRNA 또는 Cas9 mRNA를 동시에 사용하여 4개의 가이드로 편집된 T 세포에 대한 편집 프로파일을 나타낸다. 각각의 편집된 유전자좌에서의 편집 프로파일은 G015995(도 40a), G016017(도 40b), G016206(도 40c), 및 G018117(도 40d)로 별도로 나타낸다.

도 41a-h는 BC22 및 Cas9 샘플 모두에 대해 증가하는 총 RNA와 함께 항체 결합에 대해 음성인 세포의 백분율로서의 표현형 결과를 나타낸다. 도 41a는 편집을 위해 B2M 가이드 G015995가 사용된 경우 B2M 음성 세포의 백분율을 나타낸다. 도 41b는 편집을 위해 다중 가이드가 사용된 경우 B2M 음성 세포의 백분율을 나타낸다. 도 41c는 편집을 위해 TRAC 가이드 G016017이 사용된 경우 CD3 음성 세포의 백분율을 나타낸다. 도 41d는 편집을 위해 TRBC 가이드 G016206이 사용된 경우 CD3 음성 세포의 백분율을 나타낸다. 도 41e는 편집을 위해 다중 가이드가 사용된 경우 CD3 음성 세포의 백분율을 나타낸다. 도 41f는 편집을 위해 CIITA 가이드 G018117이 사용된 경우 MHC II 음성 세포의 백분율을 나타낸다. 도 41g는 편집을 위해 다중 가이드가 사용된 경우 MHC II 음성 세포의 백분율을 나타낸다. 도 41h는 편집을 위해 다중 가이드가 사용된 경우 삼중(B2M, CD3, MHC II) 음성 세포의 백분율을 나타낸다.

도 42는 BC22n 또는 Cas9 편집기 및 단일 또는 다중 가이드의 전기천공 또는 LNP 전달 후 처리되지 않은 세포에 대한 세포 생존율을 나타낸다.

도 43은 BC22n 또는 Cas9 편집기 및 단일 또는 다중 가이드의 전기천공 또는 LNP 전달 후 해당 총 γ H2AX 스폿 강도를 나타낸다.

도 44는 BC22n 또는 Cas9 편집기 및 단일 또는 다중 가이드의 LNP 전달 후 관심 유전자좌에서의 백분율 편집을 나타낸다.

도 45는 BC22n 또는 Cas9 편집기 및 단일 또는 다중 가이드의 LNP 전달 후 명시된 표면 단백질에 대한 음성 세포의 백분율을 나타낸다.

도 46은 BC22n 또는 Cas9 편집기 및 단일 또는 다중 가이드의 LNP 전달 후 전체 고유 분자 중 염색체간 전좌의 백분율을 나타낸다.

도 47a-f는 CD8+ T 세포에서의 순차적 편집에 대한 결과를 나타낸다. 도 47a는 HLA-A 양성 세포의 백분율을 나타낸다. 도 47b는 MHC 클래스 II 양성 세포의 백분율을 나타낸다. 도 47c는 WT1 TCR 양성 CD3+, Vb8+ 세포의 백분율을 나타낸다. 도 47d는 잘못 쌍을 이룬 TCR의 백분율을 나타내는 CD3+, Vb8_{low} 세포를 나타낸다. 도 47e는 내인성 TCR만을 나타내는 CD3+, vb8- 세포의 백분율을 나타낸다. 도 47f는 WT1 TCR에 대해 양성이고 HLA-A 및 MHC 클래스 II에 대해 음성인, CD3+, Vb8+의 백분율을 나타낸다.

도 48a-f는 CD4+ T 세포에서의 순차적 편집에 대한 결과를 나타낸다. 도 48a는 HLA-A 양성 세포의 백분율을 나타낸다. 도 48b는 MHC 클래스 II 양성 세포의 백분율을 나타낸다. 도 48c는 WT1 TCR 양성 CD3+, Vb8+ 세포의 백분율을 나타낸다. 도 48d는 잘못 쌍을 이룬 TCR을 나타내는 CD3+, Vb8_{low} 세포의 백분율을 나타낸다. 도 48e는 내인성 TCR만을 나타내는 CD3+, vb8- 세포의 백분율을 나타낸다. 도 48f는 WT1 TCR에 대해 양성이고 HLA-A 및 MHC 클래스 II에 대해 음성인, CD3+, Vb8+의 백분율을 나타낸다.

도 49a-d는 T 세포에서 CIITA(도 49a), HLA-A(도 49b), TRBC1(도 49c), 및 TRBC2(도 49d)에 대한 T 세포의 순차적 편집 후 퍼센트 인텔을 나타낸다.

도 50a는 TRAC 또는 TRBC1/2 유전자좌에서 유전자 파괴가 없는 T 세포 개체군을 대표하는 CD3eta+, Vb8- 세포의 백분율을 나타낸다.

도 50b는 TRAC에서 WT1 TCR 삽입을 갖는 T 세포 개체군을 대표하는 CD3eta+, Vb8+ 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 50c는 HLA 유전자좌에서 효과적인 유전자 파괴를 갖는 T 세포 개체군을 대표하는 HLA-A2- 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 50d는 CIITA 유전자좌에서 효과적인 유전자 파괴를 갖는 T 세포 개체군을 대표하는 HLA-DRDPDQ- 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 50e는 AAVS1 유전자좌에서 GFP 삽입을 갖는 T 세포 개체군을 대표하는 GFP+ 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 50f는 5개의 게놈 편집을 보유하는 T 세포의 개체군을 대표하는 Vb8+ GFP+ HLA-A- HLA-DRDPDQ- 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 51a는 활성화된 T 세포가 상이한 수준의 Apo 단백질과 함께 사전인큐베이션된 LNP로 처리된 후 TRBC1/2 유전자좌에서 효과적인 유전자 파괴를 갖는 T 세포의 개체군을 대표하는 CD3 음성 세포 퍼센트를 나타낸다.

도 51b는 비-활성화된 T 세포가 상이한 수준의 Apo 단백질과 함께 사전인큐베이션된 LNP로 처리된 후 TRBC1/2 유전자좌에서 효과적인 유전자 파괴를 갖는 T 세포의 개체군을 대표하는 CD3 음성 세포 퍼센트를 나타낸다.

도 52a는 PEG-2kDMG로 공동-제형화된 또는 제형화된 mRNA-단독 제1 LNP로 0시간에 비-활성화된 T 세포 처리 및 0시간 또는 72시간에 gRNA-단독 제2 LNP로의 처리 후, TRAC 유전자좌에서 효과적인 유전자 파괴를 갖는 T 세포의 개체군을 대표하는 CD3 음성 세포 퍼센트를 나타낸다.

도 52b는 PEG-지질 H로 공동-제형화된 또는 제형화된 mRNA-단독 제1 LNP로 0시간에 비-활성화된 T 세포 처리 및 0시간 또는 72시간에 gRNA-단독 제2 LNP로의 처리 후, TRAC 유전자좌에서 효과적인 유전자 파괴를 갖는 T 세포의 개체군을 대표하는 CD3 음성 세포 퍼센트를 나타낸다.

도 53a는 다양한 지질 몰비로 제형화된 LNP로 활성화된 T 세포 처리 후 TRAC 유전자좌에서 효과적인 유전자 파괴를 갖는 T 세포의 개체군을 대표하는 CD3⁻ 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 53b는 다양한 지질 몰비로 제형화된 LNP로 비-활성화된 T 세포 처리 후 TRAC 유전자좌에서 효과적인 유전자 파괴를 갖는 T 세포의 개체군을 대표하는 CD3⁻ 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 54는 mRNA 및 sgRNA의 다양한 w/w 비율로 제형화된 LNP로 활성화된 T 세포 처리 후 TRAC 유전자좌에서 효과적인 유전자 파괴를 갖는 T 세포의 개체군을 대표하는 CD3⁻ 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 55a-b는 mRNA 및 sgRNA의 다양한 w/w 비율로 제형화된 LNP로 비-활성화된 T 세포 처리 후 TRAC 유전자좌에서 효과적인 유전자 파괴를 갖는 T 세포의 개체군을 대표하는 CD3⁻ 세포의 퍼센트를 나타낸다. 도 55a는 공여자 1을 나타낸다. 도 55b는 공여자 2를 나타낸다.

도 56a-b는 다양한 배지 조건 하에서 배양 후 활성화된 B 세포의 개체군을 대표하는 CD20⁺에서 CD86⁺ 세포의 백분율을 나타낸다. 도 56a는 IMDM 기반 배지에서 배양된 세포를 나타낸다. 도 56b는 StemSpan 기반 배지에서 배양된 세포를 나타낸다.

도 56c-d는 다양한 배지 조건 하에서 배양 후 CD20⁺ B 세포에서 LDLR⁺ 세포의 백분율을 나타낸다. 도 56c는 IMDM 기반 배지에서 배양된 세포를 나타낸다. 도 56d는 StemSpan 기반 배지에서 배양된 세포를 나타낸다.

도 57a-b는 1, 10 또는 100 ng/ml CD40L을 함유하는 배지에서 배양된 B 세포의 14일째 배수 확장을 나타낸다. 도 57a는 1차 활성화만을 위해 자극된 세포를 나타낸다. 도 57b는 2차 활성화(형질모세포 분화)를 위해 자극된 세포를 나타낸다.

도 58a-b는 명시된 지질로 제형화된 LNP로 편집한 후 B 세포에서 NGS에 의해 결정된 평균 편집 퍼센트를 나타낸다. 도 58a는 IMDM에서 배양된 B 세포를 나타낸다. 도 58b는 StemSpan에서 배양된 B 세포를 나타낸다.

도 59는 지질 A 또는 지질 D로 제형화되고 ApoE3 또는 ApoE4와 사전-인큐베이션된 LNP로 처리한 후 효과적인 유전자 파괴를 갖는 B 세포의 개체군을 나타내는 B2M 음성 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 60a-b는 지질 A 또는 지질 D로 제형화된 LNP로 처리한 후 효과적인 유전자 파괴를 갖는 B 세포의 개체군을 나타내는 B2M 음성 세포의 퍼센트를 나타낸다. 도 60a는 활성화 1일 전부터 활성화 후 5일까지 LNP 처리를 나타낸다. 도 60b는 활성화 후 6일 내지 10일에 지질 A로 제형화된 LNP로의 처리를 나타낸다.

도 61은 DNAPK 억제제 화합물 1 또는 화합물 4로 편집한 후 효과적인 유전자 파괴를 갖는 B 세포의 개체군을 나타내는 B2M 음성 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 62는 명시된 지질로 제형화된 LNP로 처리된 NK 세포에서 NGS에 의해 평가된 편집 퍼센트를 나타낸다.

도 63은 LNP 처리 후 14일에 다양한 용량의 LNP로 처리된 NK 세포에서 NGS에 의해 평가된 편집 퍼센트를 나타낸다.

도 64는 AAVS1 유전자좌에 GFP를 삽입하기 위한 편집 후 높은 GFP 발현(GFP⁺⁺)을 갖는 NK 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 65a는 LNP 및 다양한 용량의 DNAPK 억제제 화합물 1 또는 화합물 4로 처리한 후 NGS에 의해 평가된 AAVS1에서의 평균 편집 퍼센트를 나타낸다.

도 65b는 DNAPK 억제제 화합물 1 또는 화합물 4로 AAVS1 유전자좌에 GFP를 삽입하기 위한 편집 후 높은 GFP 발현(GFP++)을 갖는 NK 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 66은 지질 A에 비해 다양한 지질 조성으로 편집 후 대식세포에서 상대적인 Cas9 단백질 발현을 나타낸다.

도 67은 대식세포 또는 단핵구 세포에서 편집 후 효과적인 유전자 파괴를 갖는 세포의 개체군을 대표하는 B2M 음성 세포의 퍼센트를 나타낸다.

도 68은 해동 후 0 내지 8일에 LNP로 처리한 후 대식세포에서 NGS로 평가된 편집 퍼센트를 나타낸다.

도 69a-b는 일련의 LNP 처리 후 음성 세포의 평균 퍼센트를 나타낸다. 도 69a는 CIITA 유전자좌의 효과적인 파괴를 대표하는 HLA-DR, DP, DQ 음성 세포 퍼센트를 나타낸다. 도 69b는 퍼센트 B2M 음성 세포를 나타낸다.

도 70은 지질 A 또는 지질 D로 제형화된 LNP로 편집한 후 CD68+, CD11b+, HLA-ABC- 세포의 백분율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0007]

본 개시내용은 예를 들어, 게놈 편집 도구와 같은 핵산을 세포로 전달하고, 시험관내에서 다중 게놈 편집을 위해 지질 핵산 어셈블리 조성물을 사용하는 플랫폼 방법을 제공한다. 본 방법은 예를 들어, 유의한 세포 부작용 없이 세포에 다중 게놈 편집 도구를 전달하는 능력을 제공한다. 본 방법은 또한 예를 들어, 세포의 생존 능력의 상당한 손실 없이 단일 세포에서 다중 시험관내 게놈 편집을 제공하는 반면, 예를 들어, 전기천공을 사용하는 이전의 방법들은 세포에 대한 그들의 독성으로 인해 방해로 받았다. 일부 구현예에서, 플랫폼은 대상체에 대한 후속 치료 투여를 위해 시험관내에서 세포를 준비하기 위한 제조 방법에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 플랫폼은 게놈 편집 도구를 포함하는 지질 핵산 어셈블리 조성물의 동시 또는 순차적 투여를 통한 다중 게놈 편집에 관한 것이다. 플랫폼은 모든 세포 유형과 관련이 있지만, 예를 들어 1차 면역 세포에서 완전한 치료 적용성을 위해 다중 게놈 편집이 필요한 세포를 준비하는 데 특히 유리하다. 상기 방법들은 이전의 전달 기술과 비교하여 개선된 특성을 나타낼 수 있으며, 예를 들어, 상기 방법들은 게놈 편집 도구와 같은 핵산의 효율적인 전달을 제공하면서, 예를 들어, 이전의 형질감염 방법으로 인해 발생하는 전좌를 포함한 높은 수준의 DNA 손상으로 인해, 형질감염 과정 자체에 의해 야기되는 세포 생존력 소실 및/또는 세포 사멸을 감소시킨다. 본원에 제공된 바와 같이, 플랫폼 방법은 시험관내 "세포" 또는 시험관내 "세포 개체군"(또는 "세포의 개체군")에 적용된다. 본원에서 "세포"에 대한 전달 또는 유전자 편집 방법을 언급할 때, 방법은 "세포 개체군"으로의 전달 또는 유전자 편집에 사용될 수 있음을 이해해야 한다.

[0008]

일부 구현예에서, 핵산을 포함하는 2개 이상의 지질 핵산 어셈블리 조성물, 예를 들어, 게놈 편집 도구를 시험관내 세포로 전달하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 다중 핵산 어셈블리 조성물을 순차적으로 및/또는 동시에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 혈청 인자를 지질 핵산 어셈블리 조성물과 사전인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 핵산, 아민 지질, 헬퍼 지질, 중성 지질, 및 PEG 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 시험관내에서 사전인큐베이션된 지질 핵산 어셈블리 조성물과 세포를 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 세포를 시험관내에서 배양하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 세포의 생존력의 유의한 소실 없이 게놈 편집 도구를 세포에 전달시킨다.

[0009]

일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 1차 면역 세포, 예를 들어, T 세포 또는 B 세포를 시험관내에서 생산하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 1차 면역 세포는 시험관내에서 배양되고, 핵산 게놈 편집 도구를 포함하는 지질 핵산 어셈블리 조성물이 제공된다. 일부 구현예에서, 1차 면역 세포는 하나 이상의 이러한 조성물을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 유전적으로 조작된 1차 면역 세포의 생산을 초래한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 초과와 유전적 변형을 갖는 유전적으로 조작된 1차 면역 세포의 생산을 초래한다.

[0010]

일부 구현예에서, 특히 CRISPR-Cas 유전자 편집 성분의 전달에 유용한 특성들을 갖는 지질 핵산 어셈블리, 예를 들어 지질 나노입자(LNP)-기반 조성물을 이용하는 방법이 본원에 제공된다. 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포막을 통한 핵산의 전달을 용이하게 하고, 특정 구현예에서, 이들은 유전자 편집을 위한 성분 및 조성물을 살아 있는 세포로 도입한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 예를 들어 특정 유전자의 발현을 실질적으로 감소시키거나 녹아웃시키기 위한 LNP 조성물을 통한, CRISPR-Cas 시스템과 같은 RNA-가이드 DNA 결합체와 함께 가이드 RNA의 전달을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 LNP 조성물과 같은 지질 핵산 어셈블리, 및 공여자 핵산(본원에서 "주형 핵산" 또는 "외인성 핵산"이라고도 함), 예를 들어 표적 서열에 삽입될 수 있는 원하는 단백질을 암호화하는 DNA를 통해 CRISPR-Cas 시스템과 같은 RNA-가이드 DNA 결합체와 함께 가이드 RNA의 전달을

제공한다. 일부 구현에는 둘다 수행한다.

- [0011] 배양물에서 CRISPR/Cas 유전자 편집 시스템의 성분을 림프구를 포함하는 단핵 세포, 및 특히 T 세포와 같은 면역 세포에 전달하는 방법은 특히 중요하다. CRISPR/Cas 시스템 성분을 포함하는 RNA를 림프구를 포함하는 단핵 세포, 및 특히 T 세포와 같은 면역 세포에 전달하는 방법이 본원에 제공된다. 상기 방법은 시험관내에서 배양된, 림프구를 포함하는 세포, 및 특히 T 세포에 핵산을 전달하며, 세포를 단백질을 암호화하는 mRNA를 제공하는 지질 나노입자(LNP) 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 또한, 시험관내에서 면역 세포, 예를 들어 림프구, 및 특히 T 세포에서의 유전자 편집 방법 및 조작된 세포를 생산하는 방법이 제공된다.
- [0012] 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 이러한 세포 개체군은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함한다. 본 개시내용은 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군을 제공하며, 여기서 세포의 개체군은 단일 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 본 개시내용은 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군을 제공한다. 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군은 예를 들어, 낮은 수준의 전좌를 가지며, 예를 들어, 편집 개시 후 확장이 가능하고, 세포 치료제로 적합하다.
- [0013] 일부 구현예에서, 상기 표적 서열을 표적으로 하는 gRNA 분자를 포함하는 CRISPR 시스템의 도입에 의해 변형된 것을 포함하여, 그들의 게놈내 하나 이상의 특정 표적 서열에서 변형된 세포와 같은 면역종양학을 위한 입양 세포 전달(ACT) 요법을 위한 조성물 및 방법, 및 이의 제조 및 사용 방법이 본원에 기재된다. 예를 들어, 본 개시내용은 면역 세포, 예를 들어, 내인성 TCR 발현이 결여되도록 조작된 T 세포, 예를 들어, 관심 핵산을 삽입하기 위한 추가 조작에 적합한 T 세포, 예를 들어, 이식유전자 TCR(tgTCR)와 같은 TCR을 발현하도록 추가 조작된 T 세포, 및 ACT 요법에 유용한 T 세포의 게놈 편집; 및 B 세포, 예를 들어, 내인성 B 세포 수용체(BCR) 발현이 결여되도록 조작된 B 세포, 예를 들어, 관심 핵산을 삽입하기 위한 추가 조작에 적합한 B 세포, 예를 들어, 이식유전자 BCR(tgBCR)와 같은 BCR을 발현하도록 추가 조작된 B 세포, 또는 항체의 발현을 위한 B 세포; 예를 들어, ACT 요법에 대한 개선된 적합성을 위해 내인성 분자가 결여되도록 조작된 본원에 개시된 NK 세포 또는 단핵구 또는 대식세포 또는 iPSC, 또는 1차 세포, 또는 전구 세포, 예를 들어, 관심 핵산을 삽입하도록 조작하기에 적합한 본원에 개시된 NK 세포 또는 단핵구 또는 대식세포 또는 iPSC, 또는 1차 세포, 또는 전구 세포, 예를 들어, 이중 단백질 서열을 발현하도록 추가 조작된 본원에 개시된 NK 세포 또는 단핵구 또는 대식세포 또는 iPSC, 또는 1차 세포, 또는 전구 세포, 및 ACT 요법에 유용한 본원에 개시된 NK 세포 또는 단핵구 또는 대식세포 또는 iPSC, 또는 1차 세포, 또는 전구 세포의 게놈 편집에 유용한 gRNA 분자, CRISPR 시스템, 세포, 및 방법에 관한 것이며, 이를 제공한다.
- [0014] 일부 구현예에서, 상기 방법은 입양 세포 요법으로 유용한 T 세포를 유전적으로 조작하기 위한 새로운 방법들을 제공한다. 예를 들어, 일부 구현예에서 T 세포는 예를 들어, 특히 내인성 T 세포 수용체 유전자를 포함하는 다수의 표적 유전자의 발현을 감소시키기 위해 시험관 내에서 유전적으로 변형되고, 공여자 핵산 형태의 이식유전자 TCR을 삽입하도록 추가로 변형된다. 일부 구현예에서, 입양 세포 요법으로서 사용하기에 특히 바람직한 T 세포는 다중 유전자 편집을 필요로 한다. 본원에 개시된 게놈에 대한 일종의 다수의 변형으로 시험관내에서 T 세포를 유전적으로 조작하는 능력은 이전에 기술적 도전으로 입증되었다. 위에서 논의한 다중 유전자 편집과 관련된 장애 외에도, T 세포는 특히 배양시에 유전적으로 변형하기가 어렵고 예를 들어 소진될 수 있다.
- [0015] 이전 방법의 장애를 극복하는 시험관 내에서 T 세포를 유전적으로 조작하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 나이브 T 세포는 적어도 하나의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 시험관 내에서 접촉되고, 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, 비-활성화된 T 세포는 둘 이상의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 시험관 내에서 접촉되고, 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포는 둘 이상의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 시험관 내에서 접촉되고, 유전적으로 변형된다. 일부 구현예에서, T 세포는 (비-활성화된) T 세포를 하나 이상의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시킨 후, T 세포를 활성화시킨 후, 활성화된 T 세포를 하나 이상의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 활성화후 단계에서 T 세포에 대한 추가 변형을 포함하는, 사전-활성화 단계에서 변형된다. 일부 구현예에서, 비-활성화된 T 세포는 1, 2, 또는 3개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포는 1 내지 12개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포는 1 내지 8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물, 선택적으로 1 내지 4개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포는 1 내지 6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 2개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 3개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 4개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 5개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세

또는 6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 7개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 9개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 10개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 11개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 12개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 지질 핵산 어셈블리 조성물의 이러한 예시적인 순차 투여(선택적으로 사전-활성화 단계 및 활성화후 단계에서 추가의 순차적 또는 동시 투여와 함께)는 T 세포의 활성화 상태를 이용하고 고유한 이점 및 편집 후 보다 건강한 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 T 세포는 각각의 표적 부위에서 높은 편집 효율, 증가된 편집 후 생존율, 다중 형질감염에도 불구하고 낮은 독성, 낮은 전좌(예를 들어, 측정가능한 표적-표적 전좌 없음), 사이토카인(예를 들어, IL-2, IFN γ , TNF α)의 생산 증가, 반복 자극(예를 들어, 반복 항원 자극)으로 계속 증식, 확장 증가, 예를 들어, 초기 줄기 세포를 포함하는 기억 세포 표현형 마커의 발현의 유리한 특성들을 가지고 있다.

[0016] I. 정의

[0017] 달리 명시되지 않는한, 본원에 사용된 하기 용어들 및 구문은 하기 의미를 갖는 것으로 의도된다:

[0018] "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산"은 본원에서 종래의 RNA, DNA, 혼합 RNA-DNA, 및 이들의 유사체인 중합체를 포함하는, 백본을 따라 함께 연결된 질소 헤테로시클릭 염기 또는 염기 유사체를 갖는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함하는 다량체 화합물을 지칭하기 위해 사용된다. 핵산 "백본"은 당-포스포다이에스테르 연결, 펩티드-핵산 결합("펩티드 핵산" 또는 PNA; PCT 번호 WO 95/32305), 포스포로티오에이트 연결, 메틸포스포네이트 연결, 또는 이들의 조합 중 하나 이상을 포함하는, 다양한 연결로 구성될 수 있다. 핵산의 당 모이어티는 리보스, 데옥시리보스, 또는 치환, 예를 들어, 2' 메톡시 또는 2' 할라이드 치환을 갖는 유사한 화합물일 수 있다. 질소 염기는 종래의 염기(A, G, C, T, U), 이들의 유사체(예를 들어, 변형된 우리딘 예컨대 5-메톡시우리딘, 슈도우리딘, 또는 N1-메틸슈도우리딘, 또는 기타); 이노신; 퓨린 또는 피리미딘의 유도체(예를 들어, N⁴-메틸 데옥시구아노신, 데아자- 또는 아자-퓨린, 데아자- 또는 아자-피리미딘, 5 또는 6 위치에 치환기를 갖는 피리미딘 염기(예를 들어, 5-메틸시토신), 2, 6, 또는 8 위치에 치환기를 갖는 퓨린 염기, 2-아미노-6-메틸아미노 퓨린, 0⁶-메틸구아닌, 4-티오-피리미딘, 4-아미노-피리미딘, 4-디메틸하이드라진-피리미딘, 및, 0⁴-알킬-피리미딘; 미국 특허 제5,378,825호 및 PCT 번호 WO 93/13121)일 수 있다. 일반적인 논의를 위해, *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams 등, ed., 11th ed., 1992)를 참조한다. 핵산은 하나 이상의 "무염기" 잔기들을 포함할 수 있으며, 여기서 백본은 중합체의 위치(들)에 대해 질소 염기를 포함하지 않는다(미국 특허 제 5,585,481호). 핵산은 종래의 RNA 또는 DNA 당, 염기 및 연결 만을 포함할 수 있거나, 또는 종래의 성분 및 치환(예를 들어, 2' 메톡시 연결을 갖는 종래의 염기, 또는 종래의 염기 및 하나 이상의 염기 유사체를 모두 함유하는 중합체)을 모두 포함할 수 있다. 핵산은 상보적인 RNA 및 DNA 서열에 대한 혼성화 친화성을 향상시키는 RNA 모방 당 형태에 잠긴 바이시클릭 푸라노스 단위를 갖는 하나 이상의 LNA 뉴클레오타이드 다량체를 함유하는 "잠금 핵산"(LNA), 유사체를 포함한다(Vester and Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41). RNA 및 DNA는 상이한 당 모이어티를 가지며, RNA에 우라실 또는 이들의 유사체가 존재하고, DNA에 티민 또는 이들의 유사체가 존재한다는 점에서 상이할 수 있다.

[0019] "가이드 RNA", "gRNA", 및 간단하게는 "가이드"는 RNA-가이드 DNA 결합체를 표적 DNA로 향하게 하고, crRNA(CRISPR RNA로도 알려져 있음), 또는 crRNA 및 trRNA의 조합(tracrRNA로도 알려져 있음)일 수 있는 가이드를 지칭하도록 상호교환적으로 사용된다. crRNA 및 trRNA는 단일 RNA 분자(단일 가이드 RNA, sgRNA) 또는 2개의 개별 RNA 분자(이중 가이드 RNA, dgRNA)로 연결될 수 있다. "가이드 RNA" 또는 "gRNA"는 각 유형을 지칭한다. trRNA는 자연-발생 서열이거나, 자연-발생 서열과 비교하여 변형 또는 변이가 있는 trRNA 서열일 수 있다.

[0020] 본원에 사용된 바와 같이, "가이드 서열"은 표적 서열에 상보적이고 RNA-가이드 DNA 결합체에 의한 결합 또는 변형(예를 들어, 절단)을 위해 가이드 RNA를 표적 서열로 향하게 하는 기능을 하는 가이드 RNA 내의 서열을 지칭한다. "가이드 서열"은 또한 "표적화 서열", 또는 "스페이서 서열"로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 스트렙토코커스 파이오게네스(*Streptococcus pyogenes*)(즉, Spy Cas9) 및 관련 Cas9 동족체/오르토로그의 경우, 가이드 서열은 길이가 20 염기쌍일 수 있다. 더 짧거나 더 긴 서열, 예를 들어, 길이가 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 21-, 22-, 23-, 24-, 또는 25-뉴클레오타이드인 경우가 또한 가이드로서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 유전자내에 있거나 염색체 상에 있으며, 예를 들어, 가이드 서열에 상보적이다. 일부 구현예에서, 가이드 서열과 그의 상응하는 표적 서열 사이의 상보성 또는 동일성 정도는 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%,

98%, 99%, 또는 100%일 수 있다. 일부 구현예에서, 가이드 서열 및 표적 영역은 100% 상보적이거나 동일할 수 있다. 다른 구현예에서, 가이드 서열 및 표적 영역은 적어도 하나의 미스매치를 함유할 수 있다. 예를 들어, 가이드 서열 및 표적 서열은 1, 2, 3, 또는 4개의 미스매치를 함유할 수 있으며, 여기서 표적 서열의 총 길이는 적어도 17, 18, 19, 20 또는 그 이상의 염기쌍이다. 일부 구현예에서, 가이드 서열 및 표적 영역은 1~4개의 미스매치를 함유할 수 있으며, 여기서 가이드 서열은 적어도 17, 18, 19, 20 또는 그 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 가이드 서열 및 표적 영역은 1, 2, 3, 또는 4개의 미스매치를 함유할 수 있으며, 여기서 가이드 서열은 20개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0021] RNA-가이드 DNA 결합체에 대한 핵산 기질은 이중 가닥 핵산이므로, RNA-가이드 DNA 결합체에 대한 표적 서열은 계승 DNA의 양성 및 음성 가닥(즉, 주어진 서열 및 서열의 역 상보체)을 둘 다 포함한다. 따라서, 가이드 서열이 "표적 서열에 상보적"이라고 하는 경우, 가이드 서열은 가이드 RNA가 표적 서열의 역 상보체에 결합하도록 지시할 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 일부 구현예에서, 가이드 서열이 표적 서열의 역 상보체에 결합하는 경우, 가이드 서열은 가이드 서열에서 U가 T로 치환된 것을 제외하고는 표적 서열(예를 들어, PAM을 포함하지 않는 표적 서열)의 특정 뉴클레오티드와 동일하다.

[0022] 본원에 사용된 바와 같이, "RNA-가이드 DNA 결합체"는 RNA 및 DNA 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 또는 폴리펩티드의 복합체, 또는 이러한 복합체의 DNA-결합 서브유닛을 의미하며, 여기서 DNA 결합 활성은 서열-특이적이고, RNA의 서열에 따라 달라진다. 예시적인 RNA-가이드 DNA 결합체는 Cas 클레아바제/닉카제 및 이의 불활성화된 형태("dCas DNA 결합체")를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 또한 "Cas 단백질"이라고도 하는 "Cas 뉴클레아제"는 Cas 클레아바제, Cas 닉카제, 및 dCas DNA 결합체를 포함한다. Cas 클레아바제/닉카제 및 dCas DNA 결합체는 III형 CRISPR 시스템의 Csm 또는 Cmr 복합체, 이의 Cas10, Csm1, 또는 Cmr2 서브유닛, I형 CRISPR 시스템의 캐스케이드 복합체, 이의 Cas3 서브유닛, 및 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "클래스 2 Cas 뉴클레아제"는 RNA-가이드 DNA 결합 활성을 갖는 단일-사슬 폴리펩티드이다. 클래스 2 Cas 뉴클레아제는 RNA-가이드 DNA 클레아바제 또는 닉카제 활성을 추가로 갖는, 클래스 2 Cas 클레아바제/닉카제(예를 들어, H840A, D10A, 또는 N863A 변이체)를 포함하고, 클레아바제/닉카제 활성이 불활성화된 클래스 2 dCas DNA 결합체를 포함한다. 클래스 2 Cas 뉴클레아제는 예를 들어, Cas9, Cpf1, C2c1, C2c2, C2c3, HF Cas9(예를 들어, N497A, R661A, Q695A, Q926A 변이체), HypaCas9(예를 들어, N692A, M694A, Q695A, H698A 변이체), eSPCas9(1.0)(예를 들어, K810A, K1003A, R1060A 변이체), 및 eSPCas9(1.1)(예를 들어, K848A, K1003A, R1060A 변이체) 단백질 및 이의 변형들을 포함한다. Cpf1 단백질(Zetsche 등, *세포*, 163: 1-13(2015))은 Cas9와 동종이며, RuvC-유사 뉴클레아제 도메인을 함유한다. Zetsche의 Cpf1 서열은 그 전체가 참고로 포함된다. 예를 들어, Zetsche, 표 S1 및 S3을 참고한다. 예를 들어, Makarova 등, *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36(2015); Shmakov 등, *Molecular 세포*, 60:385-397(2015)를 참고한다.

[0023] 본원에 사용된 바와 같이, "리보핵단백질"(RNP) 또는 "RNP 복합체"는 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas 클레아바제, Cas 닉카제, 또는 dCas DNA 결합체(예를 들어, Cas9)와 같은 RNA-가이드 DNA 결합체와 함께 가이드 RNA를 지칭한다. 일부 구현예에서, 가이드 RNA는 Cas9와 같은 RNA-가이드 DNA 결합체를 표적 서열로 가이드하고, 및 가이드 RNA는 표적 서열과 혼성화하고 작용제는 표적 서열에 결합하며; 작용제가 클레아바제 또는 닉카제인 경우, 결합 후에 절개(cleaving) 또는 절단(nicking)이 뒤따를 수 있다.

[0024] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "편집기"는 핵산 서열(예를 들어, DNA 또는 RNA) 내의 염기(예를 들어, A, T, C, G, 또는 U)를 변형시킬 수 있는 폴리펩티드를 포함하는 작용제를 지칭한다. 일부 구현예에서, 편집기는 핵산 내의 염기를 탈아민화할 수 있다. 일부 구현예에서, 편집기는 DNA 분자 내의 염기를 탈아민화할 수 있다. 일부 구현예에서, 편집기는 DNA 내의 시토신(C)을 탈아민화할 수 있다. 일부 구현예에서, 편집기는 시티딘 데아미나제 도메인에 융합된 RNA-가이드 닉카제를 포함하는 융합 단백질이다. 일부 구현예에서, 편집기는 APOBEC3A 데아미나제(A3A)에 융합된 RNA-가이드 닉카제를 포함하는 융합 단백질이다. 일부 구현예에서, 편집기는 APOBEC3A 데아미나제(A3A)에 융합된 Cas9 닉카제를 포함한다.

[0025] 본원에 사용된 바와 같이, 제1 서열은 제2 서열에 대한 제1 서열의 정렬이 그의 전체에서 제2 서열의 위치 중 X% 이상이 제1 서열과 매칭됨을 나타내는 경우, 제2 서열에 대해 "적어도 X% 동일성을 갖는 서열을 포함하는" 것으로 간주된다. 예를 들어, 서열 AAGA는 서열 AAG에 대해 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는데, 이는 정렬이 제2 서열의 모든 3개 위치에 대한 매치가 있다는 점에서 100% 동일성을 제공할 것이기 때문이다. RNA와 DNA 사이의 차이(일반적으로 우리딘을 티미딘으로 또는 그 반대로 교환) 및 변형된 우리딘과 같은 뉴클레오타이드 유사체의 존재는 관련 뉴클레오타이드(예컨대, 티미딘, 우리딘, 또는 변형된 우리딘)가 동일한 보체(예를 들어, 티미딘, 우리딘, 또는 변형된 우리딘 모두의 경우 아데노신; 또 다른 예는 보체로서 구아노신 또는 변형된 구아노

신을 갖는, 시토신 및 5-메틸시토신임)를 갖는 한, 폴리뉴클레오티드 간의 동일성 또는 상보성 차이에 기여하지 않는다. 따라서, 예를 들어, X가 슈도우리딘, N1-메틸 슈도우리딘, 또는 5-메톡시우리딘과 같은 임의의 변형된 우리딘인, 서열 5'-AXG는 둘 다 동일한 서열(5'-CAU)에 대해 완벽하게 상보적이라는 점에서 AUG와 100% 동일한 것으로 간주된다. 예시적인 정렬 알고리즘은 당업계에 잘 알려진 Smith-Waterman 및 Needleman-Wunsch 알고리즘이다. 당업자는 정렬될 주어진 서열 쌍에 대해 알고리즘 및 매개변수 설정의 어떤 선택이 적절한지 이해할 것이며; 일반적으로 유사한 길이의 서열 및 아미노산의 경우 50% 초과 또는 뉴클레오티드의 경우 75% 초과와 서열에 대해, www.ebi.ac.uk 웹 서버에서 EBI에 의해 제공되는 Needleman-Wunsch 알고리즘 인터페이스의 기본 설정을 갖는 Needleman-Wunsch 알고리즘이 일반적으로 적당하다.

[0026] "mRNA"는 폴리뉴클레오티드를 지칭하기 위해 본원에서 사용되며, 폴리펩티드로 번역될 수 있는(즉, 리보솜 및 아미노-아실화된 tRNA에 의한 번역을 위한 기질로서 작용할 수 있는) 오픈 리딩 프레임에 포함한다. mRNA는 리보스 잔기 또는 이들의 유사체, 예를 들어, 2'-메톡시 리보스 잔기를 포함하는 포스페이트-당 백본을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, mRNA 포스페이트-당 백본의 당은 본질적으로 리보스 잔기, 2'-메톡시 리보스 잔기, 또는 이들의 조합으로 이루어진다.

[0027] 본원에 사용된 바와 같이, "인델(indel)"은 예를 들어, 표적 핵산의 이중-가닥 파손(DSB) 부위에서 삽입 또는 결실된 다수의 뉴클레오티드로 이루어진 삽입/결실 돌연변이를 지칭한다.

[0028] 본원에 사용된 바와 같이, "녹다운"은 특정 유전자 산물(예를 들어, 단백질, mRNA, 또는 둘다)의 발현 감소를 지칭한다. 단백질의 녹다운은 관심 조직, 체액 또는 세포 개체군과 같은 샘플에서 단백질의 총 세포 양을 검출하여 측정될 수 있다. 단백질에 대한 대용물, 마커 또는 활성을 측정하여 측정될 수도 있다. mRNA의 녹다운을 측정하는 방법은 공지되어 있으며, 관심 샘플로부터 단리된 mRNA의 시퀀싱을 포함한다. 일부 구현예에서, "녹다운"은 특정 유전자 산물의 일부 발현 손실, 예를 들어 전사되는 mRNA의 양의 감소 또는 세포의 개체군(조직에서 발견되는 것과 같은 생체내 개체군)에 의해 발현되는 단백질의 양의 감소를 지칭할 수 있다.

[0029] 본원에 사용된 바와 같이, "녹아웃"은 세포내 특정 유전자로부터, 또는 특정 단백질의 발현 손실을 지칭한다. 녹아웃은 세포, 조직 또는 세포의 개체군에서 단백질의 총 세포 양을 검출함으로써 측정될 수 있다.

[0030] 본원에 사용된 바와 같이, "표적 서열"은 gRNA의 가이드 서열에 대해 상보성을 갖는 표적 유전자 내의 핵산 서열을 지칭한다. 표적 서열 및 가이드 서열의 상호작용은 RNA-가이드 DNA 결합체가 (작용체의 활성화에 따라) 표적 서열 내에서 결합하고, 잠재적으로 니킹하거나 절단하도록 지시한다.

[0031] 본원에 사용된 바와 같이, "치료"는 대상체에서 질환 또는 장애에 대한 치료제의 임의의 투여 또는 적용을 지칭하고, 질환 억제, 이의 발달 저지, 질병의 하나 이상의 증상 완화, 질병 치유, 또는 증상의 재발을 포함하여 질병의 하나 이상의 증상을 예방한다.

[0032] 본원에 사용된 바와 같이, "편집된 세포를 포함하는 세포 개체군" 또는 "편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군" 등은 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군을 지칭하지만, 개체군 내의 모든 세포가 편집되어야 하는 것은 아니다. 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군은 또한 편집되지 않은 세포를 포함할 수 있다. 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군 내의 편집된 세포의 백분율은 표준 세포 계수 방법에 의해 결정된 바와 같이 개체군에서 편집된 개체군 내의 세포 수를 계수함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 단일 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군은 단일 편집으로 개체군의 세포 중 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 99%를 가질 것이다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하는, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군은 적어도 2개의 게놈 편집을 갖는 개체군에서 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 가질 것이다.

[0033] 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 결정된 바와 같은 특정 값에 대한 허용 가능한 오차를 의미하며, 이는 부분적으로 값이 측정 또는 결정되는 방법 또는, 기재된 대상체 문제의 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않거나, 또는 당업계에서 허용되는 허용오차내, 예를 들어, 10%, 5%, 2%, 또는 1% 내에 있는 변동 정도에 따라 다르다. 따라서, 달리 나타내지 않는 한, 하기 명세서 및 첨부된 청구범위에 기재된 수치 매개변수는 얻고자 하는 원하는 특성에 따라 변할 수 있는 근사치이다. 최소한, 청구 범위에 대한 등가 원칙의 적용을 제한하려는 시도가 아니라, 각각의 수치 매개변수는 적어도 보고된 유효 숫자의 수에 비추어 일반적인 반올림 기술을 적용하여 해석되어야 한다.

[0034] 이제 본 발명의 특정 구현예를 상세히 참조할 것이며, 그 예는 첨부된 도면에 도시되어 있다. 본 발명은 예시된 구현예와 관련하여 설명되지만, 본 발명을 이들 구현예로 제한하려는 의도가 아님을 이해할 것이다. 반대로, 본

발명은 첨부된 청구범위 및 포함된 구현예에 의해 정의된 본 발명 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변형 및 등가물을 포함하도록 의도된다

[0035] 본 교시내용을 상세히 설명하기 전에, 본 개시내용이 특정 조성물 또는 공정 단계에 제한되지 않으며, 그 자체가 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서 사용되는 단수형 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 명백하게 다르게 지시하지 않는 한 복수 참조를 포함한다는 점에 유의해야 한다. 따라서, 예를 들어, "접합체"에 대한 언급은 다수의 접합체를 포함하고 "세포"에 대한 언급은 다수의 세포 등을 포함한다.

[0036] 숫자 범위는 범위를 정의하는 숫자를 포함한다. 측정 및 측정 가능한 값은 유효 숫자 및 측정과 관련된 오류를 고려하여 대략적인 것으로 이해된다. 또한, "포함하다", "포함하다", "포함하는", "함유하다", "함유하다", "함유하는", "포함하다", "포함하다", 및 "포함하는"의 용도는 제한하려는 의도가 아니다. 전술한 일반적인 설명 및 상세한 설명은 모두 예시적이고 설명을 위한 것이며, 교시내용을 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0037] 명세서에서 구체적으로 언급되지 않는 한, 다양한 성분을 "포함하는"을 인용하는 명세서에서의 구현예는 또한 인용된 성분으로 "이루어지거나" 또는 "필수적으로 이루어지는" 것으로 간주되며; 다양한 성분으로 "이루어진" 것을 인용하는 명세서에서의 구현예는 또한 인용된 성분을 "포함"하거나 "필수적으로 이루어진" 것으로 간주되며; 다양한 성분으로 "필수적으로 이루어진"을 인용하는 명세서에서의 구현예는 또한 인용된 성분으로 "이루어진" 또는 인용된 성분을 "포함하는 것으로 간주된다(이 호환성은 청구범위에서 이들 용어의 사용에 적용되지 않음). 용어 "또는"은 포괄적인 의미로 사용되며, 문맥에서 달리 명시하지 않는 한 "및/또는"과 동등하다.

[0038] 본원에서 사용된 섹션 제목은 구성 목적만을 위한 것이며, 어떤 식으로든 원하는 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 참조로 포함된 자료가 본 명세서에 정의된 용어 또는 본 명세서의 다른 명시적 내용과 모순되는 경우, 본 명세서가 우선한다. 본 교시내용이 다양한 구현예와 관련하여 기재되지만, 본 교시내용이 이러한 구현예로 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 반대로, 본 교시내용은 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이 다양한 대안, 변형 및 등가물을 포함한다.

[0039] II. 다중 전달 및 계층 편집

[0040] A. 다중 전달

[0041] 일부 구현예에서, 다중 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내 세포에 전달하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 다중 전달 방법은 세포 개체군으로 확장할 수 있는 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 세포 개체군으로의 세포의 확장은 성공적인 다중 전달의 마커이다. 유사하게, 생존율이 증가된 확장된 세포 개체군을 생성하기 위해 다중 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관 내에서 세포로 전달하는 방법이 제공된다. 이러한 방법은 예를 들어 세포 요법에 사용되는 세포를 생산/제조하는데 유용하며, 이는 본원에 사용된 바와 같이, 질환 또는 장애를 치료하기 위해 대상체에게 온전한 살아있는 세포를 전달하는 것을 지칭한다. ACT 요법을 포함한 치료 세포의 이식과 같은 세포 요법 접근법이 포함된다. 세포 요법은 자가(대상체로부터 유래한 세포) 및 동종(공여자로부터 유래한 세포) 세포 요법을 포함한다.

[0042] 일부 구현예에서, 다중 전달 방법은 적어도 2개의 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내 배양 세포에 전달하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 시험관내 세포는 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되어, 접촉된 세포를 생성하고, 접촉된 세포가 배양되어 배양된 접촉된 세포를 생성하고, 배양된 접촉된 세포는 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되고, 여기서 제2 핵산은 제1 핵산과 상이하다. 생성된 세포는 시험관 내에서 확장된다. 일부 구현예에서, 전달 방법은 생존율이 증가된 세포 개체군과 같은, 확장된 세포 개체군을 초래한다. 일부 구현예에서, 확장된 세포는 적어도 70%의 생존율을 갖는다. "제1" 및 "제2" 핵산은 가이드 RNA(gRNA)를 포함할 수 있다.

[0043] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내-배양된 세포에 전달하는 방법으로서, a) 시험관내 세포를 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포를 생산하는 단계; b) 상기 접촉된 세포를 시험관내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포를 생산하는 단계; c) 상기 배양된 접촉된 세포를 시험관내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및 d) 시험관 내에서 세포를 확장시키는 단계로서, 상기 확장된 세포가 증가된 생존을 나타내는, 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 확장된 세포는 적어도 70%의 생존율을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포는 2~12개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 2~8개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 2~6개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 3~8개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 3~6개

지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 4~6개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 4~12개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 4~8개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 6~12개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 3, 4, 5, 또는 6개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 6개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 8개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 6개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 비-활성화된 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 활성화된 세포이다. 일부 구현예에서, (a)의 세포는 적어도 하나의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된 후 활성화된다.

[0044] 일부 구현예에서, "증가된 생존"은 (확장된 세포로부터 생성된 편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군의 생존율을 지칭하는) 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%의 확장된 세포, 또는 세포의 형질감염 후 세포 생존율, 또는 세포 생존율에 의해 입증된다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 방법은 전기천공과 같은 알려진 기술들과 비교하여 세포 사멸을 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 방법은 5% 미만, 10% 미만, 20% 미만, 30% 미만, 또는 40% 미만의 세포 사멸을 유발할 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 방법은 세포의 생존력의 상당한 소실 없이 RNA와 같은 핵산을 전달하는 반면, 예를 들어 전기천공을 사용하는 이전 방법은 세포에 대한 독성으로 인해 방해받았다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 방법은 유리한 초기-줄기 세포 기억 표현형을 갖는 조작된 T 세포 개체군과 같은 세포 확장 및/또는 세포 표현형 개선, 사이토카인 생성, 반복된 항원 자극에 따른 증식 프로파일, 및/또는 염색체 전좌율을 초래한다.

[0045] 일부 구현예에서, 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 적어도 6개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 12개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 2~12 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 2~8개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 2~6개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 3~8개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 3~6개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 4~6개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 4~12개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 4~8개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 6~12개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 3, 4, 5, 또는 6개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 8개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 6개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 동시에 접촉된다.

[0046] 일부 구현예에서, 세포는 2개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 3개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 4개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 5개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포는 6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다.

[0047] 일부 구현예에서, 세포와 지질 핵산 어셈블리 조성물 사이의 접촉은 순차적이다(서로 이어짐). 일부 구현예에서, 세포와 지질 핵산 어셈블리 조성물 사이의 접촉은 동시적이다(접촉은 동시적이거나 거의 동시적이다). 일부 구현예에서, 다중 지질 핵산 어셈블리 조성물은 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 순차적으로 그리고 동시에 투여된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 3개의 지질 핵산 조성물이 제공되고, 2개의 지질 핵산 조성물이 먼저 동시에 투여되고, 세포는 일정 기간 동안 배양된 다음, (즉, 순차적으로, 제1 두 조성물의 투여 후) 제3 지질 핵산 조성물이 투여된다. 또 다른 구현예에서, 3개의 지질 핵산 조성물이 제공되고 하나의 지질 핵산 조성물이 먼저 투여되고, 세포가 일정 기간 동안 배양된 다음, 2개의 지질 핵산 조성물이 동시에(및 순차적으로, 제1 조성물의 투여 후) 투여된다. 따라서, 지질 핵산 어셈블리 조성물의 동시 및 순차적 투여는 특정 구현예에서 중복될 수 있다.

[0048] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내-배양된 세포에 전달하기 위한 방법으로서, a) 시험관내 세포를 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포를 생산하는 단계; b) 상기 접촉된 세포를 시험관내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포를 생산하는 단계; c) 상기 배양된 접촉된 세포를 시험관내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및 d) 시험관 내에서 세포를 확장시키는 단계로서; 상기 확장된 세포가 증

가된 생존을 나타내는, 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 여기서 세포는 적어도 6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 확장된 세포는 적어도 70%의 생존율을 갖는다. 일부 구현예에서, 적어도 4개의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 가이드 RNA를 포함하고, 적어도 하나의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 제1 게놈 편집 도구를 포함하여, 세포에서 다중 게놈 편집을 생성한다. 일부 구현예에서, 적어도 6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제이다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas9이다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 APOBEC3A 데아미나제(A3A) 및 RNA-가이드 니카제를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 세포를 제2 게놈 편집 도구를 포함하는 지질 핵산 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 게놈 편집 도구는 UGI이다. 일부 구현예에서, 제2 게놈 편집 도구는 공여자 핵산이다. 일부 구현예에서, 방법은 세포를 제3 게놈 편집 도구를 포함하는 지질 핵산 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 제3 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제이다. 일부 구현예에서, 제3 게놈 편집 도구는 UGI이다. 일부 구현예에서, 제3 게놈 편집 도구는 공여자 핵산이다. 일부 구현예에서, 게놈 편집 도구(예를 들어, 제1 게놈 편집 도구, 제2 게놈 편집 도구, 제3 게놈 편집 도구)는 mRNA이다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 비-활성화된 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 활성화된 세포이다. 일부 구현예에서, (a)의 세포는 적어도 하나의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉한 후에 활성화된다.

[0049]

일부 구현예에서, 지질 나노입자(LNP) 조성물을 시험관내-배양된 세포의 개체군에 전달하기 위한 방법으로서, a) 세포의 개체군을 시험관 내에서 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 LNP 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포의 개체군을 생성하는 단계; b) 상기 접촉된 세포의 개체군을 시험관 내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포의 개체군을 생성하는 단계; c) 세포의 개체군 또는 배양된 접촉된 세포의 개체군을 시험관 내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계로서, 상기 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및 d) 세포의 개체군을 시험관 내에서 확장시키는 단계로서, 상기 확장된 세포의 개체군이 적어도 70%의 생존율을 나타내는, 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 확장된 세포의 개체군은 확장 24시간에 적어도 70%의 생존율을 갖는다. 일부 구현예에서, 확장된 세포의 개체군은 확장 24시간에 적어도 80%의 생존율을 갖는다. 일부 구현예에서, 확장된 세포의 개체군은 확장 24시간에 적어도 90%의 생존율을 갖는다. 일부 구현예에서, 확장된 세포의 개체군은 확장 24시간에 적어도 95%의 생존율을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 2~12개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 2~8개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 2~6개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 3~8개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 3~6개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 4~6개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 6~12개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 3개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 4개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 6개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 3개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 LNP 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 6개 이하의 LNP 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 2개 이하의 LNP 조성물과 동시에 접촉된다.

[0050]

일부 구현예에서, 지질 나노입자(LNP) 조성물을 시험관내-배양된 세포의 개체군에 전달하는 방법으로서, a) 세포의 개체군을 시험관 내에서 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 LNP 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포의 개체군을 생성하는 단계; b) 상기 접촉된 세포의 개체군을 시험관 내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포의 개체군을 생성하는 단계; c) 세포의 개체군 또는 배양된 접촉된 세포의 개체군을 시험관 내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계로서, 상기 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및 d) 세포의 개체군을 시험관 내에서 확장하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 여기서 세포의 개체군 내 세포의 적어도 70%, 80%, 90%, 또는 95%가 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 내 세포의 적어도 70%는 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 내 세포의 적어도 80%는 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 내 세포의 적어도 90%는 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 내 세포의 적어도 95%는 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 2~12개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 2~8개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된

접촉된 세포의 개체군은 총 2~6개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 3~8개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 3~6개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 4~6개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 6~12개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 3개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 4개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 6개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 3개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군 및 배양된 접촉된 세포의 개체군은 총 3개 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 LNP 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 6개 이하의 LNP 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 2개 이하의 LNP 조성물과 동시에 접촉된다.

[0051] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내-배양된 세포에 전달하기 위한 방법으로, a) 시험관내 세포를 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포를 생산하는 단계; b) 상기 접촉된 세포를 시험관내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포를 생산하는 단계; c) 상기 배양된 접촉된 세포를 시험관내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및 d) 시험관 내에서 세포를 확장시키는 단계로서; 상기 확장된 세포가 증가된 생존을 나타내는, 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 MHC 클래스 I의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 HLA-A를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 선택적으로 상기 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 MHC 클래스 II의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함한다.

[0052] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내-배양된 세포에 전달하기 위한 방법으로, a) 시험관내 세포를 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포를 생산하는 단계; b) 상기 접촉된 세포를 시험관내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포를 생산하는 단계; c) 상기 배양된 접촉된 세포를 시험관내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및 d) 시험관 내에서 세포를 확장시키는 단계로서; 상기 확장된 세포가 증가된 생존을 나타내는, 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 여기서 제1 및 제2 지질 핵산 조성물은 각각 a) TRAC를 표적화하는 gRNA, b) TRBC를 표적화하는 gRNA, c) B2M을 표적화하는 gRNA 또는 HLA-A를 표적화하는 gRNA, 및 d) CIITA를 표적화하는 gRNA로부터 선택되는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함한다.

[0053] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내-배양된 세포에 전달하기 위한 방법으로, a) 시험관내 세포를 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포를 생산하는 단계; b) 상기 접촉된 세포를 시험관내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포를 생산하는 단계; c) 상기 배양된 접촉된 세포를 시험관내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및 d) 시험관 내에서 세포를 확장시키는 단계로서; 상기 확장된 세포가 증가된 생존을 나타내는, 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함한다.

[0054] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내-배양된 세포에 전달하기 위한 방법으로, a) 시험관내 세포를 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포를 생산하는 단계; b) 상기 접촉된 세포를 시험관내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포를 생산하는 단계; c) 상기 배양된 접촉된 세포를 시험관내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및 d) 시험관 내에서 세포를 확장시키는 단계로서; 상기 확장된 세포가 증

가된 생존을 나타내는, 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함한다.

[0055] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내-배양된 세포에 전달하기 위한 방법으로서, a) 시험관 내 세포를 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포를 생산하는 단계; b) 상기 접촉된 세포를 시험관내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포를 생산하는 단계; c) 상기 배양된 접촉된 세포를 시험관내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및 d) 시험관 내에서 세포를 확장시키는 단계로서; 상기 확장된 세포가 증가된 생존을 나타내는, 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 HLA-A를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 선택적으로 상기 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함한다.

[0056] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내-배양된 세포에 전달하기 위한 방법으로서, a) 시험관 내 세포를 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포를 생산하는 단계; b) 상기 접촉된 세포를 시험관내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포를 생산하는 단계; c) 상기 배양된 접촉된 세포를 시험관내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및 d) 시험관 내에서 세포를 확장시키는 단계로서; 상기 확장된 세포가 증가된 생존을 나타내는, 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함한다.

[0057] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내-배양된 세포에 전달하기 위한 방법으로서, a) 시험관 내 세포를 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포를 생산하는 단계; b) 상기 접촉된 세포를 시험관내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포를 생산하는 단계; c) 상기 배양된 접촉된 세포를 시험관내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및 d) 시험관 내에서 세포를 확장시키는 단계로서; 상기 확장된 세포가 증가된 생존을 나타내는, 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 HLA-A를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 선택적으로 상기 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성이고, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함한다.

[0058] 일부 구현예에서, 공여자 핵산은 표적화 수용체를 암호화한다. "표적화 수용체"는 표적 부위, 예를 들어, 유기체의 특정 세포 또는 조직에 대한 세포의 결합을 허용하기 위해 세포, 예를 들어, T 세포의 표면 상에 존재하는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 표적화 수용체는 CAR이다. 일부 구현예에서, 표적화 수용체는 범용 CAR(UniCAR)이다. 일부 구현예에서, 표적화 수용체는 TCR이다. 일부 구현예에서, 표적화 수용체는 T 세포 수용체 융합 작제물(TruC)이다. 일부 구현예에서, 표적화 수용체는 B 세포 수용체(BCR)(예를 들어, B 세포 상에 발현됨)이다. 일부 구현예에서, 표적화 수용체는 케모카인 수용체이다. 일부 구현예에서, 표적화 수용체는 사이토카인 수용체이다.

[0059] β 2M 또는 B2M은 본원에서 그리고 β -2 마이크로글로불린의 핵산 서열 또는 단백질 서열과 관련하여 상호 교환적으로 사용되며; 인간 유전자는 수탁 번호 NC_000015(범위 44711492..44718877), 참조 GRCh38.p13을 갖는다. B2M 단백질은 유핵 세포 표면의 이종이합체로서 MHC 클래스 I 분자와 연관되며, MHC 클래스 I 단백질 발현에 필

요하다.

- [0060] CIITA 또는, CIITA 또는 C2TA는 본원에서 그리고 클래스 II 주요 조직적합성 복합체 트랜스활성화제의 핵산 서열 또는 단백질 서열과 관련하여 본원에서 상호 교환적으로 사용되며; 인간 유전자는 수탁 번호 NC_000016.10 (범위 10866208..10941562), 참조 GRCh38.p13을 갖는다. 핵의 CIITA 단백질은 MHC 클래스 II 유전자 전사의 양성 조절자 역할을 하며, MHC 클래스 II 단백질 발현에 필요하다.
- [0061] MHC 또는 MHC 분자(들) 또는 MHC 단백질 또는 MHC 복합체(들)는, 주요 조직적합성 복합체 분자(또는 복수)를 지칭하고, 예를 들어, MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 분자를 포함한다. 인간에서, MHC 분자는 인간 백혈구 항원 복합체 또는 HLA 분자 또는 HLA 단백질이라고도 한다. 용어 MHC 및 HLA는 제한을 의미하지 않으며; 본원에 사용된 바와 같이, 용어 MHC는 인간 MHC 분자, 즉 HLA 분자를 지칭하는데 사용될 수 있다. 따라서, 용어들 MHC 및 HLA는 상호 교환적으로 사용된다.
- [0062] HLA-A 단백질과 관련하여 본원에 사용된 바와 같이, HLA-A는 MHC 클래스 I 단백질 분자를 지칭하며, 이는 중쇄(HLA-A 유전자에 의해 암호화됨) 및 경쇄(즉, 베타-2 마이크로글로불린)로 이루어진 이종이합체이다. 핵산과 관련하여 본원에 사용된 바와 같이, 용어들 HLA-A 또는 HLA-A 유전자는, HLA-A 단백질 분자의 중쇄를 암호화하는 유전자를 지칭한다. HLA-A 유전자는 HLA 클래스 I 조직적합성, A 알파 사슬이라고도 하며; 인간 유전자는 수탁 번호 NC_000006.12(29942532..29945870)를 갖는다. HLA-A 유전자는 개체군에 걸쳐 수백 가지의 다른 버전(대립 유전자라고도 함)이 있는 것으로 알려져 있다(그리고 개체는 HLA-A 유전자의 2가지 다른 대립유전자를 받을 수 있음). HLA-A의 모든 대립유전자는 HLA-A 및 HLA-A 유전자라는 용어에 포함된다.
- [0063] 핵산과 관련하여 본원에 사용된 바와 같이, HLA-B는 HLA-B 단백질 분자의 중쇄를 암호화하는 유전자를 지칭한다. HLA-B는 HLA 클래스 I 조직적합성, B 알파 사슬이라고도 하며; 인간 유전자는 수탁 번호 NC_000006.12(31353875..31357179)를 갖는다.
- [0064] 핵산과 관련하여 본원에 사용된 바와 같이, HLA-C는 HLA-C 단백질 분자의 중쇄를 암호화하는 유전자를 지칭한다. HLA-C는 HLA 클래스 I 조직적합성, C 알파 사슬이라고도 하며; 인간 유전자는 수탁 번호 NC_000006.12(31268749..31272092)를 갖는다.
- [0065] 용어 동형접합성은 특정 유전자의 2개의 동일한 대립유전자를 갖는 것을 지칭한다.
- [0066] 본원에 기재된 임의의 세포 유형이 전달 방법에 사용될 수 있다. ACT 요법에 유용한 세포, 예컨대 줄기세포, 전구세포, 일차세포가 포함된다.
- [0067] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포와 접촉하기 전에 혈청 인자로 전처리된다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포와 접촉하기 전에 인간 혈청으로 전처리된다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포와 접촉하기 전에 ApoE로 전처리된다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포와 접촉하기 전에 재조합 ApoE3 또는 ApoE4로 전처리된다. 일부 구현예에서, 세포는 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉하기 전에 혈청-고갈 상태이다.
- [0068] 일부 구현예에서, 다중 방법은 약 30초 내지 하룻밤 동안 혈청 인자 및 지질 핵산 어셈블리 조성물을 사전 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 사전 인큐베이션 단계는 약 1분 내지 1시간 동안 혈청 인자 및 지질 핵산 어셈블리 조성물을 사전 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 이는 약 1~30분 동안 사전 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 다른 구현예에서, 이는 약 1~10분 동안 사전 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 또 다른 구현예는 약 5분 동안 사전 인큐베이션하는 단계를 포함한다.
- [0069] 일부 구현예에서, 사전 인큐베이션하는 단계는 약 4℃에서 일어난다. 일부 구현예에서, 사전 인큐베이션하는 단계는 약 25℃에서 일어난다. 특정 구현예에서, 사전 인큐베이션하는 단계는 약 37℃에서 일어난다. 사전 인큐베이션하는 단계는 완충액, 예컨대 중탄산나트륨 또는 HEPES를 포함할 수 있다.
- [0070] **B. 다중 게놈 편집**
- [0071] 일부 구현예에서, 시험관내 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 방법이 제공된다(중중 본원 및 다른 곳에서 "다중화" 또는 "다중 유전자 편집" 또는 "다중 게놈 편집"이라고 함). 일부 구현예에서, 방법은 시험관내에서 세포를 배양하는 단계, 세포를 둘 이상의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서 각각의 지질 핵산 어셈블리 조성물이 표적 부위를 편집할 수 있는 핵산 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계, 및 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계를 포함한다. 방법은 게놈 편집이 상이한, 하나 이상의 게놈 편집을 갖는 세포를 생성한다. 일

부 구현예에서, 방법은 단일 게놈 편집을 갖는 세포를 생성한다.

[0072] 용어들 "게놈 편집" 및 "유전자 편집"은 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 용어들 "게놈 편집 도구" 및 "유전자 편집 도구"는 또한 본원에서 상호 교환적으로 사용된다. 용어들 "핵산 게놈 편집 도구" 및 "게놈 편집 도구"는 또한 본원에서 상호 교환적으로 사용될 수 있다.

[0073] 일부 구현예에서, 시험관내-배양된 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하기 위한 방법으로서, a) 세포를 시험관 내에서 적어도 제1 지질 나노입자(LNP) 조성물 및 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제1 LNP 조성물이 제1 표적 서열에 대한 제1 가이드 RNA(gRNA) 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하고, 제2 LNP 조성물이 제1 표적 서열과 상이한 제2 표적 서열에 대한 제2 gRNA 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계; 및 b) 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계에 의해, 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 세포는 게놈 편집 도구를 포함하는 적어도 하나의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합체를 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 표적 서열에 삽입하기 위해 공여자 핵산과 추가로 접촉된다. 일부 구현예에서, LNP 조성물은 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, LNP 조성물은 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 2~12개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 2~8개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 2~6개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 3~8개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 3~6개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 4~6개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 6~12개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 3개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 4개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 6개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 3개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 LNP 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 6개 이하의 LNP 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 2개 이하의 LNP 조성물과 동시에 접촉된다.

[0074] 일부 구현예에서, 시험관내-배양된 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하기 위한 방법으로서, 세포를 시험관 내에서 적어도 제1 지질 나노입자(LNP) 조성물 및 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제1 LNP 조성물이 제1 표적 서열에 대한 제1 가이드 RNA(gRNA) 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하고, 제2 LNP 조성물이 제1 표적 서열과 상이한 제2 표적 서열에 대한 제2 gRNA 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계; 및 b) 세포를 생체 외에서 배양하는 단계에 의해, 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 단계를 포함하는, 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 세포는 게놈 편집 도구를 포함하는 적어도 하나의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합체를 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 표적 서열에 삽입하기 위해 공여자 핵산과 추가로 접촉된다. 일부 구현예에서, LNP 조성물은 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, LNP 조성물은 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 2~12개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 2~8개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 2~6개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 3~8개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 3~6개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 4~6개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 6~12개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 3개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 4개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 6개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 3개의 LNP 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 LNP 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 6개 이하의 LNP 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군은 2개 이하의 LNP 조성물과 동시에 접촉된다.

[0075] 일부 구현예에서, 세포의 개체군에서 유전자 편집을 위한 방법으로서, a) 세포의 개체군을 시험관 내에서 제1 게놈 편집 도구를 포함하는 제1 지질 나노입자(LNP) 조성물 및 제2 게놈 편집 도구를 포함하는 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계; 및 b) 세포의 개체군을 시험관 내에서 배양하는 단계로서, 세포의 개체군내 세포의 적어도 70%, 80%, 90%, 또는 95%가 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있는 단계에 의해, 세포의 개체군을 편집하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군내 세포의 적어도 70%가 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군내 세포의 적어도 80%가 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군내 세포의 적어도 90%가 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 개체군내 세포의 적어도 95%가 LNP 조성물과 마지막 접촉한 후 24시간 생존할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 게놈 편집 도구는 가이드 RNA

를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 세포를 시험관 내에서 게놈 편집 도구를 포함하는 제3 LNP 조성물과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 적어도 2개의 LNP 조성물은 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 LNP 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 방법은 표적 서열에 삽입하기 위해 세포를 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제이다. 일부 구현예에서 RNA-가이드 DNA 결합제는 스트렙토코커스 파이오게네스(S. Pyogenes) Cas9이다.

[0076] 일부 구현예에서, 세포에서 유전자 편집을 위한 방법으로서, a) 세포를 시험관 내에서 적어도 6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 적어도 2개 내지 4개의 지질 핵산 어셈블리 조성물이 각각 가이드 RNA(gRNA)를 포함하고, 적어도 하나의 지질 핵산 어셈블리 조성물이 제1 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계; b) 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계에 의해, 세포를 편집하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 제1 게놈 편집 도구는 가이드 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 세포를 시험관 내에서 게놈 편집 도구를 포함하는 제3 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 적어도 2개의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 방법은 세포를 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 게놈 편집 도구는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 비-활성화된 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 활성화된 세포이다. 일부 구현예에서, (a)의 세포는 적어도 하나의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된 후 활성화된다.

[0077] 일부 구현예에서, 세포는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 이로써 예를 들어, 상이한 gRNA에 기초하여 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12개 또는 그 이상의 게놈 편집을 갖는 세포가 생성된다.

[0078] 일부 구현예에서, 세포는 단일 지질 핵산 어셈블리 조성물에서 하나 이상의 게놈 편집 도구를 갖는 하나 이상의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 단일 지질 핵산 어셈블리 조성물은 다중 가이드 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 단일 지질 핵산 어셈블리 조성물은 2~8, 2~6, 2~5, 2~4, 3~5, 또는 3~6개의 가이드 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 단일 지질 핵산 어셈블리 조성물은 3~5 또는 3~6개의 가이드 RNA를 포함한다. 특정 구현예에서, 1개 이상의 가이드 RNA를 포함하는 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA 가이드-DNA 결합제를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 1개 이상의 가이드 RNA를 포함하는 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA 가이드-DNA 결합제를 포함하지 않는다.

[0079] 일부 구현예에서, 세포와 지질 핵산 어셈블리 조성물 사이의 접촉은 순차적이다(다음에 하나씩). 일부 구현예에서, 세포와 지질 핵산 어셈블리 조성물 사이의 접촉은 동시적이다(접촉이 동시적이거나, 거의 동시적임). 일부 구현예에서, 다중 지질 핵산 어셈블리 조성물은 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 순차적으로 그리고 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 3개의 지질 핵산 조성물이 제공되고, 2개의 지질 핵산 조성물이 먼저 동시에 투여되고, 세포가 일정 기간 동안 배양된 다음, 제3 지질 핵산 조성물이 투여된다(즉, 순차적으로, 처음 두 조성물의 투여 후). 또 다른 구현예에서, 3개의 지질 핵산 조성물이 제공되고, 1개의 지질 핵산 조성물이 먼저 투여되고, 세포가 일정 기간 동안 배양된 다음, 2개의 지질 핵산 조성물이 동시에 투여된다(그리고 순차적으로, 제1 조성물의 투여 후). 따라서, 지질 핵산 어셈블리 조성물의 동시 및 순차적 투여는 특정 구현예에서 중복될 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물은 각각 표적 서열에 대한 gRNA를 포함하고 선택적으로 각각은 또한 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물은 각각 표적 서열에 대한 gRNA를 포함하고, 추가로 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함할 수 있다. 즉, RNA-가이드 DNA 결합제는 일부 구현예에서 gRNA-함유 지질 핵산 어셈블리 조성물 이외의 수단에 의해 세포에 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA 및 RNA-가이드 DNA 결합제는 지질 핵산 어셈블리 조성물에 공동-캡슐화될 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA 및 RNA-가이드 DNA 결합제는 별개의 지질 핵산 어셈블리 조성물로 세포에 제공될 수 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제를 포함하는 지질 핵산 어셈블리는 동일한 지질 핵산 어셈블리 또는 상이한 지질 핵산 어셈블리에서 가이드 RNA와 동시에 처음에 투여되고; RNA-가이드 DNA 결합제의 추가 투여 없이, 가이드 RNA를 순차적으로 투여한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제를 포함하는 지질 핵산 어셈블리는 동일한 지질 핵산 어셈블리 또는 상이한 지질 핵산 어셈블리에서 가이드 RNA와 동시에 처음에 투여되고; 추가의 RNA-가이드 DNA 결합제와 함께 가이드 RNA가 순차적으로 투여되며, 선택적으로 제2 RNA-가이드 DNA 결합제는 제1 RNA-가이드 DNA 결합제와 상이하다.

- [0080] 일부 구현예에서, 세포는 순차적인 접촉 또는 편집 단계 사이에 동결된다.
- [0081] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포와 접촉하기 전에 혈청 인자로 전처리된다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포와 접촉하기 전에 인간 혈청으로 전처리된다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 혈청 대체물, 예를 들어, 상업적으로 이용가능한 혈청 대체물로 전처리되며, 바람직하게는 혈청 대체물은 생체의 사용에 적합하다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포와 접촉하기 전에 ApoE로 전처리된다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포와 접촉하기 전에 재조합 ApoE3 또는 ApoE4로 전처리된다. 일부 구현예에서, 세포는 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉하기 전에 혈청-고갈 상태이다.
- [0082] 일부 구현예에서, 다중 방법은 약 30초 내지 하룻밤 동안 혈청 인자 및 지질 핵산 어셈블리 조성물을 사전 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 사전 인큐베이션 단계는 약 1분 내지 1시간 동안 혈청 인자 및 지질 핵산 어셈블리 조성물을 사전 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 이는 약 1~30분 동안 사전 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 다른 구현예에서, 이는 약 1~10분 동안 사전 인큐베이션하는 단계를 포함한다. 또 다른 구현예는 약 5분 동안 사전 인큐베이션하는 단계를 포함한다.
- [0083] 일부 구현예에서, 사전 인큐베이션하는 단계는 약 4℃에서 일어난다. 일부 구현예에서, 사전 인큐베이션하는 단계는 약 25℃에서 일어난다. 일부 구현예에서, 사전 인큐베이션하는 단계는 약 37℃에서 일어난다. 사전 인큐베이션하는 단계는 중탄산나트륨 또는 HEPES와 같은 완충액을 포함할 수 있다.
- [0084] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물이 "비-활성화된" 세포에 제공된다. "비-활성화된" 세포는 시험관 내에서 자극되지 않은 세포를 지칭한다. 일부 구현예에서, "비-활성화된" T 세포는 신체에 있는 동안 생체내에서 (예를 들어, 항원에 의해) 자극되었을 수 있지만, 상기 세포가 배양액내 시험관 내에서 자극되지 않은 경우 본원에서 비-활성화된 것으로 지칭될 수 있다. "활성화된" 세포는 또한 본원에 개시된 방법에 유용하고, 시험관 내에서 자극된 세포를 지칭할 수 있다. 시험관내에서 세포를 활성화하기 위한 작용제가 본원에 제공되고 특히 T 세포 또는 B 세포의 활성화를 위해 당업계에 공지되어 있다.
- [0085] 일부 구현예에서, T 세포는 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉하기 전에 배양 배지에서 배양된다. 일부 구현예에서, T 세포는 하나 이상의 증식성 사이토카인, 예를 들어 IL-2, IL-15 및 IL-21 중 하나 이상 또는 모두, 및/또는 CD3 및/또는 CD28을 통해 활성화를 제공하는 하나 이상의 작용제와 함께 배양된다.
- [0086] 일부 구현예에서, T 세포는 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉하기 전에 활성화되고, 지질 핵산 어셈블리 조성물과의 접촉 사이에 활성화되고/되거나, 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉한 후에 활성화된다.
- [0087] 일부 구현예에서, 세포는 T 세포이며, 방법은 제1 및 제2 접촉 단계 사이에 활성화 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 비-활성화된 T 세포는 1, 2, 또는 3개의 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포는 1 내지 8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물, 선택적으로 1 내지 4개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 적어도 6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 12개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 2~12개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 2~8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 2~6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 3~8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 3~6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 4~6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 4~12개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 4~8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 6~12개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 3, 4, 5, 또는 6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 8개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 6개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포는 적어도 6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포는 12개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포는 2~12개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포는 4~12개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포는 4~8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포는 8개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 동시에 접촉된다. 일부 구현예에서, 활성화된 T 세포는 6개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 동시에 접촉된다.

- [0088] 일부 구현예에서, T 세포는 제1 표적 서열을 표적화하는 제1 핵산 게놈 편집 도구를 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되고, 활성화되고, 활성화된 T 세포는 제2 표적 서열을 표적화하는 제2 핵산 게놈 편집 도구를 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 활성화된 T 세포는 추가적인 지질 핵산 어셈블리 조성물과 추가로 접촉될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 2개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되고, 활성화되고, 활성화된 것은 제3 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되고, 선택적으로 활성화된 세포는 추가적인 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 일부 구현예에서, T 세포는 3개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되고, 활성화되고, 활성화된 것은 제3 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되고, 선택적으로 활성화된 세포는 추가적인 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된다. 활성화 단계는 활성화 단계가 없는 동일한 방법과 비교하여 다중 게놈 편집의 결과를 향상시킬 수 있다.
- [0089] 일부 구현예에서, 시험관내-배양된 T 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 방법으로서, a) T 세포를 시험관 내에서 (i) 제1 표적 서열에 대한 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물 및 선택적으로 (ii) 1 또는 2개의 추가적인 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 각각의 추가적인 지질 핵산 어셈블리 조성물이 제1 표적 서열 및/또는 게놈 편집 도구와 상이한 표적 서열에 대한 gRNA를 포함하는, 단계; b) T 세포를 시험관 내에서 활성화시키는 단계; c) 활성화된 T 세포를 시험관 내에서 (i) (a)의 표적 서열(들)과 상이한 표적 서열에 대한 추가의 가이드 RNA를 포함하는 추가의 핵산 어셈블리 조성물 및 선택적으로 (ii) 하나 이상의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 각각의 지질 핵산 어셈블리 조성물이 (a)의 표적 서열(들)과 상이하고, 서로 상이한 표적 서열에 대한 가이드 RNA 및/또는 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계; d) 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계에 의해 T 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 방법은 T 세포를 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11개의 지질 핵산 어셈블리 조성물, 선택적으로 4~12개 또는 4~8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 세포 또는 T 세포를 4~12개 또는 4~8개 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 단계 (a)의 T 세포는 2개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되며, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물은 순차적으로 또는 동시에 투여된다. 일부 구현예에서, 단계 (a)의 T 세포는 3개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되며, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물은: (i) 순차적으로; (ii) 동시에; 또는 (iii) 동시에(2개의 조성물) 및 순차적으로(전 또는 후에 투여되는 1개의 조성물) 투여된다. 일부 구현예에서, 단계 (c)의 T 세포는 1 내지 8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물, 선택적으로 1 내지 4개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되며, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물은: (i) 순차적으로; (ii) 동시에; 또는 (iii) 동시에(적어도 2개의 조성물) 및 순차적으로(전 또는 후에 투여되는 적어도 하나의 조성물) 투여된다.
- [0090] 일부 구현예에서, 세포에서 유전자 편집을 위한 방법으로서, a) 세포를 시험관내에서 제1 게놈 편집 도구를 포함하는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물 및 제2 게놈 편집 도구를 포함하는 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계; 및 b) 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계에 의해 세포를 편집하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 MHC 클래스 I의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 HLA-A를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 선택적으로 상기 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 MHC 클래스 II의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함한다.
- [0091] 일부 구현예에서, 세포에서 유전자 편집을 위한 방법으로서, a) 세포를 시험관 내에서 제1 게놈 편집 도구를 포함하는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물 및 제2 게놈 편집 도구를 포함하는 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계; 및 b) 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계에 의해; 세포를 편집하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 여기서 제1 및 제2 지질 핵산 조성물은 각각 a) TRAC를 표적화하는 gRNA, b) TRBC를 표적화하는 gRNA, c) B2M을 표적화하는 gRNA 또는 HLA-A를 표적화하는 gRNA, 및 d) CIITA를 표적화하는 gRNA로부터 선택되는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함한다.
- [0092] 일부 구현예에서, 세포에서 유전자 편집을 위한 방법으로서, a) 세포를 시험관 내에서 제1 게놈 편집 도구를 포함하는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물 및 제2 게놈 편집 도구를 포함하는 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접

촉시키는 단계; 및 b) 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계에 의해; 세포를 편집하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합체는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함한다.

[0093] 일부 구현예에서, 세포에서 유전자 편집을 위한 방법으로서, a) 세포를 시험관 내에서 제1 게놈 편집 도구를 포함하는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물 및 제2 게놈 편집 도구를 포함하는 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계; 및 b) 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계에 의해; 세포를 편집하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합체는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함한다.

[0094] 일부 구현예에서, 세포에서 유전자 편집을 위한 방법으로서, a) 세포를 시험관 내에서 제1 게놈 편집 도구를 포함하는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물 및 제2 게놈 편집 도구를 포함하는 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계; 및 b) 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계에 의해; 세포를 편집하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 그리고 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 HLA-A를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 선택적으로 상기 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합체는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함한다.

[0095] 일부 구현예에서, 세포에서 유전자 편집을 위한 방법으로서, a) 세포를 시험관 내에서 제1 게놈 편집 도구를 포함하는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물 및 제2 게놈 편집 도구를 포함하는 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계; 및 b) 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계에 의해; 세포를 편집하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함하고, 그리고 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합체는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함한다.

[0096] 일부 구현예에서, 세포에서 유전자 편집을 위한 방법으로서, a) 세포를 시험관 내에서 제1 게놈 편집 도구를 포함하는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물 및 제2 게놈 편집 도구를 포함하는 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계; 및 b) 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계에 의해; 세포를 편집하는 단계를 포함하는 방법이 제공되며, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 HLA-A를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 선택적으로 상기 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성이고, 그리고 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합체는 Cas9이다. 일부 구현예에서, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함한다.

[0097] 일부 구현예에서, T 세포는 다클론성 활성화(또는 "다클론성 자극")(항원-특이적 자극 아님)에 의해 활성화된다. 일부 구현예에서, T 세포는 CD3 자극(예를 들어, 항-CD3 항체 제공)에 의해 활성화된다. 일부 구현예에서, T 세포는 CD3 및 CD28 자극(예를 들어, 항-CD3 항체 및 항-CD28 항체 제공)에 의해 활성화된다. 일부 구현예에서, T 세포는 (예를 들어, CD3/CD28 자극을 통해) T 세포를 활성화하기 위해 즉시-사용가능 시약을 사용하여 활성화된다. 일부 구현예에서, T 세포는 비드에 의해 제공된 CD3/CD28 자극을 통해 활성화된다. 일부 구현예에서, T 세포는 CD3/CD28 자극을 통해 활성화되며, 여기서 하나 이상의 성분은 가용성이고/이거나 하나 이상의 성분이 고체 표면(예를 들어, 플레이트 또는 비드)에 결합된다. 일부 구현예에서, T 세포는 항원-비 의존성 미토겐(예를 들어, 예를 들어, 콘카나발린 A("ConA")를 포함하는 렉틴, 또는 PHA)에 의해 활성화된다.

- [0098] 일부 구현예에서, T 세포의 활성화를 위해 하나 이상의 사이토카인이 사용된다. T 세포 활성화를 위해 IL-2가 제공된다. 일부 구현예에서, T 세포의 활성화를 위한 사이토카인(들)은 공통 감마 사슬(γc) 수용체에 결합하는 사이토카인이다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화를 위해 IL-2가 제공된다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화를 위해 IL-7이 제공된다. 일부 구현예에서, T 세포 생존을 촉진하기 위해 IL-7이 제공된다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화를 위해 IL-15가 제공된다. 일부 구현예에서, T 세포 활성화를 위해 IL-21이 제공된다. 일부 구현예에서, 예를 들어, IL-2, IL-7, IL-15, 및/또는 IL-21을 포함하는 사이토카인의 조합이 T 세포 활성화를 위해 제공된다.
- [0099] 일부 구현예에서, T 세포는 세포를 항원에 노출시킴으로써 활성화된다(항원 자극). T 세포는 항원이 주요 조직 적합성 복합체("MHC") 분자(펩티드-MHC 복합체)에서 펩티드로 제시될 때 항원에 의해 활성화된다. 동족 항원은 T 세포를 항원-제시 세포(피더 세포) 및 항원과 함께 공동-배양함으로써 T 세포에 제시될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 항원으로 펄싱된 항원-제시 세포와의 공동-배양에 의해 활성화된다. 일부 구현예에서, 항원-제시 세포는 항원의 펩티드로 펄싱되었다.
- [0100] 일부 구현예에서, T 세포는 12 내지 72시간 동안 활성화될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 12 내지 48시간 동안 활성화될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 12 내지 24시간 동안 활성화될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 24 내지 48시간 동안 활성화될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 24 내지 72시간 동안 활성화될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 12시간 동안 활성화될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 48시간 동안 활성화될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 72시간 동안 활성화될 수 있다.
- [0101] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 상기 방법은 선택 단계를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 선택 단계가 포함되고, 선택적으로 선택 단계는 물리적 분류 단계(예를 들어, FACS 또는 MAC) 또는 생화학적 선택 단계(예를 들어, 자살 유전자, 약물 내성 선택 또는 항체-독소 접합체 선택)이다.
- [0102] 본원에 개시된 지질 핵산 어셈블리 조성물은 시험관 내에서 다중 게놈 편집 방법에 사용될 수 있다. 이 방법은 형질감염 과정 자체와 관련된 독성을 줄임으로써 이러한 방법의 기존 문제를 극복한다. 각 형질감염 이벤트의 감소된 독성은 다중 트랜잭션을 허용하므로 세포당 다중 게놈 편집이 가능하다.
- [0103] 일부 구현예에서, 게놈 편집은 표적 서열내 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 삽입, 결실, 또는 치환 중 임의의 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 게놈 편집은 표적 서열에 1, 2, 3, 4 또는 5개 이상의 뉴클레오타이드의 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 게놈 편집은 표적 서열에 1, 2, 3, 4 또는 5개 이상의 뉴클레오타이드의 결실을 포함한다. 다른 구현예에서, 게놈 편집은 표적 서열에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25개 이상의 뉴클레오타이드의 삽입을 포함한다. 다른 구현예에서, 게놈 편집은 표적 서열에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25개 이상의 뉴클레오타이드의 결실을 포함한다. 일부 구현예에서, 게놈 편집은 일반적으로 당업계에서 1000개 미만의 염기쌍(bp)의 삽입 또는 결실로 정의되는, 인델을 포함한다. 일부 구현예에서, 게놈 편집은 표적 서열에서 프레임시프트 돌연변이를 초래하는 인델을 포함한다. 일부 구현예에서, 게놈 편집은 표적 서열에서 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25개 이상의 뉴클레오타이드의 치환을 포함한다. 일부 구현예에서, 게놈 편집은 주형 핵산의 혼입으로 인한 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환 중 하나 이상을 포함한다. 일부 구현예에서, 게놈 편집은 표적 서열에 공여자 핵산의 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 편집 또는 변형은 일시적이지 않다.
- [0104] 일부 구현예에서, 하나 이상의 공여자 핵산은 표적 서열에 삽입하기 위해 제공된다. 일부 구현예에서, 삽입을 위한 표적 서열은 세이프 하버 유전자좌이다. 세이프 하버 유전자좌는 숙주 게놈에 불리한 변경을 일으키지 않으면서 외인성 서열의 통합을 수용할 수 있는 게놈 내의 부위이며, 당업계에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 삽입을 위한 표적 서열은 β -2 마이크로글로불린(B2M) 유전자에 있다. 일부 구현예에서, 삽입을 위한 표적 서열은 클래스 II 주요 조직적합성 복합체 트랜스활성화제(CIITA) 유전자에 있다. 일부 구현예에서, 삽입을 위한 표적 서열은 TRAC 유전자에 있다. 일부 구현예에서, 삽입을 위한 표적 서열은 AAVS1에 있다.
- [0105] **III. 세포 개체군 및 방법/용도**
- [0106] **A. 세포 개체군**
- [0107] 일부 구현예에서, 세포 당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군을 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 세포 당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군이 제공되며, 여기서 세포 개체군내 세포의 적어도 50%가 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서: (i) 세포 개체군에서 세포의 1% 미만, 0.5% 미만, 0.2% 미만, 또는 0.1% 미만이 표적-표적 전좌(target-to-target

translocation)를 갖거나; 또는 (ii) 및 세포 개체군이 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만이다. 일부 구현예에서, 세포 개체군에서 세포의 적어도 50%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군에서 세포의 1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군에서 세포의 적어도 50%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군에서 세포의 0.5% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군에서 세포의 적어도 50%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군에서 세포의 0.2% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군에서 세포의 적어도 50%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배 또는 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 또는 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 30배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 40배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 60배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 70배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 80배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 90배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집의 적어도 하나의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되며, RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제이다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집의 적어도 2개의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되며, RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제이다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집은 공여자 핵산의 삽입을 포함하며, 여기서 삽입은 선택적으로 표적화된 삽입이다.

[0108] 일부 구현예에서, 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군이 제공되며, 여기서 세포 개체군내 세포의 적어도 60%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서: (i) 세포 개체군내 세포의 1% 미만, 0.5% 미만, 0.2% 미만, 또는 0.1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖거나; 또는 (ii) 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 60%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 60%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.5% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 60%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.2% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 60%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 60%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 또는 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 또는 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 30배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 40배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 60배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 70배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 80배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 90배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집의 적어도 하나의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되며, 여기서 RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제이다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집의 적어도 2개의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되

며, 여기서 RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제이다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집은 공여자 핵산의 삽입을 포함하며, 여기서 삽입은 선택적으로 표적화된 삽입이다.

[0109]

일부 구현예에서, 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군이 제공되며, 여기서 세포 개체군내 세포의 적어도 70%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서: (i) 세포 개체군내 세포의 1% 미만, 0.5% 미만, 0.2% 미만, 또는 0.1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖거나; 또는 (ii) 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 70%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 70%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.5% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 70%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.2% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 70%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 70%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 또는 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 또는 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 30배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 40배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 60배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 70배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 80배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 90배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집의 적어도 하나의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되며, 여기서 RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제이다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집의 적어도 2개의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되며, 여기서 RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제이다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집은 공여자 핵산의 삽입을 포함하며, 여기서 삽입은 선택적으로 표적화된 삽입이다.

[01 10]

일부 구현예에서, 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군이 제공되며, 여기서 세포 개체군내 세포의 적어도 80%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서: (i) 세포 개체군내 세포의 1% 미만, 0.5% 미만, 0.2% 미만, 또는 0.1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖거나; 또는 (ii) 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 80%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 80%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.5% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 80%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.2% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 80%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 80%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 또는 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 또는 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 30배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 40배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 60배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 70배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 80배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 90배 확장될 수 있다.

될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집의 적어도 하나의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되며, 여기서 RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제이다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집의 적어도 2개의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되며, 여기서 RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제이다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집은 공여자 핵산의 삽입을 포함하며, 여기서 삽입은 선택적으로 표적화된 삽입이다.

[0111] 일부 구현예에서, 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군이 제공되며, 여기서 세포 개체군내 세포의 적어도 90%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서: (i) 세포 개체군내 세포의 1% 미만, 0.5% 미만, 0.2% 미만, 또는 0.1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖거나; 또는 (ii) 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 90%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 90%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.5% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 90%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.2% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 90%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 90%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 또는 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 또는 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 30배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 40배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 60배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 70배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 80배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 90배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집의 적어도 하나의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되며, 여기서 RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제이다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집의 적어도 2개의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되며, 여기서 RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제이다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집은 공여자 핵산의 삽입을 포함하며, 여기서 삽입은 선택적으로 표적화된 삽입이다.

[0112] 일부 구현예에서, 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군이 제공되며, 여기서 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서: (i) 세포 개체군내 세포의 1% 미만, 0.5% 미만, 0.2% 미만, 또는 0.1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖거나; 또는 (ii) 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.5% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.2% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군내 세포의 0.1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 또는 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 또는 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 30배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 40배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생

- [0118] 일부 구현예에서, 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군이 제공되며, 여기서 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 또는 50배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 또는 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 20배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 30배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 40배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 60배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 70배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 80배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 90배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하고, 여기서 세포 개체군은 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 생체외에서 100배 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 0.5% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 0.2% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 0.1% 미만은 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만을 갖는다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집의 적어도 하나의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되며, 여기서 RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제이다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집의 적어도 2개의 게놈 편집은 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는 게놈 편집 도구에 의해 생성되며, 여기서 RNA-가이드 DNA 결합체는 선택적으로 클레아바제이다. 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집은 공여자 핵산의 삽입을 포함하며, 여기서 삽입은 선택적으로 표적화된 삽입이다.
- [0119] 본원에 사용된 바와 같이, 세포가 배양 전, 편집 전 또는 편집 단계 사이에 동결된 경우 "배양 기간"은 세포가 해동되어 배양액에 들어간 날부터 배양 측정 기간이 시작된다. 즉, 배양 기간은 불연속적일 수 있다.
- [0120] 본원에 사용된 바와 같이, "편집 개시 후"는 세포 또는 세포의 개체군이 제1 LNP 조성물과 접촉되는 때로부터의 시간을 지칭한다.
- [0121] 본원에 기재된 바와 같이, 표적-표적 전좌는 표준 ddPCR 검정을 사용하여 검출될 수 있다.
- [0122] 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 인간 세포이다. 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 중간엽 줄기 세포; 조혈모 세포(HSC); 단핵 세포; 내피 전구 세포(EPC); 신경 줄기 세포(NSC); 윤부 줄기 세포(LSC); 조직-특이적 1차 세포 또는 그로부터 유래된 세포(TSC), 유도 만능 줄기 세포(iPSC); 안구 줄기 세포; 만능 줄기 세포(PSC); 배아 줄기 세포(ESC); 장기 또는 조직 이식용 세포, 및 ACT 요법에 사용하기 위한 세포로부터 선택된다.
- [0123] 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 림프구(예를 들어, T 세포, B 세포, 자연 살해 세포("NK 세포", 및 NKT 세포, 또는 iNKT 세포)), 단핵구, 대식세포, 비만 세포, 수지상 세포, 과립구(예를 들어, 호중구, 호산구, 및 호염기구), 1차 면역 세포, CD3+ 세포, CD4+ 세포, CD8+ T 세포, 조절 T 세포(Tregs), B 세포, NK 세포, 및 수지상 세포(DC))로부터 선택되는 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 림프구, T 세포, 선택적으로 CD4+ 세포, CD8+ 세포, 기억 T 세포, 나이브 T 세포, 줄기-세포 기억 T 세포; 또는 B 세포, 선택적으로 기억 B 세포, 나이브 B 세포; 및 1차 세포로부터 선택되는 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 중앙 침윤 림프구(TIL), 알파-베타 TCR을 발현하는 T 세포, 감마-델타 TCR을 발현하는 T 세포, 조절 T 세포(Treg), 기억 T 세포, 및 초기 줄기 세포 기억 T 세포(Tscm,

CD27+/CD45+)로부터 선택되는 T 세포이다.

- [0124] 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 편집 전 인간 공여자 PBMC 또는 류코팩으로부터 단리된 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 전구 세포로부터 유래된 면역 세포이다.
- [0125] 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 비-활성화된 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 활성화된 면역 세포이다.
- [0126] 일부 구현예에서, 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 제3 게놈 편집을 포함한다.
- [0127] 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군의 세포는 인간 대상체에게 전달하기 위한 것이다.
- [0128] 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 95%는 내인성 TCR 서열의 게놈 편집을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 96%는 내인성 TCR 서열의 게놈 편집을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 97%는 내인성 TCR 서열의 게놈 편집을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 98%는 내인성 TCR 서열의 게놈 편집을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 개체군내 세포의 적어도 99%는 내인성 TCR 서열의 게놈 편집을 포함한다.
- [0129] 일부 구현예에서, 세포 개체군은 표적화 리간드 또는 대체 항원 결합 모이어티를 암호화하는 외인성 핵산 서열의 삽입을 포함하는 게놈 편집을 갖는 편집된 세포를 포함하며, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 70%는 외인성 핵산의 표적 서열로의 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 표적화 리간드 또는 대체 항원 결합 모이어티를 암호화하는 외인성 핵산 서열의 삽입을 포함하는 게놈 편집을 갖는 편집된 세포를 포함하며, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 80%는 외인성 핵산의 표적 서열로의 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 표적화 리간드 또는 대체 항원 결합 모이어티를 암호화하는 외인성 핵산 서열의 삽입을 포함하는 게놈 편집을 갖는 편집된 세포를 포함하며, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 90%는 외인성 핵산의 표적 서열로의 삽입을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 표적화 리간드 또는 대체 항원 결합 모이어티를 암호화하는 외인성 핵산 서열의 삽입을 포함하는 게놈 편집을 갖는 편집된 세포를 포함하며, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 95%는 외인성 핵산의 표적 서열로의 삽입을 포함한다.
- [0130] 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집된 T 세포를 포함하고, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 또는 65%는 기억 표현형(CD27+, CD45RA+)을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집된 T 세포를 포함하고, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 30%는 기억 표현형(CD27+, CD45RA+)을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집된 T 세포를 포함하고, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 40%는 기억 표현형(CD27+, CD45RA+)을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집된 T 세포를 포함하고, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 50%는 기억 표현형(CD27+, CD45RA+)을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집된 T 세포를 포함하고, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 55%는 기억 표현형(CD27+, CD45RA+)을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집된 T 세포를 포함하고, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 60%는 기억 표현형(CD27+, CD45RA+)을 갖는다. 일부 구현예에서, 세포 개체군은 편집된 T 세포를 포함하고, 여기서 세포 개체군의 세포의 적어도 65%는 기억 표현형(CD27+, CD45RA+)을 갖는다.
- [0131] 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군은 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II의 표면 발현이 감소되거나 제거된 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군은 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II의 표면 발현이 감소되거나 제거된 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포 개체군은 표면 발현 HLA-A가 감소되거나 제거된 세포를 포함하고, 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성이다.
- [0132] 일부 구현예에서, 편집된 T 세포를 포함하는 세포 개체군은 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II의 표면 발현이 감소되거나 제거된 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 편집된 T 세포를 포함하는 세포 개체군은 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II의 표면 발현이 감소되거나 제거된 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 편집된 T 세포를 포함하는 세포 개체군은 표면 발현 HLA-A가 감소되거나 제거된 세포를 포함하고, 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성이다.
- [0133] 일부 구현예에서, 제공된 다중 전달 및 게놈 편집 방법에 따라 세포의 개체군이 생성된다. 일부 구현예에서, 개체군 내 세포의 적어도 50% 이상이 하나 초과와 게놈 편집을 포함한다. 일부 구현예에서, 개체군 내 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는

100%(즉, 검출 방법에 의해 결정된 모든 세포)는 하나 초과와 게놈 편집을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 적어도 2개의 게놈 편집을 갖는 세포의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 바람직하게는 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%를 생성한다. 다른 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개의 게놈 편집을 갖는 세포의 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 바람직하게는 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95%를 생성한다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 방법은 적어도 2개의 게놈 편집을 갖는 개체군 내 모든 세포의 약 5% 내지 약 100%, 약 10% 내지 약 50%, 약 20 내지 약 100%, 약 20 내지 약 80%, 약 40 내지 약 100%, 또는 약 40 내지 약 80%를 생성한다. 일부 구현예에서, 세포는 편집된 세포에 대한 개체군을 풍부하게 하기 위해 편집 완료 시, 선택 프로세스, 예를 들어 FACS 또는 생화학적 선택 프로세스를 겪지 않았다.

[0134] 일부 구현예에서, 전달 방법 및 게놈 편집 방법은 생존이 증가된, 시험관내에서 확장된 세포를 생산한다. 구현예에서, 개선된 생존율은 전기천공 공정으로 처리된 세포와 비교될 수 있다. 구현예에서, 확장된 세포의 세포 생존율은 적어도 70%, 80%, 90%, 또는 95%이다.

[0135] 일부 구현예에서, 전달 방법 및 게놈 편집 방법은 독성이 낮은, 시험관내에서 세포를 생산한다. 예를 들어, 구현예에서, 개시된 방법의 생성된 세포는 예를 들어, 표적-표적 전좌, 및/또는 표적외 전좌를 포함하는, 2%, 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1% 미만의 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 개시된 방법의 생성된 세포는 1%, 0.5%, 0.2%, 0.1% 미만의 표적-표적 전좌를 갖는다. 일부 구현예에서, 개시된 방법의 생성된 세포는 예를 들어, 표적-표적 전좌, 및/또는 표적외 전좌를 포함하는 측정가능한 전좌가 없다. 일부 구현예에서, 생성된 세포는 예를 들어, 본원에 제공된 상기 방법을 사용하여 결정된 바와 같이 측정 가능한 상호 전좌를 갖지 않는다. 일부 구현예에서, 생성된 세포는 예를 들어, 본원에 제공된 방법을 사용하여 결정된 바와 같이 측정 가능한 복합 전좌를 갖지 않는다. 일부 구현예에서, 생성된 세포는 예를 들어, 본원에 제공된 방법을 사용하여 결정된 바와 같이 측정 가능한 표적외 전좌를 갖지 않는다. 일부 구현예에서, 생성된 세포는 예를 들어, 본원에 제공된 방법을 사용하여 결정된 바와 같이 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준의 2배 미만을 갖는다

[0136] 일부 구현예에서, 게놈 편집 방법은 높은 편집 효율을 갖는 세포를 생산한다. 개시된 방법의 특정 이점은 다중 게놈 편집을 갖는 세포에서 관찰되는 높은 편집 속도이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 퍼센트 편집 효율은 각 표적 부위에서 적어도 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%이다.

[0137] 임의의 특정 용도에 필요한 개체군 내 세포의 수는 예를 들어 세포 유형 및 세포의 의도된 용도에 따라 다르다는 것이 이해된다. 편집될 세포의 수는 편집 후 세포를 증식시키는 능력에 따라 달라진다. 또한 필요한 편집 수준, 또는 필요한 녹다운 수준은, 적어도 부분적으로, 수행되는 특정 편집 및 세포 개체군의 의도된 용도에 따라 달라짐이 이해된다. 예를 들면, 예를 들어, 30% 이하, 40% 이하, 50% 이하의 게놈 편집을 갖는 B 세포의 개체군은 단백질 발현 시스템에서 유용할 수 있다. 예를 들어, T 대상체에 이식될 때 세포 표면의 낮은 수준의 내인성 TCR은 심각한 부작용을 유발할 수 있으므로, 대상체에 이식하기 위해서는 T 세포 표면의 내인성 T 세포 수용체 (TCR)에 더 높은 수준의 녹다운이 필요하다. 따라서, 내인성 TCR을 발현하는 T 세포는 이식 목적을 위한 T 세포의 개체군에서 가능한 한 낮은 수준으로 존재해야 한다. 그러나, 사이토카인 또는 기타 분비 인자를 생산하기 위한 T 세포의 편집은 이식을 위한 T 세포의 개체군에서 내인성 TCR에 필요한 만큼 높은 수준의 편집을 필요로 하지 않을 수 있다.

[0138] 예시적인 편집된 세포 개체군 크기가 이하에 제공된다. 임의의 특정 적응증에 필요한 편집된 세포의 수는 다양할 수 있으며, 예를 들어 치료 방법이 다양할 수 있을 이해해야 한다. 또한, 자가 요법보다 동종이계 요법에 사용하기 위한 세포 개체군에 대해 더 많은 수의 세포가 바람직할 수 있다.

[0139] 특정 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군은 T 세포의 개체군이다. 특정 구현예에서 T 세포의 개체군은 다중, 즉, 적어도 2개의 편집을 갖는 1×10^9 개 편집된 T 세포를 포함한다. 특정 구현예에서 T 세포의 개체군은 적어도 단일 편집을 갖는 5×10^9 개 편집된 T 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, T 세포의 개체군은 $1 \sim 10 \times 10^9$ 개 편집된 T 세포를 포함하고, TCR-T 세포 요법에 유용하다. 특정 구현예에서, T 세포의 개체군은 1×10^8 개 편집된 T 세포를 포함하고, CAR-T 요법에 유용하다.

[0140] 특정 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군은 B 세포의 개체군이다. 특정 구현예에서, B 세포의 개체군은 적어도 단일 편집을 갖는 $1 \sim 5 \times 10^8$ 개 편집된 B 세포를 포함하고, 바람직하게는 다중 편집을 갖는 편집된 B 세포를 포함한다.

- [0141] 특정 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군은 NK 세포의 개체군이다. 특정 구현예에서 NK 세포의 개체군은 적어도 단일 편집을 갖는 3×10^9 개 NK 편집된 NK 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, NK 세포의 개체군은 다중 편집을 갖는 적어도 5×10^8 개 편집된 NK 세포를 포함한다. 특정 구현예에서, NK 세포의 개체군은 방법에 유용한 1×10^8 내지 9×10^9 개 편집된 NK 세포를 포함한다.
- [0142] 특정 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군은 단핵구 또는 대식세포의 개체군이다. 특정 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 단핵구 또는 대식세포의 개체군은 적어도 단일 편집을 갖는 1×10^9 개 단핵구 또는 대식세포, 또는 다중 편집을 갖는 적어도 2×10^8 개 단핵구 또는 대식세포를 포함한다.
- [0143] 특정 구현예에서, 편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군은 수지상 세포이다. 특정 구현예에서, 수지상 세포의 개체군은 5×10^6 내지 5×10^7 개 편집된 수지상 세포를 포함한다.
- [0144] 일부 구현예에서, 시험관 내에서 T 세포에 대한 게놈 편집 방법은 여러 표적 부위에서 높은 편집 효율을 생성했다. 일부 구현예에서, 내인성 TCR이 녹아웃된 조작된 T 세포가 생산된다. 일부 구현예에서, 내인성 TCR의 발현이 감소된 조작된 T 세포가 생산된다. 일부 구현예에서, 3개의 유전자가 감소된 발현을 갖고/갖거나 녹아웃된 조작된 T 세포가 생산된다. 일부 구현예에서, 4개의 유전자가 감소된 발현을 갖고/갖거나 녹아웃된 조작된 T 세포가 생산된다. 일부 구현예에서, 5개의 유전자가 감소된 발현을 갖고/갖거나 녹아웃된 조작된 T 세포가 생산된다. 일부 구현예에서, 6개의 유전자가 감소된 발현을 갖고/갖거나 녹아웃된 조작된 T 세포가 생산된다. 일부 구현예에서, 7개의 유전자가 감소된 발현을 갖고/갖거나 녹아웃된 조작된 T 세포가 생산된다. 일부 구현예에서, 8개의 유전자가 감소된 발현을 갖고/갖거나 녹아웃된 조작된 T 세포가 생산된다. 일부 구현예에서, 9개의 유전자가 감소된 발현을 갖고/갖거나 녹아웃된 조작된 T 세포가 생산된다. 일부 구현예에서, 10개의 유전자가 감소된 발현을 갖고/갖거나 녹아웃된 조작된 T 세포가 생산된다. 일부 구현예에서, 11개의 유전자가 감소된 발현을 갖고/갖거나 녹아웃된 조작된 T 세포가 생산된다.
- [0145] 일부 구현예에서, 내인성 TCR이 녹아웃되고 이식유전자 TCR이 삽입 및 발현되는 조작된 T 세포가 생산된다. 일부 구현예에서, 조작된 T 세포는 1차 인간 T 세포이다. 일부 구현예에서, tgTCR은 윌름스 종양(Wilms' tumor) 1(WT1)을 표적화한다. 일부 구현예에서, WT1 tgTCR은 개시된 지질 핵산 어셈블리 조성물을 사용하여 높은 비율의 T 세포(예를 들어, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 초과)에 삽입된다.
- [0146] 일부 구현예에서, 개시된 방법에 의해 생산된 T 세포는 증가된 사이토카인 생성을 갖는다. 일부 구현예에서, 사이토카인 생성의 증가는 전기천공 공정으로 처리된 T 세포와 비교될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 T 세포는 증가된 수준의 IL-2를 생성하였다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 T 세포는 증가된 수준의 IFN γ 를 생성하였다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 T 세포는 증가된 수준의 TNF α 를 생성하였다. 사이토카인 수준은 예를 들어, ELISA, 세포내 유세포 분석법 염색을 포함하는 표준 방법으로 결정될 수 있다.
- [0147] 일부 구현예에서, 개시된 방법에 의해 생산된 T 세포는 반복 자극으로 지속적인 증식을 나타낸다. 예를 들어, T 세포는 T 세포를 자극하는 데 사용되는 작용제로 시험관내 배양에서 반복 자극 후에 증식될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 T 세포의 TCR에 대한 동족 항원(예를 들어, T 세포와 공동 배양되는 세포 상의 펩티드-MHC 복합체)에 의한 반복 자극에 반응하여 자극되고 증식될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 반복적인 다클론성 자극에 반응하여 자극되고 증식될 수 있다. 일부 구현예에서, 반복 자극은 적어도 2회, 3회, 4회, 5회, 또는 그 이상이다. 일부 구현예에서, 증식하는 세포는 유전적 변형을 포함하는 세포의 개체군을 형성하도록 확장된다.
- [0148] 일부 구현예에서, 개시된 방법에 의해 생산된 T 세포는 증가된 확장을 나타낸다. 일부 구현예에서, 확장 증가는 전기천공 공정으로 처리된 T 세포와 비교될 수 있다. 확장은 세포 수, 증식, 또는 T 세포의 확장을 측정하기 위한 다른 표준 방법에 의해 평가될 수 있다.
- [0149] 일부 구현예에서, 개시된 방법에 의해 생산된 T 세포는 기억 T 세포 표현형을 나타낸다. 일부 구현예에서, 초기 줄기-세포 기억 T 세포(또는 "Tscm")로 지칭되는 T 세포 기억 표현형이 특히 유리하고, 개시된 방법에 의해 생성된다. 일부 구현예에서, 유전적으로 조작된 T 세포는 Tscm 표현형(CD27+, CD45RA+)을 갖는다.
- [0150] 일부 구현예에서, 개시된 방법에 의해 생산된 조작된 세포(예를 들어, T 세포)는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II의 표면 발현을 감소시키거나 제거하였다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 모두의 표면 발현을 감소시키거나 제거하였다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 표면 발현 HLA-A를 감소시키거나 제거하였으며, 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성이다.

- [0151] 일부 구현예에서, 개시된 방법에 의해 생산된 조작된 T 세포는 MHC 클래스 I 및/또는 MHC 클래스 II의 표면 발현을 감소시키거나 제거하였다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 MHC 클래스 I 및 MHC 클래스 II 모두의 표면 발현을 감소시키거나 제거하였다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 표면 발현 HLA-A를 감소시키거나 제거하였으며, 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성이다.
- [0152] 일부 구현예에서, 이에 사용된 시약 및 그에 의해 생산된 생성물의 다음 모든 이점 중 하나 이상이 당업계에 공지된 다른 계놈 편집 방법, 예를 들어 전기천공법에 의해 생산된 생성물과 비교하여 관찰된다:
- [0153] a. 편집된 세포를 편집 개시 후 배양액에서 14일 이내에 예를 들어, 20배, 30배, 40배, 또는 50배수 확장, 선택적으로 60배, 70배, 또는 80배 확장하는 개선된 능력;
- [0154] b. 대체 방법, 예컨대 전기천공에 의한 비교가능한 삽입율;
- [0155] c. 바람직하게는 편집되지 않은 세포를 제거하거나 편집된 세포를 강화시키는 선택 단계 없이, 즉 더 큰 편집 효율로 인해, 하나 이상의 편집, 예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 편집을 갖는 세포의 증가된 백분율을 포함하는, 편집되지 않은 세포의 감소된 수/백분율;
- [0156] d. 보다 바람직한 기억 세포 표현형, 예를 들어, 기억 T 세포 표현형(CD27+, CD45RA+)을 갖는 적어도 30%, 40%, 바람직하게는 적어도 50%;
- [0157] e. 편집된 세포 유형에 의존적인, 증가된 사이토카인 생산(예를 들어, IL-2, IFN γ , TNF α), 또는 다른 사이토카인;
- [0158] f. 편집된 세포의 개선된 세포독성;
- [0159] g. 편집된 세포의 개선된 증식 및/또는 증식 능력
- [0160] h. 특히 T 세포에서 반복 자극으로 반응 지속성 향상; 및/또는
- [0161] i. 감소된 전좌율, 예를 들어, 2%, 1%, 0.5%, 0.2%, 또는 0.1% 미만의 전좌율의 전좌, 바람직하게는 표적-표적 전좌; 또는 배경과 비교하여 총 전좌 수의 2배 미만과 같이, 바람직하지 않은 부작용 및 돌연변이의 비율 감소.
- [0162] **B. 장애를 치료하기 위한 방법/용도**
- [0163] 개시된 다중 방법에 의해 생성된 본원에 제공된 세포 및/또는 세포의 개체군은 다양한 질환 및 장애를 치료하는 방법에 사용될 수 있다.
- [0164] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 대상체에게 면역요법을 제공하는 방법을 제공하며, 상기 방법은 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 세포(예를 들어, 세포의 개체군), 예를 들어, 상기 세포 양태 및 구현예 중 어느 하나의 세포를 투여하는 단계를 포함한다.
- [0165] 방법의 일부 구현예에서, 방법은 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 세포(예를 들어, 세포의 개체군), 예를 들어, 상기 세포 양태 및 구현예 중 어느 하나의 세포를 투여하기 전에 림프구 고갈제 또는 면역억제제를 투여하는 단계를 포함한다. 또 다른 양태에서, 본 개시내용은 세포(예를 들어, 세포의 개체군)를 제조하는 방법을 제공한다.
- [0166] 면역요법은 면역계를 활성화 또는 억제함으로써 질환을 치료하는 것이다. 면역 반응을 유도하거나 증폭하도록 설계된 면역요법은 활성화 면역요법으로 분류된다. 세포-기반 면역요법은 일부 암 치료에 효과적인 것으로 입증되었다. 면역 효과기 세포, 예컨대 림프구, 대식세포, 수지상 세포, 자연 살해 세포, 세포독성 T 림프구(CTL)는 종양 세포 표면에서 발현되는 비정상적인 항원에 반응하여 작용하도록 프로그래밍될 수 있다. 따라서, 암 면역요법은 면역 체계의 성분이 종양 또는 다른 암 세포를 파괴하도록 한다. 세포-기반 면역요법은 또한 자가면역 질환 또는 이식 거부 치료에 효과적인 것으로 입증되었다. 면역 효과기 세포, 예컨대 조절 T 세포(Tregs) 또는 중간엽 줄기 세포는 정상 조직의 표면에서 발현되는 자가항원 또는 이식 항원에 반응하여 프로그래밍될 수 있다.
- [0167] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 세포의 개체군 또는 세포(예를 들어, 세포의 개체군)를 제조하는 방법을 제공한다. 세포의 개체군은 면역요법을 위해 사용될 수 있다.
- [0168] 본 개시내용의 세포는 예를 들어 추가로 편집되거나 변형된 유전자 또는 대립유전자의 도입에 의한 추가 조작에 적합하다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드는 야생형 또는 변이체 TCR이다. 본 개시내용의 세포는 대체 항원 결합

모이어티를 암호화하는 이중 서열을 도입함으로써, 예를 들어, 특정 단백질을 표적화하도록 조작된 대체(비-내인성) TCR, 예를 들어, 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 이중 서열을 도입함으로써, 추가 조작에 적합할 수도 있다. CAR는 또한, 키메라 면역수용체, 키메라T 세포 수용체 또는 인공 T 세포 수용체로도 알려져 있다.

[0169] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 세포(예를 들어, 세포의 개체군), 예를 들어, 본원에 기재된 세포를 제조하는 방법, 예를 들어, 세포를 제조하는 방법의 기술한 측면 및 구현예 중 임의의 방법에 의해 제조되는 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 치료를 필요로 하는 대상체의 치료 방법을 제공한다.

[0170] 일부 구현예에서, 개시된 방법에 의해 생성된 세포의 개체군 또는 세포는 암, 감염성 질환, 염증성 질환, 자가면역 질환, 심혈관 질환, 신경계 질환, 안과 질환, 신장 질환, 간 질환, 근골격계 질환, 적혈구 질환, 또는 이식 거부를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0171] 일부 구현예에서, 암은 림프종, 유방암, 폐암, 다발성 골수종, 백혈병, 간암, 요로암, 신장암, 방광암, 흑색종, 결장직장암, 췌장암, 상피 악성종양, 중피종, 구인두암, 자궁경부암, 자궁암, 난소암, 항문생식기암, 또는 뇌암이다. 일부 구현예에서, 림프종은 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), 공격형 B 세포 림프종, 또는 고등급 B 세포 림프종, 또는 맨틀 세포 림프종을 포함한 비호지킨 림프종이다. 일부 구현예에서, 유방암은 삼중 음성 유방암이다. 일부 구현예에서, 폐암은 비-소세포 폐암(NSCLC) 또는 소세포 폐암(SCLC)이다. 일부 구현예에서, 백혈병은 급성 림프구성 백혈병 또는 급성 골수성 백혈병이다. 일부 구현예에서, 암은 고형 종양이다.

[0172] 일부 구현예에서, 감염성 질환은 인간 면역결핍 바이러스(HIV), A형 간염 바이러스, C형 간염 바이러스, B형 간염 바이러스, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인-바 바이러스, 인간 유두종바이러스, 마이코박테리움 투베르쿨로시스, 인간 코로나바이러스 또는 침습성 아스페르길루스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*)로 인해 유발된다. 일부 구현예에서, 감염성 질환은 후천성 면역결핍 증후군(AIDS), A형 간염, B형 간염, C형 간염, 결핵, 중증 급성 호흡기 증후군(SARS), 중동 호흡기 증후군(MERS), 또는 코로나바이러스 질환 2019(COVID-19)이다. 일부 구현예에서, 결핵은 다약제-내성(MDR) 결핵 또는 광범위 약물-내성(XDR) 결핵이다. 일부 구현예에서, 인간 코로나바이러스는 중동 호흡기 증후군 코로나바이러스(MERS-CoV), 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스(SARS-CoV), 또는 중증 급성 호흡기 증후군 코로나바이러스 2(SARS-CoV2)이다. 일부 구현예에서, 감염성 질환은 인간 유두종바이러스-양성 암, 예컨대 자궁암, 자궁경부암, 또는 구인두암이다.

[0173] 일부 구현예에서, 염증성 질환은 알레르기, 천식, 체강 질환, 사구체신염, 염증성 장 질환, 통풍, 류마티스성 관절염(RA), 근염, 경피증, 강직성 척추염(AS), 항인지질 항체 증후군(APS), 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 쇼그렌 증후군, 류마티스 심장병, 만성 폐쇄성 폐질환(COPD), 또는 이식 거부이다.

[0174] 일부 구현예에서, 자가면역 질환은 1형 당뇨병, 다발성 경화증, 크론병, 췌양성 대장염, 자가면역 갑상선 질환, 류마티스성 관절염(RA), 염증성 장 질환, 항인지질 항체 증후군(APS), 쇼그렌 증후군, 경피증, 건선, 건선성 관절염, 길랭-바레 증후군, 애디슨병, 그레이브스병, 하시모토 갑상선염, 중증 근무력증, 자가면역 혈관염, 자가면역 포도막염, 자가면역 간염, 악성 빈혈, 셀리악 질환, 또는 전신성 홍반성 루푸스(SLE)이다.

[0175] 일부 구현예에서, 심혈관 질환은 허혈성 심장 질환, 관상동맥 심장 질환, 대동맥 질환, 마판 증후군, 선천성 심장 질환, 심장 판막 질환, 심낭 질환, 류마티스성 심장 질환, 말초 동맥 질환, 또는 뇌졸중이다.

[0176] 일부 구현예에서, 신경계 질환은 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 뇌졸중, 척수 손상, 알츠하이머병, 연령-관련 황반 변성, 외상성 뇌 손상, 다발성 경화증, 헌팅턴병, 근이영양증 또는 길랭-바레 증후군이다.

[0177] 일부 구현예에서, 안과 질환은 녹내장, 망막병증, 황반 변성 또는 거대세포바이러스(CMV) 망막염이다. 일부 구현예에서, 안과 질환은 망막 질환이다. 일부 구현예에서, 안과 질환은 VEGF에 의해 매개된다.

[0178] 일부 구현예에서, 개시된 방법에 의해 생성된 조작된 세포는 자가 세포 요법을 포함하는 세포 요법으로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 세포는 동종 줄기 세포 요법을 포함하는 세포 요법으로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 요법은 유도 만능 줄기 세포(iPSC)를 포함한다. iPSC는 예를 들어, 베타 섬 세포, 뉴런 및 혈액 세포를 포함하는 다른 세포 유형으로 분화하도록 유도될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 요법은 조혈 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 뼈, 연골, 근육 및 지방 세포로 발달할 수 있는 중간엽 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 안구 줄기 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 동종이계 줄기 세포 이식은 동종이계 골수 이식을 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 만능 줄기 세포(PSC)를 포함한다. 일부 구현예에서, 줄기 세포는 유도된 배아 줄기 세포(ESC)를 포함한다.

[0179] 일부 구현예에서, 세포 요법은 이식유전자 T 세포 요법이다. 일부 구현예에서, 세포 요법은 이식유전자 T 세포

를 표적화하는 윌름스 종양 1(WT1)을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 요법은 상업적으로 이용가능한 T 세포 요법, 예컨대 CAR T 세포 요법의 표적화 수용체 또는 표적화 수용체를 암호화하는 공여자 핵산을 포함한다. 현재 세포 치료용으로 승인된 수많은 표적화 수용체가 있다. 본원에 제공된 세포 및 방법은 이들 공지된 작제물과 함께 사용될 수 있다. 세포 치료제로 사용하기 위한 표적 수용체 작제물을 포함하는 상업적으로 승인된 세포 제품에는 예를 들어, Kymriah®(티사젠렉루셀); Yescarta®(엑시캅타진 실로루셀); Tecartus™(브렉수캅타진 오토루셀); 타벨레클루셀(Tab-cel®); 비랄림-M(ALVR105); 및 비랄림(Viralym)-C가 있다.

[0180] C. 예시적인 세포 유형

[0181] 일부 구현예에서, 세포는 면역 세포이다. 본원에 사용된 바와 같이, "면역 세포"는 예를 들어, 림프구(예를 들어, T 세포, B 세포, 자연 살해 세포("NK 세포", 및 NKT 세포, 또는 iNKT 세포)), 단핵구, 대식세포, 비만 세포, 수지상 세포, 또는 과립구(예를 들어, 호중구, 호산구, 및 호염기구)를 포함하는 면역계의 세포를 지칭한다. 일부 구현예에서, 세포는 1차 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 면역계 세포는 CD3⁺, CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포, 조절 T 세포(Tregs), B 세포, NK 세포, 및 수지상 세포(DC)로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 동종이계이다.

[0182] 일부 구현예에서, 세포는 림프구이다. 일부 구현예에서, 세포는 적응 면역 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 B 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 NK 세포이다.

[0183] 본원에 사용된 바와 같이, T 세포는 T 세포 수용체("TCR" 또는 " $\alpha\beta$ TCR" 또는 " $\gamma\delta$ TCR")를 발현하는 세포로 정의될 수 있지만, 일부 구현예에서, T 세포의 TCR은 그의 발현을 감소시키기 위해 (예를 들어, TRAC 또는 TRBC 유전자에 대한 유전적 변형에 의해)유전적으로 변형될 수 있으므로, 단백질 CD3의 발현은 표준 유세포 분석법 방법에 의해 T 세포를 식별하기 위한 마커로서 사용될 수 있다. CD3은 TCR과 관련된 다중-서브유닛 신호전달 복합체이다. 따라서, T 세포는 CD3+로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 CD3+ 마커 및 CD4+ 또는 CD8+ 마커를 발현하는 세포이다.

[0184] 일부 구현예에서, T 세포는 당단백질 CD8을 발현하므로, 표준 유세포 분석법 방법에 의해 CD8+이고, "세포독성" T 세포로 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포는 당단백질 CD4를 발현하므로 표준 유세포 분석법 방법에 의해 CD4+이고, "헬퍼" T 세포로 지칭될 수 있다. CD4+ T 세포는 서브세트로 분화할 수 있으며, Th1 세포, Th2 세포, Th9 세포, Th17 세포, Th22 세포, T 조절("Treg") 세포, 또는 T 소낭 헬퍼 세포("Tfh")로 지칭될 수 있다. 각 CD4+ 서브세트는 염증 유발 또는 항염증 기능, 생존 또는 보호 기능을 가질 수 있는 특정 사이토카인을 방출한다. T 세포는 CD4+ 또는 CD8+ 선택 방법에 의해 대상체로부터 분리될 수 있다.

[0185] 일부 구현예에서, T 세포는 기억 T 세포이다. 체내에서, 기억 T 세포는 항원을 만났다. 기억 T 세포는 2차 림프 기관(중앙 기억 T 세포) 또는 최근에 감염된 조직(효과기 기억 T 세포)에 위치할 수 있다. 기억 T 세포는 CD8+ T 세포일 수 있다. A 기억 T 세포는 CD4+ T 세포일 수 있다.

[0186] 본원에 사용된 바와 같이, "중앙 기억 T 세포"는 항원-경험 T 세포로 정의될 수 있고, 예를 들어, CD62L 및 CD45RO를 발현할 수 있다. 중앙 기억 T 세포는 CCR7도 발현하는 중앙 기억 T 세포에 의해 CD62L+ 및 CD45RO+로 검출될 수 있으며, 따라서 표준 유세포 분석법 방법에 의해 CCR7+로 검출될 수 있다.

[0187] 본원에 사용된 바와 같이, "초기 줄기-세포 기억 T 세포"(또는 "Tscm")는 CD27 및 CD45RA를 발현하는 T 세포로 정의될 수 있으며, 표준 유세포 분석법 방법에 의해 CD27+ 및 CD45RA+이다. Tscm은 CD45 동형 CD45RO를 발현하지 않으므로, Tscm은 표준 유세포 분석법 방법으로 이 동형에 대해 염색된 경우 추가로 CD45RO-가 될 것이다. 따라서, CD45RO- CD27+ 세포는 초기 줄기-세포 기억 T 세포이기도 하다. Tscm 세포는 CD62L 및 CCR7을 추가로 발현하므로, 표준 유세포 분석법 방법에 의해 CD62L+ 및 CCR7+로 검출될 수 있다. 초기 줄기-세포 기억 T 세포는 세포 치료제의 지속성 및 치료 효능 증가와 관련이 있는 것으로 나타났다.

[0188] 일부 구현예에서, 세포는 B 세포이다. 본원에 사용된 바와 같이, "B 세포"는 CD19 및/또는 CD20, 및/또는 B 세포 성숙 항원("BCMA")을 발현하는 세포로 정의될 수 있으며, 따라서 B 세포는 CD19+, 및/또는 CD20+이고/이거나 표준 유세포 분석법 방법에 의한 BCMA+이다. B 세포는 표준 유세포 분석법 방법에 의해 CD3 및 CD56에 대해 추가로 음성이다. B 세포는 형질 세포일 수 있다. B 세포는 기억 B 세포일 수 있다. B 세포는 나이브 B 세포일 수 있다. B 세포는 IgM+일 수 있거나, 또는 클래스-전환 B 세포 수용체(예를 들어, IgG+, 또는 IgA+)를 갖는다.

[0189] 일부 구현예에서, 세포는 예컨대 골수 또는 말초 혈액으로부터의 단핵 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 말초 혈액 단핵 세포("PBMC")이다. 일부 구현예에서, 세포는 PBMC, 예를 들어 림프구 또는 단핵구이다. 일부 구현예

에서, 세포는 말초 혈액 림프구("PBL")이다.

[0190] ACT 요법에 사용되는 세포, 예컨대 중간엽 줄기 세포(예를 들어, 골수(BM), 말초 혈액(PB), 태반, 제대(UC) 또는 지방으로부터 분리됨); 조혈모세포(HSC; 예를 들어 BM으로부터 분리됨); 단핵 세포(예를 들어, BM 또는 PB로부터 분리됨); 내피 전구 세포(EPC; BM, PB, 및 UC로부터 분리됨); 신경 줄기 세포(NSC); 운부 줄기 세포(LSC); 또는 조직-특이적 1차 세포 또는 그로부터 유래된 세포(TSC)가 포함된다. ACT 요법에 사용되는 세포는 예를 들어, 섬 세포, 뉴런 및 혈액 세포; 안구 줄기 세포; 만능 줄기 세포(PSC); 배아 줄기 세포(ESC); 장기 또는 조직 이식용 세포 예컨대 섬 세포, 심근 세포, 갑상선 세포, 홍선 세포, 신경 세포, 피부 세포, 망막 세포, 연골 세포, 근육 세포 및 각질 세포를 포함한, 다른 세포 유형으로 분화되도록 유도될 수 있는 유도 만능 줄기 세포(iPSC; 예를 들어, Mahla, International J. Cell Biol. 2016(Article ID 6940283): 1-24(2016) 참고)를 추가로 포함한다.

[0191] 일부 구현예에서, 세포는 인간 세포, 예컨대 대상체로부터의 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 인간 대상체로부터 분리된다. 일부 구현예에서, 세포는 환자로부터 분리된다. 일부 구현예에서, 세포는 공여자로부터 분리된다. 일부 구현예에서, 세포는 인간 공여자 PBMC 또는 류코팩으로부터 분리된다. 일부 구현예에서, 세포는 병태, 장애 또는 질환이 있는 대상체로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 세포는 엡스타인 바 바이러스("EBV")를 가진 인간 공여자로부터 유래한다.

[0192] 일부 구현예에서, 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성이다. 일부 구현예에서, 세포는 HLA-A 유전자에 유전적 변형을 함유하고, HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성이다.

[0193] 일부 구현예에서, 방법은 생체외에서 수행된다. 본원에 사용된 바와 같이, "생체외"는 세포가 대상체로 전달될 수 있는 시험관내 방법, 예를 들어 ACT 요법을 지칭한다. 일부 구현예에서, 생체외 방법은 ACT 요법 세포 또는 세포 개체군을 포함하는 시험관내 방법이다.

[0194] 일부 구현예에서, 세포는 배양액에서 유지된다. 일부 구현예에서, 세포는 환자에게 이식된다. 일부 구현예에서, 세포는 대상체로부터 제거되어, 생체외에서 유전적으로 변형된 다음, 동일한 환자에게 다시 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 대상체로부터 제거되어, 생체외에서 유전적으로 변형된 다음, 세포가 제거된 대상체 이외의 다른 대상체에게 투여된다.

[0195] 일부 구현예에서, 세포는 세포주로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 세포주는 인간 대상체로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 세포주는 림프아구성 세포주("LCL")이다. 세포는 동결보존 및 해동될 수 있다. 세포는 이전에 동결보존되지 않았을 수 있다.

[0196] 일부 구현예에서, 세포는 세포 은행으로부터 유래한다. 일부 구현예에서, 세포는 유전적으로 변형된 다음 세포 은행으로 전달된다. 일부 구현예에서, 세포는 대상체로부터 제거되어, 생체외에서 유전적으로 변형된 다음, 세포 은행으로 전달된다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 세포의 개체군은 세포 은행으로 전달된다. 일부 구현예에서, 유전적으로 변형된 면역 세포의 개체군은 세포 은행으로 전달된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 하위개체군을 포함하는 유전적으로 변형된 면역 세포의 개체군은 세포 은행으로 전달되며, 여기서 제1 및 제2 하위개체군은 적어도 하나의 공통 유전적 변형 및 적어도 하나의 상이한 유전적 변형을 갖는다.

[0197] IV. 예시적인 게놈 편집 도구

[0198] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리는 게놈 편집 도구 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함한다.

[0199] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "게놈 편집 도구"(또는 "유전자 편집 도구")는 세포의 게놈에서 편집을 생성하는 데 필요하거나 도움이 되는 "게놈 편집 시스템"(또는 "유전자 편집 시스템")이다. 일부 구현예에서, 본 개시 내용은 게놈 편집 시스템(예를 들어 징크 핑거 뉴클레아제 시스템, TALEN 시스템, 메가뉴클레아제 시스템 또는 CRISPR/Cas 시스템)의 게놈 편집 도구를 세포(또는 세포의 개체군)에 전달하는 방법을 제공한다. 게놈 편집 도구는 예를 들어, 세포의 DNA 또는 RNA, 예를 들어 세포의 게놈에서 단일 또는 이중 가닥 절단을 만들 수 있는 뉴클레아제를 포함한다. 게놈 편집 도구, 예를 들어 뉴클레아제, 또는 니카제는 선택적으로 핵산을 제거하지 않으면서 세포의 게놈을 선택적으로 변형시킬 수 있다. 게놈 편집 뉴클레아제 또는 니카제는 mRNA로 암호화될 수 있다. 이러한 뉴클레아제는 예를 들어, RNA-가이드 DNA 결합제, 및 CRISPR/Cas 성분을 포함한다. 게놈 편집 도구는 예를 들어, 편집자 도메인과 같은 효과기 도메인에 융합된 니카제를 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 게놈 편집 도구는 예를 들어, 가이드 RNA, sgRNA, dgRNA, 공여자 핵산, 등과 같이 게놈 편집의 목적을 달성하기 위해 필요하거나 도움이 되는 임의의 항목을 포함한다.

- [0200] CRISPR/Cas 시스템; 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 시스템; 및 전사 활성화기-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN) 시스템을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 지질 핵산 어셈블리 조성물을 전달하기 위한 게놈 편집 도구를 포함하는 다양한 적합한 유전자 편집 시스템이 본원에 기재되어 있다. 일반적으로, 유전자 편집 시스템은 표적 DNA 서열에서 이중 가닥 절단(DSB) 또는 Nick(예를 들어, 단일 가닥 절단, 또는 SSB)을 유도하기 위해 조작된 절단 시스템의 용도를 포함한다. 절단 또는 Nicking(nicking)은 특정 뉴클레아제 예컨대 조작된 ZFN, TALEN을 사용하거나, 또는 표적 DNA 서열의 특정 절단 또는 Nicking을 가이드하기 위해 조작된 가이드 RNA와 함께 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 일어날 수 있다. 또한, 아르곤노트(Argonaute) 시스템(예를 들어, T. 써모필루스(thermophilus)로부터 유래된, 'TtAgo'로도 알려져 있음, Swarts et al(2014) Nature 507(7491): 258-261 참고)을 기반으로 표적화된 뉴클레아제가 개발되고 있으며, 이는 또한 게놈 편집 및 유전자 요법에 사용하기 위한 잠재력을 가질 수 있다.
- [0201] **A. CRISPR/Cas 게놈 편집 도구**
- [0202] 일부 구현예에서, 게놈 편집 도구는 CRISPR/Cas 시스템의 구성요소이다.
- [0203] **1. 가이드 RNA(gRNA)**
- [0204] 일부 구현예에서, 게놈 편집 도구는 이중-가이드 RNA(dgRNA) 또는 단일-가이드 RNA(sgRNA)일 수 있는 가이드 RNA(gRNA)이다. 가이드 RNA는 RNA-가이드 DNA 결합체를 표적 서열로 안내한다.
- [0205] 본 개시내용의 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 체형을 위한 카고는 적어도 하나의 gRNA 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함한다. gRNA는 Cas 뉴클레아제 또는 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 표적 핵산 분자 상의 표적 서열로 가이드할 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA는 클래스 2 Cas 뉴클레아제와 결합하고, 이에 의한 절단의 특이성을 제공한다. 일부 구현예에서, gRNA 및 Cas 뉴클레아제는 리보핵단백질(RNP), 예를 들어, CRISPR/Cas 복합체 예컨대 CRISPR/Cas9 복합체를 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 복합체는 II형 CRISPR/Cas9 복합체일 수 있다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 복합체는 V형 CRISPR/Cas 복합체, 예컨대 Cpf1/가이드 RNA 복합체일 수 있다. Cas 뉴클레아제 및 동족 gRNA는 쌍을 이룰 수 있다. 각 클래스 2 Cas 뉴클레아제와 쌍을 이루는 gRNA 스캐폴드 구조는 특정 CRISPR/Cas 시스템에 따라 다르다.
- [0206] 일부 구현예에서, sgRNA는 Cas9 단백질에 의한 RNA-가이드 DNA 절단을 매개할 수 있는 "Cas9 sgRNA"이다. 일부 구현예에서, sgRNA는 Cpf1 단백질에 의한 RNA-가이드 DNA 절단을 매개할 수 있는 "Cpf1 sgRNA"이다. 일부 구현예에서, gRNA는 Cas9 단백질과 활성 복합체를 형성하고 RNA-가이드 DNA 절단을 매개하기에 충분한 crRNA 및 tracr RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA는 Cpf1 단백질과 활성 복합체를 형성하고 RNA-가이드 DNA 절단을 매개하기에 충분한 crRNA를 포함한다. Zetsche 2015를 참조한다.
- [0207] 본 개시내용의 특정 구현예는 또한 본원에 기재된 gRNA를 암호화하는 핵산, 예를 들어, 발현 카세트를 제공한다. "가이드 RNA 핵산"은 본원에서 가이드 RNA(예를 들어 sgRNA 또는 dgRNA) 및 가이드 RNA 발현 카세트를 지칭하기 위해 사용되며, 이는 하나 이상의 가이드 RNA를 암호화하는 핵산이다.
- [0208] 일부 구현예에서, 핵산은 DNA 분자일 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산은 crRNA를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, crRNA를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 자연-발생 CRISPR/Cas 시스템으로부터의 반복 서열의 전부 또는 일부가 측침하는 표적화 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 tracr RNA를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, crRNA 및 tracr RNA는 2개의 별개의 핵산에 의해 암호화될 수 있다. 다른 구현예에서, crRNA 및 tracr RNA는 단일 핵산에 의해 암호화될 수 있다. 일부 구현예에서, crRNA 및 tracr RNA는 단일 핵산의 반대 가닥에 의해 암호화될 수 있다. 다른 구현예에서, crRNA 및 tracr RNA는 단일 핵산의 동일한 가닥에 의해 암호화될 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA 핵산은 sgRNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, gRNA 핵산은 Cas9 뉴클레아제 sgRNA를 암호화한다. 일부 구현예에서, gRNA 핵산은 Cpf1 뉴클레아제 sgRNA를 암호화한다.
- [0209] 가이드 RNA를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 적어도 하나의 전사 또는 조절 대조군 서열, 예컨대 프로모터, 3' UTR, 또는 5' UTR에 작동가능하게 연결될 수 있다. 한 예에서, 프로모터는 tRNA 프로모터, 예를 들어, tRNA^{Lys3}, 또는 tRNA 키메라일 수 있다. Mefferd 등, *RNA*. 2015 21:1683-9; Scherer 등, *Nucleic Acids Res.* 2007 35: 2620-2628을 참고한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 RNA 폴리머라제 III(Pol III)에 의해 인식될 수 있다. Pol III 프로모터의 비-제한적 예에는 U6 및 H1 프로모터가 포함된다. 일부 구현예에서, 가이드 RNA를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 마우스 또는 인간 U6 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA 핵산은 변형된 핵산이다. 일부 구현예에서, gRNA 핵산은 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA 핵산은 핵산의 통합을 안정화하고 방지하기 위해, 5' 말단 변형, 예를

들어 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA 핵산은 각 가닥에 5' 말단 변형을 갖는 이중-가닥 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA 핵산은 5' 말단 변형으로서 역 디데옥시-T 또는 역 무염기 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, gRNA 핵산은 비오틴, 테스티오비오틴-TEG, 디곡시게닌, 및 예를 들어, FAM, ROX, TAMRA, 및 AlexaFluor를 포함하는 형광 마커와 같은 표지를 포함한다.

[0210] 일부 구현예에서, gRNA와 같은 하나 이상의 gRNA 핵산은 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템과 함께 사용될 수 있다. 각 gRNA 핵산은 CRISPR/Cas 시스템이 하나 이상의 표적 서열을 절단하도록 서로 다른 표적화 서열을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 gRNA는 CRISPR/Cas 복합체 내에서 활성 또는 안정성과 같은 동일하거나 상이한 특성을 가질 수 있다. 하나 이상의 gRNA가 사용되는 경우, 각 gRNA는 동일한 또는 상이한 gRNA 핵산에 암호화될 수 있다. 하나 이상의 gRNA의 발현을 유도하는 데 사용되는 프로모터는 동일하거나 상이할 수 있다.

[0211] Cas 단백질에 대한 표적 서열은 Cas 단백질에 대한 핵산 기질이 이중 가닥 핵산이기 때문에 게놈 DNA의 양성 및 음성 가닥(즉, 주어진 서열 및 서열의 역 상보)을 모두 포함한다. 따라서, 가이드 서열이 "표적 서열에 상보적"이라고 하는 경우, 가이드 서열은 가이드 RNA가 표적 서열의 역상보체에 결합하도록 지시할 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 일부 구현예에서, 가이드 서열이 표적 서열의 역 상보체에 결합하는 경우, 가이드 서열은 가이드 서열에서 U가 T로 치환된 것을 제외하고는 표적 서열(예를 들어, PAM을 포함하지 않는 표적 서열)의 특정 뉴클레오타이드와 동일하다.

[0212] 표적화 서열의 길이는 사용된 CRISPR/Cas 시스템 및 성분에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 상이한 박테리아 종으로부터의 상이한 클래스 2 Cas 뉴클레아제는 다양한 최적의 표적화 서열 길이를 갖는다. 따라서, 표적화 서열은 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, 35, 40, 45, 50, 또는 50개 이상의 뉴클레오타이드 길이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화 서열 길이는 자연-발생 CRISPR/Cas 시스템의 가이드 서열보다 길거나 짧은 0, 1, 2, 3, 4, 또는 5개 뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제 및 gRNA 스캐폴드는 동일한 CRISPR/Cas 시스템으로부터 유래될 것이다. 일부 구현예에서, 표적화 서열은 18~24개 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화 서열은 19~21개 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화 서열은 20개 뉴클레오타이드를 포함하거나 이로 구성될 수 있다.

[0213] 2. RNA-가이드 DNA 결합제

[0214] 일부 구현예에서, 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제이다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas 클레아아제/닉아제 및/또는 이의 불활성화된 형태(dCas DNA 결합제)이다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas 뉴클레아제이다.

[0215] 일부 구현예에서, 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제를 암호화하는 mRNA이다. 일부 구현예에서, 게놈 편집 도구는 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA이다.

[0216] 일부 구현예에서, 게놈 편집 도구는 mRNA 예컨대 Cas 뉴클레아제 mRNA 및 지질 핵산 어셈블리 조성물에서 공동-캡슐화된 gRNA 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제를 암호화하는 mRNA는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물에서 제형화되고, gRNA 핵산은 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물에서 제형화된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물은 동시에 투여된다. 다른 구현예에서, 제1 및 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물은 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물은 사전 인큐베이션 단계 전에 조합된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물은 개별적으로 사전인큐베이션된다.

[0217] Cas 뉴클레아제가 유래될 수 있는 비-제한적인 예시적인 종은 스트렙토코커스 파이오게네스(*Streptococcus pyogenes*), 스트렙토코커스 써모필루스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코커스 종(*Streptococcus sp.*), 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 이노쿠아(*Listeria innocua*), 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasserii*), 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*), 윌리넬라 속시노게네스(*Wolinella succinogenes*), 수테렐라 와즈워스텐시스(*Sutterella wadsworthensis*), 감마프로테오박테리움(*Gammaproteobacterium*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*), 파스테우렐라 물토시다(*Pasteurella multocida*), 피브로박터 속시노게네(*Fibrobacter succinogene*), 로도스피릴럼 루브럼(*Rhodospirillum rubrum*), 노카르디옵시스 다손빌레이(*Nocardiaopsis dassonvillei*), 스트렙토마이세스 프리스티네스피랄리스(*Streptomyces pristinaespiralis*), 스트렙토마이세스

비리도크로모게네스(*Streptomyces viridochromogenes*), 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스(*Streptomyces viridochromogenes*), 스트렙토스포랑기움 로세움(*Streptosporangium roseum*), 스트렙토스포랑기움 로세움(*Streptosporangium roseum*), 알리사이클로바실러스 아시도칼다리우스(*Alicyclobacillus acidocaldarius*), 바실러스 슈도마이코이데스(*Bacillus pseudomycooides*), 바실러스 셀레니티레두센스(*Bacillus selenitireducens*), 엑시구오박테리움 시비리쿰(*Exiguobacterium sibiricum*), 락토바실러스 델브루에키(*Lactobacillus delbrueckii*), 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*), 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*), 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*), 마이크로실라 마리나(*Microscilla marina*), 부르크홀데리아레스 박테리움(*Burkholderiales bacterium*), 폴라로모나스 나프탈레니보란스(*Polaromonas naphthalenivorans*), 폴라로모나스 종(*Polaromonas sp.*), 크로코스페라 왓소니(*Crocospaera watsonii*), 시아노테세 종(*Cyanotheca sp.*), 마이크로시스티스 아에루기노사(*Microcystis aeruginosa*), 시네크코커스 종(*Synechococcus sp.*), 아세토할로비움 아라바티쿰(*Acetohalobium arabaticum*), 암모니팩스 데겐시(*Ammonifex degensii*), 칼디셀룰로시럽토 베크시(*Caldicelulosiruptor beccii*), 칸디다투스 데실포르디스(*Candidatus Desulfurudis*), 클로스트리디움 보툴리눔(*Clostridium botulinum*), 클로스트리디움 디피실레(*Clostridium difficile*), 피네골디아 마그나(*Fingoldia magna*), 나트라네로비우스 쉐모필루스(*Natranerobius thermophilus*), 펠로토마쿨룸 쉐모프로피오니쿰(*Pelotomaculum thermopropionicum*), 아시디티오바실러스 칼두스(*Acidithiobacillus caldus*), 아시디티오바실러스 페록시단스(*Acidithiobacillus ferrooxidans*), 알로크로마티움 비노숨(*Allochromatium vinosum*), 마리노박터 종(*Marinobacter sp.*), 니트로소코커스 할로필루스(*Nitrosococcus halophilus*), 니트로소코커스 왓소니(*Nitrosococcus watsoni*), 슈도알테로모나스 할로플랑크티스(*Pseudoalteromonas haloplanktis*), 크테도노박터 라세미퍼(*Ktedonobacter racemifer*), 메타노할로비움 에베스티가툼(*Methanohalobium evestigatum*), 아나배나 바리아빌리스(*Anabaena variabilis*), 노듈라리아 스푸미게나(*Nodularia spumigena*), 노스톡 종(*Nostoc sp.*), 아르트로스피라 막시마(*Arthrospira maxima*), 아르트로스피라 플라텐시스(*Arthrospira platensis*), 아르트로스피라 종(*Arthrospira sp.*), 링비아 종(*Lyngbya sp.*), 미크로콜레우스 크토노플라스테스(*Microcoleus chthonoplastes*), 오실라토리아 종(*Oscillatoria sp.*), 페트로토가 모빌리스(*Petrotoza mobilis*), 쉐모시포 아프리카누스(*Thermosiphon africanus*), 스트렙토코커스 파스테우리아누스(*Streptococcus pasteurianus*), 네이세리아 시네레아(*Neisseria cinerea*), 캄필로박터 라리(*Campylobacter lari*), 파르비바쿨룸 라바멘티보란스(*Parvibaculum lavamentivorans*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*), 아시다미노코커스 종(*Acidaminococcus sp.*), 라크노스피라세 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium*) ND2006, 및 아카리클로리스 마리나(*Acaryochloris marina*)를 포함한다.

[0218] 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 스트렙토코커스 파이오게네스(*Streptococcus Pyogenes*)로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 스트렙토코커스 쉐모필루스(*Streptococcus thermophilus*)로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 스태필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 프란시셀라 노비시다(*Francisella novicida*)로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 아시다미노코커스 종(*Acidaminococcus sp.*)으로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 라크노스피라세 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium*) ND2006로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다. 추가의 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 프란시셀라 툴라렌시스(*Francisella tularensis*), 라크노스피라세 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium*), 부티리비브리오 프로테오클라스티쿠스(*Butyrivibrio proteoclasticus*), 페레그린박테리아 박테리움(*Peregrinibacteria bacterium*), 파르쿠박테리아 박테리움(*Parcubacteria bacterium*), 스미텔라 아시다미노코커스(*Smithella, Acidaminococcus*), 칸디다투스 메타노플라스마 테르미툼(*Candidatus Methanoplasma termitum*), 유박테리움 엘리겐스(*Eubacterium eligens*), 모락셀라 보보쿨리(*Moraxella bovoculi*), 랩토스피라 이나다이(*Leptospira inadaei*), 포르피로모나스 크레비오리카니스(*Porphyromonas crevioricanis*), 프레보텔라 디시엔스(*Prevotella disiens*), 또는 포르피로모나스 마카카에(*Porphyromonas macacae*)로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 아시다미노코커스(*Acidaminococcus*) 또는 라크노스피라세(*Lachnospiraceae*)로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다.

[0219] 야생형 Cas9는 2개의 뉴클레아제 도메인: RuvC 및 HNH를 갖는다. RuvC 도메인은 비-표적 DNA 가닥을 절단하고, HNH 도메인은 DNA의 표적 가닥을 절단한다. 일부 구현예에서, Cas9 뉴클레아제는 하나 이상의 RuvC 도메인 및/또는 하나 이상의 HNH 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 뉴클레아제는 야생형 Cas9이다. 일부 구현예에서, Cas9는 표적 DNA에서 이중 가닥 절단을 유도할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 dsDNA를 절단할 수 있거나, dsDNA의 한 가닥을 절단할 수 있거나, 또는 DNA 클레아바제 또는 니카제 활성을 갖지 않을 수

있다.

- [0220] 일부 구현예에서, 키메라 Cas 뉴클레아제가 사용되며, 여기서 단백질의 한 도메인 또는 영역은 다른 단백질의 일부로 대체된다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제 도메인은 FokI과 같은 상이한 뉴클레아제로부터의 도메인으로 대체될 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 변형된 뉴클레아제일 수 있다.
- [0221] 다른 구현예에서, Cas 뉴클레아제 또는 Cas 니카제는 I형 CRISPR/Cas 시스템으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 I형 CRISPR/Cas 시스템의 캐스케이드 복합체의 성분일 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 Cas3 단백질일 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 III형 CRISPR/Cas 시스템으로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 RNA 절단 활성을 가질 수 있다.
- [0222] 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 단일-가닥 니카제 활성을 가지며, 즉, 하나의 DNA 가닥을 절단하여 "닉(nick)"으로도 알려져 있는, 단일-가닥 절단을 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 Cas 니카제를 포함한다. 니카제는 dsDNA에 닉을 생성하는, 즉, DNA 이중 나선의 한 가닥은 절단하지만 다른 가닥은 절단하지 않는 효소이다. 일부 구현예에서, Cas 니카제는 촉매 도메인에서 예를 들어, 하나 이상의 변경(예를 들어, 점 돌연변이)에 의해, 내핵분해 활성 부위가 불활성화된 Cas 뉴클레아제(예를 들어, 상기 논의된 Cas 뉴클레아제)의 버전이다. Cas 니카제 및 예시적인 촉매 도메인 변경에 대한 논의를 위해, 예를 들어, 미국 특허 제8,889,356호를 참고한다. 일부 구현예에서, Cas 니카제, 예컨대 Cas9 니카제는 불활성화된 RuvC 또는 HNH 도메인을 갖는다.
- [0223] 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 단 하나의 기능성 뉴클레아제 도메인을 함유하도록 변형된다. 예를 들어, 작용제 단백질은 그의 핵산 절단 활성을 감소시키기 위해 뉴클레아제 도메인 중 하나가 돌연변이되거나 완전히 또는 부분적으로 결실되도록 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 활성이 감소된 RuvC 도메인을 갖는 니카제가 사용된다. 일부 구현예에서, 비활성 RuvC 도메인을 갖는 니카제가 사용된다. 일부 구현예에서, 활성이 감소된 HNH 도메인을 갖는 니카제가 사용된다. 일부 구현예에서, 비활성 HNH 도메인을 갖는 니카제가 사용된다.
- [0224] 일부 구현예에서, Cas 단백질 뉴클레아제 도메인 내의 보존된 아미노산은 뉴클레아제 활성을 감소시키거나 변경시키기 위해 치환된다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 RuvC 또는 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다. RuvC 또는 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인에서 예시적인 아미노산 치환은 D10A(스트렙토코커스 파이오게네스(*S. Pyogenes*) Cas9 단백질에 기초함)를 포함한다. 예를 들어, Zetsche 등(2015) *Ce11* Oct 22:163(3): 759-771을 참고한다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제는 HNH 또는 HNH-유사 뉴클레아제 도메인에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다. HNH 또는 HNH-유사 뉴클레아제 도메인에서 예시적인 아미노산 치환은 E762A, H840A, N863A, H983A, 및 D986A(스트렙토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*) Cas9 단백질에 기초함)를 포함한다. 예를 들어, Zetsche 등(2015)를 참고한다. 추가의 예시적인 아미노산 치환은 D917A, E1006A, 및 D1255A(*프란시셀라 노비시다*(*Francisella novicida*) U112 Cpf1(FnCpf1) 서열(UniProtKB-A0Q7Q2(CPF1_FRATN)에 기초함)를 포함한다.
- [0225] 일부 구현예에서, 니카제를 암호화하는 mRNA는 각각 표적 서열의 센스 및 안티센스 가닥에 상보적인 한 쌍의 가이드 RNA와 함께 제공된다. 본 구현예에서, 가이드 RNA는 니카제를 표적 서열로 향하게 하고, 표적 서열의 반대 가닥에 닉을 생성함으로써(즉, 이중 닉킹) DSB를 도입한다. 일부 구현예에서, 이중 닉킹의 사용은 특이성을 개선하고 표적의 효과를 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 니카제는 DNA의 반대 가닥을 표적으로 하는 2개의 개별 가이드 RNA와 함께 사용되어 표적 DNA에서 이중 닉을 생성한다. 일부 구현예에서, 니카제는 표적 DNA에서 이중 닉을 생성하기 위해 근접하게 선택되는 2개의 개별 가이드 RNA와 함께 사용된다.
- [0226] 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 클레아바제 및 니카제 활성이 결합되어 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 dCas DNA-결합 폴리펩티드를 포함한다. dCas 폴리펩티드는 DNA-결합 활성을 갖는 반면, 본질적으로 촉매(클레아바제/니카제) 활성이 결합되어 있다. 일부 구현예에서, dCas 폴리펩티드는 dCas9 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 클레아바제 및 니카제 활성이 결합된 RNA-가이드 DNA-결합체 또는 dCas DNA-결합 폴리펩티드는 예를 들어, 그의 촉매 도메인에서의 하나 이상의 변경(예를 들어, 점 돌연변이)에 의해, 그의 내핵분해 활성 부위가 불활성화된 Cas 뉴클레아제(예를 들어, 위에서 논의된 Cas 뉴클레아제)의 버전이다. 예를 들어, US 2014/0186958 A1; US 2015/0166980 A1을 참고한다.
- [0227] 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합체는 APOBEC3 데아미나제를 포함한다. 일부 구현예에서, APOBEC3 데아미나제는 APOBEC3A(A3A)이다. 일부 구현예에서, A3A는 인간 A3A이다. 일부 구현예에서, A3A는 야생형 A3A이다.
- [0228] 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합체는 편집자를 포함한다. 예시적인 편집자는 XTEN 링커에 의해 스트렙토

코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*)-D10A Cas9 Nickase에 융합된 *에이치. 사피엔스*(*H. sapiens*) APOBEC3A를 포함하는 BC22n이다.

[0229] 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 하나 이상의 이중 기능성 도메인(예를 들어, 융합 폴리펩티드이거나 이를 포함한다)을 포함한다.

[0230] 일부 구현예에서, 이중 기능성 도메인은 RNA-가이드 DNA-결합체의 세포 핵으로의 수송을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, 이중 기능성 도메인은 핵 위치화 신호(NLS)일 수 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 1~10개 NLS(들)와 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 1~5개 NLS(들)와 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 1개의 NLS와 융합될 수 있다. 1개의 NLS가 사용되는 경우, NLS는 RNA-가이드 DNA-결합체 서열의 N-말단 또는 C-말단에 융합될 수 있다. 그것은 또한 RNA-가이드 DNA 결합체 서열 내에 삽입될 수 있다. 다른 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 하나 이상의 NLS와 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 2, 3, 4, 또는 5개의 NLS와 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 2개의 NLS와 융합될 수 있다. 일부 환경에서, 2개의 NLS는 동일하거나(예를 들어, 2개의 SV40 NLS) 또는 상이할 수 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 카르복시 말단에서 융합된 2개의 NLS 서열(예를 들어, SV40)에 융합된다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 2개의 NLS와 융합될 수 있는데, 하나는 N-말단에 연결되고, 다른 하나는 C-말단에 연결된다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 3개의 NLS와 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 NLS 없이 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, NLS는 단일부분 서열, 예컨대, 예를 들어, SV40 NLS, PKKKRKV(서열 번호 23) 또는 PKKKRRV(서열 번호 24)일 수 있다. 일부 구현예에서, NLS는 이분 서열, 예컨대 뉴클레오폴라스민의 NLS, KRPAATKKAGQAKKKK(서열 번호 25)일 수 있다. 특정 구현예에서, 단일 PKKKRKV(서열 번호 23) NLS는 RNA-가이드 DNA-결합체의 C-말단에서 융합될 수 있다. 하나 이상의 링커가 융합 부위에 선택적으로 포함된다.

[0231] 일부 구현예에서, 이중 기능성 도메인은 RNA-가이드 DNA 결합체의 세포내 반감기를 변형시킬 수 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합체의 반감기가 증가될 수 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체의 반감기가 감소될 수 있다. 일부 구현예에서, 이중 기능성 도메인은 RNA-가이드 DNA-결합체의 안정성을 증가시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 이중 기능성 도메인은 RNA-가이드 DNA-결합체의 안정성을 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 이중 기능성 도메인은 단백질 분해를 위한 신호 펩티드로서 작용할 수 있다. 일부 구현예에서, 단백질 분해는 예를 들어 프로테아좀, 리소좀 프로테아제 또는 칼파인 프로테아제와 같은 단백질 분해 효소에 의해 매개될 수 있다. 일부 구현예에서, 이중 기능성 도메인은 PEST 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA-결합체는 유비퀴틴 또는 폴리유비퀴틴 사슬의 첨가에 의해 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 유비퀴틴은 유비퀴틴-유사 단백질(UBL)일 수 있다. 유비퀴틴-유사 단백질의 비-제한적인 예는 유비퀴틴-유사 변형자(SUMO), 유비퀴틴 교차-반응성 단백질(UCRP, 인터페론-자극 유전자-15(ISG15)로도 알려져 있음), 유비퀴틴-관련 변형자-1(URM1), 신경-전구-세포-발현 발달 하향조절된 단백질-8(NEDD8, 에스. 세레비지애(*S. cerevisiae*)에서 Rub1이라고도 함), 인간 백혈구 항원 F-관련(FAT10), 오토파지-8(ATG8) 및 -12(ATG12), Fau 유비퀴틴-유사 단백질(FUB1), 막-고착된 UBL(MUB), 유비퀴틴 폴드-변형자-1(UFM1), 및 유비퀴틴-유사 단백질-5(UBL5)를 포함한다.

[0232] 일부 구현예에서, 이중 기능성 도메인은 마커 도메인일 수 있다. 마커 도메인의 비-제한적인 예는 형광 단백질, 정제 태그, 에피토프 태그, 및 리포터 유전자 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 마커 도메인은 형광 단백질일 수 있다. 적합한 형광 단백질의 비-제한적인 예는 녹색 형광 단백질(예를 들어, GFP, GFP-2, 태그GFP, turboGFP, sfGFP, EGFP, Emerald, Azami Green, Monomeric Azami Green, CopGFP, AceGFP, ZsGreen1), 황색 형광 단백질(예를 들어, YFP, EYFP, Citrine, Venus, YPet, PhiYFP, ZsYellow1), 청색 형광 단백질(예를 들어, EBFP, EBFP2, Azurite, mKalamal, GFPuv, Sapphire, T-sapphire,), 시안색 형광 단백질(예를 들어, ECFP, Cerulean, CyPet, AmCyan1, Midoriishi-Cyan), 적색 형광 단백질(예를 들어, mKate, mKate2, mPlum, DsRed monomer, mCherry, mRFP1, DsRed-Express, DsRed2, DsRed-Monomer, HcRed-Tandem, HcRed1, AsRed2, eqFP611, mRaspberry, mStrawberry, Jred), 및 주황색 형광 단백질(mOrange, mKO, Kusabira-Orange, Monomeric Kusabira-Orange, mTangerine, tdTomato) 또는 임의의 기타 적합한 형광 단백질을 포함한다. 다른 구현예에서, 마커 도메인은 정제 태그 및/또는 에피토프 태그일 수 있다. 비-제한적인 예시적인 태그는 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 키틴 결합 단백질(CBP), 말토스 결합 단백질(MBP), 티오레독신(TRX), 폴리(NANP), 탠덤 친화성 정제(TAP) 태그, myc, AcV5, AU1, AU5, E, ECS, E2, FLAG, HA, nus, Softag 1, Softag 3, Strep, SBP, Glu-Glu, HSV, KT3, S, S1, T7, V5, VSV-G, 6xHis, 8xHis, 비오틴 카르복실 담체 단백질(BCCP), 폴리-His, 및 칼모듈린을 포함한다. 비-제한적인 예시적인 리포터 유전자는 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST), 홀스래디쉬 퍼옥시다제

(HRP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT), 베타-갈락토시다제, 베타-글루쿠로니다제, 루시퍼라제, 또는 형광 단백질을 포함한다.

[0233] 추가의 구현예에서, 이중 기능성 도메인은 RNA-가이드 DNA-결합체를 특정 소기관, 세포 유형, 조직 또는 기관으로 표적화할 수 있다. 일부 구현예에서, 이중 기능성 도메인은 RNA-가이드 DNA-결합체를 미토콘드리아로 표적화할 수 있다.

[0234] 추가의 구현예에서, 이중 기능성 도메인은 효과기 도메인 예컨대 편집자 도메인일 수 있다. RNA-가이드 DNA-결합체가 그의 표적 서열로 지시될 때, 예를 들어, Cas 뉴클레아제가 gRNA에 의해 표적 서열로 지시될 때, 효과기 도메인, 예컨대 편집자 도메인은 표적 서열을 변형시키거나 영향을 미칠 수 있다. 일부 구현예에서, 효과기 도메인, 예컨대 편집자 도메인은 핵산 결합 도메인, 뉴클레아제 도메인(예를 들어, 비-Cas 뉴클레아제 도메인), 후성적 변형 도메인, 전사 활성화 도메인, 또는 전사 억제인자 도메인으로로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 이중 기능성 도메인은 뉴클레아제, 예컨대 FokI 뉴클레아제이다. 예를 들어, 미국 특허 제9,023,649호를 참고한다. 일부 구현예에서, 이중 기능성 도메인은 전사 활성인자 또는 억제인자이다. 예를 들어, Qi 등, "Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression," *Cell* 152:1173-83 (2013); Perez-Pinera 등, "RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors," *Nat. Methods* 10:973-6 (2013); Mali 등, "CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering," *Nat. Biotechnol.* 31:833-8 (2013); Gilbert 등, "CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes," *Cell* 154:442-51 (2013)을 참고한다. 이와 같이, RNA-가이드 DNA-결합체는 본질적으로 가이드 RNA를 사용하여 원하는 표적 서열에 결합하도록 지시될 수 있는 전사 인자가 된다. 일부 구현예에서, DNA 변형 도메인은 메틸화 도메인, 예컨대 탈메틸화 또는 메틸트랜스퍼라제 도메인이다. 일부 구현예에서, 효과기 도메인은 DNA 변형 도메인, 예컨대 염기-편집 도메인이다. 특정 구현예에서, DNA 변형 도메인은 데아미나제 도메인과 같은 DNA에 특정 변형을 도입하는 핵산 편집 도메인이다. 예를 들어, WO 2015/089406; US 2016/0304846을 참고한다. WO 2015/089406 및 U.S. 2016/0304846에 기재된 핵산 편집 도메인, 데아미나제 도메인, 및 Cas9 변이체는 참조로 본원에 포함된다.

[0235] 뉴클레아제는 가이드 RNA("gRNA")와 상호작용하는 적어도 하나의 도메인을 포함할 수 있다. 또한, 뉴클레아제는 gRNA에 의해 표적 서열로 향할 수 있다. 클래스 2 Cas 뉴클레아제 시스템에서, gRNA는 뉴클레아제 및 표적 서열과 상호작용하여 표적 서열에 대한 결합을 지시한다. 일부 구현예에서, gRNA는 표적화 절단에 대한 특이성을 제공하고, 그리고 뉴클레아제는 보편적일 수 있고 상이한 표적 서열을 절단하기 위해 상이한 gRNA와 쌍을 이룰 수 있다. 클래스 2 Cas 뉴클레아제는 위에 나열된 유형, 오르토로그, 및 예시적인 종의 gRNA 스케폴드 구조와 쌍을 이룰 수 있다.

[0236] B. 추가의 게놈 편집 시스템 도구

[0237] 일부 구현예에서, 게놈 편집 도구는 징크 핑거 뉴클레아제 시스템, TALEN 시스템, 및 메가뉴클레아제 시스템으로부터 선택되는 게놈 편집 시스템의 성분이다. 일부 구현예에서, 게놈 편집 도구는 이러한 게놈 편집 시스템의 하나 이상의 성분을 암호화하는 핵산이다. 시스템의 예시적인 성분은 메가뉴클레아제, 징크 핑거 뉴클레아제, TALENS, 그의 단편을 포함한다.

[0238] 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 TALEN 시스템이다. 전사 활성화제-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN)는 DNA의 특정 서열을 절단하도록 조작될 수 있는 제한 효소이다. 이들은 DNA 절단 도메인(DNA 가닥을 절단하는 뉴클레아제)에 TAL 효과기 DNA-결합 도메인을 융합하여 제조된다. 전사 활성화제-유사 효과기(TALE)는 특정 위치에서 DNA 절단을 촉진하기 위해 원하는 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있다(예를 들어, Boch, 2011, *Nature Biotech* 참고). 제한 효소는 조작된 뉴클레아제를 사용한 게놈 편집으로 알려진 기술인, 원위치 게놈 편집 또는 유전자 편집에 사용하기 위해 세포에 도입될 수 있다. 이에 사용하기 위한 이러한 방법 및 조성물은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, WO2019147805, WO2014040370, WO2018073393을 참고하며, 이의 내용은 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0239] 일부 구현예에서, 유전자 편집 시스템은 징크-핑거 시스템이다. 징크-핑거 뉴클레아제(ZFNs)는 징크-핑거 DNA-결합 도메인을 DNA-절단 도메인에 융합시킴으로써 생성되는 인공 제한 효소이다. 징크 핑거 도메인은 징크-핑거 뉴클레아제가 복합체 게놈내 고유한 서열을 표적화할 수 있도록 특정 원하는 DNA 서열을 표적화하도록 조작될 수 있다. II형 제한 엔도뉴클레아제 FokI로부터의 비-특이적 절단 도메인은 전형적으로 ZFN에서 절단 도메인으로 사용된다. 절단은 내인성 DNA 복구 기계에 의해 복구되어, ZFN이 고등 유기체의 게놈을 정확하게 변경할 수

있다. 이에 사용하기 위한 이러한 방법 및 조성물은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, W02011091324를 참고하고, 이의 내용은 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0240] **V. 지질 핵산 어셈블리 조성물을 위한 예시적인 핵산**

[0241] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 핵산(또는 폴리뉴클레오티드)을 세포에 전달한다. 일부 구현예에서, 핵산은 종래의 RNA, DNA, 혼합 RNA-DNA, 및 이들의 유사체인 중합체들을 포함하여, 백본을 따라 함께 연결된 질소 헤테로시클릭 염기 또는 염기 유사체를 갖는 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드 유사체를 포함한다.

[0242] **A. 변형된 핵산**

[0243] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 변형된 RNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 변형된 DNA를 포함한다.

[0244] 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드는 RNA, 예를 들어 gRNA 또는 mRNA에 존재할 수 있다. 하나 이상의 변형된 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드를 포함하는 gRNA 또는 mRNA는, 예를 들어, "변형된" RNA로 불리며, 정규 A, G, C, 및 U 잔기 대신 또는 추가로 사용되는 하나 이상의 비-자연 및/또는 자연 발생 성분 또는 구성의 존재를 설명한다. 일부 구현예에서, 변형된 RNA는 본원에서 "변형된"으로 불리는 비-정규 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드로 합성된다.

[0245] 변형된 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드는 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (i) 포스포디에스테르 백본 연결에서의 변경(예시적인 백본 변형), 예를 들어, 비-연결 포스페이트 산소 중 하나 또는 둘 모두의 교체 및/또는 연결 포스페이트 산소 중 하나 이상의 교체; (ii) 리보스 당에서의 변경(예시적인 당 변형), 예를 들어, 리보스 당 구성성분의 교체, 예를 들어, 2' 히드록실의 교체; (iii) "테포스포" 링커로 포스페이트 모이어티의 전체 교체(예시적인 백본 변형); (iv) 비-정규 핵염기를 포함한 자연 발생 핵염기의 변형 또는 교체(예시적인 염기 변형); (v) 리보스-포스페이트 백본의 교체 또는 변형(예시적인 백본 변형); (vi) 올리고뉴클레오티드의 3' 단부 또는 5' 단부의 변형, 예를 들어, 말단 포스페이트 기의 제거, 변형 또는 교체 또는 모이어티, 캡 또는 링커의 접합(이러한 3' 또는 5' 캡 변형은 당 및/또는 백본 변형을 포함할 수 있음); 및 (vii) 당의 변형 또는 교체(예시적인 당 변형). 특정 구현예는 mRNA, gRNA, 또는 핵산에 대한 5' 말단 변형을 포함한다. 특정 구현예는 mRNA, gRNA, 또는 핵산에 대한 3' 말단 변형을 포함한다. 변형된 RNA는 5' 단부 및 3' 말단 변형을 함유할 수 있다. 변형된 RNA는 비-말단 위치에 하나 이상의 변형된 잔기를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA는 적어도 하나의 변형된 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, mRNA는 적어도 하나의 변형된 잔기를 포함한다.

[0246] 본원에 사용된 바와 같이, 제1 서열은 제2 서열에 대한 제1 서열의 정렬이 전체에서 제2 서열의 위치 중 X% 이상이 제1 서열과 일치함을 나타내는 경우, 제2 서열에 "대해 적어도 X% 동일성을 갖는 서열을 포함하는" 것으로 간주된다. 예를 들어, 서열 AAGA는 서열 AAG에 대해 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는데, 이는 정렬이 제2 서열의 모든 3개 위치에 대한 일치라는 점에서 100% 동일성을 제공할 것이기 때문이다. RNA와 DNA 사이의 차이(일반적으로 우리딘을 티미딘으로 교체 또는 그 반대로 교환)와 변형된 우리딘과 같은 뉴클레오시드 유사체의 존재는 관련 뉴클레오티드(예컨대 티미딘, 우리딘, 또는 변형된 우리딘)가 동일한 보체를 갖는 한(예를 들어, 티미딘, 우리딘, 또는 변형된 우리딘 모두의 경우 아데노신; 또 다른 예는 시토신 및 5-메틸시토신이며, 이 둘은 보체로서 구아노신 또는 변형된 구아노신을 가짐), 폴리뉴클레오티드 간의 동일성 또는 상보성 차이에 기여하지 않는다. 따라서, 예를 들어, X가 임의의 변형된 우리딘, 예컨대 슈도우리딘, N1-메틸 슈도우리딘, 또는 5-메톡시우리딘인, 서열 5'-AXG는 둘 다 동일한 서열에 대해 완벽하게 상보적이라는 점에서 AUG와 100% 동일한 것으로 간주된다(5'-CAU). 예시적인 정렬 알고리즘은 기술 분야에 잘 알려진 Smith-Waterman 및 Needleman-Wunsch 알고리즘이다. 당업자는 정렬될 주어진 서열 쌍에 대해 알고리즘 및 매개변수 설정의 어떤 선택이 적절한지 이해할 것이며; 동일성 아미노산에 대해 >50% 또는 뉴클레오티드에 대해 >75%의 예상되는 동일성 및 일반적으로 유사한 길이의 서열에 대해, www.ebi.ac.uk 웹 서버에서 EBI에 의해 제공되는 Needleman-Wunsch 알고리즘 인터페이스의 기본 설정을 갖는 Needleman-Wunsch 알고리즘이 일반적으로 적합하다.

[0247] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 조성물 또는 제형은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 RNA-가이드 DNA 결합체, 예컨대 Cas 뉴클레아제, 또는 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 오픈 리딩 프레임(ORF)과 같은 ORF를 포함하는 mRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합체, 예컨대 Cas 뉴클레아제 또는 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 ORF를 포함하는 mRNA가 제공되거나, 사용되거나, 투여된다. 일부 구현예에서, ORF는 코돈 최적화된다. 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합체를 암호화하는 ORF는 "변형된 RNA-가이드 DNA 결합체 ORF" 또는 간단하게는 "변형된 ORF"이며, 이는 ORF가 하기 방식들 중 하나 이상으로 변형된 것을 나타내기

위한 속기로서 사용된다: (1) 변형된 ORF는 그의 최소 우리딘 함량 내지 최소 우리딘 함량의 150% 범위의 우리딘 함량을 가지거나; (2) 변형된 ORF는 그의 최소 우리딘 디뉴클레오티드 함량 내지 최소 우리딘 디뉴클레오티드 함량의 150% 범위의 우리딘 디뉴클레오티드 함량을 가지거나; (3) 변형된 ORF는 표 89의 임의의 Cas ORF 중 어느 하나에 대해 적어도 90% 동일성을 가지거나; (4) 변형된 ORF는 코돈의 적어도 75%가 주어진 아미노산에 대한 최소 우리딘 코돈(들), 예를 들어 가장 적은 우리딘(최소 우리딘 코돈이 2개의 우리딘을 갖는 페닐알라닌에 대한 코돈을 제외하고 보통 0 또는 1임)을 갖는 코돈(들)인 코돈 세트에 구성되거나; 또는 (5) 변형된 ORF가 적어도 하나의 변형된 우리딘을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 ORF는 상기 방식 중 적어도 2, 3, 또는 4개로 변형된다. 일부 구현예에서, 변형된 ORF는 적어도 하나의 변형된 우리딘을 포함하고, 상기 (1)~(4) 중 적어도 1개, 2개, 3개, 또는 모두에서 변형된다.

[0248] "변형된 우리딘"은 본원에서, 우리딘과 동일한 수소 결합 수용체 및 우리딘과 하나 이상의 구조적 차이를 갖는 티미딘 이외의 뉴클레오시드를 지칭하기 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 치환된 우리딘, 즉, 하나 이상의 비-양성자 치환기(예를 들어, 알콕시, 예컨대 메톡시)가 양성자를 대신하는 우리딘이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 치환된 슈도우리딘, 즉, 하나 이상의 비-양성자 치환기(예를 들어, 알킬, 예컨대 메틸)가 양성자를 대신하는 슈도우리딘이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 치환된 우리딘, 슈도우리딘, 또는 치환된 슈도우리딘 중 어느 하나이다.

[0249] 본원에 사용된 바와 같이, "우리딘 위치"는 우리딘 또는 변형된 우리딘이 차지하는 폴리뉴클레오티드 내의 위치를 지칭한다. 따라서, 예를 들어, "우리딘 위치의 100%가 변형된 우리딘"인 폴리뉴클레오티드는 동일한 서열의 종래의 RNA에서 우리딘일 수 있는 모든 위치에서 변형된 우리딘을 함유한다(여기서 모든 염기는 표준 A, U, C, 또는 G 염기임). 달리 나타내지 않는 한, 본 개시내용에 또는 첨부된 서열표 또는 서열 목록의 폴리뉴클레오티드 서열에서의 U는 우리딘 또는 변형된 우리딘일 수 있다.

[0250] 최소 우리딘 코돈:

	아미노산	최소 우리딘 코돈
A	알라닌	GCA 또는 GCC 또는 GCG
G	글리신	GGA 또는 GGC 또는 GGG
V	발린	GUC 또는 GUA 또는 GUG
D	아스파르트산	GAC
E	글루탐산	GAA 또는 GAG
I	이소류신	AUC 또는 AUA 또는 AUG
T	트레오닌	ACA 또는 ACC 또는 ACG
N	아스파라긴	AAC
K	라이신	AAG 또는 AAA
S	세린	AGC
R	아르기닌	AGA 또는 AGG
L	류신	CUG 또는 CUA 또는 CUC
P	프롤린	CCG 또는 CCA 또는 CCC
H	히스티딘	CAC 또는 CAA 또는 CAG
Q	글루타민	CAG 또는 CAA
F	페닐알라닌	UUC
Y	티로신	UAC
C	시스테인	UGC
W	트립토판	UGG
M	메티오닌	AUG

[0251]

[0252] 전술한 구현예들 중 임의의 구현예에서, 변형된 ORF는 코돈의 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%가 상기 최소 우리딘 코돈 표에 열거된 코돈인 코돈 세트에 구성될 수 있다. 전술한 구현예들 중 임의의 구현예에서, 변형된 ORF는 표 89의 Cas ORF 중 어느 하나에 대해 적어도 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다

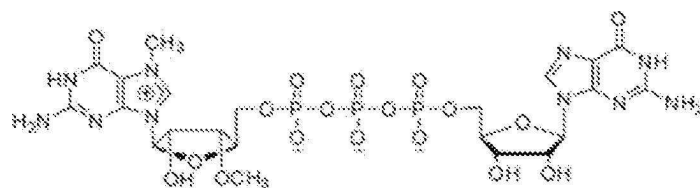
[0253] 전술한 구현예들 중 임의의 구현예에서, 변형된 ORF는 그의 최소 우리딘 함량에서 최소 우리딘 함량의 150%, 145%, 140%, 135%, 130%, 125%, 120%, 115%, 110%, 105%, 104%, 103%, 102%, 또는 101% 범위의 우리딘 함량을 가질 수 있다.

[0254] 전술한 구현예들 중 임의의 구현예에서, 변형된 ORF는 그의 최소 우리딘 디뉴클레오티드 함량에서 최소 우리딘 디뉴클레오티드 함량의 150%, 145%, 140%, 135%, 130%, 125%, 120%, 115%, 110%, 105%, 104%, 103%, 102%, 또는 101% 범위의 우리딘 디뉴클레오티드 함량을 가질 수 있다.

- [0255] 전술한 구현예들 중 임의의 구현예에서, 변형된 ORF는 적어도 하나의, 복수의, 또는 모든 우리딘 위치에 변형된 우리딘을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 5 위치에서, 예를 들어, 할로젠, 메틸, 또는 에틸로 변형된 우리딘이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 1 위치에서, 예를 들어, 할로젠, 메틸, 또는 에틸로 변형된 슈도우리딘이다. 변형된 우리딘은 예를 들어, 슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 5-메톡시우리딘, 5-요오도우리딘, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 5-메톡시우리딘이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 5-요오도우리딘이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 N1-메틸-슈도우리딘이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘 및 N1-메틸-슈도우리딘의 조합이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘 및 5-메톡시우리딘의 조합이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 N1-메틸 슈도우리딘 및 5-메톡시우리딘의 조합이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 5-요오도우리딘 및 N1-메틸-슈도우리딘의 조합이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘 및 5-요오도우리딘의 조합이다. 일부 구현예에서, 변형된 우리딘은 5-요오도우리딘 및 5-메톡시우리딘의 조합이다.
- [0256] 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 mRNA에서 우리딘 위치의 적어도 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 100%가 변형된 우리딘이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 mRNA에서 우리딘 위치의 10%~25%, 15~25%, 25~35%, 35~45%, 45~55%, 55~65%, 65~75%, 75~85%, 85~95%, 또는 90~100%가 변형된 우리딘, 예를 들어, 5-메톡시우리딘, 5-요오도우리딘, N1-메틸 슈도우리딘, 슈도우리딘, 또는 이들의 조합이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 mRNA에서 우리딘 위치의 10%~25%, 15~25%, 25~35%, 35~45%, 45~55%, 55~65%, 65~75%, 75~85%, 85~95%, 또는 90~100%가 5-메톡시우리딘이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 mRNA에서 우리딘 위치의 10%~25%, 15~25%, 25~35%, 35~45%, 45~55%, 55~65%, 65~75%, 75~85%, 85~95%, 또는 90~100%가 슈도우리딘이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 mRNA에서 우리딘 위치의 10%~25%, 15~25%, 25~35%, 35~45%, 45~55%, 55~65%, 65~75%, 75~85%, 85~95%, 또는 90~100%가 5-요오도우리딘이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 mRNA에서 우리딘 위치의 10%~25%, 15~25%, 25~35%, 35~45%, 45~55%, 55~65%, 65~75%, 75~85%, 85~95%, 또는 90~100%가 N1-메틸 슈도우리딘이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 mRNA에서 우리딘 위치의 10%~25%, 15~25%, 25~35%, 35~45%, 45~55%, 55~65%, 65~75%, 75~85%, 85~95%, 또는 90~100%가 5-메톡시우리딘이고, 나머지는 N1-메틸 슈도우리딘이다. 일부 구현예에서, 본 개시내용에 따른 mRNA에서 우리딘 위치의 10%~25%, 15~25%, 25~35%, 35~45%, 45~55%, 55~65%, 65~75%, 75~85%, 85~95%, 또는 90~100%가 5-요오도우리딘이고, 나머지는 N1-메틸 슈도우리딘이다.
- [0257] 전술한 구현예들 중 임의의 구현예에서, 변형된 ORF, 예를 들어 (a) 모든 위치에서 최소 우리딘 코돈(위에서 논의한 바와 같음)을 사용하고, (b) 주어진 ORF와 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 ORF는 감소된 우리딘 디뉴클레오티드 함량, 예컨대 가능한 가장 낮은 우리딘 디뉴클레오티드(UU) 함량을 포함할 수 있다. 우리딘 디뉴클레오티드(UU) 함량은 ORF에서 UU 디뉴클레오티드의 열거로서 절대 항목으로 표현될 수 있거나, 또는 우리딘 디뉴클레오티드의 우리딘이 차지하는 위치의 백분율로 비율 기준으로 표현될 수 있다(예를 들어, 우리딘 디뉴클레오티드의 우리딘이 5개 위치 중 2개를 차지하기 때문에 AUUAU는 40%의 우리딘 디뉴클레오티드 함량을 가질 것임). 변형된 우리딘 잔기는 최소 우리딘 디뉴클레오티드 함량을 평가할 목적으로 우리딘과 동등한 것으로 간주된다.
- [0258] 일부 구현예에서, mRNA는 발현된 포유동물 mRNA, 예컨대 구성적으로 발현된 mRNA로부터의 적어도 하나의 UTR을 포함한다. mRNA는 건강한 성인 포유동물의 적어도 하나의 조직에서 지속적으로 전사되는 경우 포유류에서 구성적으로 발현되는 것으로 간주된다. 일부 구현예에서, mRNA는 발현된 포유동물 RNA, 예컨대 구성적으로 발현된 포유동물 mRNA로부터의 5' UTR, 3' UTR, 또는 5' 및 3' UTR을 포함한다. 액틴 mRNA는 구성적으로 발현된 mRNA의 예이다.
- [0259] 일부 구현예에서, mRNA는 히드록시스테로이드 17-베타 데하이드로게나제 4(HSD17B4 또는 HSD)로부터의 적어도 하나의 UTR, 예를 들어, HSD로부터의 5' UTR을 포함한다. 일부 구현예에서, mRNA는 글로빈 mRNA, 예를 들어, 인간 알파 글로빈(HBA) mRNA, 인간 베타 글로빈(HBB) mRNA, 또는 제노푸스 래비스(*Xenopus laevis*) 베타 글로빈(XBG) mRNA로부터의 적어도 하나의 UTR을 포함한다. 일부 구현예에서, mRNA는 글로빈 mRNA, 예컨대 HBA, HBB, 또는 XBG로부터의 5' UTR, 3' UTR, 또는 5' 및 3' UTR을 포함한다. 일부 구현예에서, mRNA는 소 성장 호르몬, 사이토메갈로바이러스(CMV), 마우스 Hba-a1, HSD, 알부민 유전자, HBA, HBB, 또는 XBG로부터의 5' UTR을 포함한다. 일부 구현예에서, mRNA는 소 성장 호르몬, 사이토메갈로바이러스, 마우스 Hba-a1, HSD, 알부민 유전자, HBA, HBB, 또는 XBG로부터의 3' UTR을 포함한다. 일부 구현예에서, mRNA는 소 성장 호르몬, 사이토메갈로바이러스, 마우스 Hba-a1, HSD, 알부민 유전자, HBA, HBB, XBG, 열 충격 단백질 90(Hsp90), 글리세르알데히드 3-포스페이트 데하이드로게나제(GAPDH), 베타-액틴, 알파-튜블린, 종양 단백질(p53), 또는 표피 성장 인자 수용체

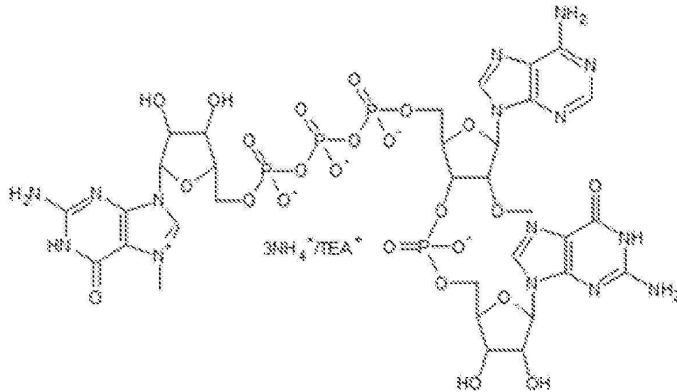
(EGFR)로부터의 5' 및 3' UTR을 포함한다.

- [0260] 일부 구현예에서, mRNA는 동일한 공급원, 예를 들어, 구성적으로 발현된 mRNA 예컨대 액틴, 알부민, 또는 글로빈 예컨대 HBA, HBB, 또는 XBG로부터 유래된 5' 및 3' UTR을 포함한다.
- [0261] 일부 구현예에서, mRNA는 5' UTR을 포함하지 않으며, 예를 들어, 5' 캡과 시작 코돈 사이에 추가의 뉴클레오티드가 없다. 일부 구현예에서, mRNA는 5' 캡과 시작 코돈 사이에 Kozak 서열(아래에 설명됨)을 포함하지만, 임의의 추가의 5' UTR을 갖지 않는다. 일부 구현예에서, mRNA는 3' UTR을 포함하지 않으며, 예를 들어, 정지 코돈과 폴리-A 테일 사이에 추가의 뉴클레오티드가 없다.
- [0262] 일부 구현예에서, mRNA는 Kozak 서열을 포함한다. Kozak 서열은 번역 개시 및 mRNA로부터 번역된 폴리펩티드의 전체 수율에 영향을 미칠 수 있다. Kozak 서열은 시작 코돈으로 기능할 수 있는 메티오닌 코돈을 포함한다. 최소 Kozak 서열은 NNNRUGN이며, 여기서 다음 중 적어도 하나가 참이다: 첫번째 N은 A 또는 G이고, 두번째 N은 G이다. 뉴클레오티드 서열의 맥락에서, R은 퓨린(A 또는 G)을 의미한다. 일부 구현예에서, Kozak 서열은 RNNRUGN, NNNRUGG, RNNRUGG, RNNAUGN, NNNAUGG, 또는 RNNAUGG이다. 일부 구현예에서, Kozak 서열은 소문자의 위치에 대한 0개의 미스매치 또는 최대 1 또는 2개의 미스매치를 갖는 rccRUGg이다. 일부 구현예에서, Kozak 서열은 소문자의 위치에 대한 0개의 미스매치 또는 최대 1 또는 2개의 미스매치를 갖는 rccAUGg이다. 일부 구현예에서, Kozak 서열은 소문자의 위치에 대한 0개의 미스매치 또는 최대 1, 2, 또는 3개의 미스매치를 갖는 gccRccAUGG(서열 번호 26)이다. 일부 구현예에서, Kozak 서열은 소문자의 위치에 대한 0개의 미스매치 또는 최대 1, 2, 3 또는 4개의 미스매치를 갖는 gccAccAUG이다. 일부 구현예에서, Kozak 서열은 GCCACCAUG이다. 일부 구현예에서, Kozak 서열은 소문자의 위치에 대한 0개의 미스매치 또는 최대 1, 2, 3 또는 4개의 미스매치를 갖는 gccgccRccAUGG(서열 번호 27)이다.
- [0263] 일부 구현예에서, RNA-가이드 DNA 결합제를 암호화하는 ORF를 포함하는 mRNA는 표 89의 Cas ORF 중 임의의 것에 대해 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함한다.
- [0264] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 mRNA는 5' 캡, 예컨대 Cap0, Cap1, 또는 Cap2를 포함한다. 5' 캡은 일반적으로 7-메틸구아닌 리보뉴클레오티드(예를 들어 ARCA와 관련하여 아래에서 논의되는 바와 같이 추가로 변형될 수 있음) 5'-트리포스페이트를 통해 mRNA의 5'-to-3' 사슬의 제1 뉴클레오티드의 5' 위치, 즉, 제1 캡-근위 뉴클레오티드에 연결된다. Cap0에서, mRNA의 제1 및 제2 캡-근위 뉴클레오티드의 리보스는 모두 2'-히드록실을 포함한다. Cap1에서, mRNA의 제1 및 제2 전사된 뉴클레오티드의 리보스는 각각 2'-메톡시 및 2'-히드록실을 포함한다. Cap2에서, mRNA의 제1 및 제2 캡-근위 뉴클레오티드의 리보스는 둘다 2'-메톡시를 포함한다. 예를 들어, Katibah 등(2014) *Proc Natl Acad Sci USA* 111(33):12025-30; Abbas 등(2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114(11):E2106-E2115를 참고한다. 포유동물 mRNA 예컨대 인간 mRNA를 포함하는, 대부분의 내인성 고등 진핵 mRNA는 Cap1 또는 Cap2를 포함한다. Cap1 및 Cap2와 상이한 Cap0 및 다른 캡 구조는 인간과 같은 포유동물에서, IFIT-1 및 IFIT-5와 같은 선천성 면역 체계의 구성요소에 의해 "비-자발"로 인식되기 때문에 면역원성일 수 있어서, I형 인터페론을 포함한 상승된 사이토카인 수준을 초래할 수 있다. IFIT-1 및 IFIT-5와 같은 선천성 면역 체계의 구성요소는 Cap1 또는 Cap2 이외의 캡과 mRNA의 결합에 대해 eIF4E와 경쟁하여 잠재적으로 mRNA의 번역을 억제할 수 있다.
- [0265] 캡은 동시-전사적으로 포함될 수 있다. 예를 들어, ARCA(항-역 캡 유사체; Thermo Fisher Scientific 카탈로그 번호 AM8045)는 시험관 내에서 개시 시 전사물에 통합될 수 있는 구아닌 리보뉴클레오티드의 5' 위치에 연결된 7-메틸구아닌 3'-메톡시-5'-트리포스페이트를 포함하는 캡 유사체이다. ARCA는 제1 캡-근위 뉴클레오티드의 2' 위치가 히드록실인 Cap0 캡을 생성한다. 예를 들어, Stepinski 등, (2001) "Synthesis and properties of mRNAs containing the novel 'anti-reverse' cap analogs 7-methyl(3'-O-methyl)GpppG and 7-methyl(3'deoxy)GpppG," *RNA* 7: 1486-1495를 참고한다. ARCA 구조는 아래와 같다.



- [0266]
- [0267] CleanCapTM AG(m7G(5')ppp(5'))(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies 카탈로그 번호 N-7113) 또는 CleanCapTM GG(m7G(5')ppp(5'))(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies 카탈로그 번호 N-7133)는 Cap1 구조를 동시-전사적으

로 제공하는데 사용될 수 있다. CleanCap™ AG 및 CleanCap™ GG의 3'-O-메틸화 버전은 또한 각각 TriLink Biotechnologies제의 카탈로그 번호 N-7413 및 N-7433으로 상업적으로 사용가능하다. CleanCap™ AG 구조는 아래와 같다.



[0268]

[0269]

대안적으로, 전사 후에 캡이 RNA에 첨가될 수 있다. 예를 들어, 백시니아 캡핑 효소가 상업적으로 이용가능하고 (New England Biolabs 카탈로그 번호 M2080S), 서브유닛에 의해 제공되는 RNA 트리포스파타제 및 구아닐릴트랜스퍼라제 활성, 및 D1 서브유닛에 의해 제공되는 구아닌 메틸트랜스퍼라제 활성을 갖는다. 이와 같이, S-아데노실 메티오닌 및 GTP의 존재 하에 Cap0를 제공하기 위해 RNA에 7-메틸구아닌을 첨가할 수 있다. 예를 들어, Guo, P. and Moss, B.(1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 4023-4027; Mao, X. and Shuman, S.(1994) *J. Biol. Chem.* 269, 24472-24479를 참고한다.

[0270]

일부 구현예에서, mRNA는 폴리-아데닐화(폴리-A) 테일을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리-A 테일은 적어도 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100개의 아데닌, 선택적으로 최대 300개의 아데닌을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리-A 테일은 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100 아데닌 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 예에서, 폴리-A 테일은 폴리-A 테일 내의 하나 이상의 위치에서 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드 "앵커"로 "중단"된다. 폴리-A 테일은 적어도 8개의 연속적인 아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있지만, 또한 하나 이상의 비-아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "비-아데닌 뉴클레오타이드"는 아데닌을 포함하지 않는 임의의 천연 또는 비-천연 뉴클레오타이드를 지칭한다. 구아닌, 티민 및 시토신 뉴클레오타이드는 예시적인 비-아데닌 뉴클레오타이드이다. 따라서, 본원에 기재된 mRNA 상의 폴리-A 테일은 RNA-가이드 DNA-결합체 또는 관심 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드에 대해 3'에 위치한 연속적인 아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 예에서, mRNA 상의 폴리-A 테일은 RNA-가이드 DNA-결합체 또는 관심 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드에 대해 3'에 위치한 비-연속적인 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 비-아데닌 뉴클레오타이드는 규칙적 또는 불규칙적 간격으로 아데닌 뉴클레오타이드를 중단시킨다.

[0271]

본원에 사용된 바와 같이, "비-아데닌 뉴클레오타이드"는 아데닌을 포함하지 않는 임의의 천연 또는 비-천연 뉴클레오타이드를 지칭한다. 구아닌, 티민, 및 시토신 뉴클레오타이드는 예시적인 비-아데닌 뉴클레오타이드이다. 따라서, 본원에 기재된 mRNA 상의 폴리-A 테일은 RNA-가이드 DNA-결합체 또는 관심 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드에 대해 3'에 위치한 연속적인 아데닌 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 예에서, mRNA 상의 폴리-A 테일은 RNA-가이드 DNA-결합체 또는 관심 서열을 암호화하는 뉴클레오타이드에 대해 3'에 위치한 비-연속적인 아데닌 뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 비-아데닌 뉴클레오타이드는 규칙적 또는 불규칙적 간격으로 아데닌 뉴클레오타이드를 중단시킨다.

[0272]

일부 구현예에서, mRNA가 정제된다. 일부 구현예에서, mRNA는 침전 방법(예를 들어, LiCl 침전, 알코올 침전, 또는 예를 들어, 본원에 기재된 것과 같은 동등한 방법)을 사용하여 정제된다. 일부 구현예에서, mRNA는 크로마토그래피-기반 방법, 예컨대 HPLC-기반 방법 또는 동등한 방법(예를 들어, 본원에 기재된 것과 같음)을 사용하여 정제된다. 일부 구현예에서, mRNA는 침전 방법(예를 들어, LiCl 침전) 및 HPLC-기반 방법을 둘다 사용하여 정제된다.

[0273]

일부 구현예에서, 적어도 하나의 gRNA는 본원에 개시된 mRNA와 조합하여 제공된다. 일부 구현예에서, gRNA는 mRNA와 별도의 분자로 제공된다. 일부 구현예에서, gRNA는 본원에 개시된 mRNA의 UTR의 일부와 같은, 일부로 제공된다.

[0274] **B. 화학적으로 변형된 핵산**

[0275] 일부 구현예에서, 핵산은 RNA, 예컨대 화학적으로 변형된 RNA이다. 일부 구현예에서, 핵산은 DNA이거나, 또는 DNA, 예컨대 화학적으로 변형된 DNA를 포함한다.

[0276] 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 포함하는 RNA는 "변형된" RNA 또는 "화학적으로 변형된" RNA로 불리며, 정규 A, G, C, 및 U 잔기 대신에 또는 추가하여 사용되는 하나 이상의 비-자연 및/또는 자연 발생 성분 또는 구성의 존재를 설명한다. 일부 구현예에서, 변형된 RNA는 비-정규 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드로 합성되며, 본원에서 "변형된"으로 불리운다. 변형된 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드는 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (i) 포스포디에스테르 백본 연결에서의 변경(예시적인 백본 변형), 예를 들어, 비-연결 포스페이트 산소 중 하나 또는 둘 모두의 교체 및/또는 연결 포스페이트 산소 중 하나 이상의 교체; (ii) 리보스 당에서의 변경(예시적인 당 변형), 예를 들어, 리보스 당 구성성분의 교체, 예를 들어, 2' 히드록실의 교체; (iii) "데포스포" 링커로 포스페이트 모이어티의 전체 교체(예시적인 백본 변형); (iv) 비-정규 핵염기를 포함한 자연 발생 핵염기의 변형 또는 교체(예시적인 염기 변형); (v) 리보스-포스페이트 백본의 교체 또는 변형(예시적인 백본 변형); (vi) 올리고뉴클레오티드의 3' 단부 또는 5' 단부의 변형, 예를 들어, 말단 포스페이트 기의 제거, 변형 또는 교체 또는 모이어티, 캡 또는 링커의 접합(이러한 3' 또는 5' 캡 변형은 당 및/또는 백본 변형을 포함할 수 있음); 및 (vii) 당의 변형 또는 교체(예시적인 당 변형).

[0277] 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 포함하는 gRNA는 "변형된" gRNA 또는 "화학적으로 변형된" RNA로 불리며, 정규 A, G, C, 및 U 잔기 대신에 또는 추가하여 사용되는 하나 이상의 비-자연 및/또는 자연 발생 성분 또는 구성의 존재를 설명한다. 일부 구현예에서, 변형된 RNA는 비-정규 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드로 합성되며, 본원에서 "변형된"으로 불리운다.

[0278] 위에 열거된 것과 같은 화학적 변형이 조합되어 2, 3, 4개, 또는 그 이상의 변형을 가질 수 있는 뉴클레오시드 및 뉴클레오티드(집합적으로 "잔기")를 포함하는 변형된 핵산, DNA, RNA, 또는 gRNA를 제공할 수 있다. 예를 들어, 변형된 잔기는 변형된 당 및 변형된 핵염기를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA의 모든 염기는 변형되며, 예를 들어, 모든 염기는 포스포로티오에이트 기와 같은 변형된 포스페이트 기를 갖는다. 일부 구현예에서, gRNA 분자의 포스페이트 기 모두 또는 실질적으로 포스포로티오에이트 기로 대체된다. 일부 구현예에서, 변형된 gRNA는 RNA의 5' 단부 또는 그 근처에 적어도 하나의 변형된 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 gRNA는 RNA의 3' 단부 또는 그 근처에 적어도 하나의 변형된 잔기를 포함한다.

[0279] 일부 구현예에서, 핵산 예컨대 gRNA는 1, 2, 3개 또는 그 이상의 변형된 잔기를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 gRNA내 위치의 적어도 5%(예를 들어, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 100%)는 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드이다.

[0280] 변형되지 않은 핵산은 예를 들어, 세포내 뉴클레아제 또는 혈청에서 발견되는 뉴클레아제에 의해 분해되기 쉬울 수 있다. 예를 들어, 뉴클레아제는 핵산 포스포디에스테르 결합을 가수분해할 수 있다. 따라서, 한 양태에서, 본원에 기재된 gRNA와 같은 변형된 핵산은 예를 들어, 세포내 또는 혈청-기반 뉴클레아제에 대한 안정성을 도입하기 위해 하나 이상의 변형된 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기재된 변형된 gRNA 분자는 생체내 및 생체의 모두에서 세포의 개체군에 도입될 때 감소된 선천성 면역 반응을 나타낼 수 있다. 용어 "선천성 면역 반응"은 사이토카인 발현 및 방출, 특히 인터페론의 유도, 및 세포 사멸을 수반하는 단일 가닥 핵산을 포함하는 외인성 핵산에 대한 세포 반응을 포함한다.

[0281] 백본 변형의 일부 구현예에서, 변형된 잔기의 포스페이트 기는 산소 중 하나 이상을 상이한 치환기로 교체함으로써 변형될 수 있다. 또한, 변형된 잔기, 예를 들어, 변형된 핵산에 존재하는 변형된 잔기는 변형되지 않은 포스페이트 모이어티를 본원에 기재된 바와 같은 변형된 포스페이트 기로 전체 교체하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 포스페이트 백본의 백본 변형은 비하전 링커 또는 비대칭 전하 분포를 갖는 하전 링커를 초래하는 변경을 포함할 수 있다.

[0282] 변형된 포스페이트 기의 예는 포스포로티오에이트, 포스포셀레네이트, 보라노 포스페이트, 보라노 포스페이트 에스테르, 수소 포스포네이트, 포스포로아미데이트, 알킬 또는 아릴 포스포네이트 및 포스포트리에스테르를 포함한다. 변형되지 않은 포스페이트 기의 인 원자는 아키랄이다. 그러나, 비가교 산소 중 하나를 상기 원자 또는 원자 기 중 하나로 교체하면 인 원자가 키랄이 될 수 있다. 입체 인 원자는 "R" 배좌(여기서 Rp) 또는 "S" 배좌

(여기서 Sp)를 가질 수 있다. 백본은 또한 가교 산소(즉, 포스페이트를 뉴클레오시드에 연결하는 산소)를 질소(가교된 포스포로아미데이트), 황(가교된 포스포로티오에이트) 및 탄소(가교된 메틸렌포스포네이트)로 교체하여 변형될 수 있다. 교체는 연결 산소 또는 연결 산소 모두에서 일어날 수 있다.

[0283] 포스페이트 기는 특정 백본 변형에서 비-인 함유 커넥터로 대체될 수 있다. 일부 구현예에서, 하전된 포스페이트 기는 중성 모이어티로 교체될 수 있다. 포스페이트 기를 대체할 수 있는 모이어티의 예는 제한 없이, 예를 들어, 메틸 포스포네이트, 히드록실아미노, 실록산, 카르보네이트, 카르복시메틸, 카르바메이트, 아마이드, 티오에테르, 에틸렌 옥시드 링커, 설포네이트, 설포아미드, 티오포름아세탈, 포름아세탈, 옥심, 메틸렌이미노, 메틸렌메틸이미노, 메틸렌히드라조, 메틸렌디메틸히드라조 및 메틸렌옥시메틸이미노를 포함할 수 있다.

[0284] 일부 구현예에서, 본 개시내용은 하기 영역들 중 하나 이상 내에 하나 이상의 변형을 포함하는 sgRNA를 포함한다: 5' 말단의 뉴클레오타이드; 하부 줄기 영역; 별지 영역; 상부 줄기 영역; 넥서스 영역; 헤어핀 1 영역; 헤어핀 2 영역; 및 3' 말단의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 2'-O-메틸(2'-O-Me) 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 2'-플루오로(2'-F) 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 뉴클레오타이드 사이의 포스포로티오에이트(PS) 결합을 포함한다.

[0285] 일부 구현예에서, 5' 말단의 처음 3개 또는 4개의 뉴클레오타이드, 및 3' 말단의 마지막 3개 또는 4개의 뉴클레오타이드가 변형된다. 일부 구현예에서, 5' 말단의 처음 4개의 뉴클레오타이드, 및 3' 말단의 마지막 4개의 뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트(PS) 결합으로 연결된다. 일부 구현예에서, 변형은 2'-O-Me를 포함한다. 일부 구현예에서, 변형은 2'-F를 포함한다.

[0286] 일부 구현예에서, 5' 말단의 처음 4개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단의 마지막 4개의 뉴클레오타이드는 PS 결합으로 연결되고, 5' 말단의 처음 3개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단의 마지막 3개의 뉴클레오타이드는 2'-O-Me 변형을 포함한다.

[0287] 일부 구현예에서, 5' 말단의 처음 4개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단의 마지막 4개의 뉴클레오타이드는 PS 결합으로 연결되고, 5' 말단의 처음 3개의 뉴클레오타이드 및 3' 말단의 마지막 3개의 뉴클레오타이드는 2'-F 변형을 포함한다.

[0288] 일부 구현예에서, sgRNA는:

[0289] (mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU(서열 번호 28)의 변형 패턴을 포함하며, 여기서 N은 임의의 자연 또는 비-자연 뉴클레오타이드이다. A, C, G, 및 U는 각각 아데닌 뉴클레오타이드, 시티딘 뉴클레오타이드, 구아닌 뉴클레오타이드, 및 우라실 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, A, C, G, 및 U는 각각 독립적으로 방향성 염기를 갖는 자연 또는 비-자연 발생 뉴클레오타이드이다. 특정 구현예에서, A, C, G, 및 U는 RNA 뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, sgRNA는 이 문장 앞의 문장에 개시된 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, sgRNA는 RNA의 잔기 1-2, 2-3, 및 3-4 사이에 포스포로티오에이트 연결을 갖는 그의 5' 단부에 처음 3개 잔기의 2'-메틸 변형을 포함한다.

[0290] C. 주형 핵산

[0291] 본원에 개시된 조성물 및 방법은 공여자 핵산, 즉, 주형 핵산을 포함할 수 있다. 주형은 Cas 뉴클레아제의 표적 부위 또는 그 근처에서 핵산 서열을 변경하거나 삽입하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 방법은 주형을 세포에 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 단일 주형이 제공될 수 있다. 다른 구현예에서, 2개 이상의 표적 부위에서 편집이 일어날 수 있도록 2개 이상의 주형이 제공될 수 있다. 예를 들어, 세포의 단일 유전자, 또는 세포의 두 개의 다른 유전자를 편집하기 위해 서로 다른 주형이 제공될 수 있다.

[0292] 일부 구현예에서, 주형은 상동성 재조합에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상동성 재조합은 주형 서열 또는 주형 서열의 일부를 표적 핵산 분자로 통합시키는 결과를 초래할 수 있다. 다른 구현예에서, 주형은 상동성-지향 복구에 사용될 수 있으며, 이는 핵산내 절단 부위에서의 DNA 가닥 침입을 수반한다. 일부 구현예에서, 상동성-지향 복구는 편집된 표적 핵산 분자에 주형 서열을 포함시키는 결과를 초래할 수 있다. 또다른 구현예에서, 주형은 비-상동성 말단 결합에 의해 매개되는 유전자 편집에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 서열은 절단 부위 근처의 핵산 서열과 유사하지 않다. 일부 구현예에서, 주형 또는 주형 서열의 일부가 통합된다. 일부 구현예에서, 주형은 측면에 역 말단 반복(ITR) 서열을 포함한다.

[0293] 일부 구현예에서, 주형은 각각 절단 부위의 업스트림 및 다운스트림에 위치한 서열에 상보적인 제1 상동성 아암

및 제2 상동성 아암(제1 및 제2 뉴클레오타이드 서열이라고도 함)을 포함할 수 있다. 주형이 2개의 상동성 아암을 포함하는 경우, 각 아암 길이가 같거나 다를 수 있으며, 상동성 아암 사이의 서열은 상동성 아암 사이의 표적 서열과 실질적으로 유사하거나 동일할 수 있거나 완전히 관련이 없을 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 상의 제1 뉴클레오타이드 서열과 절단 부위의 업스트림 서열 사이, 및 주형 상의 제2 뉴클레오타이드 서열과 절단 부위의 다운스트림 서열 사이의 상보성 정도 또는 퍼센트 동일성은 상동성 재조합, 예컨대, 예를 들어, 주형과 표적 핵산 분자 사이의 고충실도 상동성 재조합을 허용할 수 있다. 일부 구현예에서, 상보성 정도는 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%일 수 있다. 일부 구현예에서, 상보성 정도는 약 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%일 수 있다. 일부 구현예에서, 상보성 정도는 적어도 98%, 99%, 또는 100%일 수 있다. 일부 구현예에서, 퍼센트 동일성은 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%일 수 있다. 일부 구현예에서, 퍼센트 동일성은 약 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%일 수 있다. 일부 구현예에서, 퍼센트 동일성은 적어도 98%, 99%, 또는 100%일 수 있다. 일부 구현예에서, 퍼센트 동일성은 100%일 수 있다.

[0294] 일부 구현예에서, 주형 서열은 표적 세포의 내인성 서열에 상응하거나, 이를 포함하거나, 이로 구성될 수 있다. 그것은 또한 표적 세포의 외인성 서열에 대안적으로 상응하거나, 이를 포함하거나, 이로 구성될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "내인성 서열"은 세포 고유의 서열을 의미한다. 용어 "외인성 서열"은 세포에 고유하지 않은 서열, 또는 세포의 게놈에서 그의 고유 위치가 다른 위치에 있는 서열을 의미한다. 일부 구현예에서, 내인성 서열은 세포의 게놈 서열일 수 있다. 일부 구현예에서, 내인성 서열은 염색체 또는 염색체외 서열일 수 있다. 일부 구현예에서, 내인성 서열은 세포의 플라스미드 서열일 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 서열은 절단 부위 또는 그 부근의 세포에서 내인성 서열의 일부와 실질적으로 동일할 수 있지만, 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변화를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 절단된 표적 핵산 분자를 주형으로 편집하면 표적 핵산 분자의 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환을 포함하는 돌연변이가 발생할 수 있다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 표적 서열을 포함하는 유전자로부터 발현된 단백질에서 하나 이상의 아미노산 변화를 초래할 수 있다.

[0295] 일부 구현예에서, 돌연변이는 표적 삽입 부위로부터 발현된 RNA에서 하나 이상의 뉴클레오타이드 변화를 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 표적 유전자의 발현 수준을 변경할 수 있다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 표적 유전자의 발현을 증가시키거나 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 유전자 녹-다운을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 유전자 녹-아웃을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 돌연변이는 회복된 유전자 기능을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 절단된 표적 핵산 분자의 주형에 의한 편집은 엑손 서열, 인트론 서열, 조절 서열, 전사 대조군 서열, 번역 대조군 서열, 스플라이싱 부위, 또는 표적 핵산 분자, 예컨대 DNA의 비-암호화 서열의 변화를 초래할 수 있다.

[0296] 다른 구현예에서, 주형 서열은 외인성 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 서열은 암호화 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 서열은 외인성 서열이 표적 핵산 분자에 통합할 때, 세포는 통합된 서열에 의해 암호화된 단백질 또는 RNA를 발현할 수 있도록 외인성 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된 단백질 또는 RNA 암호화 서열(예를 들어, ORF)을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 외인성 서열을 표적 핵산 분자에 통합할 때, 통합된 서열의 발현은 내인성 프로모터 서열에 의해 조절될 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 서열은 단백질 또는 단백질의 일부를 암호화하는 cDNA 서열을 제공할 수 있다. 또다른 구현예에서, 외인성 서열은 엑손 서열, 인트론 서열, 조절 서열, 전사 대조군 서열, 번역 대조군 서열, 스플라이싱 부위, 또는 비-암호화 서열을 포함하거나 이로 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 서열의 통합은 회복된 유전자 기능을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 서열의 통합은 유전자 녹-인을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 외인성 서열의 통합은 유전자 녹-아웃을 초래할 수 있다.

[0297] 주형은 임의의 적합한 길이일 수 있다. 일부 구현예에서, 주형은 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000개, 또는 그이상의 뉴클레오타이드 길이를 포함할 수 있다. 주형은 단일-가닥 핵산일 수 있다. 주형은 이중-가닥 또는 부분 이중 가닥 핵산일 수 있다. 일부 구현예에서, 단일 가닥 주형은 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 또는 200개의 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 구현예에서, 주형은 표적 서열을 포함하는 표적 핵산 분자의 일부(즉, "상동성 아암")에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 주형은 표적 핵산 분자 상의 절단 부위의 업스트림 또는 다운스트림에 위치한 서열에 상보적인 상동성 아암을 포함할 수 있다.

[0298] 일부 구현예에서, 주형은 측접 역-말단 반복(ITR) 서열을 함유하는 ssDNA 또는 dsDNA를 함유한다. 일부 구현예에서, 주형은 벡터, 플라스미드, 미니서클, 나노서클 또는 PCR 생성물로 제공된다.

[0299] **D. 핵산의 정제**

[0300] 일부 구현예에서, 핵산이 정제된다. 일부 구현예에서, 핵산은 침전 방법(예를 들어, LiCl 침전, 알코올 침전, 또는 본원에 기재된 것과 같은 동등한 방법)을 사용하여 정제된다. 일부 구현예에서, 핵산은 크로마토그래피-기반 방법, 예컨대 HPLC-기반 방법 또는 (본원에 기재된 것과 같은) 동등한 방법을 사용하여 정제된다. 일부 구현예에서, 핵산은 침전 방법(예를 들어, LiCl 침전) 및 HPLC-기반 방법 모두를 사용하여 정제된다.

[0301] **D. 표적 서열**

[0302] 일부 구현예에서, 본 개시내용의 CRISPR/Cas 시스템은 표적 핵산 분자 상의 표적 서열을 지시하고 이를 절단할 수 있다. 예를 들어, 표적 서열은 Cas 뉴클레아제에 의해 인식되고 절단될 수 있다. 일부 구현예에서, Cas 뉴클레아제에 대한 표적 서열은 뉴클레아제의 동족 PAM 서열 근처에 위치한다. 일부 구현예에서, 클래스 2 Cas 뉴클레아제는 gRNA에 의해 표적 핵산 분자의 표적 서열로 향할 수 있으며, 여기서 gRNA는 이와 혼성화하고 클래스 2 Cas 단백질은 표적 서열을 절단한다. 일부 구현예에서, 가이드 RNA는 그것과 혼성화하고 클래스 2 Cas 뉴클레아제는 그의 동족 PAM에 인접하거나 이를 포함하는 표적 서열을 절단한다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 가이드 RNA의 표적화 서열에 상보적일 수 있다. 일부 구현예에서, 가이드 RNA의 표적화 서열과 가이드 RNA에 혼성화하는 상응하는 표적 서열의 일부 사이의 상보성 정도는 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%일 수 있다. 일부 구현예에서, 가이드 RNA의 표적화 서열과 가이드 RNA에 혼성화하는 상응하는 표적 서열의 일부 사이의 퍼센트 동일성은 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적의 상동성 영역은 동족 PAM 서열에 인접한다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 가이드 RNA의 표적화 서열과 100% 상보적인 서열을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 표적 서열은 가이드 RNA의 표적화 서열과 비교하여, 적어도 하나의 미스매치, 결실, 또는 삽입을 포함할 수 있다.

[0303] 표적 서열의 길이는 사용되는 뉴클레아제 시스템에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, CRISPR/Cas 시스템을 위한 가이드 RNA의 표적화 서열은 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, 35, 40, 45, 50, 또는 50개 이상의 뉴클레오타이드 길이를 포함할 수 있고, 표적 서열은 선택적으로 PAM 서열에 인접한 상응하는 길이이다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 15~24개 뉴클레오타이드 길이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 17~21개 뉴클레오타이드 길이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 20개의 뉴클레오타이드 길이를 포함할 수 있다. 니카제가 사용되는 경우, 표적 서열은 DNA 분자의 반대쪽 가닥을 절단하는 한 쌍의 니카제에 의해 인식되는 한 쌍의 표적 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 DNA 분자의 동일한 가닥을 절단하는 한 쌍의 니카제에 의해 인식되는 한 쌍의 표적 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 하나 이상의 Cas 뉴클레아제로 인식되는 한 쌍의 표적 서열의 일부를 포함할 수 있다.

[0304] 표적 핵산 분자는 세포에 대해 내인성 또는 외인성인 임의의 DNA 또는 RNA 분자일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 핵산 분자는 세포로부터의 또는 세포 내의 에피솜 DNA, 플라스미드, 게놈 DNA, 바이러스 게놈, 미토콘드리아 DNA, 또는 염색체 DNA일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 핵산 분자의 표적 서열은 인간 세포를 포함하는 세포 또는 세포 내의 게놈 서열일 수 있다.

[0305] 추가의 구현예에서, 표적 서열은 바이러스 서열일 수 있다. 추가의 구현예에서, 표적 서열은 병원체 서열일 수 있다. 또다른 구현예에서, 표적 서열은 합성된 서열일 수 있다. 추가의 구현예에서, 표적 서열은 염색체 서열일 수 있다. 특정 구현예에서, 표적 서열은 전좌 접합부, 예를 들어, 암과 관련된 전좌를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 인간 염색체와 같은 진핵생물 염색체 상에 있을 수 있다.

[0306] 일부 구현예에서, 표적 서열은 유전자의 암호화 서열, 유전자의 인트론 서열, 조절 서열, 유전자의 전사 대조군 서열, 유전자의 번역 대조군 서열, 스플라이싱 부위 또는 유전자 사이의 비-암호화 서열에 위치될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자는 단백질 암호화 유전자일 수 있다. 다른 구현예에서, 유전자는 비-암호화 RNA 유전자일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 질환-관련 유전자의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 서열은 게놈 내의 비유전자 기능 부위, 예를 들어 스캐폴드 부위 또는 유전자와 제어 영역과 같은 염색질 조직의 측면을 제어하는 부위에 위치할 수 있다.

[0307] 일부 구현예에서 Cas 뉴클레아제, 예컨대 클래스 2 Cas 뉴클레아제와 관련하여, 표적 서열은 프로토스페이서 인접 모티프("PAM")에 인접할 수 있다. 일부 구현예에서, PAM은 표적 서열의 3' 단부의 1, 2, 3, 또는 4개의 뉴클레오타이드에 인접하거나 그 내에 있을 수 있다. PAM의 길이와 서열은 사용된 Cas 단백질에 따라 달라질 수 있다.

예를 들어, PAM은 Ran 등, *Nature*, 520: 186-191(2015)의 도 1, 및 Zetsche 2015의 도 S5에 개시된 것들을 포함한다, 특정 Cas9 단백질 또는 Cas9 오솔로그에 대한 컨센서스 또는 특정 PAM 서열로부터 선택될 수 있으며, 이의 관련 개시내용은 본원에 참고로 포함된다. 일부 구현예에서, PAM은 길이가 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 개 뉴클레오티드일 수 있다. 비-제한적인 예시적인 PAM 서열은 NGG, NGGNG, NG, NAAAN, NAAAAW, NNNNACA, GNNNCNA, TTN, 및 NNNNGATT(여기서 N은 임의의 뉴클레오티드로 정의되고, W는 A 또는 T로 정의됨)를 포함한다. 일부 구현예에서, PAM 서열은 NGG일 수 있다. 일부 구현예에서, PAM 서열은 NGGNG일 수 있다. 일부 구현예에서, PAM 서열은 TTN일 수 있다. 일부 구현예에서, PAM 서열은 NAAAAW일 수 있다.

VI. 예시적인 지질 핵산 어셈블리

CRISPR/Cas 성분을 포함하는 RNA 및 이를 발현하는 RNA와 같은 게놈 편집 도구를 포함하는 지질 핵산 어셈블리를 사용하는 다양한 구현예가 본원에 개시된다.

본원에 사용된 바와 같이, "지질 핵산 어셈블리 조성물"은 지질 나노입자(LNP) 및 리포플렉스를 포함하는 지질-기반 전달 조성물을 지칭한다. 일부 구현예에서, "LNP 조성물"은 "LNPs" 또는 "LNP"와 상호 교환적으로 사용된다.

일부 구현예에서, LNP는 직경이 100 nm 미만인 지질 나노입자, 또는 평균 직경이 100 nm 미만인 LNP 개체군을 지칭한다. 특정 구현예에서, LNP는 약 1~250 nm, 10~200 nm, 약 20~150 nm, 약 50~150 nm, 약 50~100 nm, 약 50~120 nm, 약 60~100 nm, 약 75~150 nm, 약 75~120 nm, 또는 약 75~100 nm의 직경을 가지거나, 또는 LNP 개체군은 약 10~200 nm, 약 20~150 nm, 약 50~150 nm, 약 50~100 nm, 약 50~120 nm, 약 60~100 nm, 약 75~150 nm, 약 75~120 nm, 또는 약 75~100 nm의 평균 직경을 갖는다. 바람직한 구현예에서, LNP 조성물은 75~150 nm의 직경을 갖는다.

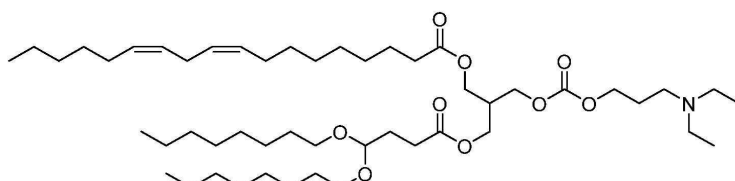
LNP는 지질 성분(예를 들어, 에탄올 중)을 수성 핵산 성분과 정밀하게 혼합함으로써 형성되고, LNP는 크기가 균일하다. 리포플렉스는 지질과 핵산 성분을 벌크 혼합하여 형성된 입자이며, 약 100 nm에서 1미크론 사이의 크기이다. 특정 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리는 LNP이다. 본원에 사용된 바와 같이, "지질 핵산 어셈블리"는 분자간 힘에 의해 서로 물리적으로 회합된 다수(즉, 하나 이상)의 지질 분자를 포함한다. 지질 핵산 어셈블리는 <7.5 또는 <7의 pKa 값을 갖는 생체이용성 지질을 포함할 수 있다. 지질 핵산 어셈블리는 수성 핵산-함유 용액을 유기 용매 기반 지질 용액, 예를 들어 100% 에탄올과 혼합하여 형성된다. 적합한 용액 또는 용매는 물, PBS, 트리스 완충액, NaCl, 시트레이트 완충액, 에탄올, 클로로포름, 디에틸에테르, 사이클로헥산, 테트라히드로푸란, 메탄올, 이소프로판올을 포함하거나 함유할 수 있다. 약제학적으로 허용가능한 완충액은 예를 들어, 생체의 ACT 요법을 위해 지질 핵산 어셈블리를 포함하는 약제학적 제형에 선택적으로 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 수용액은 RNA, 예컨대 mRNA 또는 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 수용액은 RNA-가이드 DNA 결합체, 예컨대 Cas9를 암호화하는 mRNA를 포함한다.

일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 제형은 임의의 "헬퍼 지질", "중성 지질", 및 스텔스 지질 예컨대 PEG 지질과 함께 "아민 지질"(때때로 본원에서 또는 "이온화가능한 지질" 또는 "생분해성 지질"로 다른 곳에서 기재됨)을 포함한다. 일부 구현예에서, 아민 지질 또는 이온화가능한 지질은 pH에 따라 양이온성이다.

A. 아민 지질

일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 예를 들어 이온화가능한 지질 예컨대 지질 A, 또는 지질 D 또는 지질 A 또는 지질 D의 아세탈 유사체를 포함하는, 이들의 등가물인, "아민 지질"을 포함한다.

일부 구현예에서, 아민 지질은 (9Z,12Z)-3-(((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-(((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트인 지질 A이며, 3-(((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-(((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트라고도 불린다. 지질 A는 하기와 같이 나타낼 수 있다:

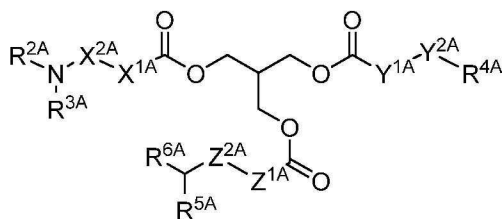


[0318] 지질 A는 W02015/095340(예를 들어, pp. 84-86)에 따라 합성될 수 있다. 일부 구현예에서, 아민 지질은 지질 A, 또는 본원에 참조로 포함된 W02020/219876에 제공된 아민 지질이다.

[0319] 일부 구현예에서, 아민 지질은 지질 A의 유사체이다. 일부 구현예에서, 지질 A 유사체는 지질 A의 아세탈 유사체이다. 특정 지질 핵산 어셈블리 조성물에서, 아세탈 유사체는 C4-C12 아세탈 유사체이다. 일부 구현예에서, 아세탈 유사체는 C5-C12 아세탈 유사체이다. 추가의 구현예에서, 아세탈 유사체는 C5-C10 아세탈 유사체이다. 추가의 구현예에서, 아세탈 유사체는 C4, C5, C6, C7, C9, C10, C11, 및 C12 아세탈 유사체로부터 선택된다.

[0320] 일부 구현예에서, 아민 지질은 하기 화학식 IA의 구조 또는 이들의 염을 갖는 화합물이다:

[0321] [화학식 IA]



[0322]

[0323] 여기서

[0324] X1A는 O, NH, 또는 직접 결합이고;

[0325] X2A는 C2-3 알킬렌이고;

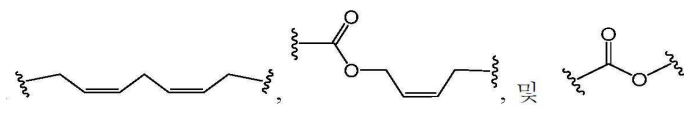
[0326] R3A는 C1-3 알킬이고;

[0327] R2A는 C1-3 알킬이거나,

[0328] R2A는 부착된 질소 원자 및 X2A의 2-3개의 탄소 원자와 함께 5원 또는 6원 고리를 형성하거나,

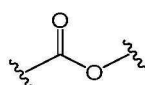
[0329] R2A는 R3A 및 이들이 부착된 질소 원자와 함께 5원 고리를 형성하고;

[0330] Y1A는 C6-10 알킬렌이고;

[0331] Y2A는 , 및 로부터 선택되고;

[0332] R4A는 C4-11 알킬이고;

[0333] Z1A는 C2-5 알킬렌이고;

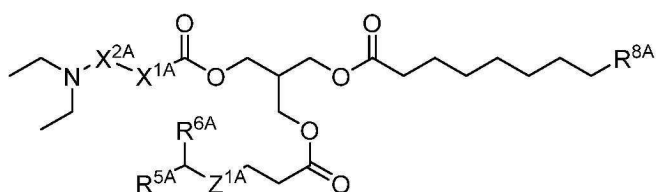
[0334] Z2A는  이거나, 부재하며;

[0335] R5A는 C6-8 알킬 또는 C6-8 알콕시이고; 및

[0336] R6A는 C6-8 알킬 또는 C6-8 알콕시이다.

[0337] 일부 구현예에서, 아민 지질은 화학식 IIA 또는 이들의 염의 화합물이다:

[0338] [화학식 IIA]



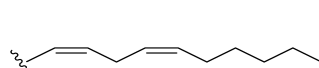
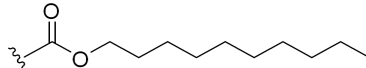
[0339]

[0340] 여기서

[0341] X1A는 O, NH, 또는 직접 결합이고;

[0342] X2A는 C2-3 알킬렌이고;

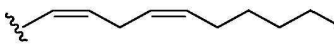
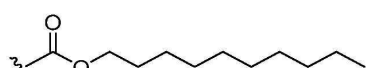
[0343] Z1A는 C3 알킬렌이고, R5A 및 R6A는 각각 C6 알킬이거나, 또는 Z1A는 직접 결합이고, R5A 및 R6A는 각각 C8 알콕시이고; 및

[0344] R8A는  또는  이다.

[0345] 특정 구현예에서, X1A는 O이다. 다른 구현예에서, X1A는 NH이다. 여전히 다른 구현예에서, X1A는 직접 결합이다.

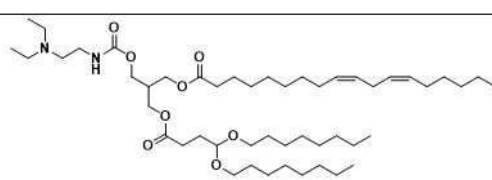
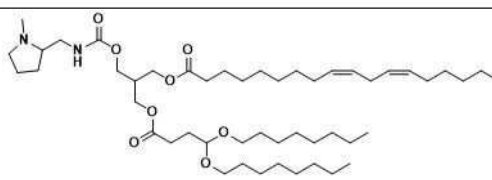
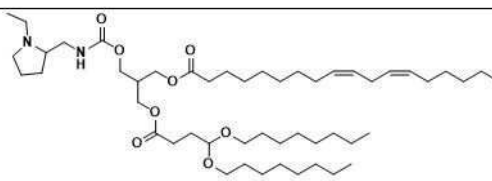
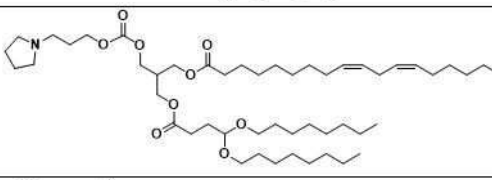
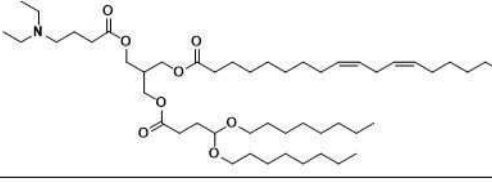
[0346] 특정 구현예에서, X2A는 C3 알킬렌이다. 특정 구현예에서, X2A는 C2 알킬렌이다.

[0347] 특정 구현예에서, Z1A는 직접 결합이고, R5A 및 R6A는 각각 C8 알콕시이다. 다른 구현예에서, Z1A는 C3 알킬렌이고, R5A 및 R6A는 각각 C6 알킬이다.

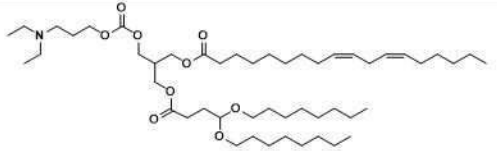
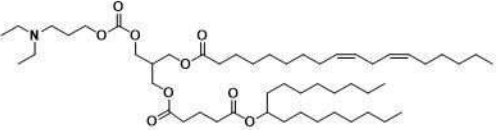
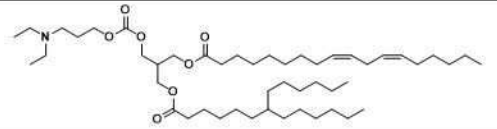
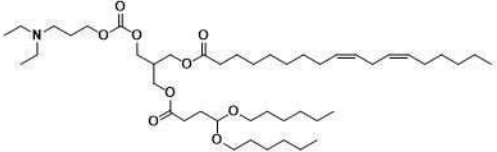
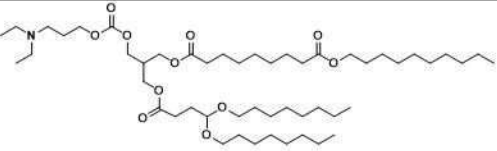
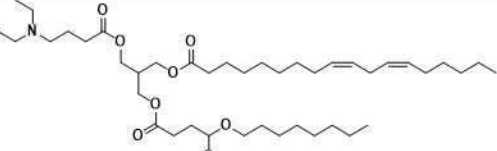
[0348] 특정 구현예에서, R8A는  이다. 다른 구현예에서, R8A는  이다.

[0349] 특정 구현예에서, 아민 지질은 염이다.

[0350] 화학식 IA의 대표적인 화합물 또는 이의 염, 예컨대 이의 약제학적으로 허용가능한 염은 하기를 포함한다:

화합물 번호	화합물
1A	
2A	
3A	
4A	
5A	

[0351]

6A	
7A	
8A	
9A	
10A	
11A	

[0352]

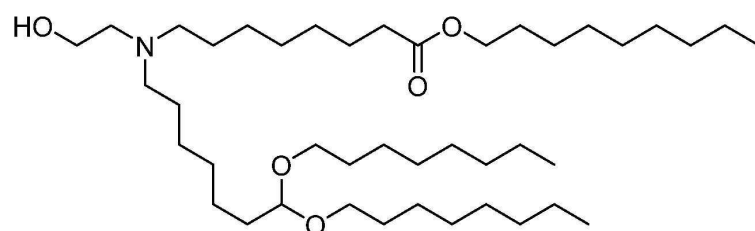
12A	
13A	
14A	
15A	
16A	
17A	

[0353]

18A	
19A	

[0354]

[0355] 일부 구현예에서, 아민 지질은 지질 D이며, 이는 노닐 8-((7,7-비스(옥틸옥시)헵탈)(2-히드록시에틸)아미노)옥타노에이트 또는 이들의 염이다:

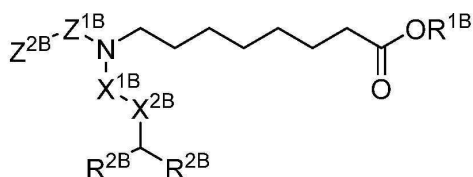


[0356]

[0357] 지질 D는 W02020072605 및 *Mol. Ther.* 2018, 26(6), 1509-1519("Sabnis")에 따라 합성될 수 있으며, 이는 그 전문이 참고로 포함된다. 일부 구현예에서, 아민 지질 지질 D, 또는 아민 지질은 W02020072605에 제공되며, 이는 본원에 참고로 포함된다.

[0358] 일부 구현예에서, 아민 지질은 화학식 IB의 구조 또는 이들의 염을 갖는 화합물이다:

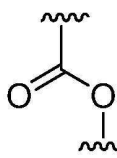
[0359] [화학식 IB]



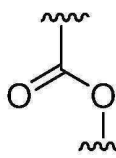
[0360]

[0361] 여기서

[0362] X^{1B} 는 C_{6-7} 알킬렌이고;



[0363] X^{2B} 는 또는 존재하지 않으며, 단 X^{2B} 가 인 경우, R^{2B} 는 알콕시가 아니다.



[0364] Z^{1B} 는 C_{2-3} 알킬렌이고;

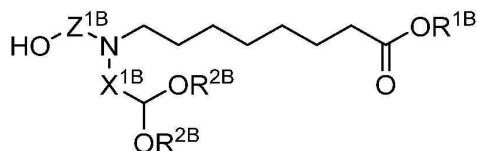
[0365] Z^{2B} 는 $-OH$, $-NHC(=O)OCH_3$, 및 $-NHS(=O)_2CH_3$ 으로부터 선택되고;

[0366] R^{1B} 는 C_{7-9} 비분지형 알킬이고; 및

[0367] 각 R^{2B} 는 독립적으로 C_8 알킬 또는 C_8 알콕시이다.

[0368] 일부 구현예에서, 아민 지질은 화학식 IIB 또는 이들의 염의 화합물이다:

[0369] [화학식 IIB]



[0370]

[0371] 여기서

[0372] X^{1B} 는 C_{6-7} 알킬렌이고;

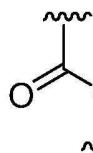
[0373] Z^{1B} 는 C_{2-3} 알킬렌이고;

[0374] R^{1B} 는 C_{7-9} 비분지형 알킬이고;

[0375] 각각의 R^{2B} 는 C_8 알킬이다.

[0376] 특정 구현예에서, X^{1B} 는 C_6 알킬렌이다. 다른 구현예에서, X^{1B} 는 C_7 알킬렌이다.

[0377] 특정 구현예에서, Z^{1B} 는 직접 결합이고, R^{5B} 및 R^{6B} 는 각각 C_8 알콕시이다. 다른 구현예에서, Z^{1B} 는 C_3 알킬렌이고, R^{5B} 및 R^{6B} 는 각각의 C_6 알킬이다.



[0378] 특정 구현예에서, X^{2B} 는 이고, R^{2B} 는 알콕시가 아니다. 다른 구현예에서, X^{2B} 는 존재하지 않는다.

[0379] 특정 구현예에서, Z^{1B} 는 C_2 알킬렌이고; 다른 구현예에서, Z^{1B} 는 C_3 알킬렌이다.

[0380] 특정 구현예에서, Z^{2B} 는 $-OH$ 이다. 다른 구현예에서, Z^{2B} 는 $-NHC(=O)OCH_3$ 이다. 다른 구현예에서, Z^{2B} 는 $-NHS(=O)_2CH_3$ 이다.

[0381] 특정 구현예에서, R^{1B} 는 C_7 비분지형 알킬렌이다. 다른 구현예에서, R^{1B} 는 C_8 분지형 또는 비분지형 알킬렌이다. 다른 구현예에서, R^{1B} 는 C_9 분지형 또는 비분지형 알킬렌이다.

[0382] 특정 구현예에서, 아민 지질은 염이다.

[0383] 화학식 IB 또는 이들의 염, 예컨대 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 대표적인 화합물은 하기를 포함한다:

화합물 번호	화합물
1B	
2B	
3B	
4B	
5B	
6B	
7B	

[0384]

[0385] 본원에 기재된 지질 핵산 어셈블리에 사용하기에 적합한 아민 지질 및 기타 "생분해성 지질"은 생체내 또는 생체외에서 생분해성이다. 아민 지질은 낮은 독성을 갖는다(예를 들어, 10 mg/kg 이상의 양으로 부작용 없이 동물 모델에서 허용됨). 일부 구현예에서, 아민 지질을 포함하는 지질 핵산 어셈블리는 아민 지질의 적어도 75%가 8, 10, 12, 24, 또는 48시간, 또는 3, 4, 5, 6, 7, 또는 10일 이내에 혈장 또는 조작된 세포로부터 제거되는 것을

포함한다. 일부 구현예에서, 아민 지질을 포함하는 지질 핵산 어셈블리는 핵산, 예를 들어, mRNA 또는 gRNA의 적어도 50%가 8, 10, 12, 24, 또는 48시간, 또는 3, 4, 5, 6, 7, 또는 10일 이내에 혈장으로부터 제거되는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 아민 지질을 포함하는 지질 핵산 어셈블리는 지질 핵산 어셈블리의 적어도 50%가 8, 10, 12, 24, 또는 48시간, 또는 3, 4, 5, 6, 7, 또는 10일 이내에 예를 들어 지질(예를 들어 아민 지질), 핵산, 예를 들어, RNA/mRNA, 또는 기타 성분을 측정함으로써 혈장으로부터 제거되는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리의 지질-캡슐화 대 유리 지질 지질, RNA, 또는 핵산 성분이 측정된다.

[0386] 생분해성 지질은 예를 들어 WO/2020/219876(예를 들어, pp. 13-33, 66-87), WO/2020/118041, WO/2020/072605(예를 들어, pp. 5-12, 21-29, 61-68, WO/2019/067992, WO/2017/173054, WO2015/095340, 및 WO2014/136086의 생분해성 지질을 포함하고, LNP는 본원에 기재된 LNP 조성물을 포함하고, 그의 지질과 조성물은 본원에 참고로 포함된다.

[0387] 지질 청소율은 문헌에 기술된 바와 같이 측정될 수 있다. Maier, M.A., 등 Biodegradable Lipids Enabling Rapidly Eliminated Lipid Nanoparticles for Systemic Delivery of RNAi Therapeutics. *Mol. Ther.* 2013, 21(8), 1570-78 ("Maier")을 참고한다. 예를 들어, Maier에서 루시퍼라제-표적화 siRNA를 함유하는 LNP-siRNA 시스템은 6 내지 8주령 수컷 C57Bl/6 마우스에 0.3 mg/kg으로 측면 꼬리 정맥을 통한 정맥내 볼루스 주사에 의해 투여하였다. 투여 후 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 및 168시간에 혈액, 간 및 비장 샘플을 수집하였다. 마우스는 조직 수집 전에 식염수로 관류되었고 혈액 샘플은 혈장을 얻기 위해 처리되었다. 모든 샘플은 LC-MS로 처리 및 분석되었다. 또한, Maier는 LNP-siRNA 제형 투여 후 독성을 평가하는 절차를 설명한다. 예를 들어, 수컷 스프라그-덜리(Sprague-Dawley) 래트에 5 mL/kg의 투여량으로 단일 정맥내 볼루스 주사를 통해 루시퍼라제-표적화 siRNA를 0, 1, 3, 5, 및 10 mg/kg(5마리 동물/그룹)으로 투여하였다. 24시간 후, 의식이 있는 동물의 경정맥으로부터 약 1 mL의 혈액을 채취하여, 혈청을 분리하였다. 투여 후 72시간에 모든 동물을 부검을 위해 안락사시켰다. 임상 징후, 체중, 혈청 화학, 기관 중량 및 조직병리학의 평가를 수행하였다. Maier가 siRNA-LNP 제형을 평가하는 방법을 설명하지만, 이러한 방법은 본 개시내용의 지질 핵산 어셈블리 조성물의 제거, 약동학 및 투여 독성을 평가하기 위해 적용될 수 있다.

[0388] 당업계에 공지된 핵산의 LNP 전달을 위한 이온화가능하고 생체이용가능한 지질이 적합하다. 지질은 함유된 매질의 pH에 따라 이온화될 수 있다. 예를 들어, 약산성 매질에서, 지질, 예컨대 아민 지질은 양성자화되어 양전하를 띌 수 있다. 반대로, 예컨대, 예를 들어, pH가 약 7.35인 혈액과 같은 약염기성 매질에서는 아민 지질과 같은 지질이 양성자화되지 않아 전하를 갖지 않을 수 있다.

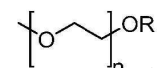
[0389] 전하를 보유하는 지질의 능력은 그의 고유 pKa와 관련이 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 아민 지질은 각각 독립적으로 약 5.1 내지 약 7.4 범위의 pKa를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 생체이용가능한 지질은 각각 독립적으로, 약 5.1 내지 약 7.4, 예컨대 약 5.5 내지 약 6.6, 약 5.6 내지 약 6.4, 약 5.8 내지 약 6.2, 또는 약 5.8 내지 약 6.5 범위의 pKa를 가질 수 있다. 예를 들어, 본 개시내용의 아민 지질은 각각, 독립적으로, 약 5.8 내지 약 6.5 범위의 pKa를 가질 수 있다. 약 5.1 내지 약 7.4 범위의 pKa를 갖는 지질은 생체내 카고의 예를 들어 간으로의 전달에 효과적이다. 또한, 약 5.3 내지 약 6.4 범위의 pKa를 갖는 지질은 예를 들어 종양에 생체내 전달에 효과적인 것으로 밝혀졌다. 예를 들어, WO2014/136086을 참고한다.

[0390] B. 추가의 지질

[0391] 본 개시내용의 지질 조성물에 사용하기에 적합한 "중성 지질"은 예를 들어 다양한 중성, 비하전 또는 쯔비터이온성 지질을 포함한다. 본 개시내용에 사용하기에 적합한 중성 인지질의 예는 5-헵타데실벤젠-1,3-디올(레조르시놀), 디팔미토일포스파티딜콜린(DPPC), 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC), 포스포콜린(DOPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 포스파티딜콜린(PLPC), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DAPC), 포스파티딜에탄올아민(PE), 난 포스파티딜콜린(EPC), 디라우릴로일포스파티딜콜린(DLPC), 디미리스토일포스파티딜콜린(DMPC), 1-미리스토일-2-팔미토일 포스파티딜콜린(MPPC), 1-팔미토일-2-미리스토일 포스파티딜콜린(PMPC), 1-팔미토일-2-스테아로일 포스파티딜콜린(PSPC), 1,2-디아라키도일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DBPC), 1-스테아로일-2-팔미토일 포스파티딜콜린(SPPC), 1,2-디에이코세노일-sn-글리세로-3-포스포콜린(DEPC), 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린(POPC), 리소포스파티딜 콜린, 디올레오일 포스파티딜에탄올아민(DOPE), 딜리놀레오일포스파티딜콜린 디스테아로일포스파티딜에탄올아민(DSPE), 디미리스토일 포스파티딜에탄올아민(DMPE), 디팔미토일 포스파티딜에탄올아민(DPPE), 팔미토일올레오일 포스파티딜에탄올아민(POPE), 리소포스파티딜에탄올아민 및 이들의 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 한 구현예에서, 중성 인지질은 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC) 및 디미리스토일 포스파티딜 에탄올아민(DMPE)로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 중성 인지

질은 디스테아로일포스파티딜콜린(DSPC)일 수 있다.

- [0392] "헬퍼 지질"은 스테로이드, 스테롤 및 알킬 레소르시놀을 포함한다. 본 개시내용에 사용하기에 적합한 헬퍼 지질은 콜레스테롤, 5-헵타데실레소르시놀 및 콜레스테롤 헤미숙시네이트를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 한 구현예에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤일 수 있다. 한 구현예에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤 헤미숙시네이트일 수 있다.
- [0393] "스텔스 지질"은 나노입자가 생체 내(예를 들어, 혈액 내)에 존재할 수 있는 시간 길이를 변경하는 지질이다. 스텔스 지질은 입자 응집을 줄이고 입자 크기를 조절함으로써 체형화 과정을 도울 수 있다. 본원에서 사용된 스텔스 지질은 지질 핵산 어셈블리의 약동학적 특성을 조절하거나 생체의 나노입자의 안정성을 도울 수 있다. 본 개시내용의 지질 조성물에 사용하기에 적합한 스텔스 지질은 지질 모이어티에 연결된 친수성 헤드 기를 갖는 스텔스 지질을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 본 개시내용의 지질 조성물에 사용하기에 적합한 스텔스 지질 및 이러한 지질의 생화학에 대한 정보는 Romberg 등, *Pharmaceutical Research*, Vol. 25, No. 1, 2008, pg. 55-71 및 Hoekstra 등, *Biochimica et Biophysica Acta* 1660(2004) 41-52에서 찾아볼 수 있다. 추가의 적합한 PEG 지질이 예를 들어, WO 2006/007712에 개시되어 있다.
- [0394] 한 구현예에서, 스텔스 지질의 친수성 헤드 기는 PEG 기반 폴리머로부터 선택되는 폴리머 모이어티를 포함한다. 스텔스 지질은 지질 모이어티를 포함한다. 일부 구현예에서, 스텔스 지질 PEG 지질이다.
- [0395] 한 구현예에서, 스텔스 지질은 PEG(때로는 폴리(에틸렌 옥시드)로 지칭됨)에 기반한 중합체, 폴리(옥사졸린), 폴리(비닐 알코올), 폴리(글리세롤), 폴리(N-비닐피롤리돈), 폴리아미노산 및 폴리[N-(2-히드록시프로필)메타크릴아미드]로부터 선택된 중합체 모이어티를 포함한다.
- [0396] 한 구현예에서, PEG 지질은 PEG(때로는 폴리(에틸렌 옥시드)로 지칭됨)에 기반한 중합체 모이어티를 포함한다.
- [0397] PEG 지질은 지질 모이어티를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 모이어티는 독립적으로 약 C4 내지 약 C40 포화 또는 불포화 탄소 원자를 포함하는 알킬 사슬 길이를 갖는 디알킬글리세롤 또는 디알킬글리카미드 기를 포함하는 것을 포함하는, 디아실글리세롤 또는 디아실글리카미드로부터 유래될 수 있으며, 여기서 사슬은 하나 이상의 작용기 예컨대, 예를 들어, 아미드 또는 에스테르를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 알킬 사슬 길이는 약 C10 내지 C20을 포함한다. 디알킬글리세롤 또는 디알킬글리카미드 기는 하나 이상의 치환된 알킬 기를 추가로 포함할 수 있다. 사슬 길이는 대칭 또는 비대칭일 수 있다.
- [0398] 달리 지시하지 않는 한, 용어 "PEG"는 본원에 사용된 바와 같이 임의의 폴리에틸렌 글리콜 또는 다른 폴리알킬렌 에테르 중합체를 의미한다. 한 구현예에서, PEG는 에틸렌 글리콜 또는 에틸렌 옥시드의 선택적으로 치환된 선형 또는 분지형 중합체이다. 한 구현예에서, PEG는 비치환된다. 한 구현예에서, PEG는 예를 들어, 하나 이상의 알킬, 알콕시, 아실, 히드록시, 또는 아릴 기에 의해 치환된다. 한 구현예에서, 용어는 PEG 공중합체 예컨대 PEG-폴리우레탄 또는 PEG-폴리프로필렌을 포함하며(예를 들어, J. Milton Harris, *Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications* (1992) 참고); 또 다른 구현예에서, 용어는 PEG 공중합체를 포함하지 않는다. 한 구현예에서, PEG는 약 130 내지 약 50,000, 하위-구현예에서, 약 150 내지 약 30,000, 하위-구현예에서, 약 150 내지 약 20,000, 하위-구현예에서 약 150 내지 약 15,000, 하위-구현예에서, 약 150 내지 약 10,000, 하위-구현예에서, 약 150 내지 약 6,000, 하위-구현예에서, 약 150 내지 약 5,000, 하위-구현예에서, 약 150 내지 약 4,000, 하위-구현예에서, 약 150 내지 약 3,000, 하위-구현예에서, 약 300 내지 약 3,000, 하위-구현예에서, 약 1,000 내지 약 3,000, 및 하위-구현예에서, 약 1,500 내지 약 2,500의 분자량을 갖는다.
- [0399] 일부 구현예에서, PEG(예를 들어, 지질 모이어티 또는 지질, 예컨대 스텔스 지질에 접합됨)는 "PEG-2K"("PEG 2000이라고도 함")이며, 약 2,000 달톤의 평균 분자량을 갖는다. PEG-2K는 본원에서 하기 화학식 IV로



나타내며, 여기서 n 은 45이고, 이는 수평균 중합도가 약 45개의 서브유닛 (I)을 포함함을 의미한다. 그러나, 예를 들어, 수평균 중합도가 약 23개의 서브유닛($n=23$) 및/또는 68개의 서브유닛($n=68$)을 포함하는 것을 포함하는 당업계에 공지된 다른 PEG 구현예가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, n 은 약 30 내지 약 60의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, n 은 약 35 내지 약 55의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, n 은 약 40 내지 약 50의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, n 은 약 42 내지 약 48의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, n 은 45일 수 있다. 일부 구현예에서, R은 H, 치환된 알킬, 및 비치환된 알킬로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서,

R은 비치환된 알킬일 수 있다. 일부 구현예에서, R은 메틸일 수 있다.

[0400] 본원에 기재된 임의의 구현예에서, PEG 지질은 PEG-디라우로일글리세롤, PEG-디미리스토일글리세롤(PEG-DMG)(카탈로그 번호 GM-020, NOF, Tokyo, Japan), PEG-디팔미토일글리세롤, PEG-디스테아로일글리세롤(PEG-DSPE)(카탈로그 번호 DSPE-020CN, NOF, Tokyo, Japan), PEG-디라우릴글리카미드, PEG-디미리스토일글리카미드, PEG-디팔미토일글리카미드, 및 PEG-디스테아로일글리카미드, PEG-콜레스테롤(1-[8'-(콜레스트-5-엔-3[베타]-옥시)카르복스아미도-3',6'-디옥사옥타닐]카르바모일-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌 글리콜), PEG-DMB(3,4-디테트라데코시벤질-[오메가]-메틸-폴리(에틸렌 글리콜)에테르), 1,2-디미리스토일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DMG)(카탈로그 번호 880150P, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA), 1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-포스포에탄올아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DSPE)(카탈로그 번호 880120C, Avanti Polar Lipids, Alabaster, Alabama, USA), 1,2-디스테아로일-sn-글리세롤, 메톡시폴리에틸렌 글리콜(PEG2k-DSG; GS-020, NOF Tokyo, Japan), 폴리(에틸렌 글리콜)-2000-디메타크릴레이트(PEG2k-DMA), 및 1,2-디스테아틸옥시프로필-3-아민-N-[메톡시(폴리에틸렌 글리콜)-2000](PEG2k-DSA)로부터 선택될 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-DMG일 수 있다. 일부 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-DSG일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-DSPE일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-DMA일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-C-DMA일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질은 WO2016/010840(단락 [00240]~[00244])에 개시된 화합물 S027일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-DSA일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-C11일 수 있다. 일부 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-C14일 수 있다. 일부 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-C16일 수 있다. 일부 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-C18일 수 있다.

[0401] C. 지질 핵산 어셈블리 조성물

[0402] 지질 핵산 어셈블리는 (i) 생분해성 지질, (ii) 선택적인 중성 지질, (iii) 헬퍼 지질, 및 (iv) 스텔스 지질, 예컨대 PEG 지질을 함유할 수 있다. 지질 핵산 어셈블리는 생분해성 지질 및 중성 지질, 헬퍼 지질, 및 스텔스 지질, 예컨대 PEG 지질 중 하나 이상을 함유할 수 있다.

[0403] 지질 핵산 어셈블리는 (i) 캡슐화 및 엔도솜 탈출을 위한 아민 지질, (ii) 안정화를 위한 중성 지질, (iii) 역시 안정화를 위한 헬퍼 지질, 및 (iv) 스텔스 지질, 예컨대 PEG 지질을 함유할 수 있다. 지질 핵산 어셈블리는 아민 지질 및 중성 지질, 또한 안정화를 위한 헬퍼 지질, 및 스텔스 지질, 예컨대 PEG 지질 중 하나 이상을 함유할 수 있다.

[0404] 지질 핵산 어셈블리 조성물은 핵산, 예를 들어, RNA, RNA-가이드 DNA-결합제, Cas 뉴클레아제 mRNA, 클래스 2 Cas 뉴클레아제 mRNA, Cas9 mRNA, 및 gRNA 중 하나 이상을 포함하는 성분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 클래스 2 Cas 뉴클레아제 및 RNA 성분으로서의 gRNA를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, n 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA 성분, 아민 지질, 헬퍼 지질, 중성 지질, 및 스텔스 지질을 포함할 수 있다. 특정 지질 핵산 어셈블리 조성물에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이다. 다른 조성물에서, 중성 지질은 DSPC이다. 추가의 구현예에서, 스텔스 지질은 PEG2k-DMG 또는 PEG2k-C11이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 A 또는 지질 A의 등가물; 헬퍼 지질; 중성 지질; 스텔스 지질; 및 RNA 예컨대 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 A 또는 지질 A의 등가물; 헬퍼 지질; 스텔스 지질; 및 RNA 예컨대 gRNA를 포함한다. 일부 조성물에서, 아민 지질은 지질 A이다. 일부 조성물에서, 아민 지질은 지질 A 또는 이의 아세탈 유사체이고; 헬퍼 지질은 콜레스테롤이고; 중성 지질은 DSPC이고; 스텔스 지질은 PEG2k-DMG이다.

[0405] 일부 구현예에서, 지질 조성은 제형 중 성분 지질의 각각의 몰 비율에 따라 기술된다. 본 개시내용의 구현예는 제형 중 성분 지질의 각각의 몰 비율에 따라 기술된 지질 조성물을 제공한다. 한 구현예에서, 아민 지질의 mol%는 약 30 mol% 내지 약 60 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 아민 지질의 mol%는 약 40 mol% 내지 약 60 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 아민 지질의 mol%는 약 45 mol% 내지 약 60 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 아민 지질의 mol%는 약 50 mol% 내지 약 60 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 아민 지질의 mol%는 약 55 mol% 내지 약 60 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 아민 지질의 mol%는 약 50 mol% 내지 약 55 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 아민 지질의 mol%는 약 50 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 아민 지질의 mol%는 약 55 mol%일 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 배치의 아민 지질 mol%는 표적 mol%의 $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, 또는 $\pm 2.5\%$ 일 것이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 배치의 아민 지질 mol%는 표적 mol%의 $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1.5\%$, $\pm 1\%$, $\pm 0.5\%$, 또는 $\pm 0.25\%$ 일 것이다. 모든 mol% 수치는 지질 핵산 어셈블리 조성물의 지질 성분의 분율로 주어진다. 일부 구현예에서, 아민 지질 mol%의

지질 핵산 어셈블리 로트간 변동율은 15% 미만, 10% 또는 5% 미만일 것이다.

[0406] 한 구현예에서, 중성 지질의 mol%는 약 5 mol% 내지 약 15 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 중성 지질의 mol%는 약 7 mol% 내지 약 12 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 중성 지질의 mol%는 약 9 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 배치의 중성 지질 mol%는 표적 중성 지질 mol%의 $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, 또는 $\pm 2.5\%$ 일 것이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 로트간 변동율은 15% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만일 것이다.

[0407] 한 구현예에서, 헬퍼 지질의 mol%는 약 20 mol% 내지 약 60 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 헬퍼 지질의 mol%는 약 25 mol% 내지 약 55 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 헬퍼 지질의 mol%는 약 25 mol% 내지 약 50 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 헬퍼 지질의 mol%는 약 25 mol% 내지 약 40 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 헬퍼 지질의 mol%는 약 30 mol% 내지 약 50 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 헬퍼 지질의 mol%는 약 30 mol% 내지 약 40 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, 헬퍼 지질의 mol%는 아민 지질, 중성 지질, 및 PEG 지질 농도를 기준으로 조정하여 지질 성분을 100 mol%로 만든다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 배치의 헬퍼 mol%는 표적 mol%의 $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, 또는 $\pm 2.5\%$ 일 것이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 로트간 변동율은 15% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만일 것이다.

[0408] 한 구현예에서, PEG 지질의 mol%는 약 1 mol% 내지 약 10 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질의 mol%는 약 2 mol% 내지 약 10 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질의 mol%는 약 1 mol% 내지 약 3 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질의 mol%는 약 2 mol% 내지 약 4 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질의 mol%는 약 1.5 mol% 내지 약 2 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질의 mol%는 약 2.5 mol% 내지 약 4 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질의 mol%는 약 3 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질의 mol%는 약 2.5 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질의 mol%는 약 2 mol%일 수 있다. 한 구현예에서, PEG 지질의 mol%는 약 1.5 mol%일 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 배치의 PEG 지질 mol%는 표적 PEG 지질 mol%의 $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, 또는 $\pm 2.5\%$ 일 것이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물, 예를 들어 LNP 조성물, 로트간 변동율은 15% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만일 것이다.

[0409] 본 개시내용의 구현예는 제형 중 성분 지질의 각각의 몰비에 따라 기재된, LNP 조성물, 예를 들어, 이온화가능한 지질(예를 들어, 지질 A 또는 이의 유사체 중 하나), 헬퍼 지질, 헬퍼 지질, 및 PEG 지질을 포함하는 LNP 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 이온화가능한 지질의 양은 약 25 mol% 내지 약 45 mol%이고; 중성 지질의 양은 약 10 mol% 내지 약 30 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 약 25 mol% 내지 약 65 mol%이고; PEG 지질의 양은 약 1.5 mol% 내지 약 3.5 mol%이다. 특정 구현예에서, 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 29-44 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 11-28 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 28-55 mol%이고; PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 2.3-3.5 mol%이다. 특정 구현예에서, 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 29-38 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 11-20 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 43-55 mol%이고; PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 2.3-2.7 mol%이다. 특정 구현예에서, 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 25-34 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10-20 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 45-65 mol%이고; PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 2.5-3.5 mol%이다. 특정 구현예에서, 이온화가능한 지질은 지질 성분의 약 30-43 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10-17 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 43.5-56 mol%이고; PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1.5-3 mol%이다. 특정 구현예에서, 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 33 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 15 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 49 mol%이고; PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 3 mol%이다. 특정 구현예에서, 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 32.9 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 15.2 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 49.2 mol%이고; PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 2.7 mol%이다.

[0410] 특정 구현예에서, 이온화가능한 지질(예를 들어, 지질 A 또는 이의 유사체 중 하나)의 양은 약 20-50 mol%, 약 25-34 mol%, 약 25-38 mol%, 약 25-45 mol%, 약 29-38 mol%, 약 29-43 mol%, 약 29-34 mol%, 약 30-34 mol%, 약 30-38 mol%, 약 30-43 mol%, 약 30-43 mol%, 또는 약 33 mol%이다. 특정 구현예에서, 중성 지질의 양은 약 10-30 mol%, 약 11-30 mol%, 약 11-20 mol%, 약 13-17 mol%, 또는 약 15 mol%이다. 특정 구현예에서, 헬퍼 지질의 양은 약 35-50 mol%, 약 35-65 mol%, 약 35-55 mol%, 약 38-50 mol%, 약 38-55 mol%, 약 38-65 mol%, 약 40-50 mol%, 약 40-65 mol%, 약 43-65 mol%, 약 43-55 mol%, 또는 약 49 mol%이다. 특정 구현예에서, PEG 지질의 양은 약 1.5-3.5 mol%, 약 2.0-2.7 mol%, 약 2.0-3.5 mol%, 약 2.3-3.5 mol%, 약 2.3-2.7 mol%, 약 2.5-3.5 mol%, 약 2.5-2.7 mol%, 약 2.9-3.5 mol%, 또는 약 2.7 mol%이다.

- [0411] 본 개시내용의 다른 구현예는 제형 중 성분 지질의 각각의 몰비에 따라 기재된, LNP 조성물, 예를 들어, 이온화 가능한 지질(예를 들어, 지질 D 또는 이의 유사체 중 하나), 헬퍼 지질, 헬퍼 지질, 및 PEG 지질을 포함하는 LNP 조성물을 제공한다. 특정 구현예에서, 이온화 가능한 지질의 양은 약 25 mol% 내지 약 50 mol%이고; 중성 지질의 양은 약 7 mol% 내지 약 25 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 약 39 mol% 내지 약 65 mol%이고; PEG 지질의 양은 약 0.5 mol% 내지 1.8 mol%이다. 특정 구현예에서, 이온화 가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 27-40 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10-20 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 50-60 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 0.9-1.6 mol%이다. 특정 구현예에서, 이온화 가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 30-45 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10-15 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 39-59 mol%이고; PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1-1.5 mol%이다. 특정 구현예에서, 이온화 가능한 지질은 지질 성분의 약 30 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 59 mol%이고; PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1-1.5 mol%이다. 특정 구현예에서, 이온화 가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 40 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 15 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 43.5 mol%이고; PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1.5 mol%이다. 특정 구현예에서, 이온화 가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 50 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 39 mol%이고; PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1 mol%이다.
- [0412] 특정 구현예에서, 이온화 가능한 지질(예를 들어, 지질 D 또는 이의 유사체 중 하나)의 양은 약 20-55 mol%, 약 20-45 mol%, 약 20-40 mol%, 약 27-40 mol%, 약 27-45 mol%, 약 27-55 mol%, 약 30-40 mol%, 약 30-45 mol%, 약 30-55 mol%, 약 30 mol%, 약 40 mol%, 또는 약 50 mol%이다. 특정 구현예에서, 중성 지질의 양은 약 7-25 mol%, 약 10-25 mol%, 약 10-20 mol%, 약 15-20 mol%, 약 8-15 mol%, 약 10-15 mol%, 약 10 mol%, 또는 약 15 mol%이다. 특정 구현예에서, 헬퍼 지질의 양은 약 39-65 mol%, 약 39-59 mol%, 약 40-60 mol%, 약 40-65 mol%, 약 40-59 mol%, 약 43-65 mol%, 약 43-60 mol%, 약 43-59 mol%, 또는 약 50-65 mol%, 약 50-59 mol%, 약 59 mol%, 또는 약 43.5 mol%이다. 특정 구현예에서, PEG 지질의 양은 약 0.5-1.8 mol%, 약 0.8-1.6 mol%, 약 0.8-1.5 mol%, 0.9-1.8 mol%, 약 0.9-1.6 mol%, 약 0.9-1.5 mol%, 1-1.8 mol%, 약 1-1.6 mol%, 약 1-1.5 mol%, 약 1 mol%, 또는 약 1.5 mol%이다.
- [0413] 일부 구현예에서, 카고는 RNA-가이드 DNA-결합체(예를 들어 Cas 뉴클레아제, 클래스 2 Cas 뉴클레아제, 또는 Cas9)를 암호화하는 mRNA, 또는 gRNA 또는 gRNA를 암호화하는 핵산, 또는 mRNA와 gRNA의 조합을 포함한다. 한 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 A 또는 그의 등가물, 또는 W02020219876에 제공된 바와 같은 아민 지질; 또는 W02020/072605에 제공된 지질 D 또는 아민 지질을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 아민 지질은 지질 A, 또는 지질 D이다. 일부 양태에서, 아민 지질은 지질 A 등가물, 예를 들어 지질 A의 유사체, 또는 W02020/219876에 제공된 아민 지질이다. 특정 양태에서, 아민 지질은 지질 A의 아세탈 유사체, 선택적으로, W02020/219876에 제공된 아민 지질이다. 일부 양태에서, 아민 지질은 지질 D 또는 W020072605에서 발견되는 아민 지질이다. 다양한 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 아민 지질, 중성 지질, 헬퍼 지질, 및 PEG 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이다. 일부 구현예에서, 중성 지질은 DSPC이다. 특정 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-DMG이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 A, 헬퍼 지질, 중성 지질, 및 PEG 지질을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 아민 지질, DSPC, 콜레스테롤, 및 PEG 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 DMG를 포함하는 PEG 지질을 포함한다. 일부 구현예에서, 아민 지질은 지질 A, 및 지질 A의 아세탈 유사체, 또는 W02020/219876에 제공된 아민 지질을 포함하는 지질 A의 등가물; 또는 지질 D 또는 W02020/072605에 제공된 아민 지질로부터 선택된다. 추가의 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 A, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG를 포함한다. 추가의 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 D, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG를 포함한다.
- [0414] 본 개시내용의 구현예는 또한 아민 지질의 양전하 아민기(N)와 캡슐화된 핵산의 음전하 포스페이트기(P) 사이의 몰비에 따라 기재된 지질 조성물을 제공한다. 이것은 방정식 N/P로 수학적으로 표현될 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 아민 지질, 헬퍼 지질, 중성 지질, 및 헬퍼 지질을 포함하는 지질 성분; 및 핵산 성분을 포함할 수 있으며, 여기서 N/P 비율은 약 3 내지 10이다. 일부 구현예에서, LNP는 약 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 또는 6.5의 RNA/DNA 포스페이트(N:P)에 대한 아민 지질의 몰비율을 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 아민 지질, 헬퍼 지질, 중성 지질, 및 헬퍼 지질을 포함하는 지질 성분; 및 RNA 성분을 포함할 수 있으며, 여기서 N/P 비율은 약 3 내지 10이다. 한 구현예에서, N/P 비율은 약 5-7일 수 있다. 한 구

현예에서, N/P 비율은 약 4.5-8일 수 있다. 한 구현예에서, N/P 비율은 약 6일 수 있다. 한 구현예에서, N/P 비율은 may be 6 ± 1 일 수 있다. 한 구현예에서, N/P 비율은 약 6 ± 0.5 일 수 있다. 일부 구현예에서, N/P 비율은 표적 N/P 비율의 $\pm 30\%$, $\pm 25\%$, $\pm 20\%$, $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 5\%$, 또는 $\pm 2.5\%$ 일 것이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 로트간 변동율은 15% 미만, 10% 미만 또는 5% 미만일 것이다.

[0415] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리는 mRNA, 예컨대 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA를 포함할 수 있는 RNA 성분을 포함한다. 한 구현예에서, RNA 성분은 Cas9 mRNA를 포함할 수 있다. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA를 포함하는 일부 조성물에서, 지질 핵산 어셈블리는 gRNA 핵산, 예컨대 gRNA를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 성분은 Cas 뉴클레아제 mRNA 및 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, RNA 성분은 클래스 2 Cas 뉴클레아제 mRNA 및 gRNA를 포함한다.

[0416] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 Cas 뉴클레아제, 예컨대 클래스 2 Cas 뉴클레아제, 아민 지질, 헬퍼 지질, 중성 지질, 및 PEG 지질을 암호화하는 mRNA를 포함할 수 있다. Cas 뉴클레아제, 예컨대 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA를 포함하는 특정 지질 핵산 어셈블리 조성물에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이다. Cas 뉴클레아제, 예컨대 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA를 포함하는 다른 조성물에서, 중성 지질은 DSPC이다. Cas 뉴클레아제, 예컨대 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA를 포함하는 추가의 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-DMG 또는 PEG2k-C11이다. Cas 뉴클레아제, 예컨대 클래스 2 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA를 포함하는 특정 조성물에서, 아민 지질은 지질 A 및 그의 등가물, 예컨대 지질 A의 아세탈 유사체, 또는 WO2020/219876에 제공된 아민 지질; 또는 지질 D 및 WO2020/072605에 제공된 아민 지질로부터 선택된다.

[0417] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 gRNA를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 아민 지질, gRNA, 헬퍼 지질, 중성 지질, 및 PEG 지질을 포함할 수 있다. gRNA를 포함하는 특정 지질 핵산 어셈블리 조성물에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이다. gRNA를 포함하는 일부 조성물에서, 중성 지질은 DSPC이다. gRNA를 포함하는 추가의 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-DMG 또는 PEG2k-C11이다. 일부 구현예에서, 아민 지질은 지질 A 및 그의 등가물, 예컨대 지질 A의 아세탈 유사체, 또는 WO2020/219876에 제공된 아민 지질 및 그의 등가물; 또는 지질 D 및 WO2020/072605에 제공된 아민 지질 및 그의 등가물로부터 선택된다.

[0418] 한 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 sgRNA를 포함할 수 있다. 한 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 Cas9 sgRNA를 포함할 수 있다. 한 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 Cpf1 sgRNA를 포함할 수 있다. sgRNA를 포함하는 일부 조성물에서, 지질 핵산 어셈블리는 아민 지질, 헬퍼 지질, 중성 지질, 및 PEG 지질을 포함한다. sgRNA를 포함하는 특정 조성물에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이다. sgRNA를 포함하는 다른 조성물에서, 중성 지질은 DSPC이다. sgRNA를 포함하는 추가의 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-DMG 또는 PEG2k-C11이다. 일부 구현예에서, 아민 지질은 지질 A 및 그의 등가물, 예컨대 지질 A의 아세탈 유사체, 또는 WO2020/219876에 제공된 아민 지질; 또는 지질 D 및 WO2020/072605에 제공된 아민 지질로부터 선택된다.

[0419] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 sgRNA일 수 있는 gRNA를 포함한다. 한 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 아민 지질, Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA, gRNA, 헬퍼 지질, 중성 지질, 및 PEG 지질을 포함할 수 있다. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 gRNA를 포함하는 특정 조성물에서, 헬퍼 지질은 콜레스테롤이다. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 gRNA를 포함하는 일부 조성물에서, 중성 지질은 DSPC이다. Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 gRNA를 포함하는 추가의 구현예에서, PEG 지질은 PEG2k-DMG 또는 PEG2k-C11이다. 일부 구현예에서, 아민 지질은 지질 A 및 그의 등가물, 예컨대 지질 A의 아세탈 유사체, 또는 WO2020/219876에 제공된 아민 지질; 또는 지질 D 및 WO2020/072605에 제공된 아민 지질로부터 선택된다.

[0420] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 Cas 뉴클레아제 mRNA, 예컨대 클래스 2 Cas mRNA 및 적어도 하나의 gRNA를 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 약 25:1 내지 약 1:25 wt/wt의, gRNA 대 Cas 뉴클레아제 mRNA, 예컨대 클래스 2 Cas 뉴클레아제 mRNA의 비율을 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 제형은 약 10:1 내지 약 1:10의, gRNA 대 Cas 뉴클레아제 mRNA, 예컨대 클래스 2 Cas 뉴클레아제 mRNA의 비율을 포함한다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 제형은 약 8:1 내지 약 1:8의, gRNA 대 Cas 뉴클레아제 mRNA, 예컨대 클래스 2 Cas 뉴클레아제 mRNA의 비율을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 비율은 중량 기준이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 제형은 약 5:1 내지 약 1:5의, gRNA 대 Cas 뉴클레아제 mRNA, 예컨대 클래스 2 Cas mRNA의 비율을 포함한다. 일부 구현예에서, 비율 범위는 약 3:1 내지 1:3, 약 2:1 내지 1:2, 약 5:1 내지 1:2, 약 5:1 내지 1:1, 약 3:1 내지 1:2, 약 3:1 내지 1:1, 약 3:1, 약 2:1 내지 1:1이다. 일부 구현예에서, gRNA 대 mRNA 비율은 약 3:1 또는 약 2:1이다. 일부 구현예에서 gRNA 대 Cas 뉴클레아제

mRNA, 예컨대 클래스 2 Cas 뉴클레아제의 비율은 약 1:1이다. 일부 구현예에서 gRNA 대 Cas 뉴클레아제 mRNA, 예컨대 클래스 2 Cas 뉴클레아제의 비율은 약 1:2이다. 비율은 약 25:1, 10:1, 5:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 또는 1:25일 수 있다.

[0421] 본원에 개시된 지질 핵산 어셈블리 조성물은 주형 핵산을 포함할 수 있다. 주형 핵산은 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA, 예컨대 클래스 2 Cas 뉴클레아제 mRNA와 공동-제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 핵산은 가이드 RNA와 공동-제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 핵산은 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 및 가이드 RNA 둘다와 공동-제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 핵산은 Cas 뉴클레아제를 암호화하는 mRNA 또는 가이드 RNA와 별도로 제형화될 수 있다. 주형 핵산은 지질 핵산 어셈블리 조성물과 함께 또는 별도로 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 핵산은 원하는 복구 메커니즘에 따라 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 주형은 표적 DNA, 또는 표적 DNA에 인접한 서열에 대한 상동성 영역을 가질 수 있다.

[0422] 일부 구현예에서, RNA 수용액을 유기 용매-기반 지질 용액, 예를 들어 100% 에탄올과 혼합함으로써 지질 핵산 어셈블리가 형성된다. 적합한 용액 또는 용매는 물, PBS, 트리스 완충액, NaCl, 시트레이트 완충액, 에탄올, 클로로포름, 디에틸에테르, 사이클로헥산, 테트라히드로푸란, 메탄올, 이소프로판올을 포함하거나 함유할 수 있다. 예를 들어, 지질 핵산 어셈블리의 생체내 투여를 위해, 약제학적으로 허용가능한 완충액이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리를 포함하는 조성물의 pH를 pH 6.5 이상으로 유지하기 위해 완충액이 사용된다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리를 포함하는 조성물의 pH를 pH 7.0 이상으로 유지하기 위해 완충액이 사용된다. 일부 구현예에서, 조성물은 약 7.2 내지 약 7.7 범위의 pH를 갖는다. 추가의 구현예에서, 조성물은 약 7.3 내지 약 7.7 또는 약 7.4 내지 약 7.6 범위의 pH를 갖는다. 추가의 구현예에서, 조성물은 약 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 또는 7.7 범위의 pH를 갖는다. 조성물의 pH는 마이크로 pH 프로브로 측정될 수 있다. 일부 구현예에서, 동결보호제가 조성물에 포함된다. 동결보호제의 비제한적인 예는 수크로스, 트레할로스, 글리세롤, DMSO 및 에틸렌 글리콜을 포함한다. 예시적인 조성물은 최대 10% 동결보호제, 예컨대, 예를 들어, 수크로스를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10% 동결보호제를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10% 수크로스를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 완충액을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 완충액은 포스페이트 완충액(PBS), Tris 완충액, 시트레이트 완충액, 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 일부 예시적인 구현예에서, 완충액은 NaCl을 포함한다. 일부 구현예에서, NaCl은 생략된다. NaCl의 예시적인 양은 약 20 mM 내지 약 45 mM의 범위일 수 있다. NaCl의 예시적인 양은 약 40 mM 내지 약 50 mM의 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, NaCl의 양은 약 45 mM이다. 일부 구현예에서, 완충액은 Tris 완충액이다. Tris의 예시적인 양은 약 20 mM 내지 약 60 mM 범위일 수 있다. Tris의 예시적인 양은 약 40 mM 내지 약 60 mM 범위일 수 있다. 일부 구현예에서, Tris의 예시적인 양은 약 50 mM이다. 일부 구현예에서, 완충액은 NaCl 및 Tris를 포함한다. 지질 핵산 어셈블리 조성물의 특정 예시적인 구현예는 Tris 완충액에 5% 수크로스 및 45 mM NaCl을 함유한다. 다른 예시적인 구현예에서, 조성물은 pH 7.5에서 약 5% w/v, 약 45 mM NaCl, 및 약 50 mM Tris의 양으로 수크로스를 함유한다. 염, 완충액, 및 동결보호제 양은 전체 제형의 삼투질농도가 유지되도록 다양할 수 있다. 예를 들어, 최종 삼투질농도는 450 mOsm/L 미만으로 유지될 수 있다. 추가의 구현예에서, 삼투질농도는 350 내지 250 mOsm/L이다. 특정 구현예는 300 +/- 20 mOsm/L의 최종 삼투질농도를 갖는다.

[0423] 일부 구현예에서, 미세유체 혼합, T-혼합 또는 교차 혼합이 사용된다. 특정 양태에서, 유속, 접합부 크기, 접합부 기하학, 접합부 모양, 튜브 직경, 용액 및/또는 RNA 및 지질 농도는 다양할 수 있다. 지질 핵산 어셈블리 또는 지질 핵산 어셈블리 조성물은 예를 들어, 투석, 접선 흐름 여과, 또는 크로마토그래피를 통해 농축되거나 정제될 수 있다. 지질 핵산 어셈블리는 예를 들어 현탁액, 에멀전 또는 동결건조 분말로 저장될 수 있다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 2~8℃에서 저장된다, 특정 양태에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 실온에서 저장된다. 추가의 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 예를 들어 -20℃ 또는 -80℃에서 냉동 보관된다. 다른 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 약 0℃ 내지 약 -80℃ 범위의 온도에서 저장된다. 냉동된 지질 핵산 어셈블리 조성물은 사용 전에 예를 들어 얼음 위에서, 4℃, 실온 또는 25℃에서 해동될 수 있다. 냉동된 지질 핵산 어셈블리 조성물은 다양한 온도에서, 예를 들어 얼음위, 4℃에서, 실온에서, 25℃에서, 또는 37℃에서 유지될 수 있다.

[0424] 일부 구현예에서, LNP 조성물 중 LNP의 농도는 약 1~10 ug/mL, 약 2~10 ug/mL, 약 2.5~10 ug/mL, 약 1~5 ug/mL, 약 2~5 ug/mL, 약 2.5~5 ug/mL, 약 0.04 ug/mL, 약 0.08 ug/mL, 약 0.16 ug/mL, 약 0.25 ug/mL, 약 0.63 ug/mL, 약 1.25 ug/mL, 약 2.5 ug/mL, 또는 약 5 ug/mL이다.

- [0425] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 스텔스 지질을 포함하며, 선택적으로 여기서:
- [0426] (i) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A 또는 지질 D, 약 8~10 mol% 중성 지질; 및 약 2.5~4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6이거나;
- [0427] (ii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 약 50~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A 또는 지질 D; 약 27~39.5 mol% 헬퍼 지질; 약 8~10 mol% 중성 지질; 및 약 2.5~4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 5~7(예를 들어, 약 6)이거나;
- [0428] (iii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A 또는 지질 D; 약 5~15 mol% 중성 지질; 및 약 2.5~4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3~10이거나;
- [0429] (iv) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 40~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A 또는 지질 D; 약 5~15 mol% 중성 지질; 및 약 2.5~4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6이거나;
- [0430] (v) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A 또는 지질 D; 약 5~15 mol% 중성 지질; 및 약 1.5~10 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6이거나;
- [0431] (vi) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 40~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A 또는 지질 D; 약 0~10 mol% 중성 지질; 및 약 1.5~10 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3~10이거나;
- [0432] (vii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 40~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A 또는 지질 D; 약 1 mol% 미만 중성 지질; 및 약 1.5~10 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3~10이거나;
- [0433] (viii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 40~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A 또는 지질 D; 및 약 1.5~10 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3~10이며, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물은 중성 인지질이 본질적으로 없거나 없거나; 또는
- [0434] (ix) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A 또는 지질 D; 약 8~10 mol% 중성 지질; 및 약 2.5~4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3~7이다.
- [0435] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A 또는 지질 D; 약 9 mol% 중성 지질 예컨대 DSPC; 약 3 mol%의 스텔스 지질 예컨대 PEG 지질, 예컨대 PEG2k-DMG를 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질, 예컨대 콜레스테롤이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6이다.
- [0436] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50 mol% 지질 A; 약 9 mol% DSPC; 약 3 mol%의 PEG2k-DMG를 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 콜레스테롤이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6이다.
- [0437] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 35 mol% 지질 A; 약 15 mol% 중성 지질; 약 47.5 mol% 헬퍼 지질; 및 약 2.5 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 콜레스테롤이고, 여기서 LNP 조성물의 N/P 비율은 약 3~7이다.
- [0438] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 35 mol% 지질 A; 약 15 mol% 중성 지질; 약 35 mol% 지질 D; 약 15 mol% 중성 지질; 약 47.5 mol% 헬퍼 지질; 및 약 2.5 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 콜레스테롤이고, 여기서 LNP 조성물의 N/P 비율은 약 3~7이다.
- [0439] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 25~45 mol% 아민 지질,

예컨대 지질 A; 약 10~30 mol% 중성 지질; 약 25~65 mol% 헬퍼 지질; 및 약 1.5~3.5 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 LNP 조성물의 N/P 비율은 약 3~7이다.

[0440] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 여기서:

[0441] a. 아민 지질의 양은 지질 성분의 약 29~44 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 11~28 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 28~55 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 2.3~3.5 mol%이거나;

[0442] b. 아민 지질의 양은 지질 성분의 약 29~38 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 11~20 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 43~55 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 2.3~2.7 mol%이거나;

[0443] c. 아민 지질의 양은 지질 성분의 약 25~34 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10~20 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 45~65 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 2.5~3.5 mol%이거나; 또는

[0444] d. 아민 지질의 양은 지질 성분의 약 30~43 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10~17 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 43.5~56 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1.5~3 mol%이다.

[0445] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 25~50 mol% 아민 지질, 예컨대 지질 D; 약 7~25 mol% 중성 지질; 약 39~65 mol% 헬퍼 지질; 및 약 0.5~1.8 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 LNP 조성물의 N/P 비율은 약 3~7이다.

[0446] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 여기서 아민 지질의 양은 지질 성분의 약 30~45 mol%이거나; 또는 지질 성분의 약 30~40 mol%이거나; 선택적으로 지질 성분의 약 30 mol%, 40 mol%, 또는 50 mol%이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 여기서 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10~20 mol%이거나; 또는 지질 성분의 약 10~15 mol%이거나; 선택적으로 지질 성분의 약 10 mol% 또는 15 mol%이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 여기서 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 50~60 mol%이거나; 지질 성분의 약 39~59 mol%이거나; 또는 지질 성분의 약 43.5~59 mol%이거나; 선택적으로 지질 성분의 약 59 mol%이거나; 지질 성분의 약 43.5 mol% 이거나; 또는 지질 성분의 약 39 mol%이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 여기서 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 0.9~1.6 mol%이거나; 또는 지질 성분의 약 1~1.5 mol%이거나; 선택적으로 지질 성분의 약 1 mol%이거나, 또는 지질 성분의 약 1.5 mol%이다.

[0447] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 여기서:

[0448] a. 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 27~40 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10~20 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 50~60 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 0.9~1.6 mol%이거나;

[0449] b. 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 30~45 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10~15 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 39~59 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1~1.5 mol%이거나;

[0450] c. 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 30 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 59 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1~1.5 mol%이거나;

[0451] d. 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 40 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 15 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 43.5 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1.5 mol%이거나; 또는

[0452] e. 이온화가능한 지질의 양은 지질 성분의 약 50 mol%이고; 중성 지질의 양은 지질 성분의 약 10 mol%이고; 헬퍼 지질의 양은 지질 성분의 약 39 mol%이고; 및 PEG 지질의 양은 지질 성분의 약 1 mol%이다.

[0453] 일부 구현예에서, LNP는 약 1~250 nm, 10~200 nm, 약 20~150 nm, 약 50~150 nm, 약 50~100 nm, 약 50~120 nm, 약 60~100 nm, 약 75~150 nm, 약 75~120 nm, 또는 약 75~100 nm의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP는 100 nm 미만의 직경을 갖는다. 일부 구현예에서, LNP 조성물은 약 10~200 nm, 약 20~150 nm, 약 50~150 nm, 약 50~100 nm, 약 50~120 nm, 약 60~100 nm, 약 75~150 nm, 약 75~120 nm, 또는 약 75~100 nm의 평균 직경을 갖는 LNP의 개체군을 포함한다. 일부 구현예에서, LNP는 100 nm 미만의 평균 직경을 갖는다.

[0454] 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은: 약 40~60 mol-% 아민 지질; 약 5~15 mol-% 중성 지질; 및 약 1.5~10 mol-% PEG 지질을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 LNP 조성물의 N/P 비율은 약 3~10이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은: 약 50~60 mol-% 아민 지질; 약 8~10 mol-%

중성 지질; 및 약 2.5~4 mol-% PEG 지질을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 LNP 조성물의 N/P 비율은 약 3~8이다. 일부 구현예에서, 지질 핵산 어셈블리 조성물은: 약 50~60 mol-% 아민 지질; 약 5~15 mol-% DSPC; 및 약 2.5~4 mol-% PEG 지질을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 콜레스테롤이고, 여기서 LNP 조성물의 N/P 비율은 3~8 $\pm$ 0.2이다.

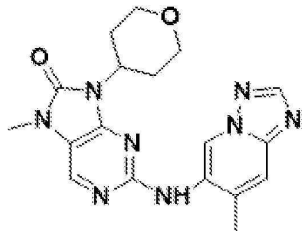
[0455] 구현예들에서, 평균 직경은 Z-평균 직경이다. 특정 구현예에서, Z-평균 직경은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 동적 광 산란(DLS)에 의해 측정된다. 예를 들어, 평균 입자 크기 및 다분산도는 Malvern Zetasizer DLS 기기를 사용하여 동적 광 산란(DLS)으로 측정할 수 있다. LNP 샘플은 DLS에 의해 측정되기 전에 PBS 완충액으로 희석된다. Z-평균 직경 및 다분산도(pdi)에 따른 수평균 직경이 측정될 수 있다. Z 평균은 입자의 앙상블 컬렉션의 강도 가중 평균 유체역학적 크기이다. 수 평균은 입자의 앙상블 컬렉션의 입자 수 가중 평균 유체역학적 크기이다. Malvern Zetasizer 장비는 또한 당업계에 공지된 방법을 사용하여 LNP의 제타 전위를 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0456] D. DNA-의존성 단백질 키나제 억제제

[0457] DNA-의존성 단백질 키나제(DNA-PK)는 DNA 이중 가닥 파단 복구 기구에서 필수적인 것으로 밝혀진 핵 세린/트레오닌 키나제이다. 포유동물에서, 이중 가닥 DNA 파단을 복구하기 위한 주요 경로는 비-상동성 말단 결합(NHEJ) 경로로서, 이는 세포 주기의 단계와 관계없이 기능적이며, 이중 가닥 파단의 비-결찰 단부 및 결찰 단부를 제거하는 역할을 한다. DNA-PK 억제제(DNA-PKi)는 DNA-PK, 및 NHEJ 경로의 구조적으로 다양한 종류의 억제제이다. 예시적인 DNA-PKi는 예를 들어, WO03024949, WO2014159690A1, 및 WO2018114999에 제공된다.

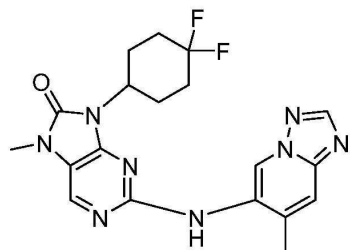
[0458] DNA-의존성 단백질 키나제(DNA-PK)는 DNA 이중 가닥 파단 복구 기구에서 필수적인 것으로 밝혀진 핵 세린/트레오닌 키나제이다. 포유동물에서, 이중 가닥 DNA 파단을 복구하기 위한 주요 경로는 비-상동성 말단 결합(NHEJ) 경로로서, 이는 세포 주기의 단계와 관계없이 기능적이며, 이중 가닥 파단의 비-결찰 단부 및 결찰 단부를 제거하는 역할을 한다. DNA-PK 억제제(DNA-PKi)는 DNA-PK, 및 NHEJ 경로의 구조적으로 다양한 종류의 억제제이다. 예시적인 DNA-PKi는 예를 들어, WO03024949, WO2014159690A1, 및 WO2018114999에 제공된다.

[0459] 바람직한 구현예에서, 본 개시내용은 하기 DNAPKI 화합물 1에 관한 것이다:



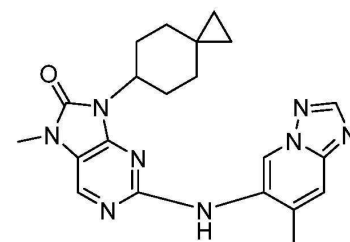
[0460]

[0461] 바람직한 구현예에서, 본 개시내용은 하기 DNAPKI 화합물 3에 관한 것이다:



[0462]

[0463] 바람직한 구현예에서, 본 개시내용은 하기 DNAPKI 화합물 4에 관한 것이다:



[0464]

[0465] 특정 구현예에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 임의의 조성물에 관한 것이며, 여기서 조성물 중 DNAPKI의 농도는 약 1 μM 이하, 예를 들어, 약 0.25 μM 이하, 예컨대 약 0.1~1 μM , 바람직하게는 약 0.1~0.5 μM 이다.

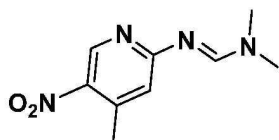
[0466] 일부 구현예에서, DNAPKI는 참고로 포함된 WO2018114999에 제시된 방법에 따라 형성된다.

[0467] 예시적인 DNA-PKi는 화합물 1, 화합물 3 및 화합물 4를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, DNAPKi는 화합물 1이다. 일부 구현예에서, DNAPKi는 화합물 3이다. 일부 구현예에서, DNAPKi는 화합물 4이다.

[0468] 1. DNA-의존성 단백질 키나제 억제제의 합성

[0469] a) 화합물 1

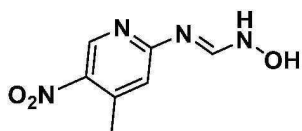
[0470] 중간체 1a: (E)-N,N-디메틸-N'-(4-메틸-5-니트로피리딘-2-일)포름이미드아미드



[0471]

[0472] 톨루엔(0.3 M) 중 4-메틸-5-니트로-피리딘-2-아민(5 g, 1.0당량)의 용액에 DMF-DMA(3.0당량)를 첨가하였다. 혼합물을 110℃에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압하에 농축하여 잔류물을 수득하고, 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 황색 고체로 수득하였다(59%). ^1H NMR(400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.82(s, 1H), 8.63(s, 1H), 6.74(s, 1H), 3.21(m, 6H).

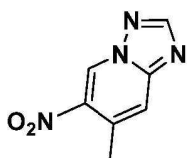
[0473] 중간체 1b: (E)-N-히드록시-N'-(4-메틸-5-니트로피리딘-2-일)포름이미드아미드



[0474]

[0475] MeOH(0.2 M) 중 중간체 1a(4 g, 1.0당량)의 용액에 $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (2.0당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 80℃에서 1시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 여과액을 감압하에 농축하여 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 H_2O 와 EtOAc 사이에 분배한 후, EtOAc로 2회 추출하였다. 유기상을 감압하에 농축하여 잔류물을 얻고, 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 백색 고체로 얻었다(66%). ^1H NMR(400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 10.52(d, J = 3.8 Hz, 1H), 10.08(dd, J = 9.9, 3.7 Hz, 1H), 8.84(d, J = 3.8 Hz, 1H), 7.85(dd, J = 9.7, 3.8 Hz, 1H), 7.01(d, J = 3.9 Hz, 1H), 3.36(s, 3 H).

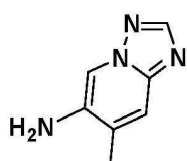
[0476] 중간체 1c: 7-메틸-6-니트로-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘



[0477]

[0478] THF(0.4 M) 중 중간체 1b(2.5 g, 1.0당량)의 용액에 트리플루오로아세트산 무수물(1.0당량)을 0℃에서 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 18시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 여과액을 감압하에 농축하여 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 백색 고체로 얻었다(44%). ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 9.53(s, 1H), 8.49(s, 1H), 7.69(s, 1H), 2.78(d, J = 1.0 Hz, 3H).

[0479] 중간체 1d: 7-메틸-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-6-아민

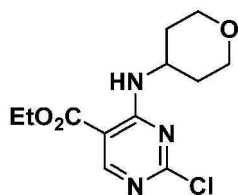


[0480]

[0481] EtOH(0.1 M) 중 Pd/C(10% w/w, 0.2당량)의 혼합물에 중간체 1c(1.0당량 및 포름산 암모늄(5.0당량)을 첨가하였

다. 혼합물을 105℃에서 2시간 동안 가열하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 여과액을 감압하에 농축하여 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 연황색 고체로 얻었다. ¹H NMR(400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.41(s, 2H), 8.07(d, J = 9.0 Hz, 2H), 7.43(s, 1H), 2.22(s, 3H).

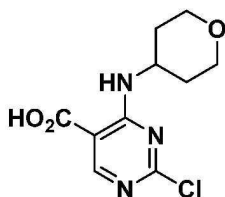
[0482] 중간체 1e: 에틸 2-클로로-4-((테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)피리미딘-5-카르복실레이트



[0483]

[0484] MeCN(0.25~2.0 M) 중 테트라히드로피란-4-아민(5 g, 1.0당량) 및 에틸 2,4-디클로로피리미딘-5-카르복실레이트(1.0당량)의 용액에 K₂CO₃(1.0~3.0당량)을 첨가하였다. 혼합물을 20~25℃에서 적어도 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 여과액을 감압하에 농축하여 잔류물을 수득하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 연황색 고체로 얻었다(21%). ¹H NMR(400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.60(s, 1H), 8.29(d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.28(q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.14(dt, J = 11.3, 8.3, 4.0 Hz, 1H), 3.82(dt, J = 12.1, 3.6 Hz, 2H), 3.57(s, 1H), 1.87~1.78(m, 2H), 1.76~1.67(m, 1H), 1.54(qd, J = 10.9, 4.3 Hz, 2H), 1.28(t, J = 7.1 Hz, 3H).

[0485] 중간체 1f: 2-클로로-4-((테트라히드로-2H-피란-4-일)아미노)피리미딘-5-카르복실산



[0486]

[0487] 1:1 THF/H₂O(0.25~1.0 M) 중 LiOH(2.5당량)의 용액에 중간체 1e(3.0 g, 1.0당량)를 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. 혼합물을 감압하에서 농축하여 THF를 제거하였다. 잔류물의 pH를 2M HCl로 2로 조정하고 생성된 침전물을 여과로 수집하고 물로 세척하고 진공 건조하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 백색 고체로 수득하거나(74%), 또는 미정제 생성물로서 직접 사용하였다.

[0488] 중간체 1g: 2-클로로-9-((테트라히드로-2H-피란-4-일)-7,9-디히드로-8H-퓨린-8-온



[0489]

[0490] MeCN(0.2~0.5 M) 중 중간체 1f(2 g, 1.0당량)의 용액에 Et₃N(1.0당량)을 첨가하였다. 혼합물을 25℃에서 30분 동안 교반하였다. 그런 다음, DPPA(1.0당량)를 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 100℃에서 적어도 7시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 물에 붓고, 생성된 침전물을 여과로 수집하고 물로 세척하고 진공 건조하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 백색 고체로 얻었다(56%). ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 9.50(s, 1H), 8.09(s, 1H), 4.53(tt, J = 12.4, 4.2 Hz, 1H), 4.07(dt, J = 9.5, 4.8 Hz, 2H), 3.48(td, J = 12.1, 1.9 Hz, 2H), 2.69(qd, J = 12.5, 4.7 Hz, 2H), 1.67(dd, J = 12.1, 3.9 Hz, 2H).

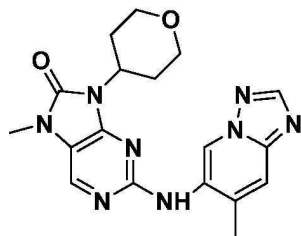
[0491] 중간체 1h: 2-클로로-7-메틸-9-(테트라히드로-2H-피란-4-일)-7,9-디히드로-8H-퓨린-8-온



[0492]

[0493] 1:1 THF/H₂O(0.25-1.0 M) 중 중간체 1g(300 mg, 1.0당량) 및 NaOH(5.0당량)의 혼합물에 요오도메탄(2.0당량)을 첨가하였다. 반응 혼합물을 25℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압하에 농축하여 잔류물을 수득하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 백색 고체로 수득하였다(47%). ¹H NMR(400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.34(s, 1H), 4.43(ddt, J = 12.2, 8.5, 4.2 Hz, 1H), 3.95(dd, J = 11.5, 4.6 Hz, 2H), 3.43(td, J = 12.1, 1.9 Hz, 2H), 2.45(s, 3H), 2.40(td, J = 12.5, 4.7 Hz, 2H), 1.66(ddd, J = 12.2, 4.4, 1.9 Hz, 2H).

[0494] 화합물 1: 7-메틸-2-((7-메틸-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-6-일)아미노)-9-(테트라히드로-2H-피란-4-일)-7,9-디히드로-8H-퓨린-8-온(화합물 1)

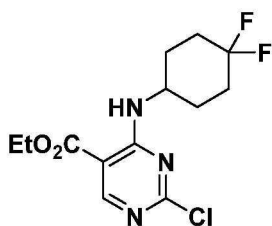


[0495]

[0496] DMF(0.05-0.3 M) 중 중간체 1h(1.3 g, 1.0당량), 중간체 1d(1.0당량), Pd(dppf)Cl₂(0.1-0.2당량), XantPhos(0.1-0.2당량) 및 Cs₂CO₃(2.0당량)의 혼합물을 탈가스하고, N₂로 3회 퍼징하고, 혼합물을 N₂ 분위기 하에 적어도 12시간 동안 100~130℃에서 교반하였다. 그런 다음, 반응 혼합물을 물에 붓고 DCM으로 3회 추출하였다. 합한 유기상을 염수로 세척하고 무수 Na₂SO₄로 건조하고 여과하고 여과액을 진공에서 농축하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 연황색 고체로 얻었다. ¹H NMR(400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 9.13(s, 1H), 8.69(s, 1H), 8.39(s, 1H), 8.10(s, 1H), 7.72(s, 1H), 4.50-4.36(m, 1H), 3.98(dd, J = 11.6, 4.4 Hz, 2H), 3.44(d, J = 11.9 Hz, 2H), 3.32(s, 3H), 2.44-2.38(m, 3H), 1.69(d, J = 11.6 Hz, 2H). MS: 381.3 m/z [M+H].

[0497] b) 화합물 3

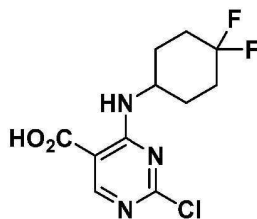
[0498] 중간체 3a: 에틸 2-클로로-4-((4,4-디플루오로시클로헥실)아미노)피리미딘-5-카르복실레이트



[0499]

[0500] 중간체 1e에서 사용된 방법을 사용하여, 에틸 2,4-디클로로피리미딘-5-카르복실레이트 및 4,4-디플루오로시클로헥산아민 하이드로클로라이드로부터 중간체 3a를 합성하였다. ¹H NMR(400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 8.61(s, 1H), 8.30(d, J = 7.7 Hz, 1H), 4.29(q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.19-4.09(m, 1H), 2.09-1.90(m, 6H), 1.69-1.58(m, 2H), 1.29(t, J = 7.1 Hz, 3H).

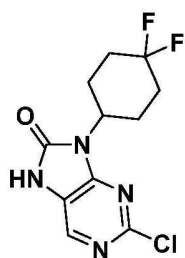
[0501] 중간체 3b: 2-클로로-4-((4,4-디플루오로시클로헥실)아미노)피리미딘-5-카르복실산



[0502]

[0503] 중간체 1f에서 사용된 방법을 사용하여, 중간체 3a로부터 중간체 3b를 합성하였다(78%). ^1H NMR(400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 13.77(s, 1H), 8.57(s, 1H), 8.53(d, J = 7.8 Hz, 1H), 4.12(d, J = 10.2 Hz, 1H), 2.14-1.89(m, 6H), 1.62(ddt, J = 17.0, 10.3, 6.0 Hz, 2H).

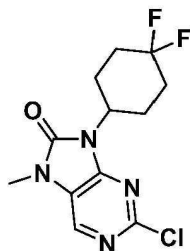
[0504] 중간체 3c: 2-클로로-9-(4,4-디플루오로시클로헥실)-7,9-디히드로-8H-퓨린-8-온



[0505]

[0506] 중간체 1g에서 사용된 방법을 사용하여, 중간체 3b로부터 중간체 3c를 합성하였다(56%). ^1H NMR(400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 11.76-11.65(m, 1H), 8.20(s, 1H), 4.47(dq, J = 12.6, 6.2, 4.3 Hz, 1H), 2.34-1.97(m, 6H), 1.90(d, J = 12.9 Hz, 2H).

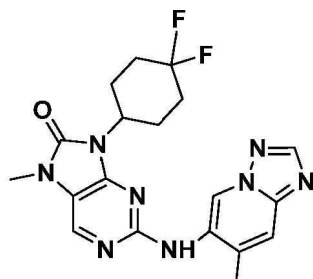
[0507] 중간체 3d: 2-클로로-9-(4,4-디플루오로시클로헥실)-7-메틸-7,9-디히드로-8H-퓨린-8-온



[0508]

[0509] 5:1 THF/H₂O(0.3 M) 중 중간체 3c(1.4 g, 1.0당량), NaOH(5.0당량)의 혼합물에 MeI(2.0당량)를 첨가하였다. 혼합물을 N₂ 분위기 하에 20℃에서 12시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압하에 농축하여 잔류물을 수득하고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 황색 고체로 수득하였다(47%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.01 (s, 1H), 4.53 - 4.39 (m, 1H), 3.43 (s, 3H), 2.73 (qd, J = 12.7, 12.1, 3.8 Hz, 2H), 2.32 - 2.20 (m, 2H), 2.03 - 1.82 (m, 4H).

[0510] 화합물 3: 9-(4,4-디플루오로시클로헥실)-7-메틸-2-((7-메틸-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-6-일)아미노)-7,9-디히드로-8H-퓨린-8-온(화합물 3)

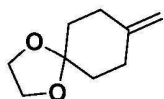


[0511]

[0512] 화합물 1에 사용된 방법을 사용하여 중간체 1d 및 중간체 3d로부터 화합물 3을 합성한 다음, 역상 HPLC로 정제하였다. ^1H NMR(400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 9.03(s, 1H), 8.66(s, 1H), 8.38(s, 1H), 8.10(s, 1H), 7.71(d, J = 1.4 Hz, 1H), 4.36(d, J = 12.3 Hz, 1H), 3.31(s, 3H), 2.38(d, J = 1.0 Hz, 3H), 2.11-1.96(m, 4H), 1.81(d, J = 12.6 Hz, 2H). MS: 415.5 m/z $[\text{M}+\text{H}]$.

[0513] **c) 화합물 4**

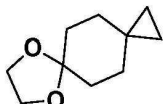
[0514] 중간체 4a: 8-메틸렌-1,4-디옥사스피로[4.5]데칸



[0515]

[0516] THF(0.6 M) 중 메틸(트리페닐)포스포늄 브로마이드(1.15당량)의 용액에 n-BuLi(1.1당량)을 -78°C 에서 적가하고, 혼합물을 0°C 에서 1시간 동안 교반하였다. 그런 다음, 1,4-디옥사스피로[4.5]데칸-8-온(50 g, 1.0당량)을 반응 혼합물에 첨가하였다. 혼합물을 25°C 에서 12시간 동안 교반하였다. 0°C 에서 반응 혼합물을 수성 NH_4Cl 에 붓고, H_2O 로 희석하고, EtOAc로 3회 추출하였다. 합한 유기층을 감압하에 농축하여 잔류물을 얻고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 무색 오일로 얻었다(51%). ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 4.67(s, 1H), 3.96(s, 4 H), 2.82(t, J = 6.4 Hz, 4 H), 1.70(t, J = 6.4 Hz, 4 H).

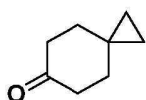
[0517] 중간체 4b: 7,10-디옥사디스피로[2.2.4.6.2.3]도데칸



[0518]

[0519] 톨루엔(3 M) 중 중간체 4a(5 g, 1.0당량)의 용액에 ZnEt_2 (2.57당량)를 -40°C 에서 적가하고 혼합물을 -40°C 에서 1시간 동안 교반하였다. 그런 다음 디요오도메탄(6.0당량)을 N 하에 -40°C 에서 혼합물에 적가하였다. 그런 다음, 혼합물을 N_2 분위기 하에 20°C 에서 17시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 0°C 에서 수성 NH_4Cl 에 붓고, EtOAc로 2회 추출하였다. 합한 유기상을 염수(20mL)로 세척하고, 무수 Na_2SO_4 로 건조시키고, 여과하고, 여과액을 진공에서 농축시켰다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 연황색 오일로 얻었다(73%).

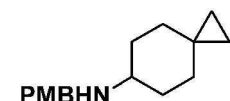
[0520] 중간체 4c: 스피로[2.5]옥탄-6-온



[0521]

[0522] 1:1 THF/ H_2O (1.0 M) 중 중간체 4b(4 g, 1.0당량)의 용액에 TFA(3.0당량)를 첨가하였다. 혼합물을 N_2 분위기 하에 20°C 에서 2시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압하에 농축하여 THF를 제거하고, 잔류물을 2M NaOH(aq.)로 pH를 7로 조정하였다. 혼합물을 물에 붓고 EtOAc로 3회 추출하였다. 합한 유기상을 염수로 세척하고 무수 Na_2SO_4 로 건조하고 여과하고 여과액을 진공에서 농축하였다. 잔류물을 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 연황색 오일로 얻었다(68%). ^1H NMR(400 MHz, CDCl_3) δ 2.35(t, J = 6.6 Hz, 4H), 1.62(t, J = 6.6 Hz, 4H), 0.42(s, 4H).

[0523] 중간체 4d: N-(4-메톡시벤질)스피로[2.5]옥탄-6-아민

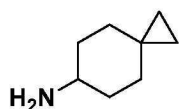


[0524]

[0525] DCM(0.3 M) 중 중간체 4c(2 g, 1.0당량) 및 (4-메톡시페닐)메탄아민(1.1당량)의 혼합물에 AcOH(1.3당량)를 첨가하였다. 혼합물을 N_2 분위기 하에 20°C 에서 1시간 동안 교반하였다. 그런 다음, $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ (3.3당량)을 0°C 에서 혼합물에 첨가하고, 및 N_2 분위기 하에 혼합물을 20°C 에서 17시간 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 감압하에 농축하여 DCM을 제거하고, 생성된 잔류물을 H_2O 로 희석하고 EtOAc로 3회 추출하였다. 합한 유기층을 염수로 세척하고, Na_2SO_4 상에서 건조하고, 여과하고, 여과액을 감압하에 농축하여 잔류물을 얻었다. 잔류물을 컬럼 크로

마토그래피로 정제하여 생성물을 회색 고체로 얻었다(51%). ^1H NMR(400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 7.15-7.07(m, 2H), 6.77-6.68(m, 2H), 3.58(s, 3H), 3.54(s, 2H), 2.30(ddt, J = 10.1, 7.3, 3.7 Hz, 1H), 1.69-1.62(m, 2H), 1.37(td, J = 12.6, 3.5 Hz, 2H), 1.12-1.02(m, 2H), 0.87-0.78(m, 2H), 0.13-0.04(m, 2H).

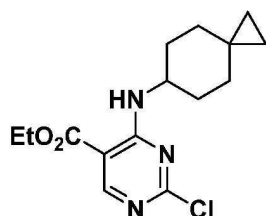
[0526] 중간체 4e: 스피로[2.5]옥탄-6-아민



[0527]

[0528] MeOH(0.25 M) 중 Pd/C(10% w/w, 1.0당량)의 현탁액에 중간체 4d(2 g, 1.0당량)를 첨가하고, 혼합물을 H_2 분위기에서 24시간 동안 80°C에서 50 Psi에서 교반하였다. 반응 혼합물을 여과하고, 여과액을 감압하에 농축하여 잔류물을 얻었고 컬럼 크로마토그래피로 정제하여 생성물을 백색 고체로 얻었다. ^1H NMR(400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 2.61(tt, J = 10.8, 3.9 Hz, 1H), 1.63(ddd, J = 9.6, 5.1, 2.2 Hz, 2H), 1.47(td, J = 12.8, 3.5 Hz, 2H), 1.21-1.06(m, 2H), 0.82-0.72(m, 2H), 0.14-0.05(m, 2H).

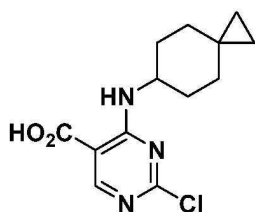
[0529] 중간체 4f: 에틸 2-클로로-4-(스피로[2.5]옥탄-6-일아미노)피리미딘-5-카르복실레이트



[0530]

[0531] 중간체 1e에서 사용된 방법을 사용하여 중간체 4e로부터 중간체 4f를 합성하였다(54%). ^1H NMR(400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 8.64(s, 1H), 8.41(d, J = 7.9 Hz, 1H), 4.33(q, J = 7.1 Hz, 2H), 4.08(d, J = 9.8 Hz, 1H), 1.90(dd, J = 12.7, 4.8 Hz, 2H), 1.64(t, J = 12.3 Hz, 2H), 1.52(q, J = 10.7, 9.1 Hz, 2H), 1.33(t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.12(d, J = 13.0 Hz, 2H), 0.40-0.21(m, 4H).

[0532] 중간체 4g: 2-클로로-4-(스피로[2.5]옥탄-6-일아미노)피리미딘-5-카르복실산



[0533]

[0534] 중간체 1f에서 사용된 방법을 사용하여 중간체 4f로부터 중간체 4g를 합성하였다(82%). ^1H NMR(400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{SO}$) δ 13.54(s, 1H), 8.38(d, J = 8.0 Hz, 1H), 8.35(s, 1H), 3.82(qt, J = 8.2, 3.7 Hz, 1H), 1.66(dq, J = 12.8, 4.1 Hz, 2H), 1.47-1.34(m, 2H), 1.33-1.20(m, 2H), 0.86(dt, J = 13.6, 4.2 Hz, 2H), 0.08(dd, J = 8.3, 4.8 Hz, 4H).

[0535] 중간체 4h: 2-클로로-9-(스피로[2.5]옥탄-6-일)-7,9-디히드로-8H-퓨린-8-온

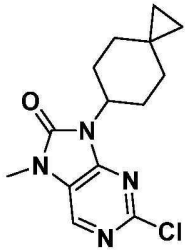


[0536]

[0537] 중간체 1g에서 사용된 방법을 사용하여 중간체 4g로부터 중간체 4h를 합성하였다(67%). ^1H NMR(400 MHz,

(CD₃)₂SO) δ 11.68(s, 1H), 8.18(s, 1H), 4.26(ddt, J = 12.3, 7.5, 3.7 Hz, 1H), 2.42(qd, J = 12.6, 3.7 Hz, 2H), 1.95(td, J = 13.3, 3.5 Hz, 2H), 1.82-1.69(m, 2H), 1.08-0.95(m, 2H), 0.39(tdq, J = 11.6, 8.7, 4.2, 3.5 Hz, 4H).

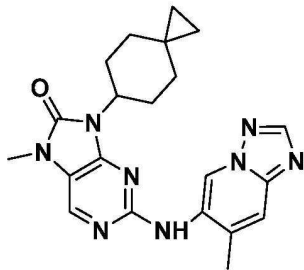
[0539] 중간체 4i: 2-클로로-7-메틸-9-(스피로[2.5]옥탄-6-일)-7,9-디히드로-8H-퓨린-8-온



[0539]

[0540] 중간체 1h에서 사용된 방법을 사용하여 중간체 4h로부터 중간체 4i를 합성하였다(67%). ¹H NMR(400 MHz, CDCl₃) δ 7.57(s, 1H), 4.03(tt, J = 12.5, 3.9 Hz, 1H), 3.03(s, 3H), 2.17(qd, J = 12.6, 3.8 Hz, 2H), 1.60(td, J = 13.4, 3.6 Hz, 2H), 1.47-1.34(m, 2H), 1.07(s, 1H), 0.63(dp, J = 14.0, 2.5 Hz, 2H), -0.05(s, 4H).

[0541] 화합물 4: 7-메틸-2-((7-메틸-[1,2,4]트리아졸로[1,5-a]피리딘-6-일)아미노)-9-(스피로[2.5]옥탄-6-일)-7,9-디히드로-8H-퓨린-8-온(화합물 4)



[0542]

[0543] 화합물 1에서 사용된 방법을 사용하여 중간체 4i 및 중간체 1d로부터 화합물 4를 합성하였다. ¹H NMR(400 MHz, (CD₃)₂SO) δ 9.09(s, 1H), 8.73(s, 1H), 8.44(s, 1H), 8.16(s, 1H), 7.78(s, 1H), 4.21(t, J = 12.5 Hz, 1H), 3.36(s, 3H), 2.43(s, 3H), 2.34(dt, J = 13.0, 6.5 Hz, 2H), 1.93-1.77(m, 2H), 1.77-1.62(m, 2H), 0.91(d, J = 13.2 Hz, 2H), 0.31(t, J = 7.1 Hz, 2H). MS: 405.5 m/z [M+H].

[0544] VII. 추가의 예시적인 구현예

[0545] 본 발명은 예시된 구현예와 함께 설명되지만, 본 발명을 이러한 구현예로 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다. 반대로, 본 발명은 첨부된 청구범위에 의해 정의된 본 발명 내에 포함될 수 있는 특정 특징의 등가물을 포함하여 모든 대안, 변형 및 등가물을 포함하도록 의도된다.

[0546] 전술한 일반적인 설명 및 상세한 설명 뿐만 아니라 하기 실시예는 모두 예시적이고 설명을 위한 것이며 교시를 제한하지 않는다. 본원에서 사용된 섹션 제목은 구성 목적으로만 사용되며, 어떤 식으로든 원하는 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다. 참조로 포함된 문헌이 본 명세서에 정의된 용어와 모순되는 경우 본 명세서가 우선된다. 달리 명시되지 않는 한 본원에 제공된 모든 범위는 끝점을 포함한다.

[0547] 하기 비제한적인 구현예도 또한 포함된다:

[0548] 구현예 1. 시험관내-배양된 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하기 위한 방법으로서,

[0549] a. 세포를 시험관 내에서 적어도 제1 및 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물이 제1 표적 서열에 대한 제1 가이드 RNA(gRNA) 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하고, 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물이 제1 표적 서열과 상이한 제2 표적 서열에 대한 제2 gRNA 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계;

[0550] b. 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계;

[0551] 예 의해, 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 단계

- [0552] 를 포함하는, 방법.
- [0553] 구현예 2. 구현예 1에 있어서, 상기 세포는 게놈 편집 도구를 포함하는 적어도 하나의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 추가로 접촉되는, 방법.
- [0554] 구현예 3. 구현예 2에 있어서, 상기 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제를 암호화하는 핵산을 포함하는, 방법.
- [0555] 구현예 4. 구현예 1에 있어서, 상기 세포는 표적 서열에 삽입하기 위해 공여자 핵산과 추가로 접촉되는, 방법.
- [0556] 구현예 5. 구현예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 순차적으로 투여되는, 방법.
- [0557] 구현예 6. 구현예 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 동시에 투여되는, 방법.
- [0558] 구현예 7. 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내-배양된 세포에 전달하는 방법으로서:
- [0559] a. 시험관내 세포를 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포를 생산하는 단계;
- [0560] b. 상기 접촉된 세포를 시험관내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포를 생산하는 단계;
- [0561] c. 상기 배양된 접촉된 세포를 시험관내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및
- [0562] d. 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계로서; 상기 확장된 세포가 증가된 생존을 나타내는, 단계를 포함하는 방법.
- [0563] 구현예 8. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 시험관내-배양된 세포는 비-활성화된 세포인, 방법.
- [0564] 구현예 9. 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 시험관내-배양된 세포는 활성화된 세포인, 방법.
- [0565] 구현예 10. 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, (a)의 세포는 적어도 하나의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된 후 활성화되는, 방법.
- [0566] 구현예 11. 시험관내-배양된 T 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 방법으로서:
- [0567] a. T 세포를 시험관 내에서 (i) 제1 표적 서열에 대한 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물 및 선택적으로 (ii) 1 또는 2개의 추가적인 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 각각의 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물이 제1 표적 서열 및/또는 게놈 편집 도구와 상이한 표적 서열에 대한 gRNA를 포함하는, 단계;
- [0568] b. T 세포를 시험관 내에서 활성화시키는 단계;
- [0569] c. 활성화된 T 세포를 시험관 내에서 (i) (a)의 표적 서열(들)과 상이한 표적 서열에 대한 추가의 가이드 RNA를 포함하는 추가의 핵산 어셈블리 조성물 및 선택적으로 (ii) 하나 이상의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 각각의 지질 핵산 어셈블리 조성물이 (a)의 표적 서열(들)과 상이하고, 서로 상이한 표적 서열에 대한 가이드 RNA 및/또는 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계;
- [0570] d. 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계;
- [0571] 에 의해 T 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0572] 구현예 12. 구현예 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포 또는 T 세포를 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0573] 구현예 13. 구현예 11 또는 12에 있어서, 상기 단계 (a)의 세포 또는 T 세포는 2개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되며, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물은 순차적으로 또는 동시에 투여되는, 방법.
- [0574] 구현예 14. 구현예 11 또는 12에 있어서, 상기 세포 또는 단계 (a)의 T 세포는 3개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되며, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물은: (i) 순차적으로; (ii) 동시에; 또는 (iii) 동시에(2개의 조성물) 및 순차적으로(전 또는 후에 투여되는 1개의 조성물) 투여되는, 방법.
- [0575] 구현예 15. 구현예 11 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 단계 (c)의 T 세포는 1 내지 8개의 지질 핵산 어셈블리

조성물, 선택적으로 1 내지 4개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되며, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물은: (i) 순차적으로; (ii) 동시에; 또는 (iii) 동시에(적어도 2개의 조성물) 및 순차적으로(전 또는 후에 투여되는 적어도 하나의 조성물) 투여되는, 방법.

- [0576] 구현예 16. 1차 면역 세포를 유전적으로 변형시키는 방법으로서,
- [0577] a. 세포 배양 배지에서 1차 면역 세포를 배양하는 단계;
- [0578] b. 핵산을 포함하는 지질 핵산 어셈블리 조성물을 제공하는 단계;
- [0579] c. 시험관 내에서 (a)의 면역 세포를 (b)의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 조합하는 단계;
- [0580] d. 선택적으로, 면역 세포가 유전적으로 변형되었는지 확인하는 단계; 및
- [0581] e. 선택적으로, 면역 세포를 증식시키는 단계
- [0582] 를 포함하는, 방법.
- [0583] 구현예 17. 구현예 16 또는 17에 있어서, 비-활성화된 면역 세포에서 조합 단계 (c)를 수행하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0584] 구현예 18. 구현예 16 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 활성화된 면역 세포에서 조합 단계 (c)를 수행하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0585] 구현예 19. 구현예 16에 있어서, 단계 (c) 후에 면역 세포를 활성화시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0586] 구현예 20. 구현예 16에 있어서,
- [0587] (b2) 제2 핵산을 포함하는 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물을 제공하는 단계;
- [0588] (c2) 단계 (c)의 유전적으로 변형된 면역 세포를 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 시험관 내에서 조합하는 단계;
- [0589] (d2) 선택적으로, 유전적 변형을 위한 제2 핵산을 사용하여, 면역 세포가 유전적으로 변형되었는지 확인하는 단계; 및
- [0590] 선택적으로, 면역 세포를 증식시키는 단계
- [0591] 를 추가로 포함하는, 방법.
- [0592] 구현예 21. 구현예 20에 있어서,
- [0593] (b3) 제3 핵산을 포함하는 제3 지질 핵산 어셈블리 조성물을 제공하는 단계;
- [0594] (c3) 단계 (c2)의 유전적으로 변형된 면역 세포를 제3 지질 핵산 어셈블리 조성물과 시험관 내에서 조합하는 단계;
- [0595] (d2) 선택적으로, 유전적 변형을 위한 제3 핵산을 사용하여, 면역 세포가 유전적으로 변형되었는지 확인하는 단계; 및
- [0596] (e) 선택적으로, 면역 세포를 증식시키는 단계
- [0597] 를 추가로 포함하는, 방법.
- [0598] 구현예 22. 구현예 20 또는 21에 있어서, 단계 (c) 및 (c2), 및 존재하는 경우 단계 (c3)가 순차적으로 수행되는, 방법.
- [0599] 구현예 23. 구현예 20 또는 21에 있어서, 단계 (c) 및 (c2), 및 존재하는 경우 단계 (c3)가 동시에 수행되는, 방법.
- [0600] 구현예 24. 구현예 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구 또는 gRNA가 RNA를 포함하는, 방법.
- [0601] 구현예 25. 구현예 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는, 방법.

- [0602] 구현예 26. 구현예 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구 또는 gRNA는 sgRNA를 포함하는, 방법.
- [0603] 구현예 27. 구현예 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구 또는 gRNA는 dgRNA를 포함하는, 방법.
- [0604] 구현예 28. 구현예 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 게놈 편집 도구를 암호화하는 mRNA를 포함하는, 방법.
- [0605] 구현예 29. 구현예 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 공여자 핵산을 포함하는, 방법.
- [0606] 구현예 30. 구현예 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하는, 방법.
- [0607] 구현예 31. 구현예 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하고, 그리고 RNA-가이드 DNA 결합체는 Cas 뉴클레아제인, 방법.
- [0608] 구현예 32. 구현예 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하고, 그리고 RNA-가이드 DNA 결합체는 Cas9인, 방법.
- [0609] 구현예 33. 구현예 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하고, 그리고 RNA-가이드 DNA 결합체는 스트렙토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*) Cas9인, 방법.
- [0610] 구현예 34. 구현예 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산 또는 핵산 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합체를 포함하고, 그리고 RNA-가이드 DNA 결합체는 Cpf1인, 방법.
- [0611] 구현예 35. 구현예 1 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 인간 세포인, 방법.
- [0612] 구현예 36. 구현예 1 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)인, 방법.
- [0613] 구현예 37. 구현예 1 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 림프구인, 방법.
- [0614] 구현예 38. 구현예 1 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 T 세포인, 방법.
- [0615] 구현예 39. 구현예 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 CD4⁺ T 세포인, 방법.
- [0616] 구현예 40. 구현예 1 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 CD8⁺ T 세포인, 방법.
- [0617] 구현예 41. 구현예 1 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 기억 T 세포, 또는 나이브 T 세포인, 방법.
- [0618] 구현예 42. 구현예 1 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 Tscm 세포인, 방법.
- [0619] 구현예 43. 구현예 1 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 B 세포인, 방법.
- [0620] 구현예 44. 구현예 1 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 기억 B 세포, 또는 나이브 B 세포인, 방법.
- [0621] 구현예 45. 구현예 1 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 1차 세포인, 방법.
- [0622] 구현예 46. 구현예 1 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포와 접촉하기 전에 혈청 인자로 전처리되고, 선택적으로 혈청 인자는 영양류 혈청 인자, 선택적으로 인간 혈청 인자인, 방법.
- [0623] 구현예 47. 구현예 1 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포와 접촉하기 전에 인간 혈청으로 전처리되는, 방법.
- [0624] 구현예 48. 구현예 1 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포와 접촉하기 전에 ApoE로 전처리되고, 선택적으로 ApoE는 인간 ApoE인, 방법.
- [0625] 구현예 49. 구현예 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 세포와 접촉하기 전에 재조합 ApoE3 또는 ApoE4로 전처리되고, 선택적으로 ApoE3 또는 ApoE4는 인간 ApoE3 또는 ApoE4인, 방법.
- [0626] 구현예 50. 구현예 1 내지 49 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 지질 핵산 어셈블리 조성물 또는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉하기 전에 혈청-고갈 상태인, 방법.
- [0627] 구현예 51. 구현예 1 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 하나 이상의 증식성 사이토카인을 포함하는

세포 배양 배지에서 배양되는, 방법.

- [0628] 구현예 52. 구현예 1 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 IL-2을 포함하는 세포 배양 배지에서 배양되는, 방법.
- [0629] 구현예 53. 구현예 1 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 IL-7을 포함하는 세포 배양 배지에서 배양되는, 방법.
- [0630] 구현예 54. 구현예 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 IL-2, IL-7, IL-15 및 IL-21 중 하나 이상 또는 모두, 및 선택적으로 CD3 및/또는 CD28을 통해 활성화를 제공하는 하나 이상의 작용제를 포함하는 세포 배양 배지에서 배양되는, 방법.
- [0631] 구현예 55. 구현예 1 내지 54 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 세포를 항원에 노출시킴으로써 활성화되는, 방법.
- [0632] 구현예 56. 구현예 1 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 다클론성 자극에 의해 활성화되는, 방법.
- [0633] 구현예 57. 구현예 1 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 생체외에서 수행되는, 방법.
- [0634] 구현예 58. 구현예 1 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0635] 구현예 59. 구현예 1 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산이 벡터를 포함하는, 방법.
- [0636] 구현예 60. 구현예 1 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산이 바이러스 벡터를 포함하는, 방법.
- [0637] 구현예 61. 구현예 1 내지 60 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산이 렌티바이러스 벡터를 포함하는, 방법.
- [0638] 구현예 62. 구현예 1 내지 61 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산이 AAV를 포함하는, 방법.
- [0639] 구현예 63. 구현예 1 내지 62 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 지질 핵산 어셈블리 조성물에 제공되는, 방법.
- [0640] 구현예 64. 구현예 1 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 상동성 재조합에 의해 통합되는, 방법.
- [0641] 구현예 65. 구현예 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 표적 서열의 전부 또는 일부에 대해 상동성인 측접 핵산 영역을 포함하는, 방법.
- [0642] 구현예 66. 구현예 1 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 평활 말단 삽입에 의해 통합되는, 방법.
- [0643] 구현예 67. 구현예 1 내지 66 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 비-상동성 말단 결합에 의해 통합되는, 방법.
- [0644] 구현예 68. 구현예 1 내지 67 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산이 세이프 하버 유전자좌에 삽입되는, 방법.
- [0645] 구현예 69. 구현예 1 내지 68 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 T 세포 수용체 서열의 상응하는 영역과 상동성을 갖는 영역을 포함하는, 방법.
- [0646] 구현예 70. 구현예 1 내지 69 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 하나 이상의 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 하나 이상의 공여자 핵산 중 적어도 하나가 TRAC 유전자좌, B2M 유전자좌, AAVS1

유전자좌, 및/또는 CIITA 유전자좌의 상응하는 영역과 상동성을 갖는 영역을 포함하는, 방법.

- [0647] 구현예 71. 구현예 1 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0648] 구현예 72. 구현예 1 내지 71 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0649] 구현예 73. 구현예 1 내지 72 중 어느 하나에 있어서, 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0650] 구현예 74. 구현예 1 내지 73 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 그리고 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0651] 구현예 75. 구현예 1 내지 74 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 그리고 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0652] 구현예 76. 구현예 1 내지 75 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 T 세포이고, 상기 방법은 내인성 T 세포 수용체의 발현을 감소시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0653] 구현예 77. 구현예 1 내지 76 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 T 세포이고, 상기 방법은 유전적으로 변형된 T 세포 수용체(TCR)를 발현하도록 T 세포를 유전적으로 변형시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0654] 구현예 78. 구현예 1 내지 77 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 공여자 핵산은 T 세포 수용체(TCR)를 암호화하는, 방법.
- [0655] 구현예 79. 구현예 1 내지 78 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포를 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 포함하고, 상기 공여자 핵산은 TCR WT1을 암호화하는, 방법.
- [0656] 구현예 80. 구현예 1 내지 79 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 그리고 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고; 상기 방법은 세포를 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 상기 공여자 핵산은 TCR을 암호화하는, 방법.
- [0657] 구현예 81. 구현예 1 내지 80 중 어느 하나에 있어서, 상기 TCR은 TCR WT1인, 방법.
- [0658] 구현예 82. 구현예 1 내지 81 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 나노입자(LNP)인, 방법.
- [0659] 구현예 83. 구현예 1 내지 82 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 리포플렉스인, 방법.
- [0660] 구현예 84. 구현예 1 내지 83 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 이온화가능한 지질을 포함하는, 방법.
- [0661] 구현예 85. 구현예 1 내지 84 중 어느 하나에 있어서, 상기 이온화가능한 지질은 생분해성 이온화가능한 지질을 포함하는, 방법.
- [0662] 구현예 86. 구현예 1 내지 85 중 어느 하나에 있어서, 상기 이온화가능한 지질은 약 5.1 내지 약 7.4, 예컨대 약 5.5 내지 약 6.6, 약 5.6 내지 약 6.4, 약 5.8 내지 약 6.2, 또는 약 5.8 내지 약 6.5의 범위의 pKa 범위의 PK 값을 갖는, 방법.
- [0663] 구현예 87. 구현예 1 내지 86 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 아민 지질을 포함하는, 방법.
- [0664] 구현예 88. 구현예 1 내지 87 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 아민 지질을 포함하고, 아민 지질은 지질 A 또는 그의 아세탈 유사체인, 방법.
- [0665] 구현예 89. 구현예 1 내지 88 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 헬퍼 지질을 포함하는, 방법.

- [0666] 구현예 90. 구현예 1 내지 89 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 스텔스 지질을 포함하고, 선택적으로:
- [0667] (i) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A, 약 8~10 mol% 중성 지질; 및 약 2.5~4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6이거나;
- [0668] (ii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 약 50~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 27~39.5 mol% 헬퍼 지질; 약 8~10 mol% 중성 지질; 및 약 2.5~4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 5~7(예를 들어, 약 6)이거나;
- [0669] (iii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 5~15 mol% 중성 지질; 및 약 2.5~4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3~10이거나;
- [0670] (iv) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 40~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 5~15 mol% 중성 지질; 및 약 2.5~4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6이거나;
- [0671] (v) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 5~15 mol% 중성 지질; 및 약 1.5~10 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6이거나;
- [0672] (vi) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 40~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 0~10 mol% 중성 지질; 및 약 1.5~10 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3~10이거나;
- [0673] (vii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 40~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 1 mol% 미만 중성 지질; 및 약 1.5~10 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3~10이거나;
- [0674] (viii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 40~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 및 약 1.5~10 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3~10이며, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물은 중성 인지질이 본질적으로 없거나 없거나; 또는
- [0675] (ix) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50~60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 8~10 mol% 중성 지질; 및 약 2.5~4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3~7인, 방법.
- [0676] 구현예 91. 구현예 1 내지 90 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 중성 지질을 포함하는, 방법.
- [0677] 구현예 92. 구현예 1 내지 91 중 어느 하나에 있어서, 상기 중성 지질은 지질 핵산 어셈블리 조성물 내에 약 9 mol%로 존재하는, 방법.
- [0678] 구현예 93. 구현예 1 내지 92 중 어느 하나에 있어서, 상기 아민 지질은 지질 핵산 어셈블리 조성물 내에 약 50 mol%로 존재하는, 방법.
- [0679] 구현예 94. 구현예 1 내지 93 중 어느 하나에 있어서, 상기 스텔스 지질은 지질 핵산 어셈블리 조성물 내에 약 3 mol%로 존재하는, 방법.
- [0680] 구현예 95. 구현예 1 내지 94 중 어느 하나에 있어서, 상기 헬퍼 지질은 지질 핵산 어셈블리 조성물 내에 약 38 mol%로 존재하는, 방법.
- [0681] 구현예 96. 구현예 1 내지 95 중 어느 하나에 있어서, 지질 핵산 어셈블리 조성물의 상기 N/P 비율은 약 6인, 방법.
- [0682] 구현예 97. 구현예 1 내지 96 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 아민 지질, 헬퍼 지질, 및 PEG 지질을 포함하는, 방법.

- [0683] 구현예 98. 구현예 1 내지 97 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 아민 지질, 헬퍼 지질, 중성 지질, 및 PEG 지질을 포함하는, 방법.
- [0684] 구현예 99. 구현예 1 내지 98 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 9 mol% 중성 지질 예컨대 DSPC; 약 3 mol%의 스텔스 지질 예컨대 PEG 지질, 예컨대 PEG2k-DMG를 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질 예컨대 콜레스테롤이고, 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6인, 방법.
- [0685] 구현예 100. 구현예 1 내지 99 중 어느 하나에 있어서, 상기 아민 지질은 지질 A인, 방법.
- [0686] 구현예 101. 구현예 1 내지 100 중 어느 하나에 있어서, 상기 중성 지질은 DSPC인, 방법.
- [0687] 구현예 102. 구현예 1 내지 101 중 어느 하나에 있어서, 상기 스텔스 지질은 PEG2k-DMG인, 방법.
- [0688] 구현예 103. 구현예 1 내지 102 중 어느 하나에 있어서, 상기 헬퍼 지질은 콜레스테롤인, 방법.
- [0689] 구현예 104. 구현예 1 내지 103 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50 mol% 지질 A; 약 9 mol% DSPC; 약 3 mol%의 PEG2k-DMG를 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 콜레스테롤이고, 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6인, 방법.
- [0690] 구현예 105. 구현예 1 내지 104 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP는 약 1~250 nm, 10~200 nm, 약 20~150 nm, 약 50~150 nm, 약 50~100 nm, 약 50~120 nm, 약 60~100 nm, 약 75~150 nm, 약 75~120 nm, 또는 약 75~100 nm의 직경을 갖는, 방법.
- [0691] 구현예 106. 구현예 1 내지 105 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 약 10~200 nm, 약 20~150 nm, 약 50~150 nm, 약 50~100 nm, 약 50~120 nm, 약 60~100 nm, 약 75~150 nm, 약 75~120 nm, 또는 약 75~100 nm의 평균 직경을 갖는 LNP의 개체군을 포함하는, 방법.
- [0692] 구현예 107. 구현예 1 내지 106 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은:
- [0693] a. 약 40~60 mol% 아민 지질;
- [0694] b. 약 5~15 mol% 중성 지질; 및
- [0695] c. 약 1.5~10 mol% PEG 지질을 포함하고,
- [0696] 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 LNP 조성물의 N/P 비율은 약 3~10인, 방법.
- [0697] 구현예 108. 구현예 1 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은:
- [0698] a. 약 50~60 mol% 아민 지질;
- [0699] b. 약 8~10 mol% 중성 지질; 및
- [0700] c. 약 2.5~4 mol% PEG 지질을 포함하고,
- [0701] 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 LNP 조성물의 N/P 비율은 약 3~8인, 방법.
- [0702] 구현예 109. 구현예 1 내지 108 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은:
- [0703] a. 약 50~60 mol% 아민 지질;
- [0704] b. 약 5~15 mol% DSPC; 및
- [0705] c. 약 2.5~4 mol% PEG 지질을 포함하고,
- [0706] 여기서 지질 성분의 나머지는 콜레스테롤이고,
- [0707] 여기서 LNP 조성물의 N/P 비율은 $3\sim 8 \pm 0.2$ 인, 방법.
- [0708] 구현예 110. 구현예 1 내지 109 중 어느 하나에 있어서 상기 평균 직경은 Z-평균 직경인, 방법.
- [0709] 구현예 111. 구현예 1 내지 110 중 어느 하나에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 세포는:
- [0710] a. 유전자의 발현을 감소시키는 유전적 변형을 포함하고;
- [0711] b. 공여자 핵산의 삽입을 포함하는 유전적 변형을 포함하고;

- [0712] c. 사이토카인(IL-2, IFN γ , 및/또는 TNF α)의 증가된 분비를 나타내고;
- [0713] d. 증가된 세포독성을 나타내고;
- [0714] e. 증가된 기억 세포 표현형을 나타내고;
- [0715] f. 증가된 확장을 나타내고;
- [0716] g. 반복된 자극에 대해 더 긴 증식 기간을 나타내고/내거나;
- [0717] h. 감소된 전좌율을 나타내는, 방법.
- [0718] 구현예 112. 구현예 1 내지 111 중 어느 하나에 있어서, 상기 접촉된 세포는 증가된 생존을 나타내고, 증가된 생존은 적어도 70%의 형질감염 후 세포 생존율인, 방법.
- [0719] 구현예 113. 구현예 1 내지 112 중 어느 하나에 있어서, 상기 접촉된 세포는 증가된 생존을 나타내고, 증가된 생존은 적어도 80%의 형질감염 후 세포 생존율인, 방법.
- [0720] 구현예 114. 구현예 1 내지 113 중 어느 하나에 있어서, 상기 접촉된 세포는 증가된 생존을 나타내고, 증가된 생존은 적어도 90%의 형질감염 후 세포 생존율인, 방법.
- [0721] 구현예 115. 구현예 1 내지 114 중 어느 하나에 있어서, 상기 접촉된 세포는 증가된 생존을 나타내고, 증가된 생존은 적어도 95%의 형질감염 후 세포 생존율인, 방법.
- [0722] 구현예 116. 구현예 1 내지 115 중 어느 하나에 있어서, 상기 접촉된 세포는 편집 후 1% 미만의 전좌를 갖는, 방법.
- [0723] 구현예 117. 구현예 1 내지 116 중 어느 하나에 있어서, 상기 퍼센트 편집 효율 비율이 각각의 gRNA 표적 부위에 대해 적어도 60%인, 방법.
- [0724] 구현예 118. 구현예 1 내지 117 중 어느 하나에 있어서, 상기 퍼센트 편집 효율 비율이 각각의 gRNA 표적 부위에 대해 적어도 70%인, 방법.
- [0725] 구현예 119. 구현예 1 내지 118 중 어느 하나에 있어서, 상기 퍼센트 편집 효율 비율이 각각의 gRNA 표적 부위에 대해 적어도 80%인, 방법.
- [0726] 구현예 120. 구현예 1 내지 119 중 어느 하나에 있어서, 상기 퍼센트 편집 효율 비율이 각각의 gRNA 표적 부위에 대해 적어도 90%인, 방법.
- [0727] 구현예 121. 구현예 1 내지 120 중 어느 하나에 있어서, 상기 퍼센트 편집 효율 비율이 각각의 gRNA 표적 부위에 대해 적어도 95%인, 방법.
- [0728] 구현예 122. 구현예 1 내지 121 중 어느 하나에 있어서, 상기 접촉된 세포는 T 세포이고, 상기 접촉된 T 세포는 표준 유세포 분석법에 의해 CD27 및 CD45RA를 발현하는 방법.
- [0729] 구현예 123. 구현예 1 내지 122 중 어느 하나에 있어서, 유전자 변형을 포함하는 세포의 개체군을 형성하기 위해 세포를 증식시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0730] 구현예 124. 구현예 1 내지 123 중 어느 하나에 있어서, 상기 편집 또는 변형은 일시적이지 않은, 방법.
- [0731] 구현예 125. 구현예 1 내지 124 중 어느 하나에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 세포는 요법에 사용하기 위한, 방법.
- [0732] 구현예 126. 구현예 1 내지 125 중 어느 하나에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 세포는 암 요법에 사용하기 위한, 방법.
- [0733] 구현예 127. 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법을 사용하여 얻을 수 있는, 유전적으로 변형된 면역 세포.
- [0734] 구현예 128. 구현예 127의 세포를 포함하는 조성물.
- [0735] 구현예 129. 환자에게 구현예 127에 따른 세포 또는 구현예 128에 따른 조성물을 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법.
- [0736] 구현예 130. 암의 치료를 위한, 구현예 129에 따른 치료 방법.

- [0737] 구현예 131. 구현예 130에 있어서, 상기 세포가 암의 세포에 의해 발현되는 폴리펩티드에 대한 특이성을 갖는 TCR을 발현하는, 방법.
- [0738] 구현예 132. 구현예 1 내지 124 중 어느 하나에 따른 생체의 방법을 수행하는 것을 포함하는 치료 방법.
- [0739] 구현예 133. 구현예 1 내지 124 중 어느 하나에 따른 방법을 수행하는 것을 포함하는 치료 방법.
- [0740] 구현예 134. 암 치료를 위한, 구현예 132 또는 133에 따른 치료법.
- [0741] 구현예 135. 세포 은행을 생성하는 방법으로서, 구현예 1 내지 126 중 어느 하나에 따른 방법을 사용하여 세포, 예를 들어 면역 세포를 유전적으로 변형하여 유전적으로 변형된 세포 집단을 얻는 단계, 및 유전적으로 변형된 세포를 세포 은행에 전달하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0742] 구현예 136. 구현예 135에 있어서, 제1 유전적 변형을 포함하는 제1 세포의 개체군, 예를 들어, 면역 세포를 생성하는 단계; 제1 개체군을 적어도 제1 및 제2 하위 집단으로 나누고, 제1 및 제2 하위 집단이 적어도 하나의 공통 유전적 변형 및 적어도 하나의 다른 유전적 변형을 갖도록 구현예 1 내지 135 중 어느 하나에 따른 각각의 상이한 유전적 변형을 추가로 수행하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0743] 구현예 137. 구현예 136에 있어서, 제1 및 제2 하위집단을 세포 은행으로 전달하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0744] 구현예 138. 입양 세포 전달(ACT) 요법에 사용하기 위한, 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군.
- [0745] 구현예 139. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 증가된 편집후 생존율을 갖는, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0746] 구현예 140. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 낮은 독성을 갖는, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0747] 구현예 141. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 2% 미만의 전좌를 갖는, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0748] 구현예 142. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 측정가능한 표적-표적 전좌를 갖지 않는, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0749] 구현예 143. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 사이토카인(IL-2, IFN γ , 및/또는 TNF α)의 생성이 증가된, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0750] 구현예 144. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 반복된 자극으로 향상된 반응 지속성을 갖는, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0751] 구현예 145. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 증가된 확장을 갖는, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0752] 구현예 146. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 기억 세포 표현형을 갖는, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0753] 구현예 147. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 전기천공법과 같은 대안적 방법으로 필적할만한 삼입률을 갖는, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0754] 구현예 148. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 감소된 수 또는 백분율의 편집되지 않은 세포를 갖는, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0755] 구현예 149. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 개선된 세포독성을 갖는, 세포 또는 세포의 개체군.

- [0756] 구현예 150. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예 1 내지 124 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 개선된 증식을 갖는, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0757] 구현예 151. 구현예 138 내지 150 중 어느 하나의 세포 또는 세포 개체군을 포함하는, 약제학적 조성물.
- [0758] 구현예 152. 구현예 138 내지 150 중 어느 하나의 세포 또는 세포 개체군을 투여하는 단계를 포함하는, 이를 필요로 하는 대상체에서의 입양 세포 요법(ACT)의 방법.
- [0759] 하기 비-제한적인 구현예들도 또한 포함된다:
- [0760] 구현예 01 1차 면역 세포를 유전적으로 변형시키는 방법으로서,
- [0761] a. 세포 배양 배지에서 1차 면역 세포를 배양하는 단계;
- [0762] b. 핵산을 포함하는 지질 핵산 어셈블리 조성물을 제공하는 단계;
- [0763] c. 시험관 내에서 (a)의 면역 세포를 (b)의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 조합하는 단계;
- [0764] d. 선택적으로, 면역 세포가 유전적으로 변형되었는지 확인하는 단계; 및
- [0765] e. 선택적으로, 면역 세포를 증식시키는 단계
- [0766] 를 포함하는, 방법.
- [0767] 구현예 02 구현예 1에 있어서, 비-활성화된 면역 세포에 대해 조합 단계(c)를 수행하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0768] 구현예 03 구현예 1에 있어서, 활성화된 면역 세포에 대해 조합 단계(c)를 수행하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0769] 구현예 04 구현예 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 단계 (c) 후에 면역 세포를 활성화시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0770] 구현예 05 구현예 4에 있어서, 상기 활성화 단계는 면역 세포를 항원에 노출시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0771] 구현예 06 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 배양 단계는 하나 이상의 증식성 사이토카인, 예를 들어 IL-2, IL-15 및 IL-21 중 하나 이상 또는 모두, 및/또는 CD3 및/또는 CD28을 통한 활성화를 제공하는 하나 이상의 제제를 포함하는, 방법.
- [0772] 구현예 07 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 면역 세포를 증식시켜서, 유전적 변형을 포함하는 면역 세포의 개체군을 형성시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0773] 구현예 08 구현예 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는:
- [0774] a. 유전자의 발현을 감소시키는 유전적 변형을 포함하고;
- [0775] b. 공여자 핵산의 삽입을 포함하는 유전적 변형을 포함하고;
- [0776] c. 사이토카인(IL-2, 인터페론-감마, TNF- α , 등)의 증가된 분비를 나타내고;
- [0777] d. 증가된 세포독성을 나타내고;
- [0778] e. 증가된 기억 세포 표현형을 나타내고;
- [0779] f. 증가된 확장을 나타내고;
- [0780] g. 반복된 자극에 대해 더 긴 증식 기간을 나타내고/내거나;
- [0781] h. 감소된 전좌율을 나타내는, 방법.
- [0782] 구현예 09 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역 세포는 림프구, 예컨대 T 세포 또는 B 세포인, 방법.
- [0783] 구현예 10 구현예 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서,
- [0784] (b2) 제2 핵산을 포함하는 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물을 제공하는 단계;
- [0785] (c2) 단계 (c)의 유전적으로 변형된 면역 세포를 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 시험관 내에서 조합하는 단계;

- [0786] (d2) 선택적으로, 유전적 변형을 위한 제2 핵산을 사용하여, 면역 세포가 유전적으로 변형되었는지 확인하는 단계; 및
- [0787] 선택적으로, 면역 세포를 증식시키는 단계
- [0788] 를 추가로 포함하는, 방법.
- [0789] 구현예 11 구현예 10에 있어서,
- [0790] (b3) 제3 핵산을 포함하는 제3 지질 핵산 어셈블리 조성물을 제공하는 단계;
- [0791] (c3) 단계 (c2)의 유전적으로 변형된 면역 세포를 제3 지질 핵산 어셈블리 조성물과 시험관 내에서 조합하는 단계;
- [0792] (d2) 선택적으로, 유전적 변형을 위한 제3 핵산을 사용하여, 면역 세포가 유전적으로 변형되었는지 확인하는 단계; 및
- [0793] (e) 선택적으로, 면역 세포를 증식시키는 단계
- [0794] 를 추가로 포함하는, 방법.
- [0795] 구현예 12 구현예 10 또는 11에 있어서, 단계 (c) 및 (c2), 및 존재하는 경우 단계 (c3)가 순차적으로 수행되는, 방법.
- [0796] 구현예 13 구현예 10 또는 11에 있어서, 단계 (c) 및 (c2), 및 존재하는 경우 단계 (c3)가 동시에 수행되는 방법.
- [0797] 구현예 14 구현예 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 핵산은 RNA-가이드 DNA 결합체에 의해 수행되는 유전적 변형에 대한 가이드 서열인, 방법.
- [0798] 구현예 15 구현예 14에 있어서, 상기 RNA-가이드 DNA 결합체가 CRISPR/Cas9 단백질인, 방법.
- [0799] 구현예 16 구현예 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물이 공여자 주형을 암호화하는 벡터를 추가로 포함하는, 방법.
- [0800] 구현예 17 구현예 16에 있어서, 상기 공여자 주형은 T 세포 수용체 유전자좌의 상응하는 영역과 상동성을 갖는 영역을 포함하는, 방법.
- [0801] 구현예 18 구현예 16 또는 17에 있어서, 상기 공여자 주형은 TRAC 유전자좌, B2M 유전자좌, AAVS1 유전자좌, 및 /또는 CIITA 유전자좌의 상응하는 영역과 상동성을 갖는 영역을 포함하는 방법.
- [0802] 구현예 19 구현예 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 면역 세포의 활성화 전에 면역 세포에 대해 다수의 유전적 변형이 수행되는, 방법.
- [0803] 구현예 20 구현예 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역 세포는 인간 세포인, 방법.
- [0804] 구현예 21 구현예 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역 세포는 기억 T 세포, 또는 나이브 세포인, 방법.
- [0805] 구현예 22 구현예 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역 세포는 CD4+ T 세포인, 방법.
- [0806] 구현예 23 구현예 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역 세포는 CD8+ T 세포인, 방법.
- [0807] 구현예 24 구현예 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 상기 면역 세포는 B 세포인, 방법.
- [0808] 구현예 25 구현예 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 생체의 방법인, 방법.
- [0809] 구현예 26 구현예 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 지질 핵산 어셈블리 조성물을 혈청 인자와 조합하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0810] 구현예 27 구현예 26에 있어서, 지질 핵산 어셈블리 조성물을 혈청 인자와 조합하는 단계를 조성물을 면역 세포와 조합하기 전에 발생하는, 방법.
- [0811] 구현예 28 구현예 26 또는 27에 있어서, 상기 혈청 인자는 ApoE인, 방법.

- [0812] 구현예 29 구현예 28에 있어서, 상기 혈청 인자는 재조합 ApoE3 또는 ApoE4인, 방법.
- [0813] 구현예 30 구현예 26 또는 27에 있어서, 상기 혈청 인자는 영장류 혈청, 예컨대 인간 혈청에 의해 포함되는, 방법.
- [0814] 구현예 31 구현예 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 유전적으로 변형된 T 세포 수용체를 발현하도록 T 세포를 유전적으로 변형시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0815] 구현예 32 구현예 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 내인성 T 세포 수용체의 발현을 감소시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0816] 구현예 33 구현예 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 면역 세포는 요법에 사용하기 위한 것인, 방법.
- [0817] 구현예 34 구현예 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 면역 세포는 암 요법에 사용하기 위한 것인, 방법.
- [0818] 구현예 35 구현예 1 내지 34 중 어느 하나에 따른 방법을 사용하여 면역 세포를 유전적으로 변형하여 유전적으로 변형된 세포 집단을 얻는 단계, 및 유전적으로 변형된 세포를 세포 은행으로 이전하는 단계를 포함하는, 세포 은행을 생성하는 방법.
- [0819] 구현예 36 구현예 35에 있어서, 제1 유전적 변형을 포함하는 면역 세포의 제1 개체군을 생성하는 단계; 제1 개체군을 적어도 제1 및 제2 하위-개체군으로 나누는 단계 및 구현예 1 내지 34 중 어느 하나에 따른 각각의 상이한 유전적 변형을 추가로 수행하여 제1 및 제2 하위-개체군이 적어도 하나의 공통 유전적 변형 및 적어도 하나의 상이한 유전적 변형을 갖도록 하는, 방법.
- [0820] 구현예 37 구현예 36에 있어서, 제1 및 제2 개체군을 세포 은행으로 전달하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0821] 구현예 38 구현예 1 내지 34 중 어느 하나의 방법을 사용하여 수득가능한, 유전적으로 변형된 면역 세포.
- [0822] 구현예 39 구현예 38에 있어서, 적어도 3개의 별개의 유전적 변형을 도입하도록 유전적으로 변형된, 세포.
- [0823] 구현예 40 구현예 38 또는 39에 따른 면역 세포를 포함하는 조성물.
- [0824] 구현예 41 구현예 38 또는 39에 따른 면역 세포 또는 구현예 40에 따른 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법.
- [0825] 구현예 42 구현예 41에 있어서, 암 치료를 위한 방법.
- [0826] 구현예 43 구현예 1 내지 34 중 어느 하나에 따른 생체의 방법을 수행하는 단계를 포함하는, 치료 방법.
- [0827] 구현예 44 구현예 1 내지 34 중 어느 하나에 따른 방법을 수행하는 단계를 포함하는, 치료 방법.
- [0828] 구현예 45 암 치료를 위한, 구현예 43 또는 44에 따른 치료 방법.
- [0829] 하기 비-제한적인 구현예도 또한 포함된다:
- [0830] 구현예_A 1. 시험관내-배양된 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하기 위한 방법으로서:
- [0831] a. 세포를 시험관 내에서 적어도 제1 및 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물이 제1 표적 서열에 대한 제1 가이드 RNA(gRNA) 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하고, 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물이 제1 표적 서열과 상이한 제2 표적 서열에 대한 제2 gRNA 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계;
- [0832] b. 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계;
- [0833] 에 의해, 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 단계
- [0834] 를 포함하는, 방법.
- [0835] 구현예_A 2. 구현예_A 1에 있어서, 상기 세포는 게놈 편집 도구를 포함하는 적어도 하나의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되는, 방법.
- [0836] 구현예_A 3. 구현예_A 2에 있어서, 상기 게놈 편집 도구는 RNA-가이드 DNA 결합제를 암호화하는 핵산을 포함하

는, 방법.

- [0837] 구현예_A 4. 구현예_A 1에 있어서, 상기 세포는 표적 서열에 삽입하기 위해 공여자 핵산과 추가로 접촉되는, 방법.
- [0838] 구현예_A 5. 구현예_A 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 순차적으로 투여되는, 방법.
- [0839] 구현예_A 6. 구현예_A 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 동시에 투여되는, 방법.
- [0840] 구현예_A 7. 지질 핵산 어셈블리 조성물을 시험관내-배양된 세포에 전달하는 방법으로서:
- [0841] a. 시험관내 세포를 제1 핵산을 포함하는 적어도 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시켜, 접촉된 세포를 생산하는 단계;
- [0842] b. 상기 접촉된 세포를 시험관내에서 배양하여, 배양된 접촉된 세포를 생산하는 단계;
- [0843] c. 상기 배양된 접촉된 세포를 시험관내에서 제2 핵산을 포함하는 적어도 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 제2 핵산이 제1 핵산과 상이한 단계; 및
- [0844] d. 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계로서; 상기 확장된 세포가 증가된 생존을 나타내는, 단계를 포함하는 방법.
- [0845] 구현예_A 8. 구현예 7에 있어서, 상기 확장된 세포가 적어도 70%의 생존율을 갖고, 선택적으로 생존율은 확장 24시간에 적어도 70%인, 방법.
- [0846] 구현예_A 9. 구현예_A 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 2~12개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되는, 방법.
- [0847] 구현예_A 10. 구현예_A 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 2~8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되는, 방법.
- [0848] 구현예_A 11. 구현예_A 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 2~6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되는, 방법.
- [0849] 구현예_A 12. 구현예_A 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 3~8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되는, 방법.
- [0850] 구현예_A 13. 구현예_A 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 3~6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되는, 방법.
- [0851] 구현예_A 14. 구현예_A 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 4~6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되는, 방법.
- [0852] 구현예_A 15. 구현예_A 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 6~12개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되는, 방법.
- [0853] 구현예_A 16. 구현예_A 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 3, 4, 5, 또는 6개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되는, 방법.
- [0854] 구현예_A 17. 구현예_A 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 지질 핵산 어셈블리 조성물과 동시에 접촉되는, 방법.
- [0855] 구현예_A 18. 구현예_A 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 6개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 동시에 접촉되는, 방법.
- [0856] 구현예_A 19. 구현예_A 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 2개 이하의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 동시에 접촉되는, 방법.
- [0857] 구현예_A 20. 세포내 유전자 편집 방법으로서:
- [0858] a. 세포를 시험관 내에서 제1 게놈 편집 도구를 포함하는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물 및 제2 게놈 편집 도

구를 포함하는 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계; 및

b. 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계

에 의해 세포를 편집하는 단계를 포함하는 방법.

구현예_A 21. 구현예_A 20에 있어서, 상기 제1 게놈 편집 도구는 가이드 RNA를 포함하는, 방법.

구현예_A 22. 구현예_A 20 또는 21에 있어서, 제3 지질 핵산 어셈블리 조성물과 시험관 내에서 세포와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하고, 게놈 편집 도구를 포함하고, 적어도 2개의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 gRNA를 포함하는, 방법.

구현예_A 23. 구현예_A 20 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA-가이드 DNA 결합제를 포함하는, 방법.

구현예_A 24. 구현예_A 23에 있어서, 상기 RNA-가이드 DNA 결합제는 Cas9인, 방법.

구현예_A 25. 구현예_A 20 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 세포를 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

구현예_A 26. 구현예_A 20 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 상기 제2 게놈 편집 도구가 RNA-가이드 DNA 결합제, 예컨대 스트렙토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*) Cas9인, 방법.

구현예_A 27. 구현예_A 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 면역 세포인, 방법.

구현예_A 28. 구현예_A 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 림프구인, 방법.

구현예_A 29. 구현예_A 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 T 세포인, 방법.

구현예_A 30. 구현예_A 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 비-활성화된 세포인, 방법.

구현예_A 31. 구현예_A 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 활성화된 세포인, 방법.

구현예_A 32. 구현예_A 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, (a)의 세포는 적어도 하나의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉된 후 활성화되는, 방법.

구현예_A 33. 시험관내-배양된 T 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 방법으로서:

a. T 세포를 시험관 내에서 (i) 제1 표적 서열에 대한 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물 및 선택적으로 (ii) 1 또는 2개의 추가적인 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 각각의 추가적인 지질 핵산 어셈블리 조성물이 제1 표적 서열 및/또는 게놈 편집 도구와 상이한 표적 서열에 대한 gRNA를 포함하는, 단계;

b. T 세포를 시험관 내에서 활성화시키는 단계;

c. 활성화된 T 세포를 시험관 내에서 (i) (a)의 표적 서열(들)과 상이한 표적 서열에 대한 추가의 가이드 RNA를 포함하는 추가의 핵산 어셈블리 조성물 및 선택적으로 (ii) 하나 이상의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계로서, 각각의 지질 핵산 어셈블리 조성물이 (a)의 표적 서열(들)과 상이하고, 서로 상이한 표적 서열에 대한 가이드 RNA 및/또는 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계;

d. 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계

에 의해 T 세포에서 다중 게놈 편집을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.

구현예_A 34. 구현예_A 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포 또는 T 세포를 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 11개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

구현예_A 35. 구현예_A 1 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포 또는 T 세포를 4-12개 또는 4-8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

구현예_A 36. 구현예_A 33 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포 또는 단계 (a)의 T 세포는 2개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되며, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물은 순차적으로 또는 동시에 투여되는, 방법.

구현예_A 37. 구현예_A 33 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 상기 단계 (a)의 세포 또는 T 세포는 3개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되며, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물은: (i) 순차적으로; (ii) 동시에; 또는

(iii) 동시에(2개의 조성물) 및 순차적으로(전 또는 후에 투여되는 1개의 조성물) 투여되는, 방법.

- [0883] 구현예_A 38. 구현예_A 33 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 상기 단계 (c)의 세포 또는 T 세포는 1 내지 8개의 지질 핵산 어셈블리 조성물, 선택적으로 1 내지 4개의 지질 핵산 어셈블리 조성물과 접촉되며, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물은: (i) 순차적으로; (ii) 동시에; 또는 (iii) 동시에(적어도 2개의 조성물) 및 순차적으로(전 또는 후에 투여되는 적어도 하나의 조성물) 투여되는, 방법.
- [0884] 구현예_A 39. 구현예_A 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 MHC 클래스 I의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0885] 구현예_A 40. 구현예_A 1 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0886] 구현예_A 41. 구현예_A 1 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 HLA-A의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0887] 구현예_A 42. 구현예_A 1 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 HLA-A를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0888] 구현예_A 43. 구현예 98에 있어서, 상기 세포는 HLA-B에 대해 동형접합성이고, HLA-C에 대해 동형접합성인, 방법.
- [0889] 구현예_A 44. 구현예_A 1 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 MHC 클래스 II의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0890] 구현예_A 45. 구현예_A 1 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0891] 구현예_A 46. 구현예_A 1 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 그리고 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0892] 구현예_A 47. 구현예_A 1 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 그리고 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0893] 구현예_A 48. 구현예_A 1 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 그리고 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 HLA-A를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0894] 구현예_A 49. 구현예_A 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함하고, 그리고 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0895] 구현예_A 50. 구현예_A 1 내지 49 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRAC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물 중 하나는 TRBC를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 HLA-A를 표적화하는 gRNA를 포함하고, 그리고 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [0896] 구현예_A 51. 구현예_A 94 내지 106 중 어느 하나에 있어서, 상기 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 RNA 가이드 DNA 결합체, 선택적으로 Cas9를 포함하는, 방법.
- [0897] 구현예_A 52. 구현예_A 94 내지 107 중 어느 하나에 있어서, 상기 추가의 지질 핵산 어셈블리 조성물은 공여자 핵산을 포함하는, 방법.
- [0898] 구현예_A 53. 구현예 108에 있어서, 상기 공여자 핵산은 표적화 수용체를 포함하는, 방법.
- [0899] 구현예_A 54. 구현예_A 1 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 아민 지질을 포함하고, 여기서 아민 지질은 지질 A 또는 그의 아세탈 유사체; WO2020219876에 제공된 아민 지질을 포함하거나,

또는 상기 아민 지질은 W02020072605에 제공된 지질 D 또는 아민 지질인, 방법.

- [0900] 구현예_A 55. 구현예_A 1 내지 54중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 헬퍼 지질을 포함하는, 방법.
- [0901] 구현예_A 56. 구현예_A 1 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은 스텔스 지질을 포함하고, 선택적으로:
- [0902] (i) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50-60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A[또는 지질 D], 약 8-10 mol% 중성 지질; 및 약 2.5-4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6이거나;
- [0903] (ii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 약 50-60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A[또는 지질 D]; 약 27-39.5 mol% 헬퍼 지질; 약 8-10 mol% 중성 지질; 및 약 2.5-4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 5-7(예를 들어, 약 6)이거나;
- [0904] (iii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50-60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A[또는 지질 D]; 약 5-15 mol% 중성 지질; 및 약 2.5-4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3-10이거나;
- [0905] (iv) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 40-60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A[또는 지질 D]; 약 5-15 mol% 중성 지질; 및 약 2.5-4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6이거나;
- [0906] (v) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50-60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A[또는 지질 D]; 약 5-15 mol% 중성 지질; 및 약 1.5-10 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 6이거나;
- [0907] (vi) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 40-60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A[또는 지질 D]; 약 0-10 mol% 중성 지질; 및 약 1.5-10 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3-10이거나;
- [0908] (vii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 40-60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A[또는 지질 D]; 약 1 mol% 미만 중성 지질; 및 약 1.5-10 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3-10이거나;
- [0909] (viii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 40-60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A[또는 지질 D]; 및 약 1.5-10 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3-10이며, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물은 중성 인지질이 본질적으로 없거나 없거나; 또는
- [0910] (ix) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 50-60 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A[또는 지질 D]; 약 8-10 mol% 중성 지질; 및 약 2.5-4 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하고, 여기서 지질 성분의 나머지는 헬퍼 지질이고, 여기서 지질 핵산 어셈블리 조성물의 N/P 비율은 약 3-7이거나;
- [0911] (x) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 25-45 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 10-30 mol% 중성 지질; 약 25-65 mol% 헬퍼 지질; 및 약 1.5-3.5 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하거나;
- [0912] (xi) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 29-44 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 11-28 mol% 중성 지질; 약 28-55 mol% 헬퍼 지질; 및 약 2.3-3.5 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하거나;
- [0913] (xii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 29-38 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 11-20 mol% 중성 지질; 약 43-55 mol% 헬퍼 지질; 및 약 2.3-2.7 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하거나;
- [0914] (xiii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 25-34 mol% 아민 지질 예컨대 지

질 A; 약 10-20 mol% 중성 지질; 약 45-65 mol% 헬퍼 지질; 및 약 2.5-3.5 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하거나;

[0915] (xiv) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 30-43 mol% 아민 지질 예컨대 지질 A; 약 10-17 mol% 중성 지질; 약 43.5-56 mol% 헬퍼 지질; 및 약 1.3-3 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하거나;

[0916] (xv) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 25-50 mol% 아민 지질 예컨대 지질 D; 약 7-25 mol% 중성 지질; 약 39-65 mol% 헬퍼 지질; 및 약 0.5-1.8 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하거나;

[0917] (xvi) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 27-40 mol% 아민 지질 예컨대 지질 D; 약 10-20 mol% 중성 지질; 약 50-60 mol% 헬퍼 지질; 및 약 0.9-1.6 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하거나; 또는

[0918] (xvii) 지질 핵산 어셈블리 조성물은 지질 성분을 포함하고, 지질 성분은: 약 30-45 mol% 아민 지질 예컨대 지질 D; 약 10-15 mol% 중성 지질; 약 39-59 mol% 헬퍼 지질; 및 약 1-1.5 mol% 스텔스 지질(예를 들어, PEG 지질)을 포함하는, 방법.

[0919] 구현예_A 57. 구현예_A 1 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 아민 지질이 지질 A 또는 지질 D인, 방법.

[0920] 구현예_A 58. 구현예_A 1 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP가 약 1-250 nm, 10-200 nm, 약 20-150 nm, 약 50-150 nm, 약 50-100 nm, 약 50-120 nm, 약 60-100 nm, 약 75-150 nm, 약 75-120 nm, 또는 약 75-100 nm의 직경을 갖거나; 또는 상기 LNP가 100 nm 미만의 직경을 갖는, 방법.

[0921] 구현예_A 59. 구현예_A 1 내지 58 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 약 10-200 nm, 약 20-150 nm, 약 50-150 nm, 약 50-100 nm, 약 50-120 nm, 약 60-100 nm, 약 75-150 nm, 약 75-120 nm, 또는 약 75-100 nm의 평균 직경을 갖는 LNP의 개체군을 포함하거나, 또는 LNP의 개체군은 100 nm 미만의 평균 직경을 갖는, 방법.

[0922] 구현예_A 60. 구현예_A 1 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 상기 지질 핵산 어셈블리 조성물은:

[0923] a. 약 50-60 mol-% 아민 지질;

[0924] b. 약 5-15 mol-% DSPC; 및

[0925] c. 약 2.5-4 mol-% PEG 지질을 포함하고,

[0926] 지질 성분의 나머지는 콜레스테롤이고,

[0927] LNP 조성물의 N/P 비율은 $3-8 \pm 0.2$ 인, 방법.

[0928] 구현예_A 61. 구현예_A 1 내지 60 중 어느 하나에 있어서, 상기 평균 직경은 Z-평균 직경인, 방법.

[0929] 구현예_A 62. 구현예_A 1 내지 61 중 어느 하나에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 세포는:

[0930] a. 유전자의 발현을 감소시키는 유전적 변형을 포함하고;

[0931] b. 공여자 핵산의 삽입을 포함하는 유전적 변형을 포함하고;

[0932] c. 사이토카인(IL-2, IFN γ , 및/또는 TNF α)의 증가된 분비를 나타내고;

[0933] d. 증가된 세포독성을 나타내고;

[0934] e. 증가된 기억 세포 표현형을 나타내고;

[0935] f. 증가된 확장을 나타내고;

[0936] g. 반복된 자극에 대해 더 긴 증식 기간을 나타내고/내거나;

[0937] h. 감소된 전좌율을 나타내고;

[0938] 선택적으로 상기 특성이 청구된 방법 이외의 방법에 의해 제조된 유전적으로 변형된 세포에 상대적인, 방법.

[0939] 구현예_A 63. 구현예_A 1 내지 62 중 어느 하나에 있어서, 상기 접촉된 세포가 증가된 생존을 나타내고, 증가된 생존은 적어도 70%의 형질감염 후, 예를 들어 LNP 조성물과 마지막 접촉한 지 24시간 후 세포 생존율인, 방법.

- [0940] 구현예_A 64. 구현예_A 1 내지 63 중 어느 하나에 있어서, 상기 접촉된 세포가 증가된 생존을 나타내고, 증가된 생존은 적어도 80%의 형질감염 후, 예를 들어 LNP 조성물과 마지막 접촉한 지 24시간 후 세포 생존율인, 방법.
- [0941] 구현예_A 65. 구현예_A 1 내지 64 중 어느 하나에 있어서, 상기 접촉된 세포가 증가된 생존을 나타내고, 증가된 생존은 적어도 90%의 형질감염 후, 예를 들어 LNP 조성물과 마지막 접촉한 지 24시간 후 세포 생존율인, 방법.
- [0942] 구현예_A 66. 구현예_A 1 내지 65 중 어느 하나에 있어서, 상기 접촉된 세포가 증가된 생존을 나타내고, 증가된 생존은 적어도 95%의 형질감염 후, 예를 들어 LNP 조성물과 마지막 접촉한 지 24시간 후 세포 생존율인, 방법.
- [0943] 구현예_A 67. 구현예_A 1 내지 66 중 어느 하나에 있어서, 예를 들어, 전좌가 표적-표적 전좌인 경우, 상기 접촉된 세포는 1% 미만 전좌, 0.5% 미만 전좌, 0.1% 미만 전좌, 또는 2배 미만의 편집 후 배경 전좌 수를 갖는, 방법.
- [0944] 구현예_A 68. 구현예_A 1 내지 67 중 어느 하나에 있어서, 상기 유전적으로 변형된 세포가 암 요법, 또는 선택적으로 자가면역 요법에서 사용하기 위한 것인, 방법.
- [0945] 구현예_A 69. 구현예_A 1 내지 68 중 어느 하나의 방법을 사용하여 수득가능한, 유전적으로 변형된 면역 세포.
- [0946] 구현예_A 70. 구현예_A 69의 세포를 포함하는 조성물.
- [0947] 구현예_A 71. 구현예_A 69에 따른 세포 또는 구현예_A70에 따른 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 치료 방법.
- [0948] 구현예_A 72. 암 치료 또는 선택적으로 자가면역 요법을 위한 구현예_A 71에 따른 치료 방법.
- [0949] 구현예_A 73. 구현예_A72에 있어서, 상기 세포가 암 세포에 의해 발현되는 폴리펩티드에 대한 특이성을 갖는 TCR을 발현하는, 방법.
- [0950] 구현예_A 74. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예_A 1 내지 159 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 낮은 독성을 가지며, 즉, 세포 또는 세포의 개체군이 세포에 대한 낮은 독성을 가지도록 하는데 사용된 방법은 세포에 대한 낮은 수준의 독성을 가져서 높은 수준의 생존력을 갖는 세포를 생성하는, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0951] 구현예_A 75. ACT 요법으로서 사용하기 위한 구현예_A 1 내지 67 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 세포 또는 세포의 개체군으로서, 상기 세포 또는 세포의 개체군은 2% 미만 전좌, 1% 미만 전좌, 0.5% 미만 전좌, 또는 0.1% 미만 전좌, 예를 들어, 표적-표적 전좌; 또는 전좌 배경 수준의 2배 미만을 갖는, 세포 또는 세포의 개체군.
- [0952] 하기 비-제한적인 구현예도 또한 포함된다:
- [0953] 구현예_B 1. 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군의 생성 방법으로서, B 세포 개체군을 시험관내에서 배양하는 단계 및 개체군을 게놈 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 지질 나노입자(LNP)와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0954] 구현예_B 2. 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군의 생성 방법으로서, B 세포 개체군을 시험관내에서 배양하는 단계 및 개체군을 i) 게놈 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 지질 나노입자(LNP); 및 ii) DNA-PK 억제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [0955] 구현예_B 3. 구현예_B 1 또는 2에 있어서, 상기 편집된 B 세포가 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는, 방법.
- [0956] 구현예_B 4. 구현예_B 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 접촉 단계 이전에 B 세포의 개체군을 활성화시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0957] 구현예_B 5. 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포 개체군을 생성하는 방법으로서, B 세포 개체군을 시험관 내에서 배양하는 단계 및 개체군을 게놈 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 지질 나노입자(LNP)와 접촉시키기 전에 B 세포를 활성화시키는 단계를 포함하고, 여기서 개체군은 활성화와 동일한 날 또는 활성화 후 10일까지 하나 이상의 LNP와 접촉되는, 방법.
- [0958] 구현예_B 6. 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군의 생성 방법으로서:
- [0959] a. B 세포 개체군을 시험관 내에서 배양하는 단계;

- [0960] b. 시험관내에서 B 세포의 개체군을 활성화시키는 단계;
- [0961] c. b)의 B 세포의 개체군을 시험관 내에서 하나 이상의 지질 나노입자(LNP)와 접촉시키는 단계로서, 상기 LNP가 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계; 및
- [0962] d. B 세포의 개체군을 DNA-PK 억제제와 접촉시키는 단계
- [0963] 에 의해 편집된 B 세포의 개체군을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.
- [0964] 구현예_B 7. 구현예_B 5 또는 6에 있어서, 상기 편집된 B 세포는 세포 당 다중 게놈 편집을 포함하는, 방법.
- [0965] 구현예_B 8. 구현예_B 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 CD40L을 포함하는 작용제를 사용하여 활성화되는, 방법.
- [0966] 구현예_B 9. 구현예_B 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 CpG로 활성화되는, 방법.
- [0967] 구현예_B 10. 구현예_B 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 인간 혈청을 포함하는 배지에서 활성화되는, 방법.
- [0968] 구현예_B 11. 구현예_B 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 동일한 날 또는 활성화 후 최대 10일까지 시험관 내에서 하나 이상의 LNP와 접촉되는, 방법.
- [0969] 구현예_B 12. 구현예_B 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 활성화와 동일한 날에 하나 이상의 LNP와 시험관내에서 접촉되는, 방법.
- [0970] 구현예_B 13. 구현예_B 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 활성화 후 1일에 하나 이상의 LNP와 시험관내에서 접촉되는, 방법.
- [0971] 구현예_B 14. 구현예_B 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 활성화 후 2일에 하나 이상의 LNP와 시험관내에서 접촉되는, 방법.
- [0972] 구현예_B 15. 구현예_B 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 활성화 후 3일에 하나 이상의 LNP와 시험관내에서 접촉되는, 방법.
- [0973] 구현예_B 16. 구현예_B 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 활성화 후 4일에 하나 이상의 LNP와 시험관내에서 접촉되는, 방법.
- [0974] 구현예_B 17. 구현예_B 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 활성화 후 5일에 하나 이상의 LNP와 시험관내에서 접촉되는, 방법.
- [0975] 구현예_B 18. 구현예_B 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 활성화 후 6일에 하나 이상의 LNP와 시험관내에서 접촉되는, 방법.
- [0976] 구현예_B 19. 구현예_B 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 활성화 후 7일에 하나 이상의 LNP와 시험관내에서 접촉되는, 방법.
- [0977] 구현예_B 20. 구현예_B 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 활성화 후 8일에 하나 이상의 LNP와 시험관내에서 접촉되는, 방법.
- [0978] 구현예_B 21. 구현예_B 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 활성화 후 9일에 하나 이상의 LNP와 시험관내에서 접촉되는, 방법.
- [0979] 구현예_B 22. 구현예_B 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 상기 B 세포의 개체군이 활성화되고, B 세포의 개체군이 활성화 후 10일에 하나 이상의 LNP와 시험관내에서 접촉되는, 방법.
- [0980] 구현예_B 23. 구현예_B 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, B 세포의 개체군을 LNP와 접촉시키기 전에 LNP가 ApoE와 사전인큐베이션되는, 방법.
- [0981] 구현예_B 24. 구현예_B 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, B 세포의 개체군을 LNP와 접촉시키기 전에 LNP가 ApoE3와 사전인큐베이션되는, 방법.
- [0982] 구현예_B 25. 구현예_B 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, B 세포의 개체군을 LNP와 접촉시키기 전에 LNP가

ApoE4와 사전인큐베이션되는, 방법.

- [0983] 구현예_B 26. 구현예_B 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, B 세포의 개체군이 2.5-10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 총 RNA 카고를 포함하는 LNP와 접촉되는, 방법.
- [0984] 구현예_B 27. 구현예_B 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, B 세포의 개체군은 2-10 LNP, 예를 들어, 2개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [0985] 구현예_B 28. 구현예_B 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, B 세포의 개체군은 3개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [0986] 구현예_B 29. 구현예_B 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, B 세포의 개체군은 4개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [0987] 구현예_B 30. 구현예_B 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, B 세포의 개체군은 5개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [0988] 구현예_B 31. 구현예_B 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서, B 세포의 개체군은 6개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [0989] 구현예_B 32. 구현예_B 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 표적 서열로의 삽입을 위해 B 세포의 개체군을 공여 자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [0990] 구현예_B 33. 구현예_B 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 또는 80%를 포함하는 B 세포의 개체군을 생성하는, 방법.
- [0991] 구현예_B 34. 구현예_B 33에 있어서, 상기 게놈 편집은 인텔 또는 염기 편집을 포함하고, B 세포의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 또는 80%를 포함하는, 방법.
- [0992] 구현예_B 35. 구현예_B 33 또는 34에 있어서, 상기 게놈 편집은 외인성 핵산 서열의 표적 서열로의 삽입을 포함하고, B 세포의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 20%, 30%, 또는 40%를 포함하는, 방법.
- [0993] 구현예_B 36. 구현예_B 33 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 개체군은 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하는 편집된 B 세포를 포함하고, 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 또는 60%는 두 게놈 편집을 포함하는, 방법.
- [0994] 구현예_B 37. 구현예_B 1 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군을 생성하고, 세포의 1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [0995] 구현예_B 38. 구현예_B 1 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군을 생성하고, 세포의 0.5% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [0996] 구현예_B 39. 구현예_B 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군을 생성하고, 세포의 0.2% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [0997] 구현예_B 40. 구현예_B 1 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군을 생성하고, 세포의 0.1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [0998] 구현예_B 41. 구현예_B 1 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군을 생성하고, 상기 편집된 세포는 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만인, 방법.
- [0999] 구현예_B 42. 구현예_B 1 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 상기 편집된 B 세포는 기억 B 세포를 포함하는, 방법.
- [1000] 구현예_B 43. 구현예_B 1 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 상기 편집된 B 세포는 형질모세포를 포함하는, 방법.
- [1001] 구현예_B 44. 구현예_B 1 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 편집된 B 세포는 형질 세포를 포함하는, 방법.
- [1002] 구현예_B 45. 구현예_B 1 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 MHC 클래스 I의 표면 발현을 감소시키는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [1003] 구현예_B 46. 구현예_B 1 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 B2M을 표적화하는 gRNA를

포함하는, 방법.

- [1004] 구현예_B 47. 구현예_B 1 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합제, 예컨대 Cas9, 선택적으로 스트렙토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*) Cas9를 암호화하는 mRNA를 포함하는, 방법.
- [1005] 구현예_B 48. 구현예_B 1 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합제를 암호화하는 mRNA를 포함하고, RNA 가이드-DNA 결합제는 니카제인, 방법.
- [1006] 구현예_B 49. 구현예_B 1 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합제를 암호화하는 mRNA를 포함하고, 상기 RNA 가이드-DNA 결합제가 클레아바제인, 방법.
- [1007] 구현예_B 50. 구현예_B 1 내지 49 중 어느 하나에 있어서, 방법은 선택 단계, 선택적으로 물리적 선택 단계 또는 생화학적 선택 단계를 포함하지 않는, 방법.
- [1008] 구현예_B 51. 구현예_B 1 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 생체외에서 수행되는, 방법.
- [1009] 구현예_B 52. 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 B 세포의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%를 포함하는, 방법.
- [1010] 구현예_B 53. 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 B 세포의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 또는 80%를 포함하고, 상기 게놈 편집은 인텔 또는 염기 편집을 포함하는, 조성물.
- [1011] 구현예_B 54. 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 B 세포의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 20%, 30%, 또는 40%를 포함하고, 상기 게놈 편집은 외인성 핵산의 표적 서열로의 삽입을 포함하는, 조성물.
- [1012] 구현예_B 55. 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 B 세포의 개체군은 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 또는 60%를 포함하는, 조성물.
- [1013] 구현예_B 56. 구현예_B52 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 세포의 1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1014] 구현예_B 57. 구현예_B52 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 세포의 0.5% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1015] 구현예_B 58. 구현예_B52 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 세포의 0.2% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1016] 구현예_B 59. 구현예_B52 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 0.1% 미만의 세포가 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1017] 구현예_B 60. 구현예_B52 내지 59 중 어느 하나에 있어서, 세포가 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만인, 조성물.
- [1018] 구현예_B 61. 구현예_B52 내지 60 중 어느 하나에 있어서, 상기 편집된 B 세포가 기억 B 세포를 포함하는, 조성물.
- [1019] 구현예_B 62. 구현예_B52 내지 61 중 어느 하나에 있어서, 상기 편집된 B 세포가 형질모세포를 포함하는, 조성물.
- [1020] 구현예_B 63. 구현예_B52 내지 62 중 어느 하나에 있어서, 상기 편집된 B 세포가 형질 세포를 포함하는, 조성물.
- [1021] 구현예_B 64. 편집된 B 세포를 포함하는 B 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 편집된 B 세포는 구현예_B1 내지 51 중 어느 하나의 방법에 의해 얻어지거나 얻을 수 있는, 조성물.
- [1022] 하기 비-제한적인 구현예도 또한 포함된다:
- [1023] 구현예_C 1. 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포의 개체군의 생성 방법으로서, NK 세포의 개체군을 시험관 내에서 배양하는 단계 및 개체군을 게놈 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 지질 나노입자(LNP)와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [1024] 구현예_C 2. 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포의 개체군의 생성 방법으로서, NK 세포의 개체군을 시험관 내에서 배양하는 단계 및 개체군을 i) 게놈 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 지질 나노입자(LNP); 및 ii) DNA-PK 억제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

- [1025] 구현예_C 3. 구현예_C 1 또는 2에 있어서, 상기 편집된 NK 세포는 세포 당 다중 게놈 편집을 포함하는, 방법.
- [1026] 구현예_C 4. 구현예_C 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 접촉 단계 이전에 NK 세포의 개체군을 활성화시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [1027] 구현예_C 5. 구현예_C 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 접촉 단계 이전에 NK 세포의 개체군을 활성화시키는 단계를 추가로 포함하고, 상기 개체군은 활성화 후 적어도 3일에 하나 이상의 LNP와 접촉되는, 방법.
- [1028] 구현예_C 6. 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포 개체군을 생성하는 방법으로서:
- [1029] a. NK 세포의 개체군을 시험관 내에서 배양하는 단계;
- [1030] b. NK 세포의 개체군을 시험관 내에서 활성화시키는 단계;
- [1031] c. b)의 NK 세포의 개체군을 시험관 내에서 하나 이상의 지질 나노입자(LNP)와 접촉시키는 단계로서, LNP가 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계; 및
- [1032] d. NK 세포의 개체군을 DNA-PK 억제제와 접촉시키는 단계
- [1033] 에 의해 편집된 NK 세포의 개체군을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.
- [1034] 구현예_C 7. 구현예_C 6에 있어서, 상기 편집된 NK 세포가 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는, 방법.
- [1035] 구현예_C 8. 구현예_C 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, NK 세포의 개체군이 활성화되고, 상기 NK 세포의 개체군이 피더 세포 및 사이토카인으로 활성화되는, 방법.
- [1036] 구현예_C 9. 구현예_C 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, NK 세포의 개체군이 활성화되고, 상기 NK 세포의 개체군이 피더 세포 및 사이토카인으로 활성화되고, 단계 a)에서 NK 세포 대 피더 세포의 비율이 1:1인, 방법.
- [1037] 구현예_C 10. 구현예_C 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, NK 세포의 개체군이 활성화되고, 상기 NK 세포의 개체군이 피더 세포 및 사이토카인으로 활성화되고, 사이토카인이 IL-2를 포함하는, 방법.
- [1038] 구현예_C 11. 구현예_C 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, NK 세포의 개체군이 활성화되고, 상기 NK 세포의 개체군이 피더 세포 및 사이토카인으로 활성화되고, 사이토카인이 IL-15를 포함하는, 방법.
- [1039] 구현예_C 12. 구현예_C 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, NK 세포의 개체군이 활성화되고, 상기 NK 세포의 개체군이 피더 세포 및 사이토카인으로 활성화되고, 사이토카인이 IL-21을 포함하는, 방법.
- [1040] 구현예_C 13. 구현예_C 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, NK 세포의 개체군이 활성화되고, 상기 NK 세포의 개체군이 접촉 단계 전 적어도 3일에 활성화되는, 방법.
- [1041] 구현예_C 14. 구현예_C 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, LNP는 NK 세포의 개체군을 LNP와 접촉시키기 전에 ApoE와 사전인큐베이션된, 방법.
- [1042] 구현예_C 15. 구현예_C 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, LNP는 NK 세포의 개체군을 LNP와 접촉시키기 전에 ApoE3과 사전인큐베이션된, 방법.
- [1043] 구현예_C 16. 구현예_C 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, LNP는 NK 세포의 개체군을 LNP와 접촉시키기 전에 ApoE4와 사전인큐베이션된, 방법.
- [1044] 구현예_C 17. 구현예_C 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, NK 세포의 개체군이 2.5-10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 총 RNA 카고를 포함하는 LNP와 접촉되는, 방법.
- [1045] 구현예_C 18. 구현예_C 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, NK 세포의 개체군은 2-10개 LNP, 예를 들어, 2개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [1046] 구현예_C 19. 구현예_C 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, NK 세포의 개체군은 3개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [1047] 구현예_C 20. 구현예_C 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, NK 세포의 개체군은 4개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [1048] 구현예_C 21. 구현예_C 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, NK 세포의 개체군은 5개의 지질 나노입자(LNP)와 접

측되는, 방법.

- [1049] 구현예_C 22. 구현예_C 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, NK 세포의 개체군은 6개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [1050] 구현예_C 23. 구현예_C 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 표적 서열로의 삽입을 위해, NK 세포의 개체군을 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [1051] 구현예_C 24. 구현예_C 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 포함하는 NK 세포의 개체군을 생성하는 방법.
- [1052] 구현예_C 25. 구현예_C 24에 있어서, 상기 게놈 편집은 인텔 또는 염기 편집을 포함하고, NK 세포의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 포함하는, 방법.
- [1053] 구현예_C 26. 구현예_C 24 또는 25에 있어서, 상기 게놈 편집은 외인성 핵산 서열의 표적 서열로의 삽입을 포함하고, NK 세포의 개체군이 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 포함하는, 방법.
- [1054] 구현예_C 27. 구현예_C 24 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 개체군이 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하는 편집된 NK 세포를 포함하고, 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 또는 80%가 두 게놈 편집을 포함하는, 방법.
- [1055] 구현예_C 28. 구현예_C 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포의 개체군을 생성하고, 여기서 세포의 1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1056] 구현예_C 29. 구현예_C 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포의 개체군을 생성하고, 여기서 세포의 0.5% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1057] 구현예_C 30. 구현예_C 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포의 개체군을 생성하고, 여기서 세포의 0.2% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1058] 구현예_C 31. 구현예_C 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포의 개체군을 생성하고, 여기서 세포의 0.1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1059] 구현예_C 32. 구현예_C 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포의 개체군을 생성하고, 여기서 편집된 세포는 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적 외 전좌의 배경 수준의 2배 미만을 갖는, 방법.
- [1060] 구현예_C 33. 구현예_C 1 내지 32 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합체, 예컨대 Cas9, 선택적으로 스트렙토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*) Cas9를 암호화하는 mRNA를 포함하는, 방법
- [1061] 구현예_C 34. 구현예_C 1 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합체를 암호화하는 mRNA를 포함하고, 상기 RNA 가이드-DNA 결합체는 니카제인, 방법.
- [1062] 구현예_C 35. 구현예_C 1 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합체를 암호화하는 mRNA를 포함하고, 상기 RNA 가이드-DNA 결합체는 클레아바제인, 방법.
- [1063] 구현예_C 36. 구현예_C 1 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 생체 외에서 수행되는, 방법.
- [1064] 구현예_C 37. 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 NK 세포의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 포함하는, 방법.
- [1065] 구현예_C 38. 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, NK 세포의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 포함하고, 상기 게놈 편집은 인텔 또는 염기 편집을 포함하는, 조성물.
- [1066] 구현예_C 39. 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, NK 세포의 개체군은 게놈

편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 포함하고, 게놈 편집은 외인성 핵산의 표적 서열로의 삽입을 포함하는, 조성물.

- [1067] 구현예_C 40. 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, NK 세포의 개체군은 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 또는 80%를 포함하는, 조성물.
- [1068] 구현예_C 41. 구현예_C37 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 세포의 1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1069] 구현예_C 42. 구현예_C37 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 세포의 0.5% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1070] 구현예_C 43. 구현예_C37 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 세포의 0.2% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1071] 구현예_C 44. 구현예_C37 내지 40 중 어느 하나에 있어서, 세포의 0.1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1072] 구현예_C 45. 구현예_C37 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 세포가 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만인, 조성물.
- [1073] 구현예_C 46. 편집된 NK 세포를 포함하는 NK 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, 편집된 NK 세포는 구현예_C1 내지 36 중 어느 하나의 방법에 의해 얻어지거나 얻을 수 있는, 조성물.
- [1074] 하기 비-제한적인 구현예도 또한 포함된다:
- [1075] 구현예_D 1. 단핵구 개체군을 시험관내에서 배양하는 단계, 상기 개체군을 게놈 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 지질 나노입자(LNP)와 접촉시키는 단계를 포함하는, 편집된 세포를 포함하는 단핵구 개체군을 생성하는 방법.
- [1076] 구현예_D 2. 편집된 세포를 포함하는 단핵구의 개체군의 생성 방법으로서, 단핵구의 개체군을 시험관 내에서 배양하는 단계 및 개체군을 i) 게놈 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 지질 나노입자(LNP); 및 ii) DNA-PK 억제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [1077] 구현예_D 3. 구현예_D 1 또는 2에 있어서, 상기 편집된 세포는 세포 당 다중 게놈 편집을 포함하는, 방법.
- [1078] 구현예_D 4. 구현예_D 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 접촉 단계 이전에 단핵구 세포의 개체군을 분화시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [1079] 구현예_D 5. 편집된 세포를 포함하는 단핵구의 개체군의 생성 방법으로서, 단핵구의 개체군을 시험관 내에서 배양하는 단계 및 개체군을 게놈 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 지질 나노입자(LNP)와 접촉시키기 전에 단핵구 개체군을 분화하는 단계를 포함하고, 상기 단핵구의 개체군은 하나 이상의 LNP와의 접촉 전 0~8일 동안 분화되는, 방법.
- [1080] 구현예_D 6. 편집된 세포를 포함하는 단핵구 개체군의 생성 방법으로서:
- [1081] a. 단핵구의 개체군을 시험관 내에서 배양하는 단계;
- [1082] b. 단핵구의 개체군을 시험관 내에서 분화하는 단계;
- [1083] c. b)의 세포의 개체군을 시험관 내에서 하나 이상의 지질 나노입자(LNP)와 접촉시키는 단계로서, LNP가 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계; 및
- [1084] d. b)의 세포의 개체군을 DNA-PK 억제제와 접촉시키는 단계
- [1085] 에 의해 편집된 단핵구의 개체군을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.
- [1086] 구현예_D 7. 구현예_D 5 또는 6 중 어느 하나에 있어서, 상기 편집된 세포가 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는, 방법.
- [1087] 구현예_D 8. 구현예_D 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구의 개체군이 GM-CSF에 의해 분화되는, 방법.
- [1088] 구현예_D 9. 구현예_D 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구가 접촉 단계 이전에 0~8일 동안 분화되는, 방법.
- [1089] 구현예_D 10. 구현예_D 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구가 접촉 단계 이전에 0~5일 동안 분화되는, 방법.

- [1090] 구현예_D 11. 구현예_D 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구가 접촉 단계 이전에 0일 동안 분화되는, 방법.
- [1091] 구현예_D 12. 구현예_D 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구가 접촉 단계 이전에 1일 동안 분화되는, 방법.
- [1092] 구현예_D 13. 구현예_D 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구가 접촉 단계 이전에 2일 동안 분화되는, 방법.
- [1093] 구현예_D 14. 구현예_D 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구가 접촉 단계 이전에 3일 동안 분화되는, 방법.
- [1094] 구현예_D 15. 구현예_D 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구가 접촉 단계 이전에 4일 동안 분화되는, 방법.
- [1095] 구현예_D 16. 구현예_D 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구가 접촉 단계 이전에 5일 동안 분화되는, 방법.
- [1096] 구현예_D 17. 구현예_D 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구가 접촉 단계 이전에 6일 동안 분화되는, 방법.
- [1097] 구현예_D 18. 구현예_D 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구가 접촉 단계 이전에 7일 동안 분화되는, 방법.
- [1098] 구현예_D 19. 구현예_D 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구가 접촉 단계 이전에 8일 동안 분화되는, 방법.
- [1099] 구현예_D 20. 구현예_D 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP는 단핵구의 개체군 또는 대식세포를 LNP와 접촉시키기 전에 ApoE와 함께 사전인큐베이션된, 방법.
- [1100] 구현예_D 21. 구현예_D 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP는 단핵구의 개체군을 LNP와 접촉시키기 전에 ApoE3과 함께 사전인큐베이션된, 방법.
- [1101] 구현예_D 22. 구현예_D 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP는 단핵구의 개체군을 LNP와 접촉시키기 전에 ApoE4와 함께 사전인큐베이션된, 방법.
- [1102] 구현예_D 23. 구현예_D 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP는 단핵구의 개체군을 LNP와 접촉시키기 전에 혈청과 함께 사전인큐베이션된, 방법.
- [1103] 구현예_D 24. 구현예_D 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 단핵구는 접촉 단계 전 및/또는 접촉 단계 동안 혈청을 포함하는 배지에서 배양되는, 방법.
- [1104] 구현예_D 25. 구현예_D 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 단핵구의 개체군은 2.5-10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 총 RNA 카고를 포함하는 LNP와 접촉되는, 방법.
- [1105] 구현예_D 26. 구현예_D 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구의 개체군은 2개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [1106] 구현예_D 27. 구현예_D 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구의 개체군은 3개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [1107] 구현예_D 28. 구현예_D 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구의 개체군은 4개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [1108] 구현예_D 29. 구현예_D 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 단핵구의 개체군은 5개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [1109] 구현예_D 30. 구현예_D 1 내지 29 중 어느 하나에 있어서, w상기 단핵구의 개체군은 6개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [1110] 구현예_D 31. 구현예_D 1 내지 30 중 어느 하나에 있어서, 단핵구의 개체군을 표적 서열에 삽입하기 위한 공여자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

- [1111] 구현예_D 32. 구현예_D 1 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 96%를 포함하는 편집된 세포를 포함하는 단핵구의 개체군을 생성하는, 방법.
- [1112] 구현예_D 33. 구현예_D 32에 있어서, 게놈 편집이 인텔 또는 염기 편집을 포함하고 단핵구의 개체군이 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 95%를 포함하는 방법.
- [1113] 구현예_D 34. 구현예_D 32 또는 33에 있어서, 상기 게놈 편집은 외인성 핵산 서열의 표적 서열로의 삽입을 포함하고, 단핵구의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 포함하는, 방법.
- [1114] 구현예_D 35. 구현예_D 32 내지 34 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 개체군은 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하고, 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 또는 80%는 두 게놈 편집을 포함하는, 방법.
- [1115] 구현예_D 36. 구현예_D 1 내지 35 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 단핵구의 개체군을 생성하고, 세포의 1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1116] 구현예_D 37. 구현예_D 1 내지 36 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 단핵구의 개체군을 생성하고, 세포의 0.5% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1117] 구현예_D 38. 구현예_D 1 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 단핵구의 개체군을 생성하고, 세포의 0.2% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1118] 구현예_D 39. 구현예_D 1 내지 38 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 단핵구의 개체군을 생성하고, 세포의 0.1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1119] 구현예_D 40. 구현예_D 1 내지 39 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 단핵구의 개체군을 생성하고, 여기서 세포는 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준의 2배 미만을 갖는, 방법.
- [1120] 구현예_D 41. 구현예_D 1 내지 40 중 어느 하나에 있어서, LNP 조성물 중 하나는 MHC 클래스 I의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [1121] 구현예_D 42. 구현예_D 1 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [1122] 구현예_D 43. 구현예_D 1 내지 42 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 MHC 클래스 II의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [1123] 구현예_D 44. 구현예_D 1 내지 43 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물 중 하나는 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [1124] 구현예_D 45. 구현예_D 1 내지 44 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합제, 예컨대 Cas9, 선택적으로 스트렙토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*) Cas9를 암호화하는 mRNA를 포함하는, 방법.
- [1125] 구현예_D 46. 구현예_D 1 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합제를 암호화하는 mRNA를 포함하고, RNA 가이드-DNA 결합제는 니카제인, 방법.
- [1126] 구현예_D 47. 구현예_D 1 내지 46 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합제를 암호화하는 mRNA를 포함하고, 상기 RNA 가이드-DNA 결합제가 클레아바제인, 방법.
- [1127] 구현예_D 48. 구현예_D 1 내지 47 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 생체외에서 수행되는, 방법.
- [1128] 구현예_D 49. 편집된 세포를 포함하는 단핵구의 개체군을 포함하는 조성물로서, 단핵구의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 포함하는, 방법.
- [1129] 구현예_D 50. 편집된 세포를 포함하는 단핵구의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 단핵구의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 포함하고, 상기 게놈 편집은 인텔 또는 염기 편집을 포함하는, 조성물.

- [1130] 구현예_D 51. 편집된 세포를 포함하는 단핵구의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 단핵구의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 포함하고, 상기 게놈 편집은 외인성 핵산의 표적 서열로의 삽입을 포함하는, 조성물.
- [1131] 구현예_D 52. 편집된 세포를 포함하는 단핵구의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 단핵구의 개체군은 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 50%, 또는 60%를 포함하는, 조성물.
- [1132] 구현예_D 53. 구현예_D49 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 세포의 1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1133] 구현예_D 54. 구현예_D49 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 세포의 0.5% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1134] 구현예_D 55. 구현예_D49 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 세포의 0.2% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1135] 구현예_D 56. 구현예_D49 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 세포의 0.1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1136] 구현예_D 57. 구현예_D49 내지 56 중 어느 하나에 있어서, 세포가 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만인, 조성물.
- [1137] 구현예_D 58. 구현예_D49 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 상기 편집된 세포가 대식세포를 포함하는, 조성물.
- [1138] 구현예_D 59. 편집된 단핵구 또는 대식세포를 포함하는 단핵구의 개체군 또는 대식세포를 포함하는 조성물로서, 상기 편집된 단핵구 또는 대식세포가 구현예_D1 내지 구현예 48 중 어느 하나의 방법에 의해 얻어지거나 얻을 수 있는, 조성물.
- [1139] 하기 비-제한적인 구현예도 또한 포함된다:
- [1140] 구현예_E 1. 시험관내 배양된 iPSC에서 다중 게놈 편집을 생성하는 방법으로서:
- [1141] a. iPSC를 시험관 내에서 적어도 제1 지질 나노입자(LNP) 조성물 및 제2 LNP 조성물과 접촉시키는 단계로서, 상기 제1 지질 핵산 어셈블리 조성물은 제1 표적 서열에 대한 제1 가이드 RNA(gRNA) 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하고, 제2 지질 핵산 어셈블리 조성물은 제1 표적 서열과 상이한 제2 표적 서열에 대한 제2 gRNA 및 선택적으로 핵산 게놈 편집 도구를 포함하고; 그리고
- [1142] b. 선택적으로, 세포를 시험관 내에서 확장시키는 단계
- [1143] 에 의해 세포 내에서 다중 게놈 편집을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.
- [1144] 구현예_E 2. 구현예_E 1에 있어서, 상기 iPSC는 시험관 내에서 확장되는, 방법.
- [1145] 구현예_E 3. 구현예_E 1 또는 2에 있어서, 상기 방법은 iPSC의 개체군 상에서 수행되는, 방법.
- [1146] 구현예_E 4. iPSC의 개체군을 시험관 내에서 게놈 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 지질 나노입자(LNP)와 배양하는 단계를 포함하는, 게놈 편집을 포함하는 편집된 iPSC를 포함하는 iPSC의 개체군을 생성하는 방법.
- [1147] 구현예_E 5. iPSC의 개체군을 시험관 내에서 (i) 게놈 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 지질 나노입자(LNP) 및 (ii) DNA-PK 억제제와 함께 배양하는 단계를 포함하는, 게놈 편집을 포함하는 편집된 iPSC를 포함하는 iPSC의 개체군의 생성 방법.
- [1148] 구현예_E 6. iPSC의 개체군을 시험관 내에서 (i) 게놈 편집 도구를 포함하는 둘 이상의 지질 나노입자(LNP) 및 (ii) DNA-PK 억제제와 함께 배양하는 단계를 포함하는, 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 iPSC를 포함하는 iPSC의 개체군의 생성 방법.
- [1149] 구현예_E 7. 구현예_E1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, iPSC의 개체군에서 편집된 iPSC를 확인하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [1150] 구현예_E 8. 구현예_E1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 편집된 iPSC를 분리하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [1151] 구현예_E 9. 구현예_E 8에 있어서, 분리된 세포를 시험관내에서 확장시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [1152] 구현예_E 10. 구현예_E1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 세포를 시험관내에서 최대 10개의 LNP와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [1153] 구현예_E 11. 구현예_E1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군을 생성하고, 세포의 1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.

- [1154] 구현예_E 12. 구현예_E1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군을 생성하고, 세포의 0.5% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1155] 구현예_E 13. 구현예_E1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군을 생성하고, 세포의 0.2% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1156] 구현예_E 14. 구현예_E1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군을 생성하고, 세포의 0.1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1157] 구현예_E 15. 구현예_E1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군을 생성하고, 여기서 세포는 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준의 2배 미만을 갖는, 방법.
- [1158] 구현예_E 16. 구현예_E1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 또는 50%를 포함하는 편집된 세포를 포함하는 세포의 개체군을 생성하는, 방법.
- [1159] 구현예_E 17. 구현예_E1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합체, 예컨대 Cas9, 선택적으로 스트렙토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*) Cas9를 암호화하는 mRNA를 포함하는, 방법.
- [1160] 구현예_E 18. 구현예_E1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합체를 암호화하는 mRNA를 포함하고, RNA 가이드-DNA 결합체는 니카제인, 방법.
- [1161] 구현예_E 19. 구현예_E1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합체를 암호화하는 mRNA를 포함하고, 상기 RNA 가이드-DNA 결합체가 클레아바제인, 방법.
- [1162] 구현예_E 20. 구현예_E1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 개체군은 DNA-PK 억제제와 추가로 접촉되는, 방법.
- [1163] 구현예_E 21. 구현예_E1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 인간 세포인, 방법.
- [1164] 구현예_E 22. 구현예_E1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 생체 외에서 수행되는, 방법.
- [1165] 구현예_E 23. 구현예_E1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 여기서 LNP 조성물 중 하나는 MHC 클래스 I의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [1166] 구현예_E 24. 구현예_E1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 여기서 LNP 조성물 중 하나는 B2M을 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [1167] 구현예_E 25. 구현예_E1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 여기서 LNP 조성물 중 하나는 MHC 클래스 II의 표면 발현을 감소시키거나 제거하는 유전자를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [1168] 구현예_E 26. 구현예_E1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 여기서 LNP 조성물 중 하나는 CIITA를 표적화하는 gRNA를 포함하는, 방법.
- [1169] 구현예_E 27. 편집된 세포를 포함하는 iPSC의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 20%, 30%, 40%, 또는 50%를 포함하는, 조성물.
- [1170] 구현예_E 28. 구현예_E27에 있어서, 세포의 1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1171] 구현예_E 29. 구현예_E27에 있어서, 세포의 0.5% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1172] 구현예_E 30. 구현예_E27에 있어서, 세포의 0.2% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1173] 구현예_E 31. 구현예_E27에 있어서, 세포의 0.1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1174] 구현예_E 32. 구현예_E27 내지 31 중 어느 하나에 있어서, 세포가 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준보다 2배 미만인, 조성물.
- [1175] 구현예_E 33. 편집된 iPSC를 포함하는 iPSC의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 편집된 iPSC가 구현예_E1 내지 구현예 26 중 어느 하나의 방법에 의해 얻어지거나 얻을 수 있는, 조성물.
- [1176] 하기 비-제한적인 구현예도 또한 포함된다:

- [1177] 구현예_F 1. T 세포 개체군을 시험관내에서 배양하는 단계, 상기 개체군을 게놈 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 지질 나노입자(LNP)와 접촉시키는 단계를 포함하는, 편집된 T 세포를 포함하는 T 세포 개체군을 생성하는 방법.
- [1178] 구현예_F 2. 편집된 T 세포를 포함하는 B 세포의 개체군의 생성 방법으로서, T 세포의 개체군을 시험관 내에서 배양하는 단계 및 개체군을 i) 게놈 편집 도구를 포함하는 하나 이상의 지질 나노입자(LNP); 및 ii) DNA-PK 억제제와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.
- [1179] 구현예_F 3. 구현예_F 1 또는 2에 있어서, 상기 편집된 T 세포는 세포 당 다중 게놈 편집을 포함하는, 방법.
- [1180] 구현예_F 4. 구현예_F 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 접촉 단계 이전에 T 세포의 개체군을 활성화시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [1181] 구현예_F 5. 편집된 T 세포를 포함하는 T 세포 개체군의 생성 방법으로서:
- [1182] a. T 세포의 개체군을 시험관 내에서 배양하는 단계;
- [1183] b. T 세포의 개체군을 시험관 내에서 활성화시키는 단계;
- [1184] c. b)의 T 세포의 개체군을 시험관 내에서 하나 이상의 지질 나노입자(LNP)와 접촉시키는 단계로서, LNP가 게놈 편집 도구를 포함하는, 단계; 및
- [1185] d. T 세포의 개체군을 DNA-PK 억제제와 접촉시키는 단계
- [1186] 에 의해 편집된 T 세포의 개체군을 생성하는 단계를 포함하는, 방법.
- [1187] 구현예_F 6. 구현예_F 5에 있어서, 상기 편집된 T 세포가 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는, 방법.
- [1188] 구현예_F 7. 구현예_F 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP는 T 세포의 개체군을 LNP와 접촉시키기 전에 ApoE와 함께 사전인큐베이션된, 방법.
- [1189] 구현예_F 8. 구현예_F 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP는 T 세포의 개체군을 LNP와 접촉시키기 전에 ApoE3과 함께 사전인큐베이션된, 방법.
- [1190] 구현예_F 9. 구현예_F 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP는 T 세포의 개체군을 LNP와 접촉시키기 전에 ApoE4와 함께 사전인큐베이션된, 방법.
- [1191] 구현예_F 10. 구현예_F 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, T 세포의 개체군은 2.5-10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ 총 RNA 카고를 포함하는 LNP와 접촉되는, 방법.
- [1192] 구현예_F 11. 구현예_F 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포의 개체군은 2-10 LNP, 예를 들어, 2개의 지질 나노입자(LNP)와 접촉되는, 방법.
- [1193] 구현예_F 12. 구현예_F 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, B 세포의 개체군을 표적 서열에 삽입하기 위한 공여 자 핵산과 접촉시키는 단계를 추가로 포함하는, 방법.
- [1194] 구현예_F 13. 구현예_F 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법이 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함하는 편집된 세포를 포함하는 T 세포의 개체군을 생성하는, 방법.
- [1195] 구현예_F 14. 구현예_F 13에 있어서, 게놈 편집이 인텔 또는 염기 편집을 포함하고 T 세포의 개체군이 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함하는 방법.
- [1196] 구현예_F 15. 구현예_F 13 또는 14에 있어서, 상기 게놈 편집은 외인성 핵산 서열의 표적 서열로의 삽입을 포함하고, T 세포의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 포함하는, 방법.
- [1197] 구현예_F 16. 구현예_F 13 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포의 개체군은 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하는 편집된 T 세포를 포함하고, 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 85%는 두 게놈 편집을 포함하는, 방법.
- [1198] 구현예_F 17. 구현예_F 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집

된 T 세포를 포함하는 T 세포의 개체군을 생성하고, 세포의 1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.

- [1199] 구현예_F 18. 구현예_F 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 T 세포를 포함하는 T 세포의 개체군을 생성하고, 세포의 0.5% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1200] 구현예_F 19. 구현예_F 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 T 세포를 포함하는 T 세포의 개체군을 생성하고, 세포의 0.2% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1201] 구현예_F 20. 구현예_F 1 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 T 세포를 포함하는 T 세포의 개체군을 생성하고, 세포의 0.1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 방법.
- [1202] 구현예_F 21. 구현예_F 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 세포당 다중 게놈 편집을 포함하는 편집된 T 세포를 포함하는 T 세포의 개체군을 생성하고, 여기서 세포는 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준의 2배 미만을 갖는, 방법.
- [1203] 구현예_F 22. 구현예_F 1 내지 21 중 어느 하나에 있어서, 상기 편집된 T 세포는 CD4+ T 세포를 포함하는, 방법.
- [1204] 구현예_F 23. 구현예_F 1 내지 22 중 어느 하나에 있어서, 상기 편집된 T 세포는 CD8+ T 세포를 포함하는, 방법.
- [1205] 구현예_F 24. 구현예_F 1 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 상기 편집된 T 세포는 기억 T 세포를 포함하는, 방법.
- [1206] 구현예_F 25. 구현예_F 1 내지 24 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합체, 예컨대 Cas9, 선택적으로 스트렙토코커스 파이오게네스(*S. pyogenes*) Cas9를 암호화하는 mRNA를 포함하는, 방법.
- [1207] 구현예_F 26. 구현예_F 1 내지 25 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합체를 암호화하는 mRNA를 포함하고, RNA 가이드-DNA 결합체는 니카제인, 방법.
- [1208] 구현예_F 27. 구현예_F 1 내지 26 중 어느 하나에 있어서, 상기 LNP 조성물은 가이드 RNA 및 RNA 가이드-DNA 결합체를 암호화하는 mRNA를 포함하고, 상기 RNA 가이드-DNA 결합체가 클레아바제인, 방법.
- [1209] 구현예_F 28. 구현예_F 1 내지 27 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 선택 단계, 선택적으로 물리적 선택 단계 또는 생화학적 선택 단계를 포함하지 않는, 방법.
- [1210] 구현예_F 29. 구현예_F 1 내지 28 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 생체외에서 수행되는, 방법.
- [1211] 구현예_F 30. 편집된 T 세포를 포함하는 T 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, T 세포의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함하는, 방법.
- [1212] 구현예_F 31. 편집된 T 세포를 포함하는 T 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 T 세포의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%를 포함하고, 상기 게놈 편집은 인텔 또는 염기 편집을 포함하는, 조성물.
- [1213] 구현예_F 32. 편집된 T 세포를 포함하는 T 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 T 세포의 개체군은 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 95%를 포함하고, 상기 게놈 편집은 외인성 핵산의 표적 서열로의 삽입을 포함하는, 조성물.
- [1214] 구현예_F 33. 편집된 T 세포를 포함하는 T 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 T 세포의 개체군은 적어도 2개의 게놈 편집을 포함하는 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 또는 85%를 포함하는, 조성물.
- [1215] 구현예_F 34. 구현예_F30 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 세포의 1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1216] 구현예_F 35. 구현예_F30 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 세포의 0.5% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1217] 구현예_F 36. 구현예_F30 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 세포의 0.2% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1218] 구현예_F 37. 구현예_F30 내지 33 중 어느 하나에 있어서, 세포의 0.1% 미만이 표적-표적 전좌를 갖는, 조성물.
- [1219] 구현예_F 38. 구현예_F30 내지 37 중 어느 하나에 있어서, 세포는 상호 전좌, 복합 전좌, 또는 표적외 전좌의 배경 수준의 2배 미만을 갖는, 조성물.

- [1220] 구현예_F 39. 편집된 T 세포를 포함하는 T 세포의 개체군을 포함하는 조성물로서, 상기 편집된 T 세포는 구현예_F1 내지 29 중 어느 하나의 방법에 의해 얻어지거나 얻어질 수 있는, 조성물.
- [1221] VIII. 실시예
- [1222] 실시예 1. 일반적인 방법
- [1223] 실시예 1.1. 지질 핵산 어셈블리의 제조
- [1224] 일반적으로, 지질 성분을 다양한 몰비로 100% 에탄올에 용해시켰다. RNA 카고(예를 들어, Cas9 mRNA 및 sgRNA)를 25 mM 시트레이트, 100 mM NaCl, pH 5.0에 용해시켜 약 0.45 mg/mL의 RNA 카고 농도를 획득하였다.
- [1225] 달리 명시되지 않는 한, 지질 핵산 어셈블리는 이온화가능한 지질 A((9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트, 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트라고도 함), 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG를 각각 50:38:9:3 몰비로 함유하였다. 지질 핵산 어셈블리는 달리 명시되지 않는 한, 지질 아민 대 RNA 포스페이트(N:P) 몰비가 약 6이고, gRNA 대 mRNA의 중량 비율이 1:1이 되도록 제형화하였다. 실시예 15-34에서, 달리 명시되지 않는 한, 1:2의 gRNA 대 mRNA의 중량 비율을 사용하였다.
- [1226] LNP는 2부피의 RNA 용액 및 1부피의 물로 에탄올 내 지질의 충돌 체트 혼합을 이용하는 교차 흐름 기술을 사용하여 제조되었다. 에탄올의 지질은 2부피의 RNA 용액과 혼합 교차를 통해 혼합하였다. 네 번째 물 스트림은 인라인 티를 통해 크로스의 출구 스트림과 혼합하였다(WO2016010840 도 2 참조). LNP는 실온에서 1시간 동안 유지하고, 추가로 물로 희석하였다(대략 1:1 v/v). LNP는 예를 들어 플랫 시트 카트리지(Sartorius, 100kD MWC) 상에서 접선 흐름 여과를 사용하여 농축하였고, 50 mM Tris, 45 mM NaCl, 5%(w/v) 수크로스, pH 7.5(TSS)로의 PD-10 탈염 컬럼(GE)을 사용하여 완충액 교환하였다. 대안적으로, LNP는 선택적으로 100 kDa Amicon 스핀 필터를 사용하여 농축하였고, PD-10 탈염 컬럼(GE)을 사용하여 TSS로 완충액 교환하였다. 그런 다음, 생성된 혼합물을 0.2 µm 멸균 필터를 사용하여 여과하였다. 최종 LNP는 추가 사용 전까지 4°C 또는 -80°C에서 보관했다.
- [1227] 실시예 1.2. 뉴클레아제 mRNA의 시험관내 전사("IVT")
- [1228] N1-메틸 슈도-U를 함유하는 캡핑되고 폴리아데닐화된 mRNA는 선형화된 플라스미드 DNA 주형 및 T7 RNA 폴리머라제를 사용하여 시험관내 전사에 의해 생성되었다. T7 프로모터, 전사를 위한 서열, 및 폴리아데닐화 영역을 함유하는 플라스미드 DNA는 하기 조건들: 200 ng/µL 플라스미드, 2 U/µL XbaI(NEB), 및 1x 반응 완충액을 갖는 XbaI와 함께 2시간 동안 37°C에서 인큐베이션하여 선형화시켰다. XbaI는 반응물을 65°C에서 20분 동안 가열하여 불활성화시켰다. 선형화된 플라스미드를 효소 및 완충액 염으로 정제하였다. 변형된 mRNA를 생성하기 위한 IVT 반응은 다음 조건에서 37°C에서 1.5~4시간 인큐베이션하여 수행하였다: 50 ng/µL 선형화된 플라스미드; GTP, ATP, CTP, 및 N1-메틸 슈도-UTP(Trilink) 각각 2-5 mM; 10-25 mM ARCA(Trilink); 5 U/µL T7 RNA 폴리머라제(NEB); 1 U/µL 뮤린 RNase 억제제(NEB); 0.004 U/µL 무기 이. 콜라이(E. coli) 파이로포스파타제(NEB); 및 1x 반응 완충액. TURBO DNase(ThermoFisher)를 0.01 U/µL의 최종 농도로 첨가하고, 반응물을 추가 30분 동안 인큐베이션하여, DNA 주형을 제거하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 MegaClear 전사 클린-업 키트(ThermoFisher) 또는 RNeasy Maxi 키트(Qiagen)를 사용하여 mRNA를 정제하였다. 대안적으로, mRNA를 침전 프로토콜을 통해 정제하고, 어떤 경우에는 HPLC-기반 정제가 뒤따랐다. 간략하게는 DNase 소화 후, LiCl 침전, 암모늄 아세테이트 침전 및 아세트산나트륨 침전을 사용하여 mRNA를 정제한다. HPLC 정제된 mRNA의 경우, LiCl 침전 및 재구성 후, mRNA를 RP-IP HPLC로 정제하였다(예를 들어, Kariko, 등 Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 21 e142 참고). 풀링을 위해 선택된 분획을 합하고 상기 기재된 바와 같이 아세트산나트륨/에탄올 침전에 의해 탈염하였다. 추가의 대체 방법에서, mRNA를 LiCl 침전 방법으로 정제한 다음, 접선 흐름 여과에 의해 추가로 정제하였다. RNA 농도는 260 nm(Nanodrop)에서 흡광도를 측정하여 결정하고 전사체는 Bioanalyzer(Agilent)의 모세관 전기영동으로 분석했다.
- [1229] 스트렙토코커스 파이오게네스("Spy") Cas9 mRNA는 서열 번호 1-3에 따른 오픈 리딩 프레임을 암호화하는 플라스미드 DNA로부터 생성되었다(표 89의 서열 참조). BC22n mRNA는 서열 번호 18에 따른 오픈 리딩 프레임을 암호화하는 플라스미드 DNA로부터 생성되었다. UGI mRNA는 서열 번호 21에 따른 오픈 리딩 프레임을 암호화하는 플라스미드 DNA로부터 생성되었다. 이 단락에서 인용된 서열이 RNA와 관련하여 아래에 언급될 때, Ts는 Us(상기 기술된 바와 같이 N1-메틸 슈도우리딘임)로 대체되어야 한다는 것이 이해된다. 실시예에 사용된 메신저 RNA는 5' 캡 및 3' 폴리아데닐화 서열, 예를 들어 최대 100nt를 포함하고 표 89에 의해 확인된다. 가이드 RNA는 당업계에

공지된 방법에 의해 화학적으로 합성되었다.

[1230] **실시예 1.3. 표적 절단 효율에 대한 차세대 시퀀싱("NGS") 및 분석**

[1231] 제조사의 프로토콜에 따라 QuickExtract™ DNA 추출 솔루션(Lucigen, 카탈로그 QE09050)을 사용하여 게놈 DNA를 추출하였다.

[1232] 게놈의 표적 위치에서 편집의 효율성을 정량적으로 결정하기 위해, 딥 시퀀싱을 이용하여 유전자 편집에 의해 도입된 삽입 및 결실의 존재를 확인했다. PCR 프라이머는 관심 유전자(예를 들어, TRAC) 내의 표적 부위 주위에 설계되었고, 관심 게놈 영역이 증폭되었다. 프라이머 서열 설계는 이 분야에서 표준으로 수행되었다.

[1233] 시퀀싱을 위한 화학을 추가하기 위해 제조사의 프로토콜s(Illumina)에 따라 추가 PCR을 수행하였다. 앰플리콘을 Illumina MiSeq 기기에서 시퀀싱하였다. 품질 점수가 낮은 항목을 제거한 후 판독을 인간 참조 게놈(예를 들어, hg38)에 정렬했다. 관심 표적 영역과 중복되는 판독은 정렬을 개선하기 위해 로컬 게놈 서열로 재정렬되었다. 그런 다음, 야생형 야생형 판독 수 대 C-to-T 돌연변이, C-to-A/G 돌연변이 또는 인델을 함유하는 판독의 수를 계산하였다. 삽입 및 결실은 예측된 Cas9 절단 부위를 중심으로 하는 20 bp 영역에서 점수를 매겼다. 인델 백분율은 20 bp 채점 영역내에서 삽입되거나 결실된 하나 이상의 염기를 갖는 총 시퀀싱 리드 수를 야생형을 포함하는, 시퀀싱 판독의 총 수로 나누어 정의한다. 20 bp sgRNA 표적 서열의 10 bp 업스트림 및 10 bp 다운스트림을 포함하는 40 bp 영역 내에서 C-to-T 돌연변이 또는 C-to-A/G 돌연변이를 채점하였다. C-to-T 편집 백분율은 내에서 하나 이상의 C-to-T 돌연변이가 있는 총 시퀀싱 판독 수를 야생형을 포함한 총 시퀀싱 판독 수로 나눈 값으로 정의된다. C-to-A/G 돌연변이의 백분율은 유사하게 계산한다.

[1234] **실시예 1.4. T 세포 배양 배지 제조**

[1235] 하기에 사용된 T 세포 배양 배지 조성물은 본원 및 표 2에 기재되어 있다. "X-VIVO 기본 배지"는 X-VIVO™ 15 Media, 1% Penstrep, 50 µM 베타-머캅토에탄올, 10 mM NAC로 구성된다. "RPMI 기본 배지"는 RPMI 배지, 1% Penstrep, 2 mM L-글루타민, 100 µM 비-필수 아미노산, 1 mM 피루브산 나트륨, 10 mM HEPES 완충액, 및 55 µM 베타-머캅토에탄올로 구성된다. "CTS OpTmizer 기본 배지"는 전체 보충 내용물이 배지와 함께 제공되는, CTS OpTmizer Media, 1X Glutamax 및 10 mM HEPES로 구성된다. 위에서 언급한 성분 외에도 본원에 사용되는 가변 배지 성분은 거의 없다: 1. 혈청(FBS(소 태아 혈청) 또는 인간 혈청 AB, 및 2. 사이토카인(IL-2, IL-7, IL-15)도 표 1에 기재되어 있다. 배지 성분은 하기 표 2에 기재되어 있다.

표 1

배지 성분

배지 성분		농도	제조사	카탈로그 번호
기본	RPMI 배지		Corning	
기본	L-글루타민	2 mM	Corning	
임의	Pen-Strep	1%	Corning	30-002-CI
기본	비-필수 아미노산 s	100 μM	Gibco	
기본	피루브산 나트륨	1 mM	Gibco	
기본	HEPES 완충액	10 mM	Gibco	
기본	베타-머캅토에탄올	55 μM	Fisher	ICN19470583
가변	FBS (소 태아 혈청)	10%	Gibco	
기본	X-VIVO™ 15 배지		LONZA	BE02-060Q
기본	인간 혈청 AB	5%	Gemini Bio Products	100-512
임의	Pen-Strep	1%	Corning	30-002-CI
기본	베타-머캅토에탄올	50 μM	Fisher	ICN19470583
기본	N-아세틸 L-시스테인 (NAC)	10 mM	Fisher	ICN19460325
가변	rh IL-15	200 Units/mL	Peprtech	200-15
가변	rh-IL7	5 ng/mL	Peprtech	200-07
가변	rh-IL-2	5 ng/mL	Peprtech	200-02
기본	CTS Optimizer 배지		ThermoFisher	
기본	보충	내용물 모두 제공됨	ThermoFisher	
가변	인간 혈청 AB	5%	Gemini Bio Products	100-512
기본	Glutamax	1X		
기본	HEPES 완충액	10 mM	Gibco	
가변	rh IL-15	5 ng/mL	Peprtech	200-15
가변	rh-IL7	5 ng/mL	Peprtech	200-07
가변	rh-IL-2	200 Units/mL	Peprtech	200-02

[1236]

[1237]

T 세포는 달리 언급되지 않는 한, 해동되거나, 하기 표 2의 배지 번호에 기재된 바와 같이 T 세포 배양 배지에서 배양되었다.

표 2

T 세포 배지 조성

배지 번호	배지 조성	
1	X-VIVO 기본 배지+IL-2+IL-15+IL7	인간 혈청 AB 있음
2	X-VIVO 기본 배지+IL-2+IL-15	
3	X-VIVO 기본 배지+IL-2+IL7	
4	X-VIVO 기본 배지+IL-2	
5	X-VIVO 기본 배지	
6	X-VIVO 기본 배지	혈청 없음
7	X-VIVO 기본 배지 +IL-2 +IL-15+ IL7	
8	X-VIVO 기본 배지 +IL-2 +IL-15	
9	X-VIVO 기본 배지 +IL-2+IL7	
10	X-VIVO 기본 배지 +IL-2	
11	RPMI 기본 배지+IL-2	소 태아 혈청 있음 (FBS)
12	RPMI 기본 배지+IL-2+IL-15	
13	RPMI 기본 배지+IL-2+IL7	
14	RPMI 기본 배지+IL-2+IL-15+ IL7	
15	RPMI 기본 배지	
16	CTS Optimizer 기본 배지 +IL-2, IL7, IL-15	혈청 없음
17	CTS Optimizer 기본 배지 +혈청포함 +IL-2, IL7, IL-15	인간 혈청 AB 있음

[1238]

[1239] 실시예 2. LNP 및 전기천공으로 조작된 T 세포의 시험관내 기능적 특성화

[1240] T 세포 조작 방법이 생성된 세포의 특성에 영향을 미치는지 결정하기 위해, 전기천공(EP) 또는 지질 나노입자(LNP)를 통해 유전적으로 조작된 T 세포의 시험관내 특성을 비교하였다.

[1241] 실시예 2.1. T 세포 제조

[1242] 건강한 인간 공여자 성분채집술을 상업적으로 입수하였고(Hemacare), 세포를 세척하고 LOVO 장치 상의 CliniMACS PBS/EDTA 완충액(Miltenyi 카탈로그 130-070-525)에 재현탁하였다. T 세포는 CliniMACS Plus 및 CliniMACS LS 일회용 키트를 사용한 CD4 및 CD8 자성 비드(Miltenyi BioTec 카탈로그 130-030-401/130-030-801)를 사용하여 양성 선택을 통해 분리하였다. T 세포를 바이알에 분주하고 향후 사용을 위해 Cryostor CS10(StemCell Technologies 카탈로그 07930) 및 Plasmalyte A(Baxter 카탈로그 2B2522X)의 1:1 체형으로 동결 보존하였다. 해동 시, T 세포를 표 2에 기재된 바와 같이, 배지 번호 1에서 1. 5x10e6 세포/mL의 밀도로 밤새 휴지시켰다. 하룻밤 휴지 후 편집 전에 T 세포를 TransAct(1:100 dilution, Miltenyi)로 48시간 동안 활성화시켰다.

[1243] 실시예 2.2. T 세포의 LNP 처리

[1244] Cas9 mRNA 및 TRAC(G013006)(서열 번호 708) 또는 TRBC(G016239)(서열 번호 707)를 표적화하는 sgRNA를 비율 1:2의 gRNA 대 mRNA 중량 비율로 함유하는 LNP를 37℃에서 5분 동안 6% 사이노몰구스 원숭이 혈청(BioreclamationIVT, 카탈로그 CYN220760)으로 보충된 표 2에 기재된 바와 같은, 배지 번호 1에서 개별적으로 인큐베이션하였다. 활성화 후 48시간 후에, T 세포를 세척하고, 표 2에 기재된 바와 같이, 배지 번호 1에 현탁하였다. 사전-인큐베이션된 LNP 믹스를 각 웰에 첨가하여, LNP당 1 µg/mL 및 1x10e6 세포/mL T 세포의 최종 농도로 수득하였다. AAV6은 TRAC 유전자좌로의 부위-특이적 통합을 위해 상동성 아암이 측면에 있는 WT1 표적화 이식유전자 T 세포 수용체(tgTCR)를 암호화하는 상동성 방향성 복구 주형(HDRT)을 전달하는 데 사용되었다. AAV는 3x10e5 게놈 복사 단위(GCU)/세포의 감염 다중도(MOI)로 첨가되었다. 비편집 T 세포(LNP 또는 AAV 없음) 및 LNP로 형질감염되었지만 AAV로 형질도입되지 않은 T 세포를 포함하는 대조군도 포함되었다. 24시간 후, T 세포를 수집하고, 원심분리하고, 표 2에 기술된 바와 같이 배지 번호 1의 G-REX® 플레이트(Wilson Wolf)로 옮겼다. T 세포는 확장, tgTCR 삽입 및 유동 세포측정법에 의한 내인성 TCR 녹아웃에 대해 평가되기 전에 격일로 배지

교환과 함께 7일 동안 배양되었다. 모든 그룹은 복제 웰로 수행되었다(n=2). 확장된 T 세포는 하기 기술된 바와 같이 기능 분석을 위해 동결보존하였다.

[1245] 실시예 2.3. T 세포의 RNP 전기천공

[1246] Cas9 단백질을 TRAC(G013006)(서열 번호 708) 또는 TRBC(G016239)(서열 번호 707)를 표적화하는 열 변성 sgRNA와 2:1 가이드:Cas9 비율로 15분 동안 혼합하여 20 μ M 스톱 농도에서 RNP를 형성했다. RNP 스톱은 사용하기 전까지 -80°C 에서 보관했다. 활성화 48시간 후, T 세포를 수확하고, 원심분리하고, P3 전기천공 완충액(Lonza)에 $10\text{--}20 \times 10^6$ T 세포/ $100 \mu\text{L}$ 의 농도로 재현탁했다. 세포 현탁액을 RNP와 혼합하여 $2 \mu\text{M}$ 의 최종 RNP 농도를 달성한 후, 뉴클레오택터 Cuvette로 옮기고 제조사의 펄스 코드를 사용하여 전기천공했다. 전기천공된 T 세포는 표 2에 설명된 대로 배지 번호 1에서 1×10^6 세포/well/ 1 mL 의 밀도로 플레이팅되기 전 10분 동안 사이토카인 없이 표 2에 설명된 대로 배지 번호 5에서 $400 \mu\text{L}$ 에 즉시 휴지되어, 3×10^5 GCU/세포의 MOI로 WT1 TCR을 암호화하는 AAV를 사용한다. 24시간 후, T 세포를 수확하고, 세척하고, 표 2에 기재된 바와 같이 배지 번호 1의 G-REX® 플레이트(Wilson Wolf)에 첨가하였다. T 세포는 확장, tgTCR 삽입 및 유동 세포측정법에 의한 내인성 TCR 녹아웃에 대해 평가되기 전에 격일로 배지 교환과 함께 7일 동안 배양하였다. 전기천공 처리된 T 세포는 다시 유세포 분석법으로 분석하고, T 세포 기능 검정에서 평가하기 전, 동결보존되기 전에 추가 4일 동안 연속 배양하였다.

[1247] 실시예 2.4.1 T 세포 확장

[1248] Vi-CELL 세포 계수기(Beckman Coulter)를 사용하여 세포를 계수하고, 세포 수율을 삽입 시 시작 세포 계수로 나누어 배수 확장을 계산했다. LNP로 처리된 세포는 표 3 및 도 1에 도시된 바와 같이, 편집되지 않은 T 세포에 필적하는 편집 후 T 세포 확장 수준 및 전기천공으로 처리된 세포보다 2배 이상의 더 큰 확장을 나타냈다. 전기천공 세포와 비교하여 LNP 처리된 세포의 더 빠른 확장은 짧은 제조 시간(10일 대 14일)을 허용하여 임상 제조에 바람직한 확장 수준을 산출했다(편집 후 >50배 증가).

표 3

총 배양 10 일 또는 14 일 후 배수 확장

그룹	일	배수 확장 (평균)	배수 확장(SD)
EP + AAV	10	13	1
EP	10	20	1
LNP + AAV	10	84.5	2.5
LNP	10	88.5	1.5
편집되지 않음	10	94	10
EP + AAV	14	37	1.4

[1250] 실시예 2.4.2. 유세포 분석법

[1251] 편집 후 7일째에 T 세포는 내인성 TCR 녹아웃 및 tgTCR 삽입뿐만 아니라 기억 및 고갈 상태를 결정하기 위해 유세포 분석법으로 표현형을 결정하였다. 간략하게, T 세포를 CD3, CD4, CD8, Vb8, CD62L, CD45RO를 표적화하는 항체의 콕테일에서 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고, Cytoflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. T 세포를 크기, CD4/CD8 상태, 및 WT1 tgTCR 발현(Vb8+CD3+)에 대해 게이팅하였다. Vb8은 WT1 tgTCR의 발현을 식별한다.

[1252] 내인성 TCR 유전자 파괴 및 WT1 tgTCR 삽입물을 유세포 분석법으로 평가하였다. 표 4 및 도 2는 CD3+Vb8+ TCR T 세포의 퍼센트를 나타낸다. 표 5 및 도 3은 잔류 내인성 TCR(CD3+Vb8-)을 나타낸다.

표 4

조작된 T 세포에서 이식유전자 TCR 삽입률

세포 유형	그룹	삽입 % (평균)	삽입 (SD)
CD8	EP + AAV	68.5	0.4
	EP 단독	1.2	0.4
	LNP + AAV	60.9	1.4
	LNP 단독	0.8	0.0
	편집되지 않음	5.3	0.1
CD4	EP + AAV	71.55	0.85
	EP 단독	1.33	0.02
	LNP + AAV	55.4	1.3
	LNP 단독	0.855	0.115
	편집되지 않음	6.295	0.395

[1253]

표 5

조작된 T 세포에서 잔류 내인성 TCR

세포 유형	그룹	내인성 TCR % (평균)	내인성 TCR % (SD)
CD8	EP + AAV	12.0	0.3
	EP 단독	10.1	0.1
	LNP + AAV	0.8	0.1
	LNP 단독	1.6	0.0
	편집되지 않음	94.5	0.1
CD4	EP + AAV	6.67	0.11
	EP 단독	8.045	0.215
	LNP + AAV	1.46	0.29
	LNP 단독	1.765	0.005
	편집되지 않음	93.55	0.35

[1254]

[1255] 확장 후 표현형 분석을 위해(LNP 그룹에 대한 편집 후 7일째 및 EP 그룹에 대한 편집 후 11일째), 동결보존된 T 세포를 해동하고, 표 2에 기재된 바와 같이 배치 번호 1에서 밤새 휴지시킨 후, U-바닥 96-웰 플레이트에서 20 분 동안 CD3, CD4, CD8, CD45RA, IL-7R, CD45RO, CD95, LAG3, CD27, CD62L, TIM3, PD1, LAG3으로 염색하였다. 10일에 수확된 LNP 조작된 T 세포 대 14일에 수확된 RNP 전기천공 T 세포는 도 4 및 표 6에 나타난 바와 같이 증가된 CD45RA+CD27+ 초기 줄기-세포 기억 표현형을 나타낸다. CD45RA+CD27+ 초기 줄기-세포 기억 표현형은 증가된 지속성과 상관 관계가 있는 것으로 나타났으며, 세포 치료제의 치료 효능이 세포 제품에서 분석되었다.

표 6

LNP 또는 전기천공법으로 조작된 CD8+ T 세포의 기억 표현형

CD8+ T 세포	EP (14 일)	LNP (10 일)
% CD45RA+ CD27+	33.2	67.4
% CD45RA- CD27+	11.2	23.1
% CD45RA- CD27-	37.4	18.2
% CD45RA+ CD27-	18.2	4.1

[1256]

[1257] 실시예 2.5. T 세포 기능 검정: 세포독성 및 사이토카인 방출

[1258] 실시예 2.5.1. OCI-AML3 공동-배양

[1259] LNP 및 전기천공 Cas9/sgRNA 전달 과정을 사용하여 조작된 T 세포는 적정량의 WT1 펩티드(VLDFAPPGA, 이하, 이

하 VLD 펩타이드라고 함)로 펄스된 OCI-AML3 표적 세포와의 공동 배양 후 IL-2 분비를 측정함으로써 기능적 반응성에 대해 추가로 평가되었다. OCI-AML3 세포를 40,000개 세포/웰의 밀도로 시딩하고, 표 7에 나타낸 바와 같이 적정량의 VLD 펩타이드와 함께 인큐베이션하였다. 조작된 T 세포를 표 2에 기술된 바와 같이 배지 번호 5의 2.5:1 효과기 T 세포:표적 세포(E:T) 비율로 펄스 OCI-AML3 세포에 첨가하였다. 24시간의 공동-배양 상청액을 수확한 후 제조사의 프로토콜(R&D Duoset, 카탈로그 번호. DY202-5)에 따라 ELISA로 IL-2 분비를 정량화했다. 표 7 및 도 5에서, RNP 조작된 T 세포에 비해 LNP 조작된 T 세포는 VLD 펩타이드 펄스된 OCI-AML3 세포와 함께 배양되었을 때 증가된 IL-2 생산을 나타냈다.

표 7

LNP 또는 RNP/EP 조작된 WT1 TCR T 세포와 적정량의 VLD 펩타이드로 펄스된 OCI-AML3 세포의 공동 배양물에서의 IL-2 분비

그룹	VLD 펩타이드 (nM)	IL-2 (평균 pg/mL)	IL-2 (SD)
LNP + AAV	5000	5369	65
LNP + AAV	500	5604	54
LNP + AAV	50	5436	130
LNP + AAV	5	4372	nd
LNP + AAV	0.5	1390	nd
LNP + AAV	0.05	<LLOD	<LLOD
EP + AAV	5000	4022	117
EP + AAV	500	3661	155
EP + AAV	50	2875	32
EP + AAV	5	1943	65
EP + AAV	0.5	308	16
EP + AAV	0.05	<LLOD	<LLOD

결정되지 않음 = nd; 검출 한한 = LLOD

[1260]

[1261]

실시예 2.5.2. K562 공동-배양

[1262]

HLA-A*02:01 및 루시퍼라제 리포터 유전자로 형질도입된 K562 세포를 25 µg/mL에서 1시간 동안 미토마이신 C(Tocris Biosciences, 카탈로그 번호 3258)로 처리하여 세포 분열을 정지시킨 다음, WT1 tgTCR T 세포 또는 TCR-null(LNP 단독) 대조군 T 세포와 중복으로 공동-배양되었다. 24시간 후, 사이토카인 방출(IFN γ)을 ELISA(R&D 시스템 카탈로그 번호 DY285)로 정량화하였다. 48시간 후, 제조사의 프로토콜(Promega, E2610)에 따라 Bright-GLO 시약을 사용하여 표적 세포의 T 세포 매개 세포독성을 정량화했다. 특이적 용해 퍼센트는 하기 식에 의해 결정하였다:

[1263]

% 특이적 용해 = 100 - ((실험 웰/표적 단독 대조군 웰) × 100)

[1264]

표 8 및 도 6은 K562 HLA-A*02:01 양성 세포와의 공동-배양에 대한 반응으로 조작된 T 세포에 의한 인터페론-감마(IFN γ) 방출을 나타낸다.

[1265]

표 9 및 도 7은 조작된 T 세포와 공동-배양된 경우, K562 HLA-A*02:01 양성 세포의 특이적 용해를 보여준다.

표 8

K562 HLA-A*02:01 양성 세포와 공동-배양된 조작된 T 세포에 의한 IFNγ 방출

그룹	E:T	IFNγ (평균 pg/mL)	IFNγ (SD)
LNP + AAV	10	4742	151
LNP + AAV	5	5398	209
LNP + AAV	2.5	4937	227
LNP + AAV	1.25	2610	150
LNP + AAV	T 세포 단독	106	9
EP + AAV	10	2405	46
EP + AAV	5	2324	25
EP + AAV	2.5	2420	30
EP + AAV	1.25	1263	19
EP + AAV	T 세포 단독	150	35

[1266]

표 9

K562 HLA-A*02:01 양성 세포의 특이적 용해

그룹	E:T	% 특이적 용해	SD
LNP + AAV	10	98.51	0.12
LNP + AAV	5	98.28	0.02
LNP + AAV	2.5	96.38	0.53
LNP + AAV	1.25	75.27	0.06
EP + AAV	10	98.92	0.14
EP + AAV	5	98.48	0.27
EP + AAV	2.5	98.20	0.50
EP + AAV	1.25	83.05	0.60
LNP	10	31.08	5.53
LNP	5	10.40	0.02
LNP	2.5	2.90	2.90
LNP	1.25	0.00	0.00

[1267]

[1268]

실시예 2.6. 표적화된 세포-매개 T 세포 재-자극 검정

[1269]

간략하게, 효과기 T 세포는 표 2에 기재된 바와 같이, 배지 번호 5에서 2.5:1 효과기 T 세포:표적 세포(E:T) 비율(자극 1)로 500 nM VLD 펩티드로 펄스된 OCI-AML3 표적 세포와 공동-배양되었다. 5일 후, 효과기 T 세포 수를 기록하고, 및 자극 1에서와 같이 세포를 다시 시딩하였다. 제2 자극 5일 후, 세포 수를 기록하고, 유세포 분석법을 위해 샘플을 채취하였다. 나머지 세포는 5:1 E:T 비율을 사용하는 것을 제외하고 자극 1과 같이 세 번째로 재자극되었다. 제3 자극 5일 후, 세포 수를 기록하고, 유세포 분석법을 위해 샘플을 채취하였다. LNP 또는 RNP 조작된 T 세포가 VLD-펩티드 펄스 OCI-AML3 세포와 공동 배양된 장기 재-자극 검정은 다중 자극 과정에 걸쳐 LNP 조작된 T 세포의 증식이 증가한 반면 RNP 전기천공 T 세포는 반복 자극후 증식이 감소한 것으로 나타났다(도 8, 표 10).

표 10

VLD 펩티드-펄스 OCI-AML3 세포에 의한 3회 연속 재-자극 동안 T 세포 확장

데이터는 자극 1 이전의 양에 대한 T 세포 수의 배수 변화로 표시됨.

그룹	자극 후 #	누적 배수 변화	SD
LNP + AAV	1	7.2	0.4
LNP + AAV	2	34.2	3.5
LNP + AAV	3	120.1	17.2
EP + AAV	1	7.9	0.4
EP + AAV	2	19.0	1.0
EP + AAV	3	27.1	4.8

[1270]

[1271]

실시예 3. 전기천공 및 LNP 조작된 T 세포의 구조적 계층 특징화

[1272]

전기천공 또는 LNP 공정에 의한 조작 후 염색체 전좌 및 시험관내 기능적 특징에 대해 T 세포를 검정하였다.

[1273]

실시예 3.1. T 세포 조작

[1274]

T 세포 배양 배지가 표 2에 기재된 바와 같이 배지 번호 17인 것을 제외하고는 실시예 2에서와 같이 T 세포를 단리하고 배양하였다.

[1275]

P3 완충액(Lonza X 키트 L, 카탈로그 V4X9-3012)에서 3-5×10⁶ 세포/100 μL의 밀도로 T 세포를 전기천공한 것을 제외하고는 T 세포의 전기천공 처리를 실시예 2에서와 같이 수행하고, 전기천공 큐벳의 전체 내용물을 GREX 플레이트(Wilson Wolf)로 옮겼다.

[1276]

LNP 처리 및 T 세포의 활성화를 실시예 2에서와 같이 하기 변형으로 수행하였다. LNP는 일반적으로 50/9/39.5/1.5 지질 A, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG의 비율로 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다. LNP는 TRAC를 표적화하는 Cas9 mRNA 및 sgRNA G013006(서열 번호 708) 또는 TRBC를 표적화하는 Cas9 mRNA 및 sgRNA G016239(서열 번호 707)를 함유하였다. LNP는 1:2의 gRNA 대 mRNA의 중량비로 제조하였다. LNP는 표 2에 기술된 바와 같이 배지 번호 17에서 5 μg/mL의 2X 농도(달리 명시되지 않는 한)에서 사전인큐베이션되었고, 37 °C에서 15분 동안 제조함 인간 ApoE3(Peprotech, 카탈로그 번호 350-02)로 1 μg/mL의 농도로 보충되었다. 표 2에 기술된 바와 같이 T 세포를 세척하고 배지 번호 16에 현탁시켰다. 사전-인큐베이션된 LNP를 각 웰에 첨가하

여 표 11에 나타난 바와 같이 0.5×10^6 세포/mL T 세포를 갖는 LNP의 최종 농도를 산출하였다. AAV6은 TRAC 유전자좌로의 부위 특이적 통합을 위해 상동성 아암에 측접한 WT1 표적화 tgTCR을 암호화하는 상동성 방향성 복구 주형(HDRT)을 전달하는 데 사용되었다. 편집 후 모든 T 세포는 GREX 플레이트에서 확장되었다.

표 11은 각 샘플에 대한 편집 단계를 설명한다. 일부 예에서, T 세포는 표 11에 계획된 바와 같이 LNP를 사용하여 순차적인 방식으로 편집되었다. LNP 순차적 1 프로세스(BF)에 대해 간략히 설명하면, T 세포를 세포가 1×10^6 세포/mL의 밀도에서 유지되는 것을 제외하고는 상기한 바와 같이 TRBC를 표적화하는 LNP로 처리하고, 실시예 2에 기술된 바와 같이 TransAct의 1:100 희석으로 활성화되었다. LNP를 2.5%(BF2.5) 또는 5%(BF5) 또는 5%(AF) 인간 AB 혈청(HABS)과 함께 인큐베이션하였다. 3일 후에 이들 편집된 T 세포를 상기한 바와 같이 TRAC LNP 및 AAV로 처리하였다. LNP AF의 경우, T 세포를 48시간 동안 활성화시키고, 상기한 바와 같이 TRAC LNP 및 AAV로 처리하였다. 다음 날 T 세포를 수집하고, 세척하고, TRBC LNP로 24시간 동안 처리한 후 GREX 플레이트로 옮겼다. 동시 샘플(LNP SIM)은 TRAC LNP, TRBC LNP 및 AAV로 3일 차에 편집하였다.

표 11

T 세포 조작 조건

상태	1일	2일	3일	4일	5일
편집되지 않음	해동, 활성화		세척	확장	
EP	해동, 활성화		RNP + AAV	확장	
LNP SIM LNP	해동, 활성화		TRAC LNP + TRBC LNP + AAV	확장	
BF2.5 LNP	해동, 활성화, TRBC LNP 2.5% HABS, 2.5 µg/ml LNP		TRAC LNP + AAV	확장	
BF5 LNP	해동, 활성화, TRBC LNP 5% HABS, 5 µg/ml LNP		TRAC LNP + AAV	확장	
LNP AF	해동, 활성화		TRAC LNP + AAV	TRBC LNP	확장

처리 및 성장 후, CD3, Vb8, CD4, CD8, CD45RO, 및 CD27을 표적화하는 항체를 사용하여 실시예 2에 기재된 바와 같이, 유세포 분석법에 의해 T 세포를 수확 및 검정하였다. T 세포는 Cryostore® CS10 배지에서 보존하였다. 표 12 및 도 9는 조작 후 T 세포 배양물의 확장을 보여준다. 각 공여자 또는 그룹에 대해 9일째 총 세포를 0일째 세포 수(3백만개)로 나누어, 실험 전반에 걸친 배수 확장을 계산하였다. 일반적으로 배수 확장은 총 세포 수를 시드된 세포 수로 나누어, 예를 들어 공초점 현미경으로 핵을 카운팅하여 계산하였다. 표 13 및 도 10은 조작된 CD8+ T 세포에 대한 tgTCR 삽입률을 보여준다. 표 14 및 도 11은 처리 후 내인성 TCR을 보유하는 CD8+ T 세포의 백분율을 보여준다. 표 15 및 도 12는 기억 세포 표현형과 관련된 표현형인, CD27+인 조작된 T 세포의 백분율을 보여준다.

표 12

T 세포 확장, 전체 세포

그룹	일	평균 (x10e6)	SD (x10e6)	N	복제	복제	복제	배수 변화
편집되지 않음	0	3	0	3	3.0	3.0	3.0	
	2	2.5	0.8	3	3.1	1.6	2.9	
	6	52	13.6	2	62.2	0.0	43.0	
	9	255	12.5	3	241.0	262.0	263.0	85
EP	0	3	0	3	3.0	3.0	3.0	
	2	3.0	5.4	3	3.0	2.5	3.5	
	6	20.4	7.1	3	28.0	19.3	13.9	
	9	123	22.8	3	149.0	109.0	110.0	41
	12	261	61.7	3	325.0	255.0	202.0	87
SIM LNP	0	3	0	3	3.0	3.0	3.0	
	2	2.8	1.0	3	3.9	1.9	2.8	
	6	54	15.6	3	71.7	51.1	41.1	
	9	253	51.5	3	312.0	230.0	217.0	84.3
BF2.5 LNP	0	3	0	3	3.0	3.0	3.0	
	2	2.42	0.3	3	2.7	2.1	2.4	
	6	51.1	23.9	3	78.4	41.4	33.5	
	9	256	57.0	3	317.0	247.0	204.0	85.3
BF5 LNP	0	3	0	3	3.0	3.0	3.0	
	2	1.94	0.5	3	2.2	1.4	2.3	
	6	48.1	20.9	3	71.3	42.5	30.6	
	9	238	47.9	3	293.0	210.0	210.0	79.3
AF LNP	0	3	0	3	3.0	3.0	3.0	
	2	2.52	0.5	3	3.1	2.0	2.5	
	6	62.5	25.8	3	92.3	48.1	47.1	
	9	256	40.9	3	293.0	263.0	212.0	85.3

[1280]

표 13

CD8+ T 세포로의 이식유전자 TCR 삼입률

그룹	삼입 % (평균)	SD	N	복제	복제	복제
편집되지 않음	6.7	2.0	3	4.9	6.5	8.8
EP	81.1	5.4	3	76.7	87.2	79.6
SIM LNP	45.7	15.2	3	30.3	60.7	46.2
BF2.5 LNP	57.7	9.8	3	46.8	66.1	60.2
BF5 LNP	61.2	9.5	3	51.8	70.8	61.2
AF LNP	53.9	10.7	3	41.6	61.7	58.4

[1281]

표 14

CD8+ T 세포내 잔류 내인성 TCR

그룹	내인성 TCR % (평균)	SD	N	복제	복제	복제
편집되지 않음	93.1	1.61	3	94.90	93.40	91.00
EP	0.43	0.43	3	0.93	0.22	0.14
SIM LNP	0.85	0.19	3	0.98	0.63	0.96
BF2.5 LNP	0.75	0.14	3	0.90	0.62	0.72
BF5 LNP	0.56	0.26	3	0.77	0.64	0.27
AF LNP	0.52	0.22	3	0.75	0.49	0.32

[1282]

표 15

기억 표현형

그룹	% CD27 + (평균)	SD	N	복제	복제	복제
편집되지 않음	76.1	23.6	3	91.4	88.0	48.9
EP	35.8	3.4	3	36.1	39.0	32.3
SIM LNP	54.9	11.6	3	64.4	58.4	42.0
BF2.5 LNP	58.7	13.5	3	68.6	64.3	43.3
BF5 LNP	57.5	10.4	3	66.7	59.6	46.2
AF LNP	67.4	11.8	3	76.4	71.7	54.0

[1283]

[1284] 실시예 3.2. Droplet Digital™ PCR에 의한 TRBC 유전자좌로의 전좌 분석 및 삽입

[1285] TRAC 유전자좌와 TRBC 유전자좌 사이의 전좌 및 TRBC 유전자좌로의 삽입을 Droplet Digital™ PCR(ddPCR)을 사용하여 검정하였다. 간략하게는, 제조사의 프로토콜에 따라 DNeasy 혈액 및 조직 키트(Qiagen, 카탈로그 69506)를 사용하여 T 세포 샘플에서 gDNA를 단리하였다. ddPCR 프라이머는 TRAC-TRBC 및 TRBC-TRAC 접합부를 증폭하기 위해 선택되었으며, 이는 TRAC-TRBC 및 TRBC-TRAC 전좌 뿐만 아니라 선택된 TCR AAV 작제물의 상동성-독립적 무작위 통합에 의한 TRBC 유전자좌로의 삽입을 검출한다. ddPCR 검정은 제조사의 프로토콜에 따라 수행되었다. 간략하게는, 100 ng의 gDNA를 프로브(Biorad, 카탈로그 1863024) 및 III HF(New England Biolabs, R3104S), 900 nM의 검증된 프라이머 및 250 nM의 프로브에 대해 2x ddPCR Supermix로 제조하였다. 샘플은 QX200™ Droplet Generator(Biorad, 카탈로그 1864002)로 처리되었으며, 열순환되었다. 주기 매개변수는 다음과 같다: 95℃에서 10분 동안 효소 활성화; 94℃에서 30초 동안 변성, 60℃에서 1분 어닐링, 및 72℃에서 4분 확장의 50 주기; 98℃에서 10분 동안 효소 비활성화, 및 4℃에서 유지. QX200™ Droplet Reader(Biorad, 카탈로그 1864003)를 사용하여 액적 형광을 측정하고, QuantaSoft™ 소프트웨어, Regulatory Edition(Biorad, 카탈로그 1864011)으로 데이터를 분석하였다. 전좌된 TRAC-TRBC의 백분율 및 TRBC 삽입 세포(도 13a(TRAC 프로브) 및 도 13b(TRBC 프로브)) 및 TRBC-TRAC(도 14a(TRAC 프로브) 및 도 14b(TRBC 프로브))의 백분율 및 TRBC 삽입 세포는 표 16A에 제시되어 있다.

[1286] [표 16A]

전좌된 및 TRBC 삽입 세포의 퍼센트

ddPCR 상태	샘플	공여자 003			공여자 006			공여자 276		
		평균	Poisson Max	Poisson Min	평균	Poisson Max	Poisson Min	평균	Poisson Max	Poisson Min
TRAC- TRBC TRAC 프로브	편집되지 않음	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	EP	2.56	2.96	2.16	1.94	2.32	1.56	1.71	2.05	1.35
	SIM LNP	1.59	1.95	1.22	1.73	2.03	1.43	1.31	1.62	1.00
	BF2.5 LNP	0.51	0.67	0.34	0.36	0.49	0.23	0.42	0.57	0.27
	BF5 LNP	0.63	0.83	0.44	0.39	0.55	0.23	0.57	0.77	0.36
	AF LNP	0.89	1.09	0.68	0.58	0.76	0.41	0.73	0.94	0.51
TRAC- TRBC TRBC 프로브	편집되지 않음	0.01	0.05	0.00	0.01	0.04	0.00	0.02	0.06	0.00
	EP	1.59	1.92	1.25	1.77	2.15	1.39	1.48	1.81	1.14
	SIM LNP	1.20	1.54	0.87	2.14	2.49	1.78	1.61	1.92	1.30
	BF2.5 LNP	0.06	0.12	0.01	0.27	0.39	0.16	0.17	0.29	0.06
	BF5 LNP	0.21	0.32	0.10	0.46	0.65	0.28	0.10	0.19	0.02
	AF LNP	0.68	0.87	0.48	0.61	0.80	0.41	0.94	1.16	0.71
TRBC- TRAC TRAC 프로브	편집되지 않음	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	EP	1.81	2.16	1.47	1.92	2.32	1.53	2.20	2.59	1.81
	SIM LNP	2.30	2.77	1.83	2.69	3.09	2.29	2.40	2.79	2.01
	BF2.5 LNP	0.25	0.37	0.13	0.40	0.58	0.23	0.31	0.46	0.15
	BF5 LNP	0.19	0.30	0.08	0.60	0.80	0.40	0.20	0.31	0.08
	AF LNP	0.62	0.80	0.45	0.82	1.03	0.60	0.80	1.04	0.56
TRBC- TRAC TRBC 프로브	편집되지 않음	0.13	0.22	0.04	0.04	0.10	0.00	0.14	0.24	0.03
	EP	1.90	2.25	1.55	2.03	2.41	1.66	1.68	2.04	1.30
	SIM LNP	1.84	2.23	1.46	1.76	2.12	1.42	1.94	2.34	1.54
	BF2.5 LNP	0.39	0.54	0.23	0.44	0.60	0.28	0.28	0.41	0.14
	BF5 LNP	0.43	0.59	0.26	0.30	0.45	0.16	0.30	0.45	0.15
	AF LNP	0.63	0.80	0.45	0.80	1.01	0.58	0.75	0.98	0.53

[1287]

[1288] TRAC 유전자좌와 TRBC 유전자좌 사이의 전좌율을 구체적으로 정량화하고 상동성-독립적 무작위 TRBC 삽입의 검출을 피하기 위해, TRAC-TRBC 또는 TRBC-TRAC 전좌 부위의 접합부에 걸친 앰플리콘을 증폭하기 위해 새로운 프라이머 세트를 설계했다. 정방향 및 역방향 프라이머는 각각 TRAC 유전자좌(AAV 상동성 아암의 외부) 또는 TRBC 유전자좌에 있었다. TRAC 또는 TRBC 유전자좌를 표적화하는 프로브는 증폭된 전위 앰플리콘을 인식하도록 설계되었다. 새로운 프라이머 및 프로브 세트는 TRAC 유전자좌와 TRBC 유전자좌 사이의 전좌의 특이적인 검출을 허용하지만 전술한 바와 같이 TRBC 유전자좌에서 상동성-독립적 무작위 통합을 검출하지는 않을 것이다. TRAC 유전자좌와 TRBC 유전자좌 사이의 전좌는 새로운 프라이머 및 프로브 세트를 사용하여 분석되었다. ddPCR 과정은 위에서 설명한 대로 수행되었다. TRAC-TRBC 전좌된 세포(도 14C(TRAC 프로브) 및 도 14D(TRBC 프로브)) 및 TRBC-TRAC(도 14E(TRAC 프로브) 및 도 14F(TRBC 프로브)) 전좌된 세포의 백분율은 표 16B에 나타나 있다.

[1289] 표 16B

전좌된 세포 퍼센트

ddPCR 상태	샘플	공여자 003			공여자 006			공여자 276		
		평균	Poisson Max	Poisson Min	평균	Poisson Max	Poisson Min	평균	Poisson Max	Poisson Min
TRAC- TRBC TRAC 프로브	편집되지 않음	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	EP	0.19	0.26	0.11	0.13	0.20	0.06	0.22	0.32	0.13
	SIM LNP	0.17	0.24	0.10	0.04	0.07	0.01	0.06	0.11	0.02
	BF2.5 LNP	0.01	0.03	0.00	0.04	0.07	0.01	0.01	0.02	0.00
	BF5 LNP	0.01	0.03	0.00	0.03	0.05	0.01	0.03	0.05	0.00
	AF LNP	0.06	0.10	0.02	0.02	0.03	0.00	0.03	0.05	0.02
TRAC- TRBC TRBC 프로브	편집되지 않음	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	EP	0.24	0.32	0.15	0.06	0.11	0.01	0.17	0.25	0.08
	SIM LNP	0.16	0.23	0.08	0.03	0.07	0.00	0.09	0.15	0.03
	BF2.5 LNP	0.01	0.02	0.00	0.01	0.02	0.00	0.01	0.01	0.00
	BF5 LNP	0.02	0.03	0.00	0.00	0.01	0.00	0.01	0.03	0.00
	AF LNP	0.04	0.07	0.00	0.02	0.04	0.00	0.03	0.04	0.01
TRBC- TRAC TRBC 프로브	편집되지 않음	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	EP	0.30	0.40	0.20	0.15	0.23	0.08	0.17	0.25	0.09
	SIM LNP	0.11	0.17	0.05	0.07	0.12	0.03	0.07	0.12	0.02
	BF2.5 LNP	0.01	0.02	0.00	0.01	0.03	0.00	0.01	0.01	0.00
	BF5 LNP	0.03	0.05	0.00	0.02	0.04	0.00	0.01	0.03	0.00
	AF LNP	0.07	0.11	0.03	0.03	0.05	0.01	0.04	0.06	0.02
TRBC- TRAC TRAC 프로브	편집되지 않음	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	EP	0.24	0.33	0.16	0.19	0.27	0.10	0.17	0.25	0.08
	SIM LNP	0.14	0.20	0.07	0.04	0.07	0.00	0.05	0.10	0.00
	BF2.5 LNP	0.01	0.02	0.00	0.02	0.05	0.00	0.01	0.02	0.00
	BF5 LNP	0.01	0.02	0.00	0.02	0.03	0.00	0.01	0.02	0.00
	AF LNP	0.03	0.06	0.00	0.02	0.04	0.01	0.03	0.05	0.01

[1290]

[1291] 실시예 3.3. 루시퍼라제-기반 표적 세포 사멸 검증

[1292] T 세포는 시험관내 기능적 특성에 대해 추가로 특성화되었다. B 세포 급성 림프구성 백혈병 세포주 697(ACC 4 2)은 Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH(DSMZ)(Braunschweig Germany)에서 입수했다. 제조사의 프로토콜에 따라 폴리브렌(Millipore Sigma, 카탈로그 번호 TR-1003)의 존재 하에 LV-SFFV-Luc2-P2A-EmGFP 렌티바이러스 벡터(Imanis Bioscience, 카탈로그 번호 LV050-L)로 세포를 형질도입했다. 생물 발광 강도를 측정하여 루시퍼라제 활성화에 대해 클론 개체군을 스크리닝했다. 697-Luc2 세포를 37℃, 95% 습도, 5% CO2에서 10% 소 태아 혈청(Gibco, 카탈로그 번호 A38402-01), 5% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco, 카탈로그 번호 15140-122) 및 Glutamax(Gibco, 카탈로그 번호 35050-061)가 보충된 RPMI-1640 배지(Corning/Cellgro, 카탈로그 번호 10-040-CM)에서 배양하였다.

[1293] HLA-A02:01 표적(697-Luc2, K562 HLA-A*02:01-Luc2)을 발현하는 WT1 및 음성 대조군 K562-Luc2의 TCR-T 세포 매개 세포독성을 검증하였다. 이를 위해 LNP 편집된 WT1 TCR T 세포 또는 비편집 대조군 T 세포를 3:1, 1.5:1, 및 0.75:1의 효과기-대-표적 비율로 48시간 동안 상기 표적 세포주와 공동-배양하였다. 그런 다음 Bright-GLO 시약을 사용하여 루시퍼라제 신호를 검출하고 실시예 2에 기재된 바와 같이 분석했다. 특이적 용해를 표 17 및 도 15a-f에 나타내었다.

표 17

조작된 T 세포에 의한 표적 세포의 특이적 용해

공여자	표적	E/T	편집되지 않음			EP			SIM LNP			BF2.5 LNP		
			평균	SD	N	평균	SD	N	평균	SD	N	평균	SD	N
006	K562	3	-0.4	1.4	2	11.7	1.4	2	14.1	2.1	2	15.3	1.7	2
		1.5	8.3	0.2	2	16.3	2.1	2	15.7	1.6	2	17.2	1.4	2
		0.75	9.3	4.0	2	16.4	1.0	2	16.0	1.7	2	18.0	5.1	2
		0	-5.1	2.8	2	5.5	3.6	2	0.5	4.5	2	-1.0	4.3	2
	K562 HLA A*02:01	3	12.7	1.5	2	97.9	0.0	2	97.8	0.0	2	98.6	0.4	2
		1.5	12.4	2.1	2	94.6	0.2	2	98.1	0.4	2	99.1	0.4	2
		0.75	8.7	10.9	2	74.6	1.7	2	85.8	1.5	2	92.3	0.5	2
		0	0.5	6.9	2	0.4	0.1	2	4.1	2.1	2	-4.9	5.2	2
	697-luc	3	19.0	4.2	2	97.8	1.3	2	98.8	0.7	2	99.5	0.1	2
		1.5	8.3	3.4	2	92.0	0.2	2	96.4	3.8	2	98.9	0.4	2
		0.75	13.0	13.5	2	73.0	3.2	2	78.4	10.3	2	93.9	0.3	2
		0	-12.8	2.1	2	5.9	15.3	2	-5.2	3.1	2	12.2	6.5	2
276	K562	3	-3.8	3.5	2	-9.8	1.6	2	1.2	1.5	2	-3.2	2.5	2
		1.5	-7.7	2.6	2	0.4	0.5	2	-4.7	3.5	2	-3.5	1.0	2
		0.75	-5.2	7.7	2	-0.4	1.0	2	0.2	1.9	2	-5.3	1.8	2
		0	-9.6	11.7	2	5.4	4.7	2	4.8	4.0	2	-0.7	8.8	2
	K562 HLA A*02:01	3	-2.6	8.8	2	97.7	0.2	2	95.4	0.7	2	96.3	0.9	2
		1.5	-7.0	9.3	2	88.7	0.4	2	80.2	2.7	2	85.3	1.2	2
		0.75	-12.9	7.1	2	62.2	0.3	2	50.6	2.3	2	54.1	1.7	2
		0	0.4	3.1	2	-0.1	4.0	2	1.0	3.4	2	-1.4	6.1	2
	697-luc	3	5.1	9.8	2	98.0	0.9	2	90.1	0.4	2	95.5	0.9	2
		1.5	2.2	13.2	2	88.0	8.6	2	55.6	13.5	2	72.2	6.6	2
		0.75	-5.9	6.7	2	45.7	2.5	2	34.9	12.4	2	28.3	1.8	2
		0	-3.1	12.3	2	5.8	2.0	2	2.9	18.2	2	9.7	0.0	1

[1294]

[1295] 실시예 4. LNP 조작된 T 세포의 생체내 효과.

[1296] LNP 조작된 T 세포는 B 세포 급성 림프구성 백혈병 세포주 697로 생성된 마우스에서 암 세포 성장 및 치사율에 영향을 미치는 생체내 효능에 대해 검증되었다.

[1297] 실시예 4.1. 697개 세포 제조.

[1298] 생장 전에, 10% 소 태아 혈청(Gibco, 카탈로그 번호 A38402-01), 5% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco, 카탈로그 번호 15140-122) 및 Glutamax(Gibco, 카탈로그 번호 35050-061)가 보충된 RPMI-1640 배지(Corning/Cellgro, 카탈로그 번호 10-040-CM)에서 37°C, 95% 습도, 5% CO₂에서 실시예 3에 기재된 바와 같은 697개 세포를 배양하였다.

[1299] 실시예 4.2. T 세포 조작.

[1300] T 세포를 분리하고 실시예 2에서와 같이 제조하였다. LNP는 일반적으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 50/9/39.5/1.5 지질 A, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG의 비율로 제조하였다. LNP는 TRAC를 표적화하는 Cas9 (서열 번호 6) 및 sgRNA G013006(서열 번호 708)를 암호화하는 mRNA 또는 TRBC를 표적화하는 Cas9 mRNA 및 sgRNA G016239(서열 번호 707)를 함유하였다. T 세포의 LNP 처리는 하기 변형으로 실시예 2에서와 같이 수행하였다. 활성화 후 48시간 후, T 세포를 표 2에 기재된 바와 같이 세척하고, 배지 번호 7에 현탁하였다. TRAC 또는 TRBC를 표적화하는 Cas9 mRNA 및 sgRNA를 1:2의 gRNA 대 mRNA의 중량 비로 함유하는 LNP를 1 µg/mL 제조한 인간 ApoE3(Peprotech, 카탈로그 번호 350-02)의 최종 농도로 보충된 표 2에 기재된 바와 같은, 배지 번호 1에서 37°C에서 15분 동안 함께(각각 5 µg/mL) 인큐베이션하였다. 사전-인큐베이션된 LNP 믹스를 각 웰에 첨가하여 LNP 당 2.5 µg/mL 및 0.5x10⁶ 세포/mL T 세포의 최종 농도를 산출하였다. WT1 표적화 tgTCR(서열 번호 9) 또는 GFP(Vigene; 서열 번호 8)를 암호화하는 상동성 방향성 복구 주형(HDRT)을 전달하기 위해 AAV6을 사용하고, 각각은 TRAC 유전자좌로의 부위-특이적 통합을 위한 상동성 아암에 측접하였다.

[1301] 처리 및 성장 후, CD3, CD4, CD8, CD45RO, 및 CD27을 표적화하는 항체를 사용하여, 실시예 2에 기재된 바와 같이, T 세포를 수확하고, 유세포 분석법으로 검증하였다. T 세포는 CryoStore® CS10 배지에서 보존하였다. 표 18 및 도 16은 조작된 T 세포에 대한 tgTCR 삽입률을 나타낸다. 표 19 및 도 17은 처리 후 내인성 TCR을 보유하는 CD8+ T 세포의 백분율을 나타낸다. 표 20 및 도 18은 기억 세포 표현형과 연관된 표현형인 CD45RO+CD27+인 조작된 T 세포의 백분율을 나타낸다.

표 18

CD8+ T 세포로의 이식유전자 TCR 삽입

T 세포	EP	LNP
% CD3+ Vb8+	78.2	53.1
% CD3- Vb8+	2.38	2.36
% CD3- Vb8-	15.7	43.4
% CD3+ Vb8-	3.87	1.16

[1302]

표 19

내인성 TCR 의 보유

T 세포	EP	LNP
% CD3+ GFP+	0.68	0.26
% CD3- GFP+	86.2	48.9
% CD3- GFP-	10.6	50.0
% CD3+ GFP-	2.58	0.85

[1303]

표 20

기억 표현형 CD8+ T 세포

CD8+ T 세포	EP	LNP
% CD45RO+ CD27+	21.4	13.6
% CD45RO- CD27+	58.9	77.5
% CD54RO- CD27-	7.34	4.71
% CD45RO+ CD27-	12.4	4.17

[1304]

[1305] 실시예 4.3. 생체내 조작된 T 세포 효능

[1306] Taconic Biosciences로부터 입수한 4개의 인간화 면역결핍 마우스 계통을 697개 세포: NOG-h IL-2(모델 번호: 13440-F), NOG- IL-15(모델 번호: 13683-F), NOG(모델 번호: NOG-F) 및 NOG-EXL(모델 번호: 13395-F)로 생착하였다. 200 rad 마우스에 준치사 방사선 조사 24시간 후, 0.2×10^6 697-Luc2 백혈병 세포를 정맥내 접종하였다. 마우스를 가열 램프 아래에서 3~5분 동안 따뜻하게 하고, HBSS(Gibco, 카탈로그 번호 14025-092)에 현탁된 인간 백혈병 세포를 꼬리 정맥을 통해 정맥 내로 이식했다. 백혈병 접종 2일 후, 꼬리 정맥 시각화를 위해 가열 램프 아래에서 3~5분 동안 따뜻하게 한 후 마우스에 꼬리 정맥을 통해 15×10^6 TCR+ T 세포를 정맥 접종했다.

[1307] 처리된 마우스는 생체내 생물발광 영상화 및 실험 전반에 걸쳐 주당 2회 체중 모니터링을 겪었다. 영상화 절차 동안 마우스를 흡입 이소플루란(2%)으로 마취시켰다. 루시페라제-기반 생물발광 영상화를 IVIS 스펙트럼 시스템으로 수행하였다. 포스페이트 완충 식염수(PBS)에 용해된 150 mg/kg D-루시페린(Perkin-Elmer, 파트 번호 122799)을 복강내 주사한 후 동물의 영상을 촬영했다. 자동 노출로 설정된 카메라로 주사 후 5분 동안 동물의 이미지를 촬영했다. Living Image 수집 및 분석 소프트웨어(caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)를 사용하여 이미지를 촬영하고, 생물발광 신호를 기록하였다. 광자(p)/초(s) 단위로 측정된 총 플럭스 값을 결정하기 위해 동일한 관심 영역(ROI)을 각 마우스에 그렸다. 동물을 임상적으로 주당 3회 모니터링하고 백혈병 보급 및 임상 증상(체중 감소 >18%, 뒷다리 마비)시 안락사시켰다. 질환 진행으로 인해 체중이 감소했다.

[1308] 표 21은 모든 샘플에 대한 ALL 액상 종양 부담의 척도로서 평균 생물발광을 나타내고, 도 19는 NOG-hIL-2 마우스에 대한 생물발광을 나타낸다. 표 22는 모든 샘플에 대한 T 세포 처리된 마우스의 생존율을 나타내고, 도 20은 NOG-hIL-2 마우스의 생존율을 나타낸다.

표 21

생물발광

		평균 생물발광 (중양 부담)							
		WT1-tgTCR				GFP-대조군 T 세포			
		NOG-h IL-2	NOG-h IL-15	NOG	NOG-EXL	NOG-h IL-2	NOG-h IL-15	NOG	NOG-EXL
		N	7	7	5	7	7	7	5
모든 접종 이후 일	1	2.03E+06	2.23E+06	1.48E+06	1.84E+06	2.59E+06	1.55E+06	1.56E+06	2.12E+06
	6	1.12E+06	1.10E+06	1.21E+06	1.00E+06	3.68E+07	3.89E+07	6.40E+07	1.30E+07
	9	1.26E+06	1.23E+06	1.82E+06	1.22E+06	2.21E+08	2.31E+08	5.58E+08	3.96E+08
	14	1.43E+06	1.71E+06	2.40E+07	5.42E+06	1.45E+10	1.26E+10	6.20E+09	8.19E+09
	16	1.12E+06	2.24E+06	4.76E+07	6.94E+06	1.44E+10	2.41E+10	2.92E+10	3.08E+10
	21	2.00E+06	3.20E+07	6.67E+08	3.46E+08	3.76E+10	3.28E+10		
	24	4.74E+06	8.19E+06	2.41E+09	1.34E+09				

[1309]

표 22

T 세포 처리된 마우스의 생존율

		EF1a-HD1				GFP-KO			
		NOG-h IL-2	NOG-h IL-15	NOG	NOG-EXL	NOG-h IL-2	NOG-h IL-15	NOG	NOG-EXL
N		7	7	7	5	7	7	7	5
모든 접종 이후 일	0	100	100	100	100	100	100	100	100
	2	100	100	100	100	100	100	100	100
	6	100	100	100	100	100	100	100	100
	9	100	71	100	100	100	100	100	100
	14	100	71	100	100	100	100	100	100
	16	86	71	100	100	86	86	43	100
	20	86	71	100	100	57	86	43	0
	21	86	71	100	100	14	14	0	
	24	86	71	100	100	0	0		
	27	86	71	100	100				

[1310]

[1311] 실시예 5. T 세포에서 LNP 투여량 반응 연구

[1312] T 세포는 상업적으로 입수하거나(예를 들어 인간 말초 혈액 CD4+CD45RA+ T 세포, 동결됨, Stem Cell Technology, 카탈로그 70029) 또는 류코팩(leukopak)에서 내부적으로 제조하였다. 내부 준비를 위해, 제조사 프로토콜에 따라 EasySep 인간 T 세포 분리 키트(Stem Cell Technology, 카탈로그 17951)를 사용하여 음성 선택으로 T 세포를 분리하였다. T 세포는 향후 사용을 위해 Cryostor CS10 동결 배지(카탈로그 07930)에서 동결보존하였다. 분리된 T 세포를 표 2에 기재된 바와 같이 배지 번호 11에서 해동시켰다. 해동 시, 세포를 3:1 비율의 CD3/CD28 비드(Dynabeads, Life Technologies)를 첨가하여 활성화시키고, LNP 첨가 전에 37°C에서 48시간 동안 배양하였다.

[1313] 활성화 후, 각각 B2M 및 TRAC를 표적화하는 Cas9 mRNA 및 sgRNA G000529(서열 번호 701) 및 G012086(서열 번호 703)을 전달하는 LNP를 T 세포에 전달하였다.

[1314] 본 실시예에서, LNP는 약 4.5의 양이온성 지질 아민 대 RNA 포스페이트(N:P) 몰비로 제형화되었다. 지질 나노입자 성분을 하기 몰비로 100% 에탄올에 용해시켰다: 45 mol-(12.7 mM) 양이온성 지질(예를 들어, (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-(((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트,

3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-((((3(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트라고도 함, 본원에서 지질 A로 지칭됨); 44 mol%(12.4 mM) 헬퍼 지질(예를 들어, 콜레스테롤); 9 mol%(2.53 mM) 중성 지질(예를 들어, DSPC); 및 2 mol%(.563 mM) PEG(예를 들어, PEG2k-DMG). RNA 카고는 25 mM 나트륨 시트레이트, 100 mM NaCl 완충액, pH 5에서 준비하여, 대략 0.45 mg/ml의 RNA 카고 농도를 생성했다. 제조사의 프로토콜에 따라 Precision Nanosystems NanoAssemblr™ Benchtop Instrument를 사용하여 지질과 RNA 용액의 미세유체 혼합에 의해 LNP가 형성되었다. 제형은 PD-10 탈염 컬럼(GE)을 사용하여 50 mM Tris-HCl, 45 mM NaCl, 5%(w/v) 수크로스 pH 7.5(TSS)로 완충액 교환하고, 0.2 um 막 필터를 통해 여과하였다.

LNP를 6%(v/v)의 *엘. 파시쿨라리스(M. fascicularis)*(사이노물구스 원숭이) 혈청(BioReclamationIVT, CYN197452)과 함께 약 5분 동안 37°C에서 사전인큐베이션하였다. 사전-인큐베이션된 LNP를 표 23 및 표 24에 나타낸 바와 같이 다양한 양의 총 RNA 카고로 T 세포에 첨가하였다. 24시간 LNP 노출 후, 세포를 세척하고 24웰 플레이트로 옮겼다. LNP 형질감염 5일 후, 유동 세포측정 분석 및 NGS 시퀀싱을 위해 세포를 수집하였다. 실시 예 1에 기재된 바와 같이 DNA 샘플을 PCR 및 후속 NGS 분석에 적용하였다.

실시예 5.1. 유세포 분석

유세포 분석을 위해 세포를 FACS 완충액(PBS + 2% FBS + 2mM EDTA)에서 세척했다. 그런 다음 세포를 실온(RT)에서 5분 동안 Human TruStain FcX(Biolegend®, 카탈로그 422302)로 차단하고 APC-접합 항-인간 B2M 항체(Biolegend®, 316312) 또는 PE-접합 TRAC 항체(Biolegend®, 카탈로그 304120)와 함께 4°C에서 30분 동안 1:200 희석하여 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 세포를 세척하고 생사 마커 7AAD(1:1000 희석; Biolegend®; 420404)를 함유하는 완충액을 재현탁시켰다. 예를 들어 Beckman Coulter CytoflexS를 사용하여, 유세포 분석법으로 세포를 처리하고, FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. 표 23 및 도 21a-b는 각각의 LNP 투여량에서 B2M 음성 세포의 백분율 및 편집 퍼센트를 나타낸다. 표 24 및 도 22a-b는 각각의 LNP 투여량에서 TRAC 음성 세포의 백분율 및 편집 퍼센트를 나타낸다.

표 23

B2M 편집의 투여량 반응 연구

LNP 투여량 (ng 총 RNA)	평균 % 편집	SD	평균 % B2M 음성	SD	N
10	23.1	2.6	8.1	1.3	3
25	54.5	3.0	35.3	2.4	3
50	83.0	0.9	72.4	1.5	3
75	93.4	1.3	86.0	2.0	3
100	95.5	0.2	89.2	0.1	3
125	97.6	0.3	92.0	0.6	3
150	98.4	0.2	93.0	0.3	3
175	98.5	0.6	93.1	0.4	3
200	99.1	0.1	93.9	0.2	3

표 24

TRAC 편집의 투여량 반응 연구

LNP 투여량 (ng 총 RNA)	평균 % 편집	SD	N	평균 % TRAC 음성	SD	N
10	23.1	2.6	3	7.7	0.2	3
25	54.5	3.0	3	18.6	2.0	2
50	83.0	0.9	3	44.1	9.9	3
75	93.4	1.3	3	51.6	8.7	3
100	95.5	0.2	3	68.6	2.8	3
125	97.6	0.3	3	69.3	1.3	3
150	98.4	0.2	3	75.2	1.8	3
175	98.5	0.6	3	81.5	2.3	3
200	99.1	0.1	3	85.4	2.3	3

- [1320] 실시예 6. 유전자 편집에 따른 염색체 전좌를 위한 방향성 게놈 혼성화 분석.
- [1321] Cas9 mRNA 및 가이드를 전달하기 위해 전기천공 또는 지질 나노입자로 처리된 T 세포는 KromaTiD(Longmont, CO)에 의한 방향성 게놈 혼성화(dGH™)에 의한 전좌를 포함하는 염색체 구조 변이에 대해 분석되었다.
- [1322] 실시예 6.1. 전기천공 처리
- [1323] 전기천공 처리를 위해, T 세포를 단리하고 실시예 5에서와 같이 동결보존하였다. 동결보존된 T 세포를 해동하고 표 2에 기재된 바와 같이 배지 번호 1에서 밤새 휴지시켰다.
- [1324] 각각 CIITA 및 B2M 유전자를 표적화하는 가이드 G013674(서열 번호 702) 또는 G000529(서열 번호 701)를 함유하는 리보핵단백질(RNP) 복합체를 전달하기 위해 상기 휴지된 T 세포를 전기천공하였다. 간략하게 스톱 RNP는 제조함 Cas9-NLS 단백질(50 μM 스톱)을 sgRNA(100 μM)와 함께 인큐베이션하여 최종 농도 20 μM Cas9와 40 μM sgRNA(1:2 Cas9 단백질 대 가이드 비율)로 준비했다. 배양된 T 세포를 100 μL 완충액 P3(Lonza, 카탈로그 V4SP-3960)에 재현탁된 10e6 세포에서 수확하고, 각각 2 μM의 최종 농도가 되도록 12.5 μL의 RNP와 함께 인큐베이션하였다. 이어서 T 세포를 Lonza 4D 뉴클레오펙터 5를 사용하여 전기천공하였다. 전기천공한 세포를 수집하고 표 2에 기재된 바와 같이 배지 번호 1에서 48시간 동안 휴지시켰다. 이어서, T 세포를 수확하고, 표 2에 기재된 바와 같이 배지 번호 1에서 1x10e6 세포/mL의 밀도로 재현탁하고, 1/100 희석에서 T 세포 TransAct 시약(Miltenyi, 카탈로그 130-111-160)으로 활성화시켰다. T 세포 활성화 후 48시간 후, TRAC를 표적화하는 G012086(서열 번호 703)을 포함하는 Cas9-RNP로 상기 기재한 바와 같이 T 세포를 전기천공하였다. 삼중 편집된 T 세포는 표 2에 기재한 바와 같이 배지 번호 1로 옮겨졌고, 향후 분석을 위해 확장하였다.
- [1325] 확장 후, 세포는 제조사의 프로토콜에 따라 MHC 클래스 I(Miltenyi Biotec, 카탈로그 130-120-431), MHC 클래스 II(Miltenyi Biotec, 130-104-823) 및 CD3-비오틴(Miltenyi Biotec, 카탈로그 130-098-612)에 대한 항-비오틴 마이크로비드(Miltenyi Biotec, 카탈로그 130-090-485) 프로토콜을 사용하여 삼중 녹아웃 세포를 선택하기 위한 자기-활성화 세포 분류(MAC) 고갈 프로세스를 통과하였다. 유세포 분석 및 NGS 분석을 위해 음성으로 선별된 세포를 수집하였다. 실시예 5에 기재된 프로토콜을 이들 분석에 사용하였다.
- [1326] 실시예 6.2. 순차적 및 동시 LNP 처리
- [1327] LNP 처리를 위해, T 세포를 단리하고 실시예 5에서와 같이 동결보존하였다. 해동시, T 세포를 T 세포 TransAct(Miltenyi Biotec, 카탈로그 130-111-160)로 제조사의 프로토콜에 의해 권장된 대로 활성화시키고 37 °C에서 24-72시간 동안 아래 명시된 대로 배양하였다.
- [1328] 동시 LNP 처리를 위해, 활성화 후 72시간에 T 세포를 Cas9 mRNA를 전달하는 3개의 LNP 및 각각 B2M, TRAC 및 CIITA를 표적화하는 sgRNA G000529(서열 번호 701), G012086(서열 번호 703), 및 G013674(서열 번호 702)와 함께 처리하였다. LNP를 50/10/38.5/1.5 이온화가능한 지질, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG의 비율로 실시예 1에 기재된 바와 같이, 본원에서 지질 B로 지칭되는, 이온화가능한 지질 노닐 8-((8,8-비스(옥틸옥시)옥틸)(2-히드록시에틸)아미노)옥타노에이트와 함께 제형화하였다. LNP는 37°C에서 5분 동안 6% 사이노몰구스 혈청에서 사전-인큐베이션하고, 100,000개 T 세포 당 총 RNA 카고 100 ng을 투여했다. 24시간 LNP 노출 후, 세포를 세척하고 표 2에 기재된 바와 같이 배지 번호 11에 재현탁하고 37°C에서 5일 동안 배양하였다.
- [1329] 순차적 LNP 처리를 위해, 활성화 24시간 후에 상기 동시 LNP 처리에 대해 기술된 바와 같이, T 세포를 Cas9 mRNA를 전달하는 단일 LNP 및 B2M을 표적으로 하는 G000529(서열 번호 701)로 처리하였다. 세척 및 재현탁 후, Cas9 mRNA 및 CIITA를 표적화하는 G013674(서열 번호 702)를 전달하는 단일 LNP를 활성화 후 48시간에 첨가하였다. 마지막으로, 세척 및 재현탁 후에, Cas9 mRNA 및 TRAC를 표적화하는 G012086(서열 번호 703)을 전달하는 단일 LNP를 활성화 후 72시간 후에 첨가하였다. 최종 LNP에 24시간 노출시킨 후, 표 2에 기재된 바와 같이, 세포를 세척하고 배지 번호 11에 재현탁하고 37°C에서 5일 동안 배양하였다.
- [1330] LNP 처리된 T 세포는 MACS 삼중 음성 선별 과정을 통과했고, 상기 전기천공 처리된 세포에 대해 기술된 바와 같이 이들 샘플에 대해 추가 유세포 분석법 분석 및 NGS 분석을 수행하였다.
- [1331] MACS 처리 전과 후에 실시예 5에 기술된 바와 같이 처리된 세포 및 비처리된 세포를 NGS에 의한 퍼센트 편집 및 유세포 분석법에 의한 단백질 발현에 대해 검정하였다. B2M, CIITA 및 TRAC 각각에 대한 유전자 편집의 표현형 판독값으로 하기 유세포 분석법 시약을 사용했다: FITC 항-인간 β2-마이크로글로불린 항체(Biolegend®, 카탈로그 316304), APC 항-인간 CD3 항체(Biolegend®, 카탈로그 300412), PE 항-인간 HLA-DR, DP, DQ 항체

(Biolegend®, 카탈로그 361716). NGS 편집 결과는 표 25 및 도 23a-b에 제시되어 있다. 유세포분석 결과는 표 26 및 도 24a-b에 제시되어 있다. 인간 MHC 클래스 II 단백질(예를 들어, HLA-DR, HLA-DP, 및 HLA-DQ)의 발현 감소는 CIITA 유전자의 편집을 나타낸다. CIITA는 MHC 클래스 II 분자의 전사 조절자이다.

표 25

NGS에 의한 편집 분석

상태	B2M % 편집		CIITA % 편집		TRAC % 편집	
	이전	이후	이전	이후	이전	이후
MACS						
비처리	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1
동시적 LNP	97.3	99.3	96.5	98.2	97.3	98.6
순차적 LNP	97.0	99.4	99.6	99.8	98.2	98.5
RNP EP	98.0	99.1	98.7	99.4	96.7	99.4

[1332]

표 26

유세포 분석

상태	B2M % 음성		HLA-DR-DP-DQ % 음성		CD3 % 음성	
	이전	이후	이전	이후	이전	이후
MACS						
비처리	0.2	0.2	29.4	32.8	0.3	0.2
동시적 LNP	87.9	98.4	56.5	95.0	91.7	98.3
순차적 LNP	93.2	97.6	67.0	91.8	89.0	97.6
RNP EP	85.4	99.9	59.6	89.4	93.1	100

[1333]

실시예 6.3. 염색체 구조 재배열을 위한 Kromatid dGH™ 분석

[1334]

KromaTiD의 프로토콜에 따라 dGH 절차를 위해 조작된 T 세포를 준비했다. 간략하게, T 세포는 KromaTiD에서 제공한 대로 5 μM BrdU 및 1 μM BrdC를 첨가하여 17시간 동안 배양하였다. 콜세미드를 추가로 4시간 동안 10 μl/ml의 농도로 첨가하였다. 세포를 원심분리에 의해 수확하고, 실온에서 30분 동안 75mM KCl 저장성 용액에서 인큐베이션하고, 3:1 메탄올 대 아세트산 용액에서 고정시켰다.

[1335]

3개 세트의 형광 제자리 혼성화(FISH) 프로브는 별도의 염색체에 위치하는 이러한 T 세포를 조작하는 데 사용되는 가이드의 게놈 표적 부위를 묶도록 설계되었다. KromaTiD는 독점 dGH FISH를 사용하여 샘플당 200개의 중기 스프레드를 이미지화하고 염색체 구조 재배열을 위해 스프레드에 점수를 매겼다. 염색체 구조적 재배열이 없는 세포는 3개의 색상이 일치하는 인접 쌍의 FISH 신호를 나타냈다. 세포에서 표적 부위에 대한 FISH 신호가 0으로 확인되었을 때 "결실" 점수를 매겼는데, 이는 편집 이벤트 발생으로 인해 세포 복제 주기 동안 단편이 손실된 염색체 재배열을 나타낸다. 인접한 색상-미스매치 FISH 신호의 각 쌍에 대해 "상호 전좌"를 점수화하여 2개의 Cas9 표적 절단 사이(예를 들어, B2M 및 TRAC 표적 부위 사이) 전좌를 나타낸다. "표적의 염색체로의 전좌"는 단일 FISH 신호를 보여 Cas9-표적화 절단 부위와 표지되지 않은 염색체 부위 사이의 융합을 나타낸다. "복합 전좌"는 상호 전좌 및 비표적 부위로의 전좌에 포함되지 않는 FISH 신호를 나타낸다. 전체 전좌는 상호 전좌, 게놈에서 비표적 염색체/부위로의 전좌 및 복합 전좌의 합계로서 계산하였다. 표 27 및 도 25는 각 조건에 대해 이 방법에 의해 확인된 염색체 재배열을 보여준다.

[1336]

표 27

Kromatid dGH 분석에 의한전좌 분석

염색체 재배열 이벤트	처리되지 않음	순차적 LNP	동시적 LNP	RNP EP
총 전좌	1	0	7	13
상호 전좌	0	0	2	3
탈-표적 염색체로의 전좌	1	0	3	9
복합 전좌	0	0	2	1
결실	0	8	6	30

[1337]

[1338] 실시예 7. 상이한 이온화가능한 지질 제형을 사용한 T 세포로의 LNP 전달

[1339] 상이한 이온화가능한 지질로 제형화된 LNP를 T 세포 전달 효능에 대해 시험하였다. 실시예 5에서와 같이 T 세포를 준비하고, 해동하고, 활성화시켰다. 활성화 48시간 후, T 세포를 Cas9 mRNA 및 B2M을 표적화하는 gRNA G000529(서열 번호 701)를 전달하는 LNP로 처리하였다. LNP는 일반적으로 실시예 1과 같이 제조하였다. 지질 A 제형은 50/9/38/3 이온화가능한 지질 A, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG의 비율로 제조하였다. 지질 B 조성물은 50/10/38.5/1.5 이온화가능한 지질 노닐 8-((8,8-비스(옥틸옥시)옥틸)(2-히드록시에틸)아미노)옥타노에이트, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG의 비율로 제형화하였다. LNP는 3% 최종(v/v)의 *엠. 파시쿨라리스(M. fascicularis)*(사이노몰구스 원숭이) 혈청(BioreclamationIVT, CYN197452)과 함께 37℃에서 약 5분 동안 사전 인큐베이션하였다. 사전-인큐베이션된 LNP를 표 28에 나타낸 바와 같은 총 RNA 카고의 양으로 T 세포에 첨가하였다. 24시간 LNP 노출 후, 세포를 세척하고 24웰 플레이트로 옮겼다. LNP 처리 5일 후, 실시예 1에 기재된 바와 같이 세포를 수집하고 NGS 분석을 수행하였다. 도 26 및 표 28에 나타낸 바와 같이, 지질 A 및 지질 B 모두로 제형화된 LNP를 사용하여 효율적인 편집이 명백하였다

표 28

NGS에 의한투여량 반응연구의 평균편집 백분율

샘플	투여량 (ng 총 RNA)	평균 % 편집	SD	N
단독세포	0	0.1	0.1	3
단독혈청	0	0.2	0.1	3
지질 A	25	71.1	3.5	3
	50	84.7	0.9	2
	100	94.4	0.2	3
	200	98.6	0.6	3
지질 B	25	56.4	4.1	3
	50	73.6	6.6	2
	100	87.9	0.2	3
	200	94.9	0.4	3

[1340]

[1341] 실시예 8. LNP-조작된 T 세포에 대한 편집 동역학

[1342] LNP-조작된 T 세포에서 최대 편집을 위한 최소 LNP 노출 시간을 결정하기 위해, LNP 접촉 후 상이한 시점에서 퍼센트 인텔를 결정하였다.

[1343] 실시예 5에 기재된 바와 같이 CD3+ T 세포를 제조하고, 해동하고, 활성화시켰다. 활성화 후, B2M을 표적화하는 Cas9 mRNA 및 sgRNA G000529(서열 번호 701)를 전달하는 LNP를 T 세포에 전달하였다. LNP는 일반적으로 실시예 1과 같이 제조하였다. 지질 A LNP는 50/9/38/3 이온화가능한 지질, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG의 비율로 제조하였다. 지질 B LNP는 50/10/38.5/1.5 이온화가능한 지질 B, 콜레스테롤, DSPC, 및 PEG2k-DMG의 비율로 제형화하였다. LNP를 6% 사이노몰구스(cyno) 혈청(v/v)과 함께 37℃에서 60분 동안 사전-인큐베이션하였다. 사전-

인큐베이션된 LNP는 T 세포에 대한 총 RNA 카고의 50나노그램으로 투여하였다. 표 31에 나타난 바와 같이 LNP 접촉 후 시점에서, 250 μ L의 T 세포를 수집하고 실시예 1에 기재된 바와 같이 NGS에 의해 분석하였다. 각 시점에서의 편집 결과를 표 29 및 도 27에 나타내었다.

표 29

편집 동역학 연구 NGS 편집 데이터

샘플	LNP 첨가로부터의 시간 (시간)	평균 % 편집	SD	N
지질 A	10	27.5	1.0	3
	13	49.0	2.5	3
	24	80.3	1.2	3
	29	82.5	1.1	3
	45	87.0	2.0	3
	53	88.8	0.4	3
	70	89.9	0.3	3
	77	90.1	0.5	3
	85	90.3	0.2	3
	101	90.9	0.6	3
지질 B	10	30.6	1.5	3
	13	47.8	4.3	3
	24	81.4	1.1	3
	29	81.6	2.5	3
	45	88.2	0.5	3
	53	90.7	0.7	3
	70	90.9	0.4	3
	77	91.0	0.3	3
	85	91.3	0.2	3
	101	91.4	1.1	3

[1344]

[1345] 실시예 9. 다양한 혈청 인자 공급원을 갖는 T 세포로의 LNP 전달

[1346] 다양한 공급원의 혈청 또는 재조합 ApoE 이소형과 사전인큐베이션된 LNP로 T 세포를 조작하였다. 이 연구는 인간 혈청, 사이노 혈청 및 ApoE 이소형 ApoE2, ApoE3 및 ApoE4를 사용하여 8-포인트 용량 반응 분석으로 수행하였다. T 세포를 준비하고 실시예 5에서와 같이 동결 보존했다. 표 2에 설명된 대로 배치 번호 1에서 해동 시, T 세포는 편집 전 48시간 동안 TransAct(1:100 희석, Milteni Biotec, 카탈로그 번호 130-111-160)로 활성화하였다.

[1347] 활성화 후, TRAC를 표적화하는 Cas9 mRNA 및 sgRNA(G013006, 서열 번호 708)를 전달하는 LNP를 T 세포에 전달하였다. LNP는 실시예 1에 기술된 바와 같이 gRNA 대 mRNA의 중량비 1:2로 제형화되었다. LNP는 표 30에 기재된 바와 같이, 상이한 ApoE 이소형 ApoE2(Biovision, 카탈로그 번호 4760), ApoE3(R&D 시스템, 카탈로그 번호 4144-AE-500) 및 ApoE4(Novus Biologicals, 카탈로그 번호 NBP1-99634)과 함께 37°C에서 약 5분 동안 사전인큐베이션하였다. 사전-인큐베이션된 LNP를 T 세포에 100 ng의 총 RNA 카고로 첨가하였다. LNP 형질감염 5일 후, 실시예 5에 기재된 바와 같이, 유세포 분석을 위해 세포를 수집하였다. 결과는 도 28 및 표 30에 기재되어 있다. MHC 클래스 I 단백질(예를 들어, HLA-A, HLA-B, 및 HLA-C)의 발현 감소는 B2M 유전자의 편집을 나타낸다. B2M 단백질은 MHC 클래스 I 단백질의 성분이므로, B2M이 녹아아웃되면, MHC 클래스 I 단백질이 검출되지 않을 것이다.

표 30

상당한-용량의 ApoE 이소형의 평균 % CD3 KO

샘플	투여량 ($\mu\text{g/mL}$)	평균 % CD3 음성 세포	표준 편차
6% 사이노 혈청	n/a	82.46	0.74
처리되지 않음	0	0.00	0.00
ApoE2	1	0.70	0.16
	0.5	0.72	0.09
	0.25	0.98	0.20
	0.125	1.30	0.25
	0.0625	2.69	0.23
	0.0312	0.81	0.18
	0.015	1.26	0.03
	0.007	1.97	0.59
ApoE3	1	61.87	0.38
	0.5	56.33	1.19
	0.25	67.80	0.28
	0.125	70.50	0.29
	0.0625	70.83	2.36
	0.0312	71.77	4.37
	0.015	67.90	4.68
	0.007	69.47	4.01
ApoE4	1	47.40	1.31
	0.5	66.23	0.49
	0.25	67.50	0.86
	0.125	69.03	1.10
	0.0625	72.53	0.87
	0.0312	73.73	0.59
	0.015	64.93	3.14
	0.007	60.30	2.12

[1348]

[1349] 실시예 10. T 세포로의 리포펙션 전달을 위한 다양한 농도의 혈청을 사용한 리포플렉스 치료

[1350] T 세포로의 고효율 리포플렉스 전달을 위한 조건을 결정하기 위해, 리포펙션 시약을 사용하여 단일 가이드 RNA와 함께 SpyCas9를 암호화하는 mRNA를 전달했다.

[1351] 실시예 10.1. 세포 배양

[1352] 건강한 인간 공여자 PBMC 또는 류코팩을 상업적으로 입수하였고(Hemacare), T 세포를 하기와 같이 MultiMACSTM 세포24 Separator Plus 기기에 대한 제조사 프로토콜에 따라 StraightFrom® Leukopak® CD4/CD8 마이크로비드(Miltenyi Biotec, 카탈로그 번호 130-122-352)를 사용하여 CD4/CD8 양성 선별로 분리하였다. T 세포를 바이알에 분주하고 향후 사용을 위해 Cryostor CS10 냉동 배지(카탈로그 번호 07930)에 동결보존하였다. 바이알은 이후 실험을 위해 필요에 따라 해동하였다. 그런 다음 이들 T 세포를 수조에서 해동하고 표 2에 기재된 바와 같이 미리 데운 배지 번호 5 10 mL로 옮겼다. 표 2에 기재된 바와 같이, 배지 번호 1에서, 해동 시 T 세포를 1:100 희석된 TransAct(Miltenyi Biotec, 카탈로그 130-111-160)를 첨가하여 활성화했다. 세포는 T 세포 조작 처리 전에 37°C에서 48시간 동안 활성화한다.

[1353] 실시예 10.2. 인간 T 세포의 리포펙션

[1354] 48시간의 T 세포 배양 후, T 세포를 리포플렉스로 생물학적 복제 처리하였다. 리포펙션 시약은 실시예 1에 기술된 바와 같이 50/9/38/3 지질 A, 콜레스테롤, DSPC 및 PEG2k-DMG의 비율로 지질의 혼합물로 준비하였다. 리포펙션 시약은 B2M을 표적화하는 Cas9mRNA 및 gRNA G000529(서열 번호 701)와 벌크 혼합하여 조합하였다. 물질을 약 6의 지질 아민 대 RNA 포스페이트(N:P) 몰비 및 1:2의 mRNA 대 gRNA의 w/w 비율로 조합하였다. 생성된 벌크-혼합 리포플렉스 물질(지질 키트)을 표 2에 기재된 바와 같이, 배지 번호 1에서 12%, 6%, 3% 또는 0% 사이노 혈청(Bioreclamation IVT; CYN220760)과 함께 T 세포에 첨가하기 전에 15분 동안 사전 배양한 후 첨가하였다.

[1355] T 세포는 100,000개의 T 세포당 200 ng의 가이드 sgRNA와 함께 100 ng의 Cas9 mRNA의 용량으로 생물학적 복제물에서 리포플렉스로 처리하였다. 리포플렉스 접촉 48시간 후 T 세포를 세척하고, 신선한 완전 T 세포 배지로 교체하였다. 리포펙션 4일 후 세포의 절반은 NGS 시퀀싱을 위해 수집되었고, 하루 후에 세포의 나머지 절반은 유세포 분석을 위해 수집하였다.

[1356] 실시예 10.3. 인간 T 세포의 LNP 처리

[1357] 형질감염 제어를 위해, Cas9 mRNA 및 gRNA G000529(서열 번호 701)를 함유하는 LNP 제형을 100,000개의 활성화된 T 세포에 첨가하였다. LNP는 표 2에 기술된 바와 같이 6%(v/v) 비인간 영양류 혈청(엽. 파시쿨라리스(*M. fascicularis*)(사이노물구스 원숭이) 혈청, BioReclamationIVT, CYN220760) 및 배지 번호 1과 함께 약 15분 동안 37°C에서 사전인큐베이션하였다. 사전 인큐베이션된 LNP를 100ng의 총 RNA 카고(Cas9 mRNA 및 단일 가이드의 1:2 w/w 비율)로 T 세포에 첨가하였다. LNP 처리 48시간 후 세포를 세척하고 표 2에 기재된 바와 같이 배지 번호 1로 교체하였다. LNP 처리 4일 후 세포의 절반을 NGS 시퀀싱 분석을 위해 수집하였다.

[1358] 실시예 10.4. 인간 T 세포의 전기천공

[1359] 전기천공 제어를 위해, RNP를 100,000개의 활성화된 T 세포에 전기천공하였다. RNP는 Cas9 단백질을 B2M을 표적화하는 열 변성 gRNA G000529(서열 번호 701)와 2:1 가이드:Cas9 비율로 15분 동안 혼합하여 20 uM 스톱 농도에서 형성되었다. 활성화 48시간 후, T 세포를 수확하고, 원심분리하고, P3 전기천공 완충액(Lonza)에 10×10^6 T- 세포/100 uL의 농도로 재현탁했다. 세포 현탁액을 RNP와 혼합하여 2uM의 최종 RNP 농도를 달성한 후 뉴클레오택터 플레이트로 옮기고, 제조사의 펄스 코드를 사용하여 전기천공했다. 표 2에 기재된 바와 같이 전기천공된 T 세포를 100 uL 배지 번호 1에 즉시 휴지시켰다. LNP 처리 4일 후 세포의 절반을 NGS 시퀀싱 분석을 위해 수집하였다.

[1360] 실시예 10.5. NGS 및 유세포 분석법

[1361] 처리 4일 후, 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행된 NGS 분석을 위해 T 세포를 용해시켰다. T 세포 처리 5일 후, B2M 단백질 녹아웃을 결정하기 위해 T 세포를 유세포 분석법으로 표현형을 결정하였다. 간략하게, T 세포는 B2M을 표적화하는 항체(항-인간 B2M 항체 FITC Labelled, 카탈로그 번호 316304, Biolegend®)에서 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 CytoFLEX S 기기(Beckman Coulter)에서 분석하였다. T 세포는 크기, B2M FITC 발현에 게이팅하였다.

[1362] B2M 단백질 녹아웃 빈도는 표 31 및 도 29에 나타내고, B2M 인텔 빈도는 표 32 및 도 30에 나타낸다.

표 31

100 ng Cas9 mRNA 및 200 nM gRNA 를 사용한 지질 키트 처리된 T 세포에 의한 B2M 단백질 녹아웃 빈도.

혈청 상태	단백질(B2M) 녹아웃 빈도	
	생물학적 복제 1	생물학적 복제 2
12% 사이노혈청	0.56	0.448
6% 사이노혈청	0.196	0.177
3% 사이노혈청	0.032	0.059
전기천공 대조군	0.865	0.894
LNP 대조군	0.92	0.931

[1363]

표 32

100 ng Cas9 mRNA 및 200 nM gRNA 를 사용한 지질 키트 처리된 T 세포에 의한 B2M 인텔 빈도

혈청 상태 s	B2M 인텔 빈도	
	생물학적 복제 1	생물학적 복제 2
12% 사이노혈청	0.663	0.568
6% 사이노혈청	0.293	0.234
3% 사이노혈청	0.033	0.092

[1364]

[1365] 실시예 11. 활성화된 및 비-활성화된 T 세포의 편집 효율

[1366] 활성화 및 비-활성화된 T 세포 모두에 대한 고효율 LNP 전달을 위한 조건을 결정하기 위해, Cas9 mRNA 및 sgRNA

의 전달 후 T 세포에서 편집 효율을 검정하기 위해 딥 시퀀싱을 사용했다. T 세포를 표 33에 열거된 조건 하에서 다음과 같이 배양하였다.

[1367] 실시예 11.1. 세포 배양

[1368] 건강한 인간 공여자 PBMC 또는 류코팩을 상업적으로 입수하였고(Hemacare), T 세포를 MultiMACS™ Cell124 Separator Plus 장비의 제조사 프로토콜에 따라 StraightFrom® Leukopak® CD4/CD8 마이크로비드(Milteni, 카탈로그 번호 130-122-352)를 사용하여 CD4/CD8 양성 선택에 의해 분리하였다. T 세포를 바이알에 분주하고 향후 사용을 위해 Cryostor CS10 냉동 배지(카탈로그 번호 07930)에 동결보존하였다. T 세포를 표 2에 기재된 바와 같이 배지 번호 5에서 해동시켰다.

[1369] 해동 시, T 세포는 TransAct(Milteny Biotech, 카탈로그 번호 130-111-160)의 1:100 희석액을 첨가하여 활성화하거나 표 2에 기재된 바와 같이 T 세포 배지에서 활성화되지 않은 상태로 두었다. T 세포는 LNP 처리 전 37℃에서 24~48시간 동안 배양하였다.

[1370] 실시예 11.2. LNP 처리 및 인간 T 세포에 대한 배양 배지의 효과

[1371] 초기 배양 24시간 후, T 세포를 TRBC를 표적화하는 Cas9 mRNA 및 가이드 G016239(서열 번호 707)를 함유하는 LNP로 처리하였다. LNP는 gRNA 대 mRNA의 중량비 1:2로 제조하였다. LNP는 세포 상에서 최종 3%(v/v)에 대해 6%(v/v)의 비인간 영양류 혈청(엠. 파시쿨라리스(*M. fascicularis*)(사이노몰구스 원숭이) 혈청, BioreclamationIVT, CYN220760)과 함께 37℃에서 약 5분 동안 사전인큐베이션하였다.

[1372] 사전 인큐베이션된 LNP를 생물학적 복제물에서 100 ng의 총 RNA 카고 용량으로 T 세포에 첨가하였다. 각각의 T 세포 배지로 LNP 처리 후 48시간에 세포를 세척하고, 각각의 새로운 T 세포 배지로 교체하였다. LNP 처리 5일 후, 유세포 분석 및 NGS 시퀀싱을 위해 세포를 수집했다. 표 33은 활성화된 T 세포에서 TRBC1 및 TRBC2 절단 부위 모두에서 편집 후 인텔 빈도에 대한 결과를 보여준다. 표 34는 활성화되지 않은 T 세포에서 TRBC1 및 TRBC2 절단 부위 모두에서 편집 후 인텔 빈도에 대한 결과이다. 편집에 대한 배지 조성의 영향은 도 31 및 도 32에 제시되어 있다.

표 33

활성화된 T 세포에서 인텔 %에 대한 배지 조성의 효과

배지 번호(표 2에 기재된 바와 같음)	% 편집			
	TRBC1		TRBC2	
	복제 A	복제 B	복제 A	복제 B
1	95.5	94.8	96.4	95.8
2	94.4	91.8	95	94.2
3	93.5	94.2	95.5	93.8
4	90.6	92	92.4	92.7
5	88.6	89.4	91	90.9
6	95.4	95.4	96.9	96.5
7	96.5	96.3	97.1	97.6
8	96.5	95.4	97.3	97.4
9	95.3	94.9	97.1	97.9
10	94.9	94.6	97.2	96.7
11	88.2	84.4	91.4	89.2
12	86	85.4	87	89.7
13	84.9	83.7	85.7	85.3
14	84.5	83.2	87.8	88.9
15	85	82.4	86.8	84.6
16	87.3	86.1	89.8	86.5
17	94.8	94.5	97.1	96.4

[1373]

표 34

활성화되지 않은 T 세포에서 인델 %에 대한 배지 조성의 효과

배지 번호 (표 2에 기재된 바와 같음)	% 편집			
	TRBC1		TRBC2	
	복제 A	복제 B	복제 A	복제 B
1	73.4	76.5	73.7	72.3
2	37.6	39.5	32.1	36.1
3	60.8	64.8	63.3	66.5
4	21.3	13	19.1	19.4
5	15.3	25.3	18.8	14.9
6	55.7	58.1	62.2	63.2
7	89	87.1	86.7	86.8
8	81.2	82.9	82	84.6
9	81.1	85.7	77.9	86.7
10	68.1	67.8	75.4	75.3
11	11.1	12	17	17.2
12	43.3	44.8	63.4	63.7
13	31.7	26.2	56.2	56.4
14	52.4	63.5	55.3	60.3
15	2.2	3	4.1	5
16				85.1
17		86.7	71.8	69.1

[1374]

[1375]

실시예 12. 림프아구성 세포주에 대한 LNP 전달

[1376]

B2M을 표적화하는 지질 나노입자를 사용하여 2개의 림프아구성 세포주(LCL)를 편집했다. LCL은 인간 공여자의 말초 혈액 림프구(PBL)를 엡스타인 바 바이러스(EBV)로 감염시켜 개발한다. 이 과정은 B 세포 마커 CD19에 대해 양성이고, T 세포 마커 CD3 및 NK 세포 마커 CD56에 대해 음성인 능동적으로 증식하는 B 세포 개체군을 발생시키는 시험관 내에서 휴지 중인 인간 B 세포를 불멸화시키는 것으로 입증되었다(Neitzel H. A routine method for the establishment of permanent growing lymphoblastoid cell lines. Hum Genet. 1986;73(4):320-6).

[1377]

림프아구성 세포주 GM26200 및 GM20340은 Coriell Institute for Medical Research(Camden, NJ, USA)에서 구입했다. LCL은 L-글루타민 및 15% FBS와 함께 RPMI-1640에서 성장되었다. LNP 접촉 시, 세포는 4 ng/ml IL-4(R&D System 카탈로그 번호 204-IL-010), 1 ng/ml IL-40(R&D System 카탈로그 번호 6245-CL-050), 25 ng/ml BAFF(R&D 시스템 카탈로그 번호 2149-BF-010)로 활성화하였다. 실시예 1에 기술된 바와 같이, LNP는 50/10/38.5/1.5 이온화가능한 지질 B(노닐 8-((8,8-비스(옥틸옥시)옥틸)(2-하이드록시에틸)아미노)옥타노에이트), 콜레스테롤, DSPC 및 PEG2k-DMG의 비율로 제형화하였다. B2M을 표적화하는 Cas9 mRNA 및 gRNA G000529(서열 번호 701)로 제형화된 LNP는 실시예 5에 기술된 바와 같이 6% 사이노몰구스 혈청(v/v)과 함께 사전-인큐베이션되었고, 림프아구성 세포에 표 35 및 표 36에 표시된 용량 100% 전달되었다. 배지는 2일마다 교체하였다. LNP 처리 6일 후, NGS 시퀀싱을 위해 세포의 절반을 수집하고, 하루 후에 유세포 분석을 위해 세포의 나머지 절반을 수집했다. NGS 분석은 실시예 1에서와 같이 수행하였다. 항-인간 B2M 항체(Biolegend(카탈로그 번호 316312))를 사용하여 실시예 5에서와 같이 유세포 분석을 수행하였다. 표 35 및 도 33은 2개의 LCL에서 LNP에 의한 편집을 나타낸다. 표 36 및 도 34는 LNP 처리 후 B2M 음성 세포의 백분율을 나타낸다.

표 35

LCL에서 B2M 편집의 투여량 반응 연구

투여량 (ng 총 RNA)	GM26200			GM20340		
	평균 %편집	SD	N	평균 %편집	SD	N
처리되지 않음	0.0%	0.0%	3	0.0%	0.0%	3
300	75.0%	0.9%	3	70.4%	2.6%	3
200	67.6%	0.6%	2	46.1%	1.5%	3
100	50.3%	2.3%	3	44.6%	0.9%	3
50	34.5%	3.3%	3	21.8%	0.2%	3
25	21.1%	5.4%	3	21.3%	1.2%	3

[1378]

표 36

LCL에서 편집 후 B2M 단백질 발현의 투여량 반응 연구

투여량 (ng 총 RNA)	GM26200			GM20340		
	평균 % B2M 음성	SD	N	평균 % B2M 음성	SD	N
처리되지 않음	2.4	1.0	3	2.4	1.0	3
300	55.4	3.1	3	53.7	2.4	3
200	45.5	1.2	3	35.3	2.7	3
100	29.5	3.1	3	31.4	1.2	3
50	16.8	3.2	3	43.0	9.2	3
25	15.1	9.5	3	33.3	8.9	3

[1379]

[1380] 실시예 13. 다중 삽입으로 T 세포 조작.

[1381] 먼저 TRBC 유전자좌에서 단백질 발현을 녹아웃시킨 후 TRAC 유전자좌에 tgTCR을, 그리고 B2M 유전자좌에 GFP를 동시에 삽입하도록 T 세포를 조작하였다.

[1382] T 세포를 분리하고 표 2에 기재된 바와 같이 배지 번호 17에서 배양하였다. LNP는 일반적으로 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다. TRAC 및 TRBC LNP는 지질 A, 콜레스테롤, DSPC 및 PEG2k-DMG의 50/9/39.5/1.5 비율로 제조하였다. B2M LNP는 지질 A, 콜레스테롤, DSPC 및 PEG2k-DMG를 50/10/38.5/1.5의 비율로 제조했다. LNP는 gRNA 대 mRNA의 중량비가 1:2로 제조되었다. TRBC를 표적화하는 Cas9 mRNA 및 gRNA G016239(서열 번호 707)를 함유하는 LNP는 제조함 인간 ApoE3(Peprotech, 카탈로그 350-02)로 1 µg/mL의 농도로 보충된, 표 2에 기술된 바와 같은 배지 번호 17에서 5 µg/mL의 농도로 37°C에서 15분 동안 사전인큐베이션하였다. T 세포를 TRBC를 표적화하는 LNP로 처리하고, 실시예 3에서 LNP BF2.5에 대해 기술된 바와 같이 활성화시켰다. 3일에, 이들 편집된 T 세포를 실시예 3에 기술된 바와 같이 37°C에서 15분 동안 20 µg/mL의 농도로 제조함 인간 ApoE3(Peprotech, 카탈로그 350-02)와 사전-인큐베이션한, gRNA G013006(서열 번호 708)을 포함하는 TRAC LNP 및 gRNA G000529(서열 번호 701)를 포함하는 B2M LNP로 처리하였다. 2개의 HDRT 주형은 AAV6를 통해 300,000 MOI로 세포에 전달된다. 하나의 HDRT 작제물은 TRAC 가이드 절단 부위에 측접한 상동성 아암과 함께 tgTCR을 표적으로 하는 WT1을 함유했다. 다른 HDRT 작제물은 B2M 가이드 절단 부위에 측접한 상동성 아암을 갖는 GFP 서열을 함유했다. LNP 및 AAV 첨가 24시간 후, T 세포를 세척하고 표 2에 기재된 바와 같이 배지 번호 17에 재현탁시키고 GREX 플레이트에서 확장시켰다. 처리 및 성장 6일 후, T 세포를 수확하고 CD3(APC-Cy7, Biolegend, 카탈로그 300318), Vb8(PE, Biolegend, 카탈로그 348104), HLA-ABC(BV605, Biolegend, 카탈로그 311432), CD4(APC, Biolegend, 카탈로그 300537) 및 CD8(PE/Cy7, Biolegend, 카탈로그 344712)을 표적화하는 항체를 사용하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 유세포 분석법으로 검정하였다. 표 37 및 도 35는 삽입률을 나타낸다. 표 38 및 도 36은 삽입 후 잔류 내인성 단백질로 처리된 세포의 백분율을 나타낸다.

표 37

tgTCR 삽입을 갖는 처리된 세포의 백분율 및 GFP 비율

그룹	TCR 삽입 % (평균)	TCR 삽입 % (SD)	GFP 삽입%(평균)	GFP 삽입%(SD)
TRAC	74.1	0.2	N/A	N/A
TRAC+B2M	56.8	0.1	43.5	1.1
B2M	N/A	N/A	60.1	1.6

표 38

잔류 내인성 TCR 또는 잔류 HLA-ABC 발현을 갖는 처리된 세포의 백분율

그룹	잔류 CD3% (평균)	잔류 CD3% (SD)	잔류 HLA- ABC%(평균)	잔류 HLA- ABC%(SD)
TRAC	1.2	0.2	N/A	N/A
TRAC+B2M	3.0	1.0	8.4	0.2
B2M	N/A	N/A	7.1	0.4
비처리	94.5	0.5	100.0	0.1

실시예 14. 조작된 T 세포의 전사체 프로파일링

T 세포 전사체에 대한 전기천공(EP) 및 지질 나노입자(LNP) 조작 방법의 영향을 직접 비교하기 위해 전사체 프로파일링을 사용했다. NanoString nCounter® CAR-T 특성화 패널(T 세포 생물학의 8가지 필수 성분을 780개의 인간 유전자로 측정). CAR-T 특성화 패널에 포함된 유전자는 활성화, 고갈, 대사, 표현형, TCR 다양성, 독성, 세포 유형 및 지속성을 포함하여, T 세포 생물학의 8개의 필수 측면을 효율적으로 탐색할 수 있도록 다양한 고급 분석 모듈에 구성되고 연결된다. AAVS1 유전자좌의 녹아웃이 T 세포 전사체의 변경을 유도하지 않기 때문에 세포를 AAVS1 유전자좌에서 편집하였다.

실시예 14.1. T 세포 제조

건강한 인간 공여자 성분채집술을 상업적으로 입수하였고(Hemacare), 세포를 세척하고 LOVO 장치 상의 CliniMACS® PBS/EDTA 완충액(Miltenyi Biotec 카탈로그 번호 130-070-525)에 재현탁하였다. EasySep™ 인간 T 세포 분리 키트(StemCell Technologies, 카탈로그 번호 17951)를 사용하여 음성 선택을 통해 T 세포를 분리했다. T 세포를 바이알에 분주하고 향후 사용을 위해 Cryostor® CS10(StemCell Technologies 카탈로그 번호 07930) 및 Plasmalyte A(Baxter 카탈로그 번호 2B2522X)의 1:1 제형으로 동결보존했다.

해동 시, CTS OpTmizer T 세포 확장 SFM 및 T 세포 확장 보충제(ThermoFisher 카탈로그 A1048501), 5% 인간 AB 혈청(GeminiBio, 카탈로그 100-512) 1X 페니실린-스트렙토마이신, 1X Glutamax, 10 mM HEPES, 200 U/mL 재조합 인간 인터루킨-2(Peprotech, 카탈로그 200-02), 5 ng/ml 재조합 인간 인터루킨 7(Peprotech, 카탈로그 200-07) 및 5 ng/ml 재조합 인간 인터루킨 15(Peprotech, 카탈로그 200-15)를 함유하는 OpTmizer 기반 배지에 T 세포를 1.0×10^6 세포/mL의 밀도로 플레이팅했다. T 세포를 이 배지에서 24시간 동안 TransAct™(1:100 희석, Miltenyi Biotec)로 활성화하고, 이때 세포를 세척하고 편집을 위해 3회 플레이팅했다.

실시예 14.2. 지질 나노입자에 의한 T 세포 편집

LNP는 일반적으로 50/10/38.5/1.5 지질 A, 콜레스테롤, DSPC 및 PEG2k-DMG의 비율로 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다. LNP는 gRNA 대 mRNA의 중량비가 1:2로 제조되었다. AAVS1을 표적화하는 Cas9 mRNA 및 sgRNA G000562(서열 번호 710)를 함유하는 LNP를 실시예 1에 기재된 바와 같이 제형화하였다. 각각의 LNP 제제를 10 ug/ml 재조합 인간 ApoE3(Peprotech, 카탈로그 350-02)이 상기 기재된 바와 같은 사이토카인을 갖는 OpTmizer-기반 배지에서 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 활성화 24시간 후, T 세포를 세척하고 기술된 바와 같이 사이토카인을 포함하지만 인간 혈청은 포함하지 않는 OpTmizer 배지에 현탁시켰다. 사전-인큐베이션된 LNP 믹스를 100,000개 세포의 각 웰에 첨가하여 2.5 ug/ml의 최종 농도를 산출했다. 편집되지 않은 T 세포(LNP 없음)를 포함하는 대조군도 포함되었다. 전달 후 6시간에 RNA 추출을 위해 세포 펠릿을 수집했다.

실시예 14.3. T 세포의 RNP 전기천공

- [1393] 전기천공법은 활성화 24시간 후에 수행하였다. sgRNA G000562(서열 번호 710)를 표적화하는 AAVS1은 실온에서 10분 동안 냉각하기 전에 95℃에서 2분 동안 변성하였다. 20 μ M sgRNA와 10 μ M Cas9-NLS 단백질(서열 번호 16)의 RNP 혼합물을 준비하고 25℃에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 12.5 μ L의 RNP 혼합물을 87.5 μ L P3 전기천공 완충액(Lonza)에서 10,000,000개의 세포와 조합하였다. 100 μ L의 RNP/세포 믹스를 해당 큐벳으로 옮겼다. 제조사의 펄스 코드 EH 115로 세포를 이중으로 전기천공하였다. T 세포 기반 배지를 전기천공 직후 세포에 첨가하였다. 전달후 6시간 및 24시간에, RNA 추출을 위해 세포 펠릿을 수집하였다.
- [1394] **실시예 14.4 전사체 프로파일링**
- [1395] 제조사의 프로토콜에 따라 RNeasy Mini Kit(Qiagen, 카탈로그 74106)를 사용하여 메신저 RNA 단리를 수행하고 nCounter 인간 CAR-T 특성화 패널(NanoString, 카탈로그 XT-CSO-CART1-12)을 사용하여 전사체 프로파일링을 수행했다. 간략하게, 추출된 mRNA는 20 ng/ μ l로 희석되었다. 샘플 및 희석된 표준은 적어도 16시간 동안 65℃에서 15 μ l 반응 부피의 Reporter Codeset 및 Capture Codeset와 혼성화하였다. 혼성화 후 샘플 카트리지, 프랩 플레이트 및 기타 소모품을 NanoString 프랩 스테이션(NanoString, 카탈로그 NCT-PREP-120)에 로드했다. 그런 다음 샘플을 카트리지에서 처리하고 디지털 분석기로 스캔했다.
- [1396] 스캔된 RCC 파일은 4개의 품질 관리(QC) 검사를 모두 통과했다. NanoString nSolver 4.0 소프트웨어를 사용하여 데이터를 분석했다. 유전자 발현 히트맵은 기본 분석 모듈에서 생성되었다. 차등 유전자 발현 및 경로 스코어링의 통계적 유의성은 nSolver 4.0 소프트웨어에서 t 테스트에 의해 결정하였다.
- [1397] **도 37**은 전사체 발현 수준의 열 지도를 보여준다. 본 발명자들은 처리 후 6시간에 RNP의 EP-매개 전달이 Cas9 mRNA 및 gRNA(196개 유전자 대 75개 유전자)의 LNP 전달과 비교하여 이 Nanostring 어레이에 표시되는 대부분의 T 세포-중심 세포 경로에 걸쳐, 더 큰 유전자 세트의 T 세포 발현을 상당히($p < 0.05$) 변경한다는 것을 발견했다. LNP 전달로 인한 섭동은 제어 전달(비히클)과 통계적으로 구별할 수 없다.
- [1398] **실시예 15. AML 모델에서 조작된 T 세포의 생체내 효능**
- [1399] WT1 특이적 tgTCR-T 세포는 AAV 공여자 주형(서열 번호 9 참조)을 사용하고 Cas9/sgRNA 리보핵단백질(RNP)의 전기천공에 의해 또는 Cas9 mRNA 및 sgRNA를 함유하는 LNP로의 형질감염에 의해 TCR α 및 TRBC β (각각 TRAC 및 TRBC1/2)를 암호화하는 유전자를 표적화하는 CRISPR/Cas9 성분을 도입하여 조작되었다.
- [1400] **실시예 15.1. T 세포 제조**
- [1401] 건강한 인간 공여자 성분채집술을 상업적으로 입수하고(Hemacare), 세척하고 LOVO 장치 상의 CliniMACS PBS/EDTA 완충액에 재현탁하였다. T 세포는 CliniMACS Plus 및 CliniMACS LS 일회용 키트를 사용하여 CD4 및 CD8 자기 비드를 사용하여 양성 선택을 통해 단리하였다. T 세포를 바이알에 분주하고 향후 사용을 위해 Cryostor CS10 및 Plasmalyte A의 1:1 제형으로 동결보존했다. 동결보존된 T 세포를 해동하고 완전 T 세포 성장 배지(TCGM, XVIVO-15 배지 또는 CTS Optimizer 배지, 5% 인간 AB 혈청, 2 mM L-글루타민, 1% 페니실린/스트렙토마이신, 1X 2-머캅토에탄올, IL-2(200 U/mL), IL7(5 ng/mL), IL-15(5 ng/mL) 보충함)에서 1.5×10^6 세포/ml의 밀도로 하룻밤 휴지시켰다. 다음날 T 세포를 T 세포 TransAct 시약(1:100 희석)로 편집 전 48시간 동안 활성화시켰다.
- [1402] **실시예 15.2. 리보핵단백질 전기천공을 이용한 T 세포 편집**
- [1403] RNP는 Cas9-NLS 단백질(서열 번호 16)을 TRAC(G013006)(서열 번호 708) 또는 TRBC(G016239)(서열 번호 707) 2:1 가이드:Cas9 중량비로 15분 동안 혼합하여 20 μ M 스톱 농도로 형성시켰다. 활성화 48시간 후, T 세포를 수확하고, 원심분리하고, P3 전기천공 완충액(Lonza)에 20×10^6 T 세포/100 μ L의 농도로 재현탁했다. 세포 현탁액을 RNP와 혼합하여 2 μ M의 최종 RNP 농도를 달성한 후 뉴클레오택터 큐벳으로 옮기고 전기천공했다. 전기천공된 T 세포는 즉시 10분 동안 사이토카인 없이 400 μ L TCGM에서 휴지되었다. 3×10^5 vg/세포의 MOI로 WT1 TCR(서열 번호 9) 또는 MART1 특이적 TCR(Journal of Immunology. 2006. 177 (9) 6548-6559)을 암호화하는 상동성 방향성 복구 주형을 갖는 AAV6과 함께 완전 TCGM 배지에서 5×10^6 세포/well/5 mL의 밀도로 세포를 플레이트팅하였다. 24시간 후 T 세포를 수확하고, 세척하고 완전한 TCGM 배지에서 G-Rex® 세포 배양 시스템(Wilson Wolf)에 첨가했다. T 세포는 확장, tgTCR 삽입 및 유동 세포측정법에 의한 내인성 TCR 녹아웃에 대해 평가되기 전에 격일로 배지 교환과 함께 9일 동안 배양하였다. 이어서 T 세포를 CryoStor® CS10 배지에서 동결보존했다.
- [1404] **실시예 15.3. 지질 나노입자에 의한 T 세포 편집**

- [1405] LNP 공정에 의해 실시예 4에서 조작된 T 세포를 본 실험에 사용하였다.
- [1406] **실시예 15.4. 유세포 분석법**
- [1407] 조작된 T 세포는 FACS 완충액(PBS pH 7.4, 2% FBS, 1 mM EDTA)에서 항-Vβ8 항체(WT1 tgTCR에 의해 사용되는 TRBC에 결합함) 또는 MART1 사량체와 함께 CD3, CD4, CD8을 표적화하는 항체의 콕테일에서 인큐베이션하였다. 이어서 T 세포를 세척하고 Cytoflex 기기(Beckman Coulter)에서 분석했다. FlowJo 소프트웨어 패키지(v.10.6.1)를 사용하여 데이터 분석을 수행했다. T 세포는 크기, CD4 또는 CD8 발현에 게이트팅되었고, WT1 tgTCR(Vβ8+CD3+) 또는 MART1 tgTCR(MART1 사량체+ & CD3+)에 대해 분석하였다.
- [1408] **실시예 15.5 생체내 모델에서 AML의 조작된 T 세포 효능.**
- [1409] EP 및 LNP 공정에 의해 제조된 WT1-TCR T 세포의 효능 및 특이성을 평가하기 위해, HLA-A*02:01+ 환자로부터 수확된 1차 백혈병아세포를 면역결핍 마우스에 주입하였다. 마우스를 EP 또는 LNP-조작된 T 세포로 처리하고 백혈병 성장을 모니터링하였다. 도 38a는 조작된 WT1 T 세포 및 대조군으로 처리된 마우스에 대한 생체내 실험의 타임라인을 보여준다. 도 38b는 도 38a의 마우스의 4개 기의 처리시 혈액 1 마이크로리터당 세포로서 시간 경과에 따라 측정된 AML 백혈병아세포 성장을 보여준다. 간략하게, EP 및 LNP 공정에 의해 제조된 조작된 WT1-TCR T 세포, 관련 없는 MART1-TCR로 형질도입된 T 세포, 또는 어떠한 처리도 하지 않은 또 다른 대조군(백혈병아세포 단독)으로 처리된 마우스를 비교하였다. 골수(도 38c) 및 비장(도 38d)에서 백혈병아세포 파생물을 도 38a에서와 같이 마우스 처리시 총 살아있는 세포당 AML 세포의 백분율로 측정하였다.
- [1410] **실시예 16A. BC22n:UGI의 고정 비율로 T 세포에서 LNP 적정.**
- [1411] 활성화된 인간 T 세포에 대한 LNP 전달을 사용하여, 단일 표적 및 다중 표적 편집의 효능을 Cas9 또는 데아미나제(BC22n)로 평가했다.
- [1412] **실시예 16.A.1. T 세포 제조.**
- [1413] 건강한 인간 공여자 성분채집술을 상업적으로 입수하였고(Hemacare), 세포를 세척하고 LOVO 장치 상의 CliniMACS® PBS/EDTA 완충액(Miltenyi Biotec 카탈로그 번호 130-070-525)에 재현탁하였다. T 세포는 CliniMACS® Plus 및 CliniMACS® LS 일회용 키트를 사용하여 CD4 및 CD8 자기 비드(Miltenyi Biotec 카탈로그 번호 130-030-401/130-030-801)를 사용하여 양성 선택을 통해 분리하였다. T 세포를 바이알에 분주하고 향후 사용을 위해 Cryostor® CS10(StemCell Technologies 카탈로그 번호 07930) 및 Plasmalyte A(Baxter 카탈로그 번호 2B2522X)의 1:1 제형으로 동결보존했다. 해동 시, 5%(v/v)의 소 태아 혈청, 50 μM의 2-머캅토에탄올, 10 mM의 N-아세트-L-(+)-시스테인, 10 U/mL의 페니실린-스트렙토마이신, 1X 사이토카인(200 U/mL의 제조함 인간 인터루킨-2, 5 ng/mL의 제조함 인간 인터루킨-7 및 5 ng/mL의 제조함 인간 인터루킨-15)를 함유하는 X-VIVO 15™ 무혈청 조혈 세포 배지(Lonza Bioscience)로 구성된 T 세포 기본 배지에 T 세포를 1.0 x 10⁶ 세포/mL의 밀도로 플레이팅하였다. T 세포는 TransAct™(1:100 희석, Miltenyi Biotec)로 활성화하였다. LNP 형질감염 전 72 시간 동안 T 세포 기본 배지에서 세포를 증식시켰다.
- [1414] **실시예 16.A.2. T 세포 편집**
- [1415] 각각의 RNA 종, 즉 UGI mRNA, 가이드 RNA 또는 편집자 mRNA는 실시예 1에 기술된 바와 같이 LNP에서 개별적으로 제형화하였다. 편집자 mRNA는 BC22n(서열 번호 18) 또는 Cas9를 암호화했다. 가이드 표적 B2M(G015995)(서열 번호 711), TRAC(G016017)(서열 번호 712), TRBC1/2(G016206)(서열 번호 713), 및 CIITA(G018117)(서열 번호 714)을 단독 또는 조합하여 사용하였다. UGI(서열 번호 21)를 암호화하는 메신저 RNA는 지질 양을 정상화하기 위해 실험의 Cas9 및 BC22n 암 모두에 전달하였다. 이전 실험에서는 UGI mRNA가 Cas9 mRNA와 함께 사용될 때 전체 편집 또는 편집 프로파일에 영향을 미치지 않는다는 것을 확립했다. LNP는 표 12에 기재된 바와 같이 각각 편집자 mRNA, 가이드 RNA 및 UGI mRNA에 대해 6:3:2의 고정된 총 mRNA 중량비로 혼합하였다. 표 39에 기재된 4-가이드 실험에서, 개별 가이드는 4배 희석하여, 전체 6:3 편집자 mRNA: 가이드 중량비를 유지하고 총 지질 전달을 기준으로 개별 가이드 효능과 비교할 수 있도록 하였다. LNP 혼합물을 소 태아 혈청을 6% 사이노물거스 원숭이 혈청(Bioreclamation IVT, 카탈로그 CYN220760)으로 대체한 T 세포 기본 배지에서 37°C에서 5분 동안 인큐베이션하였다.
- [1416] 활성화 72시간 후, T 세포를 세척하고 기본 T 세포 배지에 현탁시켰다. 사전 인큐베이션된 LNP 믹스를 1x10⁵ Tcells/웰로 각 웰에 첨가하였다. T 세포는 실험 기간 동안 5% CO₂와 함께 37°C에서 배양하였다. 활성화 후 6일 및 8일에 T 세포 배지를 교체하고 활성화 후 10일째에 NGS 및 유세포분석에 의한 분석을 위해 세포를 수확하였

다. NGS는 실시예 1.4에서와 같이 수행하였다.

[1417]

표 39 및 **도 39a-d**는 개별 가이드가 편집을 위해 사용되었을 때 T 세포의 편집 프로필을 설명한다. 전체 편집 및 C to T 편집은 테스트된 모든 가이드에 걸쳐 BC22n mRNA, UGI mRNA 및 가이드의 양이 증가함에 따라 직접적인 용량 반응 관계를 보여주었다. A 또는 G로의 인델 및 C 전환은 용량과 반비례 관계에 있으며, 더 낮은 용량이 이러한 돌연변이의 더 높은 백분율을 초래했다. Cas9로 편집된 샘플에서 총 편집 및 인델 활성은 총 RNA 용량에 따라 증가한다.

표 39

전체 판독의 백분율로 편집 - 단일 가이드 전달.

가이드	편집자	총 RNA (ng)	C-to-T %		C-to-A/G %		인델 %		N
			평균	SD	평균	SD	평균	SD	
G015995 B2M	BC22n	0.0	0.3	0.0	1.5	0.1	0.2	0.0	2
		8.6	49.5	3.5	7.7	0.6	6.0	0.4	2
		17.2	68.5	1.7	6.7	1.3	4.3	0.1	2
		34.4	79.0	0.9	5.7	0.3	3.8	0.0	2
		68.8	88.2	0.8	4.6	0.0	2.5	0.2	2
		137.5	90.6	1.8	4.1	0.4	2.2	0.5	2
		275.0	92.6	0.8	3.7	0.3	2.2	0.3	2
		550.0	95.2	0.4	2.8	0.0	1.6	0.2	2
	Cas9	0.0	0.3	0.0	1.5	0.2	0.2	0.0	2
		8.6	0.3	0.0	1.2	0.1	23.7	2.1	2
		17.2	0.3	0.0	0.9	0.1	41.1	0.2	2
		34.4	0.3	0.0	0.6	0.0	59.4	0.6	2
		68.8	0.2	0.1	0.4	0.0	76.8	1.2	2
		137.5	0.1	0.1	0.2	0.0	88.2	2.0	2
		275.0	0.1	0.0	0.1	0.1	95.1	0.5	2
		550.0	0.1	0.0	0.1	0.0	97.5	0.3	2
G016017 TRAC	BC22n	0.0	0.2	0.0	2.2	0.1	0.2	0.1	2
		8.6	34.6	1.1	5.6	0.8	6.6	0.2	2
		17.2	51.3	0.8	5.7	0.1	6.7	1.0	2
		34.4	66.9	2.6	5.4	0.2	4.7	0.4	2
		68.8	79.0	0.6	4.4	0.7	4.5	0.9	2
		137.5	89.2	0.4	3.6	0.9	2.5	0.2	2
		275.0	92.8	0.9	2.9	0.0	2.3	0.0	2
		550.0	94.5	1.3	3.4	1.0	1.6	0.2	2
	Cas9	0.0	0.2	0.0	2.3	0.1	0.1	0.0	2
		8.6	0.2	0.0	2.1	0.2	20.7	0.5	2
		17.2	0.1	0.0	1.4	0.0	34.6	0.7	2
		34.4	0.1	0.0	1.5	0.4	49.8	0.4	2
		68.8	0.1	0.0	1.0	0.0	62.3	0.1	2
		137.5	0.1	0.0	0.6	0.1	77.0	0.1	2
		275.0	0.0	0.0	0.3	0.0	87.8	0.2	2
		550.0	0.0	0.0	0.2	0.0	93.8	0.6	2
G016206 TRBC1/2	BC22n	0.0	0.4	0.1	0.6	0.1	0.1	0.1	2
		8.6	23.7	1.3	6.1	0.0	6.1	0.8	2
		17.2	42.4	2.2	6.8	0.1	6.8	0.3	2
		34.4	60.1	2.2	5.7	0.3	5.9	0.7	2
		68.8	73.2	4.2	4.3	0.1	4.7	1.1	2
		137.5	81.7	0.8	3.6	0.2	3.7	0.4	2
		275.0	91.0	1.7	2.3	0.1	2.8	0.8	2
		550.0	93.6	1.9	2.0	0.2	1.7	0.6	2
	Cas9	0.0	0.3	0.0	0.5	0.0	0.1	0.0	1

[1418]

가이드	편집자	총 RNA (ng)	C-to-T %		C-to-A/G %		인델 %		N
			평균	SD	평균	SD	평균	SD	
		8.6	0.3	0.2	0.5	0.1	8.1	0.2	2
		17.2	0.3	0.1	0.7	0.1	14.9	0.6	2
		34.4	0.2	0.0	0.8	0.0	24.1	0.0	1
		68.8	0.2	0.0	0.4	0.0	35.9	0.0	1
		137.5	0.2	0.0	0.5	0.0	48.6	2.1	2
		275.0	0.1	0.0	0.4	0.0	63.8	0.0	1
		550.0	검정되지 않음						
G018117 CIITA	BC22n	0.0	0.3	0.0	2.7	0.1	0.3	0.0	2
		8.6	14.5	1.5	3.8	0.3	3.5	0.3	2
		17.2	28.1	0.6	3.5	0.3	3.9	1.0	2
		34.4	45.9	0.4	3.3	0.4	3.6	0.0	2
		68.8	62.8	5.3	3.6	0.1	3.7	1.2	2
		137.5	78.9	1.3	2.7	0.1	2.7	0.7	2
		275.0	86.3	1.8	2.6	0.1	2.0	0.1	2
		550.0	92.3	1.2	2.6	0.2	1.1	0.2	2
	Cas9	0.0	0.2	0.0	2.8	0.1	0.3	0.0	2
		8.6	0.3	0.0	2.5	0.0	6.0	0.2	2
		17.2	0.2	0.0	2.4	0.1	11.2	1.6	2
		34.4	0.2	0.0	2.1	0.0	20.8	0.3	2
		68.8	0.2	0.0	1.9	0.1	33.2	0.4	2
		137.5	0.1	0.0	1.3	0.1	51.2	0.0	2
		275.0	0.1	0.0	0.9	0.2	64.5	0.9	2
		550.0	0.1	0.0	0.6	0.0	78.4	1.1	2

[1419]

[1420]

표 40 및 도 40a-d는 4개의 가이드가 편집을 위해 동시에 사용되었을 때 총 판독의 백분율로 T 세포에 대한 편집 프로파일을 설명한다. 이 실험 아암에서, 각 가이드는 단일 가이드 편집 실험에 비해 25%의 농도로 사용되었다. 전체적으로, T 세포는 6개의 상이한 LNP에 동시에 노출되었다(편집자 mRNA, UGI mRNA, 4개의 가이드). BC22n 및 트랜스 UGI를 사용한 편집은 Cas9를 사용한 편집과 비교할 때 각 유전자좌에 대한 최대 총 편집 백분율이 더 높다.

표 40

전체 판독의 백분율로 편집 - 다중 가이드 전달.

분석된 유전자좌	편집자	총 RNA (ng)	C-to-T %		C-to-A/G %		인델 %		N
			평균	SD	평균	SD	평균	SD	
G015995 B2M	BC22n	0.0	0.3	0.0	1.5	0.2	0.2	0.0	2
		8.6	27.3	0.2	3.8	0.1	2.6	0.1	2
		17.2	47.2	2.2	4.1	0.4	3.0	0.1	2
		34.4	61.2	3.0	3.9	0.1	2.6	0.3	2
		68.8	81.4	0.1	2.9	0.1	1.4	0.1	2
		137.5	90.0	1.1	2.6	0.3	1.3	0.5	2
		275.0	94.7	0.1	2.2	0.1	0.8	0.0	2
		550.0	95.9	0.9	2.9	1.0	0.4	0.3	2
	Cas9	0.0	0.3	0.0	1.4	0.1	0.2	0.0	2
		8.6	0.3	0.0	1.4	0.0	5.0	0.1	2
		17.2	0.3	0.0	1.3	0.0	10.5	0.4	2
		34.4	0.3	0.0	1.1	0.0	19.3	0.6	2
		68.8	0.3	0.0	0.9	0.0	34.4	0.1	2
		137.5	0.2	0.0	0.7	0.0	51.1	1.3	2
		275.0	0.2	0.1	0.5	0.0	68.0	0.1	2
		550.0	0.3	0.1	0.4	0.1	76.7	2.0	2
G016017 TRAC	BC22n	0.0	0.1	0.1	1.9	0.6	0.2	0.0	2
		8.6	12.1	1.3	4.3	0.2	2.4	0.2	2
		17.2	25.7	2.2	4.2	0.5	3.8	0.7	2
		34.4	44.7	1.4	4.7	1.0	3.0	0.3	2
		68.8	64.2	1.9	4.4	0.6	2.5	0.1	2
		137.5	79.3	1.1	3.6	0.4	2.1	0.1	2
		275.0	90.7	0.0	3.0	0.1	1.5	0.0	2
		550.0	93.3	0.6	2.4	0.1	0.9	0.4	2
	Cas9	0.0	0.1	0.1	2.1	0.2	0.1	0.0	2
		8.6	0.2	0.1	2.3	0.2	6.1	0.2	2
		17.2	0.1	0.0	1.8	0.2	11.5	0.5	2
		34.4	0.1	0.0	2.0	0.4	21.0	0.4	2
		68.8	0.1	0.0	1.4	0.0	33.5	0.1	2
		137.5	0.1	0.0	1.2	0.1	47.5	0.5	2
		275.0	0.1	0.0	0.9	0.1	64.8	0.2	2
		550.0	0.1	0.0	0.6	0.1	76.1	1.3	2
G016206 TRBC1/2	BC22n	0.0	데이터 없음						
		8.6	11.6	0.3	2.6	0.2	2.8	0.3	2
		17.2	23.4	0.4	3.6	0.3	2.6	0.5	2
		34.4	38.5	1.4	3.7	0.2	2.9	0.7	2
		68.8	55.6	1.7	2.3	0.4	2.4	0.0	2
		137.5	72.4	1.2	1.8	0.5	1.7	0.5	2
		275.0	85.1	1.0	1.9	0.5	1.7	0.6	2
		550.0	89.8	2.8	2.2	0.1	0.9	0.3	2

[1421]

분석된 유전자좌	편집자	총 RNA (ng)	C-to-T %		C-to-A/G %		인델 %		N
			평균	SD	평균	SD	평균	SD	
	Cas9	0.0	0.2	0.0	0.6	0.0	0.1	0.0	1
		8.6	0.2	0.1	0.7	0.1	2.3	0.3	2
		17.2	0.3	0.0	0.7	0.3	4.2	0.4	2
		34.4	0.1	0.0	0.5	0.1	6.6	0.5	2
		68.8	0.4	0.0	0.5	0.0	12.3	0.0	1
		137.5	0.2	0.0	0.5	0.0	17.8	0.0	1
		275.0	0.1	0.0	0.5	0.0	33.0	0.0	1
		550.0	0.3	0.2	0.3	0.0	43.3	1.7	2
G018117 CHTA	BC22n	0.0	0.2	0.0	2.6	0.1	0.3	0.0	2
		8.6	4.6	0.9	3.1	0.2	0.8	0.2	2
		17.2	10.5	0.2	2.9	0.1	1.1	0.2	2
		34.4	18.8	0.3	2.9	0.2	1.6	0.2	2
		68.8	35.1	0.6	2.7	0.2	1.6	0.7	2
		137.5	52.9	0.2	2.9	0.3	1.5	0.0	2
		275.0	71.9	2.4	2.5	0.3	1.3	0.1	2
		550.0	81.1	1.9	2.6	0.1	1.1	0.6	2
	Cas9	0.0	0.3	0.0	2.7	0.1	0.3	0.0	2
		8.6	0.2	0.0	2.6	0.2	1.4	0.0	2
		17.2	0.2	0.0	2.5	0.0	2.1	0.3	2
		34.4	0.3	0.0	2.5	0.0	3.9	0.1	2
		68.8	0.2	0.0	2.5	0.2	7.7	0.6	2
		137.5	0.2	0.0	2.2	0.1	13.3	0.2	2
		275.0	0.1	0.0	1.9	0.0	26.7	1.3	2
		550.0	0.1	0.0	1.7	0.1	42.3	0.3	2

[1422]

[1423]

활성화 후 10일째에, T 세포는 편집이 세포 표면 단백질의 손실을 초래하는지 결정하기 위해 유세포 분석법에

의해 표현형을 결정하였다. 간략하게, T 세포는 B2M-FITC(BioLegend, 카탈로그 316304), CD3-AF700(BioLegend, 카탈로그 317322), HLA DR DQ DP-PE(BioLegend, 카탈로그 361704) 및 DAPI(BioLegend, 카탈로그 422801)의 항체 믹스에서 인큐베이션하였다. 편집되지 않은 세포의 하위 집합을 이소형 대조군-PE(BioLegend® 카탈로그 번호 400234)와 함께 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고 Cytotflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석하였다. T 세포는 크기, 모양, 생존율 및 항원 발현을 기반으로 게이팅하였다.

[1424] 표 41 및 도 41a-h는 표현형 분석 결과를 항체 결합에 대해 음성인 세포의 백분율로 보고한다. 항원 음성 세포의 백분율은 BC22n 및 Cas9 샘플 모두에 대해 총 RNA가 증가함에 따라 투여량 반응 방식으로 증가하였다. BC22n으로 편집된 세포는 테스트한 모든 가이드에 대해 Cas9로 편집된 세포와 비교할 때 유사하거나 더 높은 단백질 녹아웃을 보여주었다. 다중 편집된 세포에서, 트랜스 UGI가 있는 BC22n은 트랜스 UGI가 있는 Cas9보다 항원 음성 세포의 백분율이 훨씬 더 높았다. 예를 들어, 550 ng의 가장 높은 총 RNA 용량의 BC22 편집된 샘플은 세 가지 항원이 모두 결여된 세포의 84.2%를 나타낸 반면, Cas9 편집은 이러한 삼중 녹아웃 세포가 46.8%에 불과했다. 하나의 가이드로만 처리된 샘플의 경우, DNA 편집과 항원 감소 사이의 상관관계가 강했다. BC22n은 C에서 T로의 전환을 항원 녹아웃과 비교할 때 R 제공 측정값이 0.93이었다. Cas9는 인텔과 항원 녹아웃을 비교할 때 R 제공 측정값이 0.95였다.

표 41

유세포분석 데이터 - 항원에 대해 음성인 세포 퍼센트(n=2).

가이드(s)	표현형	총 RNA (ng)	BC22n		Cas9	
			평균 %	SD	평균 %	SD
G015995 B2M	B2M neg	550.0	95.7	0.1	91.3	0.6
		275.0	94.4	0.4	89.3	0.1
		137.5	91.2	0.1	82.1	3.3
		68.8	83.9	0.4	68.7	3.3
		34.4	75.7	1.4	53.4	0.2
		17.2	60.8	2.0	30.7	1.3
		8.6	44.0	2.3	13.9	2.0
		0.0	14.1	4.1	9.9	1.9
G015995 G016017 G016206 G018117	B2M neg	550.0	94.4	0.1	74.2	0.4
		275.0	91.3	0.1	65.2	0.1
		137.5	84.3	0.2	45.4	1.9
		68.8	72.7	0.4	24.5	0.8
		34.4	56.2	1.2	14.1	2.3
		17.2	38.5	0.2	9.9	0.8
		8.6	20.6	0.7	7.6	2.4
		0.0	14.1	4.1	9.9	1.9
G016017 TRAC	CD3 neg	550.0	97.3	0.3	94.8	0.4
		275.0	96.0	0.2	87.0	4.9
		137.5	91.9	0.2	72.7	0.9
		68.8	85.7	0.5	65.6	0.1
		34.4	76.6	0.8	51.7	3.0
		17.2	61.8	1.7	35.7	1.1
		8.6	42.1	0.7	20.1	1.5
		0.0	1.0	0.1	0.9	0.1
G016206 TRBC1/2	CD3 neg	550.0	97.9	0.1	86.6	0.3
		275.0	96.0	0.1	77.3	0.1
		137.5	90.4	0.8	59.4	0.4
		68.8	82.9	0.1	40.6	1.2
		34.4	71.9	1.5	27.0	1.6
		17.2	53.4	0.3	16.1	0.1
		8.6	32.6	0.6	7.9	0.4
		0.0	0.8	0.0	0.9	0.4
G015995 G016017 G016206 G018117	CD3 neg	550.0	98.3	0.2	84.2	0.1
		275.0	96.3	0.1	74.6	0.5
		137.5	90.4	0.3	57.4	1.0
		68.8	81.3	0.3	39.4	0.1
		34.4	66.3	1.6	25.6	0.8
		17.2	48.2	1.0	15.3	0.5
		8.6	27.3	0.7	8.6	0.5
		0.0	0.9	0.1	0.9	0.2
G018117		550.0	95.7	0.4	72.0	0.1

[1425]

가이드(s)	표현형	총 RNA (ng)	BC22n		Cas9	
			평균 %	SD	평균 %	SD
CIITA	HLA DR DP DQ neg	275.0	92.5	1.1	65.6	0.4
		137.5	85.2	0.6	55.5	0.6
		68.8	74.5	1.1	48.9	0.0
		34.4	65.8	3.7	40.7	0.6
		17.2	49.9	0.1	36.2	0.6
		8.6	41.6	0.8	34.2	1.3
		0.0	30.1	1.6	35.2	0.4
		550.0	88.0	0.2	52.8	1.1
G015995 G016017 G016206 G018117	HLA DR DP DQ neg	275.0	81.2	0.2	46.4	0.4
		137.5	70.4	1.3	39.9	1.8
		68.8	60.0	0.4	39.1	3.3
		34.4	48.8	0.6	37.7	2.9
		17.2	43.0	4.2	37.5	0.6
		8.6	37.8	2.1	35.0	0.0
		0.0	33.0	1.9	37.3	2.1
		550.0	84.2	0.0	46.8	1.1
G015995 G016017 G016206 G018117	B2M neg CD3 neg HLA DR DP DQ neg	275.0	76.2	0.0	37.8	0.2
		137.5	63.0	1.3	23.4	2.4
		68.8	48.2	0.2	10.8	0.9
		34.4	31.5	1.1	3.6	0.9
		17.2	17.8	1.7	1.1	0.2
		8.6	6.4	0.0	0.4	0.1
		0.0	0.1	0.0	0.1	0.0

[1426]

[1427]

[1428]

실시예 16.B. 전기천공 또는 LNP를 통한 전달 후 T 세포에서 BC22n 또는 Cas9로 동시 4중 편집

전달 조건 및 Cas9 또는 염기 편집자에 의한 편집과 관련된 구조적 게놈 변화의 양을 평가하기 위해, 4개의 가이드를 전달하기 위해 RNP 또는 지질 나노입자(LNP) 및 Cas9 또는 BC22n를 전달하기 위해 전기천공으로 처리된 T 세포를 세포 생존율, DNA 이중-가닥 파단, 편집, 표면 단백질 발현 및 염색체 구조에 대해 분석하였다.

[1429]

실시예 16.B.1. T 세포 제조

[1430]

건강한 인간 공여자 성분채집술을 상업적으로 입수하였고(Hemacare), 세포를 세척하고 LOVO 장치 상의 CliniMACS® PBS/EDTA 완충액(Miltenyi Biotec 카탈로그 번호 130-070-525)에 재현탁하였다. T 세포는 EasySep™ 인간 T 세포 분리 키트(StemCell Technologies 카탈로그 번호 17951)를 사용하여 음성 선택을 통해 분리하였다. T 세포를 바이알에 분주하고 향후 사용을 위해 Cryostor® CS10(StemCell Technologies 카탈로그 번호 07930) 및 Plasmalyte A(Baxter 카탈로그 번호 2B2522X)의 1:1 제형으로 동결보존했다.

[1431]

해동 시, CTS OpTmizer T 세포 확장 SFM 및 T 세포 확장 보충제(ThermoFisher 카탈로그 A1048501), 5% 인간 AB 혈청(GeminiBio, 카탈로그 100-512) 1X 페니실린/스트렙토마이신, 1X Glutamax, 10 mM HEPES, 200 U/mL 재조합 인간 인터루킨-2(PeproTech, 카탈로그 200-02), 5 ng/ml 재조합 인간 인터루킨 7(PeproTech, 카탈로그 200-07) 및 5 ng/ml 재조합 인간 인터루킨 15(PeproTech, 카탈로그 200-15)를 함유하는 OpTmizer-기반 배지에 T 세포를 1.0×10^6 세포/mL의 밀도로 플레이팅하였다. T 세포를 이 배지에서 72시간 동안 TransAct™(1:100 희석, Miltenyi Biotec)로 활성화하고, 이때 T 세포를 세척하고 전기천공법 또는 지질 나노입자에 의한 편집을 위해 4 회 플레이팅했다.

[1432]

실시예 16.B.2. 지질 나노입자를 사용한 단일 gRNA 및 4 gRNA T 세포 편집

[1433]

LNP는 일반적으로 단일 RNA 종 카고를 사용하여 실시예 1에서와 같이 제형화되었다. 카고는 BC22n을 암호화하는 mRNA, Cas9를 암호화하는 mRNA, UGI를 암호화하는 mRNA, B2M을 표적화하는 sgRNA G015995(서열 번호 711), TRAC를 표적화하는 sgRNA G016017(서열 번호 712), TRBC를 표적화하는 sgRNA G016200 또는 CIITA를 표적화하는 sgRNA G016086으로부터 선택되었다. 각각의 LNP는 37°C에서 15분 동안 20ug/ml 재조합 인간 ApoE3(PeproTech, 카탈로그 350-02)로 보충된 상기 기재된 바와 같은 사이토카인과 함께 OpTmizer-기반 배지에서 인큐베이션되었다. 활성화 72시간 후, T 세포를 세척하고 인간 혈청 없이 사이토카인이 있는 OpTmizer 배지에 현탁했다. 단일 sgRNA 편집 조건의 경우, 사전-인큐베이션된 LNP 믹스를 100,000개 세포의 각 웰에 추가하여 최종 농도 2.3 μ g/mL 편집자 mRNA(BC22n 또는 Cas9), 1.1 μ g/mL UGI 및 4.6 μ g/ μ L G016017(서열 번호 712)을 생성하였다. 4 중 sgRNA 편집을 위해 LNP 믹스를 100,000개 세포의 각 웰에 첨가하여 최종 농도 2.3 μ g/mL 편집자 mRNA(BC22n 또는 Cas9), 1.1 μ g/mL UGI, 1.15 μ g/ μ L G015995(서열 번호 711), 1.15 μ g/ μ L G016017(서열 번호 712), 1.15 μ g/ μ L G016200 및 1.15 μ g/ μ L G016086을 생성하였다. 편집되지 않은 T 세포(LNP 없음)를 포함하는 대조군도 포함되었다. 전달 후 16시간에 세포의 하위집합을 사용하여 세포 생존율을 측정하고 세포의 다른 하위

집합을 γ H2AX 병소의 영상화를 위해 처리했다. 나머지 T 세포는 배양에서 계속 확장되었다. 활성화 후 5일 및 8일에 배지를 교체하고, 활성화 후 11일째에 NGS, 유세포 분석 및 UnIT로 분석하기 위해 세포를 수확했다. NGS는 실시예 1에서와 같이 수행하였다.

[1434] **실시예 16.B.3. mRNA 전기천공법으로 단일 gRNA 및 4개 gRNA T 세포 편집**

[1435] 전기천공법은 활성화 72시간 후에 수행하였다. B2M을 표적화하는 sgRNA G015995(서열 번호 711), TRAC를 표적화하는 sgRNA G016017(서열 번호 712), TRBC를 표적화하는 sgRNA G016200(서열 번호 718) 및 sgRNA G016086(서열 번호 719)을 95℃에서 2분 동안 변성시킨 후 실온에서 10분 동안 냉각시킨다. T 세포를 수확하고, 원심분리하고, P3 전기천공 완충액(Lonza)에 12.5×10^6 T 세포/mL의 농도로 재현탁했다. 단일 sgRNA 편집 조건의 경우, 1×10^5 T 세포를 40ng/ μ L의 편집자 mRNA(BC22n 또는 Cas9), 10ng/ μ L의 UGI mRNA 및 80 pmol의 sgRNA와 최종 부피 20 μ L의 P3 전기천공 완충액에서 혼합했다. 4중 sgRNA 편집 조건의 경우, 최종 부피 20 μ L의 P3 전기천공 완충액에서 1×10^5 T 세포를 40 ng/ μ L의 편집기 mRNA(BC22n 또는 Cas9), 10 ng/ μ L의 UGI mRNA 및 4개의 개별 sgRNA 20 pmol과 혼합하였다. 이 믹스를 96-웰 Nucleofector™ 플레이트로 4회 옮기고 제조사의 펄스 코드를 사용하여 전기천공했다. 전기천공된 T 세포는 새로운 평평한 바닥 96-웰 플레이트로 옮겨지기 전에 사이토카인이 있는 80 μ L의 OpTmizer-기반 배지에 보관되었다. 편집되지 않은 T 세포(EP 없음)를 포함하는 대조군도 포함되었다. 전달 후 16시간에 세포의 하위 집합을 사용하여 세포 생존율을 측정하고 세포의 다른 하위 집합을 γ H2AX 병소의 영상화를 위해 처리했다.

[1436] **실시예 16.B.4. 세포 Titer Glo를 통한 상대적 생존율**

[1437] 전기천공 또는 지질 나노입자 전달 16시간 후 대조군 또는 편집된 세포 20 μ L를 원래 플레이트에서 제거하고 검은색 벽이 있는 새로운 평평한 바닥 96-웰 플레이트(Corning 카탈로그 3904)에 추가했다. CellTiter-Glo® 2.0(Promega 카탈로그 G9241)을 추가하고 샘플을 제조사의 프로토콜에 따라 처리했다. 상대적 발광 단위(RLU)는 게인이 3600으로 설정된 CLARistar plus(BMG Labtech) 플레이트 판독기에 의해 판독되었다. 표 42 및 도 42에 나타난 상대적인 생존율은 모든 샘플 RLU를 처리되지 않은 대조군 RLU의 평균으로 나누어 계산했다. 모든 전기천공 조건은 처리되지 않은 대조군 수준에서 5배 이상의 생존율 감소를 보인 반면, LNP 처리는 4개의 가이드가 동시에 편집되는 경우에도 처리되지 않은 대조군 샘플에 가까운 세포 생존율을 유지했다.

표 42

다양한 편집 및 전달 조건으로 처리한 후 16 시간 동안 상대적인 세포 생존율

편집자	가이드(s)	EP		LNP	
		평균	SD	평균	SD
편집자 없음	가이드 없음	100.00	2.52	100.00	5.90
편집자 없음	G016017	13.88	1.05	89.48	1.77
Cas9	G016017	13.25	1.18	96.43	9.82
BC22n	G016017	14.78	1.37	91.20	4.67
Cas9	4 가이드	13.45	0.65	98.30	4.80
BC22n	4 가이드	14.38	1.49	103.40	2.75

[1438]

[1439] **실시예 16.B.5. γ H2AX 병소의 염색, 이미징 및 정량화**

[1440] 전기천공 또는 지질 나노입자 전달 16시간 후 T 세포를 Cytospin 4(Thermo Fisher)를 사용하여 슬라이드로 세포 분리했다. 얼음 위의 PBS/0.5% Trion X-100에서 5분 사전-추출 후, 세포를 4% 파라포름알데히드에서 10분 동안 고정했다. 그런 다음 세포를 PBS에서 여러 번 세척하고, PBS/0.1% TX-100/1% BSA에서 30분 동안 차단했다. 1차 항체(마우스 항-인-히스톤 H2A.X(Ser139)(Millipore 카탈로그 05-636)를 차단 완충액에서 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. PBS/0.05% Tween-20에서 3회 세척한 후, 2차 항체 (염소 항-마우스 IgG Alexa 568(Thermo Fisher 카탈로그 A31556)을 실온에서 30분 동안 차단 완충액에서 인큐베이션하였다. 세포를 PBS/0.05% Tween-20에서 세척하고 핵을 Hoechst 33342로 역염색했다. 이미지는 Leica SP8를 사용한 공초점 이미징에 의해 생성되었다. 이미지 분석은 Thermo Scientific HCS Studio 세포 분석 소프트웨어 스팟 검출기 모듈에서 맞춤형 프로토콜을 통해 수행하였다. 표 43 및 도 43은 명시된 편집 및 전달 조건으로 처리한 후 핵당 총 γ H2AX 스팟 강도를 보여준다. 4개의 가이드 샘플이 있는 EP Cas9는 LNP Cas9-4 가이드 샘플에 비해 핵당 γ H2AX 병소의 상당한 증가를 보여주었다.

표 43

다양한 편집 및 전달 조건으로 처리한 후 핵당 평균 총 pH2AX 스폿 강도

전달	편집자 없음			Cas9, 4 가이드			BC22n, 4 가이드		
	평균	SD	N	평균	SD	N	평균	SD	N
처리되지 않음	134.33	95.78	5						
EP				21386.62	4336.69	3	실행되지 않음		
LNP				2550.88	562.77	3	1770.11	291.97	5

[1441]

[1442]

실시예 16.B.6. 유세포 분석법 및 NGS 시퀀싱

[1443]

편집 후 8일째에, T 세포는 B2M, CD3 및 HLA II-DR, DP, DQ 단백질 발현을 결정하기 위해 유세포 분석법에 의해 표현형을 결정하였다. 간략하게, T 세포는 B2M-APC/Fire™ 750(BioLegend® 카탈로그 번호 316314), CD3-BV605(BioLegend® 카탈로그 번호 316314) 및 HLA II- DR, DP, DQ-PE(BioLegend® 카탈로그 번호 361716)를 표적화하는 항체 각테일에서 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고, Cytoflex 유세포 분석기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. T 세포는 크기, 모양, 생존율 및 MHC II 발현을 기반으로 게이팅하였다. **실시예 1**에 기재된 바와 같이 DNA 샘플을 PCR 및 후속 NGS 분석에 적용하였다. **표 44** 및 **도 44**는 LNP로 처리한 후 관심 유전자좌에서 퍼센트 편집을 보여준다. 4개의 가이드가 LNP에 의해 전달된 조건에서 BC22n은 Cas9보다 각 유전자좌에서 편집률이 더 높았다. **표 45** 및 **도 45**는 LNP 처리 후 관심 있는 표면 단백질 발현을 보여준다. BC22n으로 편집하면 Cas9로 편집하는 것보다 삼중 녹아웃 세포의 비율이 더 높아졌다.

표 44

LNP 전달에 의해 언급된 편집 방식으로 처리한 후 평균 편집 퍼센트.

편집자	가이드(들)	관독 유전자좌	C-to-T %			C-to-A/G %			인델 %		
			평균	SD	N	평균	SD	N	평균	SD	N
편집자 없음	가이드 없음	B2M	0.20	0.00	2	0.41	0.01	2	0.13	0.01	2
		TRAC	0.05	0.07	2	0.53	0.01	2	0.09	0.01	2
		TRBC1	0.25	0.07	2	0.86	0.09	2	0.24	0.02	2
		TRBC2	0.30	0.14	2	0.85	0.04	2	0.27	0.01	2
		CIITA	0.15	0.07	2	0.26	0.03	2	0.06	0.00	2
Cas9	G016017	TRAC	0.00	0.00	2	0.05	0.00	2	96.59	0.52	2
	4 가이드	B2M	0.30	0.14	2	0.37	0.21	2	83.61	2.72	2
		TRAC	0.00	0.00	2	0.06	0.04	2	89.45	0.25	2
		TRBC1	0.00	0.00	2	0.35	0.01	2	75.98	2.09	2
		TRBC2	0.00	0.00	2	0.38	0.03	2	78.07	1.51	2
		CIITA	0.20	0.14	2	0.38	0.04	2	55.23	0.92	2
BC22n	G016017	TRAC	93.90	0.57	2	2.29	0.29	2	2.34	0.08	2
	4 가이드	B2M	95.65	0.07	2	1.42	0.23	2	1.07	0.16	2
		TRAC	95.00	0.57	2	1.65	0.07	2	1.44	0.43	2
		TRBC1	92.40	0.00	2	1.55	0.18	2	1.91	0.10	2
		TRBC2	92.50	0.00	2	1.62	0.02	2	1.87	0.33	2
		CIITA	91.35	0.35	2	0.93	0.04	2	0.64	0.04	2

[1444]

표 45

LNP 전달에 의해 명시된 편집 방식으로 처리한 후 표면을 발현하는 세포의 평균 백분율.

편집자	가이드	표면 단백질	평균	SD	N
편집자 없음	가이드 없음	CD3-	2.30	2.12	2
		B2M-	4.00	2.26	2
		HLA DP DQ DR-	60.40	1.70	2
Cas9	4 가이드	G016017 CD3-	97.05	0.16	2
		B2M-	77.90	4.67	2
		CD3-	94.54	1.34	2
		HLA DP DQ DR-	70.10	4.81	2
		CD3- B2M- HLA DP DQ DR-	61.58	5.42	2
		G016017			
BC22n	4 가이드	CD3-	96.20	0.13	2
		B2M-	97.35	0.37	2
		CD3-	97.34	0.08	2
		HLA DP DQ DR-	93.46	0.89	2
		CD3- B2M- HLA DP DQ DR-	90.63	0.89	2
		G016017			

실시예 16.B.7. UnIT에 의한 구조 변이 및 전좌 측정

처리되지 않은 T 세포의 서브세트를 편집 후 8일에, LNP-Cas9-4 가이드 및 LNP-BC22n-4 가이드 샘플을 수집하고, 회전시키고, 100 μ L의 PBS에 재현탁시켰다. gDNA는 DNeasy Blood & Tissue Kit(Qiagen 카탈로그 69504)를 사용하여 세포에서 단리하였다. UnIT 구조 변이체 특성화 분석을 이러한 gDNA 샘플에 적용했다. 고분자량 게놈 DNA는 부분 Illumina P5 서열 및 12 bp 고유 분자 식별자(UMI)가 있는 Tn5 트랜스포사제 및 어댑터로 동시에 단편화되고 서열 태그('태그')된다. 샘플당 두 개의 Illumina 호환 NGS 라이브러리를 생성하기 위해 Illumina에 P7 서열을 부여하는 P5 및 절반-네스팅된(hemi-nested) 유전자 특이적 프라이머(GSP)에 대한 프라이머를 사용하는 2개의 순차적 PCR. 2개의 라이브러리를 사용하여 CRISPR/Cas9 표적 절단 부위의 양방향에 걸쳐 시퀀싱하면 게놈 편집 후 DNA 복구 결과에서 구조적 변이체를 추론하고 정량화할 수 있다. 두 단편이 서로 다른 염색체에 정렬된 경우, SV는 "염색체 간 전좌"로 분류되었다. 구조적 변이 결과는 BC22n에 의해 다중 편집이 수행될 때 염색체간 전좌가 배경 수준으로 감소되는 반면, Cas9 다중 편집은 표 46 및 도 46에 나타난 바와 같이 구조적 변이에서 상당한 증가를 유도함을 보여준다.

표 46

LNP 전달에 의해 명시된 편집 방식으로 처리한 후 총 고유 분자 식별자 중 염색체간 전좌 퍼센트 평균.

편집	유전자좌	평균	SD	N
처리되지 않음	B2M	0.16	0.09	2
	TRAC	0.21	0.13	2
	CIITA	0.10	0.04	2
Cas9, 4 가이드	B2M	2.71	0.52	2
	TRAC	1.55	0.24	2
	CIITA	0.92	0.37	2
BC22n, 4 가이드	B2M	0.14	0.06	2
	TRAC	0.21	0.08	2
	CIITA	0.14	0.08	2

실시예 17. 순차적 LNP 전달에 의한 다중-편집 WT1 T 세포

일련의 유전자 파괴 및 삽입으로 T 세포를 조작하였다. 건강한 공여자 세포는 4개의 LNP로 순차적으로 처리되었으며, 각각의 LNP는 Cas9(서열 번호 6)를 암호화하는 mRNA와 TRAC(G013006)(서열 번호 708), TRBC(G016239)(서열 번호 707), CIITA(G013676)(서열 번호 715), 또는 HLA-A(G018995)(서열 번호 716) 중 하나를 표적화하는 sgRNA로 공동 제형화되었다. 윌름스 중앙 항원(WT1 TCR)(서열 번호 717)을 표적화하는 이식유전자 T 세포 수용체는 AAV를 사용하여 상동성 방향성 복구 주형을 전달함으로써 TRAC 절단 부위에 통합되었다.

실시예 17.1. T 세포 제조

3명의 건강한 HLA-A2+ 공여자(STEMCELL Technologies)의 백혈구성분채집술 생성물로부터 T 세포를 단리하였다.

제조사 프로토콜에 따라 EasySep 인간 T 세포 분리 키트(STEMCELL Technologies, 카탈로그 17951)를 사용하여 T 세포를 분리하고 Cryostor CS10(STEMCELL Technologies, 카탈로그 07930)을 사용하여 동결보존하였다. T 세포 편집을 시작하기 전날, 세포를 해동하고 2.5% 인간 AB 혈청(Gemini, 카탈로그 100-512), 1X GlutaMAX(Thermofisher, 카탈로그 35050061), 10 mM HEPES(Thermofisher, 카탈로그 15630080), 200 U/mL IL-2(Peprotech, 카탈로그 200-02), IL-7(Peprotech, 카탈로그 200-07), IL-15(Peprotech, 카탈로그 200-15)가 보충된 T 세포 활성화 배지(TCAM): CTS OpTmizer(Thermofisher, 카탈로그 A3705001)에서 밤새 휴지시켰다.

[1453] 실시예 17.2. T 세포의 LNP 처리 및 확장

[1454] LNP는 일반적으로 50/10/38.5/1.5 지질 A, 콜레스테롤, DSPC 및 PEG2k-DMG의 비율로 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조하였다. LNP는 gRNA 대 mRNA의 중량비가 1:2로 제조되었다. LNP를 ApoE 함유 배지에서 매일 제조하고 표 47 및 이하에 기재된 바와 같이 T 세포에 전달하였다.

표 47

T 세포 조작을 위한 편집 순서

그룹	1일	2일	3일	4일
	편집되지	편집되지	편집되지	편집되지
1	없음	없음	없음	없음
2	TRBC	CHTA	TRAC	HLA-A
3	TRBC	HLA-A	TRAC	CHTA
4	TRBC		TRAC	

[1456] 1일에, 표 47에 나타난 바와 같은 LNP를 5 ug/mL rhApoE3(Peprotech, 카탈로그 350-02)을 함유하는 TCAM에서 5 ug/mL의 농도로 인큐베이션하였다. 한편, T 세포를 수확하고, 세척하고, T Cell TransAct, 인간 시약(Miltenyi, 카탈로그 130-111-160)을 1:50으로 희석한 TCAM에 2×10^6 개 세포/mL의 밀도로 재현탁시켰다. T 세포와 LNP-ApoE 배지를 1:1 비율로 혼합하고, T 세포를 배양 플라스크에 밤새 플레이팅했다.

[1457] 2일째에, 표 47에 나타난 바와 같은 LNP를 20 ug/mL rhApoE3(Peprotech, 카탈로그 350-02)을 함유하는 TCAM에서 25 ug/mL의 농도로 인큐베이션하였다. 그런 다음 LNP-ApoE 용액을 1:10 비율로 적절한 배양액에 첨가했다.

[1458] 3일째에, TRAC-LNP를 10 ug/mL rhApoE3(Peprotech, 카탈로그 350-02)을 함유하는 TCAM에서 5 ug/mL의 농도로 인큐베이션하였다. T 세포를 수확하고, 세척하고, TCAM에서 1×10^6 개 세포/mL의 밀도로 재현탁시켰다. T 세포와 LNP-ApoE 배지를 1:1 비율로 혼합하고 T 세포를 배양 플라스크에 플레이팅했다. 이어서 WT1 AAV(서열 번호 717)를 3×10^5 게놈 카피/세포의 MOI로 각 그룹에 첨가하였다.

[1459] 4일째에, 표 47에 나타난 바와 같은 LNP를 5 ug/mL rhApoE3(Peprotech, 카탈로그 350-02)을 함유하는 TCAM에서 5 ug/mL의 농도로 인큐베이션하였다. 그런 다음 LNP-ApoE 용액을 1:1 비율로 적절한 배양액에 첨가했다.

[1460] 5-11일에, T 세포를 5% CTS 면역 세포 혈청 대체물(Thermofisher, 카탈로그 A2596101), 1X GlutaMAX(Thermofisher, 카탈로그 35050061), 10 mM HEPES(Thermofisher, 카탈로그 15630080), 200 U/mL IL-2(Peprotech, 카탈로그 200-02), IL-7(Peprotech, 카탈로그 200-07), 및 IL-15(Peprotech, 카탈로그 200-15)로 보충된 T 세포 확장 배지(TCEM): CTS OpTmizer(Thermofisher, 카탈로그 A3705001)에서 24-웰 GREX 플레이트(Wilson Wolf, 카탈로그 80192)로 옮겼다. 제조사 프로토콜에 따라 세포를 확장했다. T 세포는 격일로 배지 교환과 함께 6일 동안 확장되었다. Vi-CELL 세포 계수기(Beckman Coulter)를 사용하여 세포를 계수하고 표 48에 나타난 바와 같이 세포 수율을 출발 물질로 나누어 배수 확장을 계산하였다.

표 48

다중 편집 T 세포 조작 후 배수 확장

그룹	공여자 A	공여자 B	공여자 C	평균	SD
1	331.40	362.24	533.18	408.94	108.69
2	61.82	72.15	116.13	83.37	28.84
3	64.08	76.29	157.75	99.37	50.92
4	데이터 없음	146.78	331.67	239.22	130.74

[1461]

[1462] 실시예 17.3. 유세포 분석법 및 NGS에 의한 T 세포 편집의 정량화

[1463] 확장 후, 편집된 T 세포는 HLA-A2 발현(HLA-A⁺), 녹다운 CIITA 후 HLA-DR-DP-DQ 발현(MHC II⁺), WT1-TCR 발현(CD3⁺ Vb8⁺), 및 잔류 내인성 TCR(CD3⁺ Vb8⁻) 또는 잘못 짝지어진 TCR(CD3⁺ Vb8^{low})의 발현을 결정하기 위해 유세포 분석법에 의해 분석하였다. T 세포를 다음 분자를 표적화하는 항체 콕테일과 함께 인큐베이션하였다: CD4(Biolegend, 카탈로그 300524), CD8(Biolegend, 카탈로그 301045), Vb8(Biolegend, 카탈로그 348106), CD3(Biolegend, 카탈로그 300327), HLA-A2(Biolegend, 카탈로그 343306), HLA-DRDPDQ(Biolegend, 카탈로그 361706), CD62L(Biolegend, 카탈로그 304844), CD45RO(Biolegend, 카탈로그 304230). 이어서 세포를 세척하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 Cytotflex LX 기기(Beckman Coulter)에서 분석했다. T 세포는 편집 및 삽입 마커의 발현이 결정되기 전에 크기 및 CD4/CD8 상태에 대해 게이팅되었다. 순차적인 T 세포 조작 후 관련 세포 표면 단백질을 발현하는 세포의 백분율은 CD8⁺ T 세포의 경우 표 49 및 도 47a-f에, CD4⁺ T 세포의 경우 표 50 및 도 48a-f에 제시되어 있다. 완전히 편집된 CD4⁺ 또는 CD8⁺ T 세포의 백분율은 % CD3⁺ Vb8⁺ HLA-A⁻ MHC II⁻로 게이팅하였다. 높은 수준의 HLA-A 및 MHC II 녹다운, WT1-TCR 삽입 및 내인성 TCR KO가 편집된 샘플에서 관찰된다. 유세포 분석에 추가하여 게놈 DNA를 준비하고 실시예 1에 기술된 바와 같이 NGS 분석을 수행하여 각각의 표적 부위에서의 편집률을 결정하였다. 표 51 및 도 49a-d는 CIITA, HLA-A 및 TRBC1/2 유전자좌에서 퍼센트 편집에 대한 결과를 보여주며, 그룹 전반에 걸친 패턴은 유세포 분석법에 의해 확인된 것과 일치한다. TRBC1/2 유전자좌는 모든 그룹에서 >90-95%로 편집되었다.

표 49

순차적 T 세포 조작 후 세포 표면 표현형을 갖는 CD8⁺ 세포의 백분율

공여자	그룹	% HLA-A ⁺	% MHC II ⁺	% WT1 TCR	% 짝 없는 TCR	% 잔류 내인성 TCR	% 완전히 편집됨
		HLA-A2 ⁺	HLA-DR-DP-DQ ⁺	CD3 ⁺ Vb8 ⁺	CD3 ⁺ Vb8 ^{low}	CD3 ⁺ Vb8 ⁻	CD3 ⁺ Vb8 ⁺ HLA-A2 ⁻ HLA-DR-DP-DQ ⁻
A	1 편집되지 않음	100.0	60.9	6.7	0.8	93.2	0.0
B		99.7	71.0	3.4	0.6	96.1	0.2
C		99.7	52.2	5.7	0.8	94.0	0.0
A	2	2.7	1.2	68.9	1.3	0.4	66.7
B		1.3	21.0	50.4	3.1	4.5	43.3
C		1.8	2.9	62.2	2.6	2.7	60.3
A	3	1.3	0.8	66.0	1.4	0.3	64.4
B		1.4	2.2	56.8	2.2	2.0	55.1
C		1.2	5.7	63.3	1.0	0.9	60.6
B	4	99.8	64.8	62.3	2.0	2.5	0.1
C		99.0	51.5	71.0	1.0	0.5	0.4

[1464]

표 50

순차적 T 세포 조작 후 세포 표면 표현형을 갖는 CD4⁺ 세포의 백분율

		% HLA-A ⁺	% MHC II ⁺	% WT1 TCR	% 정없는 TCR	% 잔류 내인성 TCR	% 완전히 편집됨
공여자	그룹	HLA-A2 ⁺	HLA-DR-DP-DQ ⁺	CD3 ⁺ Vb8 ⁺	CD3 ⁺ Vb8 ^{low}	CD3 ⁺ Vb8 ⁻	CD3 ⁺ Vb8 ⁺ HLA-A2 ⁺ HLA-DR-DP-DQ ⁺
A	1	100.0	36.3	5.4	0.4	94.5	0.0
B	편집되지 않음	98.7	27.6	5.6	0.4	94.3	0.0
C		99.3	32.3	6.2	0.3	93.6	0.1
A	2	2.6	0.7	62.4	2.4	1.1	60.9
B		1.8	0.5	59.7	2.2	1.0	58.5
C		1.7	3.2	58.6	1.6	1.8	55.8
A	3	1.3	0.8	63.0	3.4	0.8	61.7
B		1.1	1.1	61.8	2.6	0.9	60.6
C		1.1	0.4	60.9	1.7	1.0	59.9
B	8	99.5	25.1	61.9	1.9	5.2	0.1
C		97.9	40.1	69.5	4.7	1.9	0.8

[1465]

표 51

순차적 T 세포 조작 후 CIITA, HLA-A, TRBC1 및 TRBC2 에서의 인델 퍼센트

	CIITA (G013676)			HLA-A (G018995)			TRBC1 (G016239)			TRBC2 (G016239)		
그룹	공여자 A	공여자 B	공여자 C	공여자 A	공여자 B	공여자 C	공여자 A	공여자 B	공여자 C	공여자 A	공여자 B	공여자 C
1	0.2	0.2	0.2	6.9	3.3	2.3	0.1	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3
2	98.2	81.8	93.8	94.1	90.2	90.6	97.6	89.9	91.4	98.7	86.8	94.9
3	98.9	98.1	98.9	97.2	86.4	93.1	98.6	94.4	94.7	98.6	94.2	96.6
4	0.1	0.2	0.6	7.6	2.7	3.2	98.9	94	95	98.6	93.2	97.4

[1466]

[1467]

실시예 18. T 세포에 2개의 삽입을 통한 다중-편집

[1468]

5개의 별개의 Cas9 편집을 갖는 T 세포의 조작을 입증하기 위해, 건강한 공여자 세포를 Cas9를 암호화하는 mRNA(서열 번호 6) 및 TRAC(G013006)(서열 번호 708), TRBC(G016239)(서열 번호 707), CIITA(G013676)(서열 번호 715), HLA-A(G018995)(서열 번호 716), 또는 AAVS1(G000562)(서열 번호 710)를 표적화하는 sgRNA로 공동-제형화된 5개의 LNP로 순차적으로 처리하였다. TCR을 표적화하는 이식유전자 WT1은 AAV를 사용하여 상동성 방향성 복구 주형(서열 번호 717)을 전달함으로써 TRAC 절단 부위에 부위 특이적으로 통합하였다. 개념 증명으로서 GFP는 제2 상동성 복구 주형(서열 번호 720)을 사용하여 AAVS1 표적 부위에 부위-특이적으로 통합되었다.

[1469]

2명의 건강한 HLA-A*02:01⁺ 공여자(STEMCELL Technologies)의 백혈구성분채집술 생성물로부터 T 세포를 분리하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 EasySep 인간 T 세포 분리 키트(STEMCELL Technologies, 17951)를 사용하여 T 세포를 분리하고 Cryostor CS10(STEMCELL Technologies, 07930)을 사용하여 동결보존하였다. T 세포 편집을 시작하기 전날, 세포를 해동하고 2.5% 인간 AB 혈청(Gemini, 100-512), 1X GlutaMAX(Thermofisher, 35050061), 10 mM HEPES(Thermofisher, 15630080), 200 U/mL IL-2(Peprotech, 200-02), 5 ng/mL IL7(Peprotech, 200-07), 및 5 ng/mL IL-15(Peprotech, 200-15)가 보충된 T 세포 활성화 배지(TCAM: CTS OpTmizer(Thermofisher, A3705001))에서 배양 휴지시켰다.

[1470]

실시예 18.1. T 세포의 LNP 처리 및 확장

[1471]

LNP는 일반적으로 각각 이온화가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 몰비로 표현되는 50/10/38.5/1.5의 지질 조성으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조하였다. T 세포에 노출되기 직전에, LNP를 ApoE 함유 배지에서 사전인큐베이션하였다. 순차적 편집 단계 및 대조군 그룹의 실험 설계는 표 52에 나와 있다.

표 52

실험 설계

그룹	1일	2일	3일	4일	5일	목적
편집되지 않음	없음	없음	없음	없음	없음	음성 대조군
GFP-AAV 단독	없음	없음	없음	AAV-GFP	없음	GFP 표피 발현을 위한 대조군
TCR 편집 단독	없음	없음	TRAC LNP + WT1 AAV	없음	TRBC	TCR 교체를 위한 대조군
Quintuple 편집	CIITA	HLA-A	TRAC LNP + WT1 AAV	AAVS1 + AAV-GFP	TRBC	실험

[1472]

[1473]

1일: 표 52에 나타난 바와 같이 CIITA를 표적화하는 LNP를 5 ug/mL rhApoE3(Peprotech 350-02)을 함유하는 TCAM에서 5 ug/mL의 농도로 인큐베이션하였다. T 세포를 수확하고, 세척하고, T Cell TransAct, 인간 시약 (Milenyi, 130-111-160)을 1:50으로 희석한 TCAM에 2×10^6 세포/mL의 밀도로 재현탁했다. 그런 다음, T 세포와 LNP-ApoE 용액을 1:1 비율로 혼합하고, T 세포를 배양 플라스크에 밤새 플레이팅하였다.

[1474]

2일: 표 52에 나타난 바와 같이 HLA-A를 표적화하는 LNP를 20 ug/mL rhApoE3(Peprotech 350-02)을 함유하는 TCAM에서 25 ug/mL의 농도로 인큐베이션하였다. 그런 다음 LNP-ApoE 용액을 1:10 부피 비율로 적절한 배양액에 첨가했다.

[1475]

3일: TRAC를 표적화하는 LNP를 5 ug/mL rhApoE3(Peprotech 350-02)을 함유하는 TCAM에서 5 ug/mL의 농도로 인큐베이션하였다. T 세포를 수확하고, 세척하고, TCAM에서 1×10^6 세포/mL의 밀도로 재현탁했다. T 세포와 LNP-ApoE 배지를 부피비 1:1로 혼합하고 T 세포를 배양 플라스크에 플레이팅했다. 그런 다음 WT1 AAV를 3×10^5 GCU/셀의 MOI로 각 그룹에 추가했다. DNA-PK 억제제 화합물 4를 각 그룹에 0.25 μ M의 농도로 첨가했다.

[1476]

4일: AAVS1을 표적화하는 LNP를 5 ug/mL rhApoE3(Peprotech 350-02)을 함유하는 TCAM에서 5 ug/mL의 농도로 인큐베이션하였다. 한편, T 세포를 수확하고, 세척하고, TCAM에 1×10^6 세포/mL의 밀도로 재현탁시켰다. T 세포와 LNP-ApoE 배지를 1:1 부피비로 혼합하고 각 군에 0.25 μ M의 농도로 첨가하였다.

[1477]

5일: 표 52에 표시된 TRBC를 표적화하는 LNP를 5 ug/mL rhApoE3(Peprotech 350-02)을 함유하는 TCAM에서 5 ug/mL의 농도로 인큐베이션했다. T 세포를 수확하고, 세척하고, TCAM에서 1×10^6 세포/mL의 밀도로 재현탁했다. 그런 다음 LNP-ApoE 용액을 1:1 부피비로 적절한 배양액에 첨가했다.

[1478]

6~11일: T 세포를 5% CTS 면역 세포 혈청 대체물(Thermofisher, A2596101), 1X GlutaMAX(Thermofisher, 35050061), 10 mM HEPES(Thermofisher, 15630080), 200 U/mL IL-2(Peprotech, 200-02), 5 ng/ml IL7(Peprotech, 200-07), 5 ng/ml IL-15(Peprotech, 200-15))이 보충된 T 세포 확장 배지(TCEM: CTS OpTmizer(Thermofisher, A3705001)) 내의 24-웰 GREX 플레이트(Wilson Wolf, 80192)로 옮기고, 제조사의 프로토콜에 따라 확장하였다. 간략하게, T 세포는 격일로 배지 교환과 함께 6일 동안 확장되었다.

[1479]

실시예 18.2. 유세포 분석법 및 NGS에 의한 T 세포 편집의 정량화

[1480]

확장 후, 편집된 T 세포를 HLA-A*02:01(Biolegend 343307), HLA-DR-DP-DQ(Biolegend 361712), WT1-TCR (Vb8+, Biolegend 348104), CD3e(Biolegend 300328), CD4(Biolegend 317434), CD8(Biolegend 301046), 및 Viakrome 808 Live/Dead(카탈로그 C36628)을 표적화하는 항체들로 염색하였다. 이러한 각테일을 사용하여 HLA-A*02:01 녹아웃(HLA-A2-), CIITA 녹아웃(HLA-DRDPDQ-)을 통한 HLA-DR-DP-DQ 녹다운, WT1-TCR 삽입(CD3+Vb8+), 및 잔류 내인성 TCR(CD3+Vb8-)을 발현하는 세포의 백분율을 결정하였다. AAVS1 부위로의 삽입은 GFP 발현을 모니터링하여 추적하였다. 항체 인큐베이션 후 세포를 세척하고 Cytoflex LX 기기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석하였다. T 세포는 편집 및 삽입 마커를 검사하기 전에 크기 및 CD4/CD8 상태에 대해 게이팅하였다. CD8+ 및 CD4+ T 세포에 대한 편집 및 삽입률은 각각 표 53 및 54에서 확인할 수 있다. 도 50a-f는 CD8+ T 세포에서 모든 표적의 편집 속도 그래프를 보여준다. 모든 의도된 편집(즉, HLA-A 및 CIITA의 녹아웃과 결합된 WT1-TCR 및 GFP의 삽입)이 있는 T 세포의 퍼센트는 % CD3+ Vb8+ GFP+ HLA-A- HLA-DRDPDQ-로 게이팅하였다. 높은 수준의 HLA-A 및 CIITA 녹아웃뿐만 아니라 GFP 및 WT1-TCR 삽입이 두 공여자의 5중 편집 샘플에서 관찰되었으며, 완전히 편집된 CD8+ T 세포의 >75% 및 완전히 편집된 CD4+ T 세포의 >85%를 산출했다.

표 53

공여자 A 및 B의 CD8+ T 세포에서의 편집율

마커	편집되지 않음		GFP-AAV 단독		TCR 편집 단독		Quintuple 편집	
	A	B	A	B	A	B	A	B
GFP+	0.0	0.0	0.3	0.7	0.0	0.0	88.4	93.1
HLA-A2-	0.1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.2	99.7	99.4
HLA-DRDPDQ-	31.9	29.6	30.0	32.0	40.5	56.7	99.0	98.7
CD3+Vb8-	93.3	96.4	94.1	95.8	0.2	0.3	1.0	0.8
CD3+Vb8+	6.0	3.5	5.5	4.0	92.3	94.3	86.7	92.1
CD3+Vb8+ GFP+ HLA-A-, HLA-DRDPDQ-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	76.7	84.8

[1481]

표 54

공여자 A 및 B의 CD4+ T 세포에서의 편집율

마커	편집되지 않음		GFP-AAV 단독		TCR 편집 단독		Quintuple 편집	
	A	B	A	B	A	B	A	B
GFP+	0.0	0.0	0.9	1.3	0.0	0.0	86.4	91.3
HLA-A2-	0.1	0.0	0.0	0.1	0.2	0.2	99.5	99.2
HLA-DRDPDQ-	77.0	73.6	71.3	75.0	93.1	96.1	99.2	99.1
CD3+Vb8-	94.6	94.6	94.8	94.2	0.3	0.4	1.3	1.3
CD3+Vb8+	5.1	5.1	4.9	5.4	86.3	90.9	80.7	91.0
Vb8+ GFP+ HLA-A- HLA-DRDPDQ-	0.6	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	86.1	90.6

[1482]

[1483] 실시예 19. 활성화된 및 비-활성화된 T 세포에서 다양한 APO 단백질의 편집 효율

[1484] 편집 효율을 평가하기 위해, TRBC를 표적화하는 LNP를 활성화 또는 비활성화 T 세포에 노출시키기 전에 다양한 농도의 ApoE3, ApoE4 또는 ApoA1과 사전 인큐베이션했다. 편집은 편집 후 CD3 음성 세포의 백분율 증가로 분석되었다. TRBC 및 CD3에 의해 암호화된 T 세포 수용체 베타 사슬은 모두 세포 표면에서 T 세포 수용체 복합체의 필수 부분이다. 따라서 게놈 편집에 의한 TRBC 유전자의 파괴는 T 세포의 세포 표면에서 CD3 단백질의 손실을 초래한다.

[1485] 건강한 인간 공여자 류코백을 상업적으로 입수하였고(Hemacare), T 세포를 MultiMACS Cell124 Separator Plus 기기에 대한 제조사의 프로토콜에 따라 StraightFrom® Leukopak® CD4/CD8 마이크로비드(Miltenyi, 카탈로그 130-122-352)를 사용하여 CD4/CD8 양성 선택에 의해 분리하였다. T 세포를 바이알에 분주하고 향후 사용을 위해 Cryostor CS10 냉동 배지(카탈로그, 07930)에 동결보존하였다.

[1486] 해동 시, T 세포를 완전한 T 세포 배지에서 배양하였다: XVIVO-15 배지(Fisher, BE02-060Q), 1% Pen-Strep(Corning, 30-002-CI), 50 uM 베타-머캅토에탄올, 및 N-아세틸 L-시스테인(Fisher, ICN19460325)으로 구성된 T 세포 기본 배지, 5% 인간 AB 혈청(Gemini Bio Products, 100-512), 200 U/mL IL-2(Peprotech, 200-02), 5 ng/mL IL7(Peprotech, 200-07), 5 ng/mL IL-15(Peprotech, 200-15))으로 추가 보충됨. 이 단계에서 TransAct(Miltenyi Biotech, 카탈로그 번호 130-111-160)의 1:100 희석액을 첨가하여 세포의 일부를 활성화하였다. 모든 세포를 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 100,000개의 T 세포를 LNP 형질감염 전에 15~30분 동안 인간 혈청 없이 완전 T 세포 배지에 재현탁시켰다.

[1487] 배양 48시간 후, 활성화 및 비활성화 T 세포를 Cas9(서열 번호 6)를 암호화하는 mRNA 및 TRBC를 표적화하는 sgRNA(G016239)(서열 번호 707)를 전달하는 LNP로 처리했다. LNP는 일반적으로 각각 이온화 가능한 지질 A/콜레스테롤/DSPC/PEG의 물비로 표현되는 50/9/39.5/1.5의 지질 조성을 갖는 실시예 1과 같이 제조되었다. T 세포에 노출되기 직전에, LNP는 혈청 없는 T 세포 배지에서 10, 5, 2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16 및 0.08 ug/mL 농도의 재조합 인간 ApoE3(Peprotech, 카탈로그 번호 350-02), 재조합 인간 ApoE4(Novus Biologicals, 카탈로그 번호 NBP1-99634-1000ug), 또는 재조합 인간 ApoA1(Novus Biologicals, 카탈로그 번호 NBP2-34869-500ug)에서 37°C에서 약 5 내지 15분 동안 사전인큐베이션하였다. 재조합 Apo 단백질과 함께 5~15분 인큐베이션 후, LNP를

총 RNA 카고의 4 ug/mL 용량으로 100,000개의 T 세포에 첨가했다(Cas9 mRNA와 단일 가이드의 1:2 w/w 비율). 세포를 T 세포 배지로 LNP 처리 후 48시간에 세척하여 세척하고, 새로운 완전 T 세포 배지로 교체하였다.

[1488] LNP 처리 5일 후, CD3 단백질 표면 발현을 결정하기 위해 T 세포를 유세포 분석법으로 표현형을 결정하였다. 간략하게, T 세포를 항체 표적화 CD3(Biolegend, 300441)에서 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 CytoFLEX S 기기(Beckman Coulter)에서 분석했다. T 세포는 크기 및 CD3 발현에 게이팅되었다. 표 55는 활성화된 T 세포의 LNP 처리 후 CD3 음성 세포의 퍼센트를 나타낸다. 표 56은 비활성화된 T 세포의 LNP 처리 후 CD3 음성 세포 퍼센트를 나타낸다. 활성화된 T 세포와 비활성화된 T 세포 모두에서 ApoE3 및 ApoE4 노출은 용량-의존 방식으로 효율적인 편집을 유도했다. 반대로, ApoA1 단백질의 테스트된 농도 중 어느 것도 효율적인 편집으로 이어지지 않아 CD3 표면 발현이 감소했다.

표 55

활성화된 T 세포를 명시된 수준의 Apo 단백질과 사전인큐베이션한 LNP로 처리한 후 CD3 음성 세포 퍼센트

Apo 단백질 (ug/mL)	ApoE3		ApoE4		ApoA1	
	생물학적 복제 1	생물학적 복제 2	생물학적 복제 1	생물학적 복제 2	생물학적 복제 1	생물학적 복제 2
10.00	90.2	90.8	89.8	91.7	3.6	3.6
5.00	90.2	90.7	91.0	91.2	2.5	3.2
2.50	90.2	91	91.4	91.0	4.0	2.9
1.25	89.5	89.7	90.4	89.4	2.8	3.0
0.63	86.4	88.0	85.9	87.5	3.1	2.6
0.31	82.6	82.2	72.3	75.0	2.9	2.1
0.16	70.9	69.4	37.2	39.2	2.5	2.7
0.08	51.1	49.0	17.6	18.8	2.9	2.5

[1489]

표 56

비-활성화된 T 세포를 명시된 수준의 Apo 단백질과 사전인큐베이션한 LNP로 처리한 후 CD3 음성 세포 퍼센트

Apo 단백질 (ug/mL)	ApoE3		ApoE4		ApoA1	
	생물학적 복제 1	생물학적 복제 2	생물학적 복제 1	생물학적 복제 2	생물학적 복제 1	생물학적 복제 2
10.00	78.7	76.8	82.8	79.9	5.4	3.8
5.00	69.0	66.5	76.3	78.9	6.1	4.8
2.50	60.3	61.6	73.6	77.4	6.8	3.9
1.25	58.4	63.5	74.3	78.5	4.7	4.2
0.63	58.3	58.4	72.2	72.5	6.5	6.0
0.31	60.6	61.8	63.5	67.0	4.4	3.8
0.16	58.5	56.6	52.7	54.5	5.2	3.8
0.08	54.7	56.3	49.9	43.4	4.2	6.2

[1490]

[1491] 실시예 20. 활성화된 및 비-활성화된 T 세포에서 상이한 이온화가능한 지질에 의한 편집 효율

[1492] 효율적인 핵산 전달을 평가하기 위해, 활성화 및 비활성화 T 세포를 상이한 이온화가능한 지질로 제형화된 LNP로 처리하고, Cas9 단백질 발현 또는 CD3 음성 세포의 퍼센트를 측정하였다.

[1493] T 세포를 실시예 19에서와 같이 단리하였다. 해동 시, 5% 인간 AB 혈청(Gemini, 100-512), 200 U/mL IL-2(Peprotech, 200-02), 5 ng/ml IL7(Peprotech, 200-07), 5 ng/ml IL-15(Peprotech, 200-15)이 추가로 보충된, CTS OpTmizer(Thermofisher, A10485-01), 1% pen-strep(Corning, 30-002-CI) 1X GlutaMAX(Thermofisher, 35050061), 1% pen-strep(Corning, 30-002-CI) 1X GlutaMAX(Thermofisher, 35050061), 10 mM HEPES(Thermofisher, 15630080))로 조성된 T 세포 기본 배지에서 T 세포를 배양하였다. 이 단계에서, TransAct(Miltenyi Biotech, 카탈로그 번호 130-111-160)의 1:100 희석액을 첨가하여 세포의 일부를 활성화하였다. 모든 세포를 37°C에서 24시간 동안 배양했다. 10만 개의 T 세포를 LNP 형질감염 전 15-30분 동안 인간 혈청 없이, 200 U/mL IL-2(Peprotech, 200-02), 5 ng/mL IL7(Peprotech, 200-07), 5 ng/mL IL-15(Peprotech, 200-15)로 추가로 보충한, CTS OpTmizer(Thermofisher, A10485-01), 1% pen-strep(Corning, 30-002-CI) 1X GlutaMAX(Thermofisher, 35050061), 10 mM HEPES(Thermofisher, 15630080))로 조성된 T 세포

기본 배지에 재현탁하였다.

[1494] 실시예 20.1. 활성화된 및 비-활성화된 T 세포에서의 Cas9 발현

[1495] 배양 24시간 후, 활성화 및 비활성화 T 세포를 Hibit-Cas9(서열 번호 7)를 암호화하는 mRNA를 전달하고 sgRNA는 전달하지 않는 LNP로 처리하였다. LNP는 일반적으로 50/10/38.5/1.5의 지질 조성(각각 이온화 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 몰비로 표시됨)에서 표 57에 표시된 이온화가능한 지질을 사용하여 실시예 1에서와 같이 제조되었다. T 세포에 노출되기 직전에, LNP는 5% 인간 AB 혈청(Gemini, 100-512), 200 U/mL IL-2(Peprotech, 200-02), 5ng/mL IL7(Peprotech, 200-07), 5ng/mL IL-15(Peprotech, 200-15)으로 추가 보충된, CTS OpTmizer(Thermofisher, A10485-01), 1% pen-strep(Corning, 30-002-CI) 1X GlutaMAX(Thermofisher, 35050061), 10 mM HEPES(Thermofisher, 15630080))로 조성된 T 세포 기본 배지에서 20 ug/mL ApoE3(Peprotech, 카탈로그 번호 350-02)와 함께 20 ug/ml 총 RNA 카고의 LNP 농도에서 약 5~15분 동안 37℃에서 사전인큐베이션 되었다. 사전인큐베이션 후, LNP를 100,000개의 T 세포에 첨가하였다. LNP 처리 48시간 후, 단백질 발현을 위해 T 세포를 수확하였다.

[1496] 수확된 T 세포는 Nano-Glo® HiBiT Lytic Assay(Promega)에 의해 용해하였다. Cas9 단백질 수준은 제조사의 프로토콜에 따라 Nano-Glo® HiBiT 세포의 검출 시스템(Promega, 카탈로그 N2420)을 사용하여 결정되었다. Biotek Neo2 플레이트 판독기를 사용하여 발광성을 측정했다. 선이 $X = 0$, $Y = 0$ 을 통과하도록 강제하면서 표준 대조군의 단백질 번호 및 발광 판독값을 사용하여 GraphPad에서 선형 회귀를 플로팅했다. 용해물당 단백질 수를 계산하기 위해 $Y = ax + 0$ 방정식을 사용했다. 샘플은 활성화된 세포의 평균인 1.25 ug/ml 지질 A 제제 샘플로 정규화되었다. 표 57은 mRNA가 상이한 이온화가능한 지질로 구성된 LNP로 전달될 때 활성화 및 비활성화 세포에서의 상대적인 Cas9 단백질 발현을 보여준다. Cas9는 제형화 조건 및 활성화 및 비활성 세포 모두에서 용량 의존적 방식으로 발현되었다. 단백질 발현은 시험된 두 제형 모두에 대해 활성화된 세포에서 더 높았다.

표 57

상대적 Cas9 단백질 발현

세포 상태	LNP (ug/ml)	지질 A		지질 D	
		평균	SD	평균	SD
활성화된	20.00	28.62	6.98	12.00	2.90
	10.00	20.73	0.29	5.92	0.32
	5.00	14.91	0.17	2.79	0.21
	2.50	6.33	1.05	0.93	0.08
	1.25	1.00	0.05	0.34	0.04
	0.63	0.19	0.04	0.15	0.01
	0.31	0.05	0.01	0.08	0.01
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
활성화되지 않음	20.00	0.81	0.12	0.23	0.00
	10.00	0.69	0.02	0.11	0.02
	5.00	0.68	0.07	0.09	0.01
	2.50	0.35	0.00	0.03	0.00
	1.25	0.08	0.01	0.01	0.00
	0.63	0.01	0.00	0.01	0.00
	0.31	0.00	0.00	0.01	0.00
	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00

[1498] 실시예 20.2. 비-활성화된 T 세포에서 시간에 따라 분리된 mRNA 및 가이드 RNA 전달로 편집 평가

[1499] Cas9 mRNA 및 sgRNA가 별도의 시간에 전달될 때 편집 효율을 평가하기 위해, T 세포를 Cas9 mRNA 및 TRAC 표적화 sgRNA가 별도로 제형화된 LNP로 처리하였다. 편집은 편집 후 CD3 음성 세포의 백분율 증가로 분석하였다. TRAC에 의해 암호화된 T 세포 수용체 알파 사슬은 T 세포 수용체/CD3 복합체 어셈블리 및 세포 표면으로의 전위에 필요하다. 따라서, 게놈 편집에 의한 TRAC 유전자의 파괴는 T 세포의 세포 표면에서 CD3 단백질의 손실을 초래한다.

[1500] T 세포를 분리하고 실시예 19에서와 같이 제조하였다. 배양 24시간 후, 비-활성화된 T 세포를 Cas9(서열 번호 7)를 암호화하는 mRNA만을 전달하는 LNP 또는 Cas9를 암호화하는 mRNA 및 TRAC를 표적화하는 sgRNA G013006(서열

번호 708) 두 가지 모두를 전달하도록 공동 제형화된 LNP로 처리하였다. 이어서, 조작된 T 세포를 초기 LNP 처리 후 0시간 또는 72시간에 지질 A 및 sgRNA G013006(서열 번호 708)만을 전달하는 PEG-DMG로 제형화된 제2 LNP로 처리하였다. LNP는 일반적으로 각각 이온화가능한 지질 A/콜레스테롤/DSPC/PEG의 몰비로 표현되는 50/10/38.5/1.5의 지질 조성으로 표 58에 표시된 PEG 지질을 사용하여 실시예 1에서와 같이 제조하였다. 표 58에 표시된 용량으로 T 세포에 노출되기 직전에, LNP는 5% 인간 혈청을 포함하는 T 세포 기반 배지에서 20 ug/mL ApoE3(Peprotech, 카탈로그 번호 350-02)와 함께 약 5~15분 동안 37°C에서 사전인큐베이션하였다. LNP 처리 전에 실시예 20.1에 나타난 바와 같이 T 세포를 플레이팅하였다. LNP 처리 후, 완전한 T 세포 배지를 각각의 시점에서 48시간마다 교체하고, 0시간에 처리된 세포에 대한 LNP 처리 7일 후 및 72시간에 처리된 세포에 대해 제2 LNP 처리 후 4일에 CD3 표면 발현에 대한 유세포 분석을 위해 수집하였다.

[1501]

표 58 및 도 52a 및 52b는 기술된 바와 같이 비-활성화된 T 세포 처리 후 CD3 음성 세포의 백분율을 보여준다. 공동-제형화된 LNP로 처리된 세포는 mRNA-단독 LNP로 먼저 처리된 세포보다 더 높은 백분율의 CD3 음성 세포를 나타내었다. 더 높은 CD3 음성 백분율은 PEG-2kDMG 또는 PEG 지질 H 지질 제형 모두와 함께 공동 제형화된 카고에 대해 나타났다. sgRNA-단독 카고가 mRNA-단독 카고 후 0시간 또는 72시간 후에 전달되었을 때 용량 의존적 편집이 관찰되었다. 초기 LNP 처리 후 24시간 또는 48시간 후에 제2 gRNA-단독 LNP를 첨가한 경우 제1 지질 제형 모두에서 유사한 용량-의존적 편집 반응이 관찰되었다.

표 58

0 시간에 공동-제형화된 또는 mRNA-단독 제1 LNP 및 0 시간 또는 72 시간에 gRNA-단독 제2 LNP 로의 비활성화된 T 세포 처리 후 CD3 음성 세포 퍼센트

제1 LNP:	카고	공동제형화된 mRNA + gRNA				mRNA 단독			
	PEG	지질 H		2k-DMG		지질 H		2k-DMG	
제2 LNP	LNP (ug/mL)	Bio rep 1	Bio rep 2	Bio rep 1	Bio rep 2	Bio rep 1	Bio rep 2	Bio rep 1	Bio rep 2
0 시간	20.00	60.0	54.8	67.6	68.4	58.2	61.3	58.4	59.3
	10.00	67.2	58.4	61.6	62.8	59.2	54.1	57.5	55.0
	5.00	62.2	56.8	64.9	59.9	54.3	48.1	45.3	52.6
	2.50	58.8	50.4	45.9	53.0	36.8	42.7	36.8	37.8
	1.25	42.5	32.7	32.1	33.6	13.3	14.3	12.5	18.6
	0.63	16.8	11.4	9.1	11.7	3.2	4.1	3.3	5.4
	0.31	3.5	3.1	3.2	3.4	2.9	3.5	3.2	2.1
	0.00	1.2	1.9	1.8	1.5	1.6	1.4	2.2	1.6
72 시간	20.00	64.9	63.9	76.8	70.1	50.3	51.9	42.9	52.9
	10.00	70.7	69.4	71.6	76.7	57.4	47.6	51.5	46.3
	5.00	67.4	63.3	71.4	73.1	43.3	43.9	39.9	33.0
	2.50	75.4	70.4	65.5	62.6	20.3	27.8	18.7	22.6
	1.25	67.5	50.3	39.5	38.6	10.6	11.7	12.2	8.7
	0.63	32.5	26.6	14.2	16.9	6.6	7.4	5.0	9.7
	0.31	11.4	8.3	6.5	5.9	4.8	4.8	3.2	7.3
	0.00	7.4	7.1	5.6	7.5	8.9	4.7	4.0	5.7

[1502]

실시예 21. T 세포에서 지질 A 조성물 스크리닝

[1503]

편집 효능을 평가하기 위해, Cas9 mRNA를 캡슐화하는 지질 성분 및 TRAC 유전자를 표적화하는 sgRNA의 다양한 몰비를 갖는 LNP 조성물로 T 세포를 처리하였다. 편집은 편집 후 CD3 음성 세포의 백분율을 증가로 분석되었다. TRAC에 의해 암호화된 T 세포 수용체 알파 사슬은 T 세포 수용체/CD3 복합체 어셈블리 및 세포 표면으로의 전좌에 필요하다. 따라서, 게놈 편집에 의한 TRAC 유전자의 파괴는 T 세포의 세포 표면에서 CD3 단백질의 손실을 초래한다.

[1504]

건강한 인간 공여자 성분채집술을 상업적으로 입수하였다(Hemacare). 제조사 지침에 따라 MultiMACS Cell124 Separator Plus 기기에서 T 세포는 EasySep 인간 T 세포 분리 키트(Stem Cell Technology, 카탈로그 17951)를 사용한 음성 선택에 의해, 또는 StraightFrom® Leukopak® CD4/CD8 마이크로비드(Miltenyi, 카탈로그, 130-122-352)를 사용한 CD4/CD8 양성 선택에 의해 분리하였다. T 세포는 향후 사용을 위해 Cryostor CS10 동결 배지(카탈로그, 07930)에 동결보존하였다.

[1505]

해동 시, 활성화된 T 세포를 200 U/ml IL-2, 5 ng/ml IL7 및 5 ng/ml IL-15 및 2.5% 인간 혈청(Gemini, 100-512)으로 추가 보충된, CTS OpTmizer 기본 배지(1X GlutaMAX, 10mM HEPES 완충액(10 mM), 및 1% 페니실린/스트렙토마이신으로 보충된 CTS OpTmizer 배지(Gibco, A3705001))로 구성된 완전 T 세포 성장 배지에 플레이팅하였

[1506]

다. 하룻밤 휴지 후, 1×10^6 /mL 밀도의 T 세포를 T 세포 TransAct Reagent(1:100 희석, Miltenyi)로 활성화하고 48시간 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 0.5×10^6 세포/mL 밀도의 활성화된 세포를 편집 용도로 사용했다.

[1507] 다음을 제외하고 비활성화된 T 세포에 대해 동일한 프로세스를 사용했다. 해당 시, 비활성화된 T 세포를 활성화 없이 24시간 동안 5% 인간 혈청과 함께 CTS 완전 성장에서 배양하였다. 그런 다음, 편집 적용을 위해 T 세포를 100 μ L의 완전한 T 세포 성장 배지에서 1×10^6 /mL의 세포 밀도로 플레이팅했다.

[1508] 이온화가능한 지질 A/콜레스테롤/DSPC/PEG의 물비로 표현된, 표 59에 나타낸 바와 같은 지질 조성을 갖는 실시예 1에 기술된 바와 같이 제형화된 LNP로 T 세포를 형질감염시켰다. LNP는 표 59에 표시된 용량으로 TRAC를 표적화하는 Cas9(서열 번호 6) 및 sgRNA(G013006)(서열 번호 708)를 암호화하는 mRNA를 전달했다. sgRNA 대 Cas9 mRNA의 카고 비율은 중량 기준으로 1:2였다. 달리 지시하지 않는 한 N:P 비율은 약 6이었다.

[1509] LNP 투여량 반응 곡선(DRC) 형질감염은 Hamilton Microlab STAR 액체 취급 시스템에서 수행하였다. 액체 처리기에는 다음이 제공되었다: (a) 96-딥 웰 플레이트의 상단 행에 있는 4X 원하는 최고 LNP 투여량, (b) 20 μ g/mL의 배지에 희석된 ApoE3, (c) 1X GlutaMAX, 10mM HEPES 완충액(10 mM), 및 1% 페니실린/스트렙토마이신)이 보충되고 200 IU/ml IL-2, 5 ng/ml IL7 및 5 ng/ml IL-15 및 2.5% 인간 혈청(Gemini, 100-512)이 추가 보충된, CTS OpTmizer 기본 배지(CTS OpTmizer 배지(Gibco, A3705001)로 조성된 완전 T 세포 성장 배지 및 (d) 96-웰 평평한 바닥 조직 배양 플레이트에서 100 μ L에서 1×10^6 /mL 밀도로 플레이팅된 T 세포. 액체 처리기는 먼저 딥 웰 플레이트에서 4X LNP 투여량부터 시작하여 LNP의 8포인트 2배 연속 희석을 수행했다. 그 후, 동일한 부피의 ApoE3 배지를 각 웰에 첨가하여 LNP와 ApoE3 모두를 1:1로 희석했다. 이어서, 100 μ L의 LNP-ApoE3 믹스를 각 T 세포 플레이트에 첨가했다. 최고 용량에서 LNP의 최종 농도는 5 μ g/mL로 설정되었습니다. 5 μ g/mL의 ApoE3 및 T 세포의 최종 농도는 0.5×10^6 세포/mL의 최종 밀도였다. 플레이트를 37°C, 5% CO₂에서 7일 동안 인큐베이션한 후 유세포 분석을 위해 수확했다.

[1510] 유세포 분석법에 의해 세포 표면 단백질을 검정하기 위해, T 세포를 CD3(Biolegend, 카탈로그 300441), CD4(Biolegend, 카탈로그 300538) 및 CD8a(Biolegend, 카탈로그 301049)를 표적화하는 항체와 함께 인큐베이션하였다. 이어서 T 세포를 Cytoflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하였다. FlowJo 소프트웨어 패키지(v.10.6.1 또는 v.10.7.1)를 사용하여 데이터 분석을 수행하였다. 간략하게, T 세포는 림프구에 게이트된 다음 단일 세포에 게이트되었다. 이들 단일 세포는 CD8+/CD3- 세포가 선택된 CD4+/CD8+ 상태에 대해 게이트되었다.

[1511] 표 59 및 도 53a는 지시된 LNP 조성물로 활성화된 T 세포 처리 후의 CD3 음성 세포를 나타낸다. 표 60 및 도 53b는 지시된 LNP 조성물로의 비활성화된 T 세포 처리 후 CD3 음성 세포를 나타낸다.

표 59

지시된 LNP 제형으로의 활성화된 T 세포 처리 후 CD3 음성 세포의 평균 퍼센트.

LNP 조성	LNP (ug/mL)	평균	SD	N	EC50
50/10/38.5/1.5	5.00	95.3	0.5	2	1.55
	2.50	81.7	0.8	2	
	1.25	31.8	3.1	2	
	0.63	5.8	0.6	2	
	0.31	1.4	0.0	2	
	0.16	0.6	0.0	2	
	0.08	0.4	0.0	2	
	0.04	0.3	0.1	2	
50/5/43.5/1.5	5.00	88.8	0.2	2	1.41
	2.50	77.8	0.7	2	
	1.25	37.4	1.6	2	
	0.63	8.2	0.8	2	
	0.31	2.9	0.7	2	
	0.16	0.6	0.0	2	
	0.08	0.3	0.0	2	
	0.04	0.3	0.0	2	
45/15/38.5/1.5	5.00	97.1	0.2	2	1.41
	2.50	87.6	0.8	2	
	1.25	38.6	0.6	2	
	0.63	6.6	0.7	2	
	0.31	1.3	0.2	2	
	0.16	0.4	0.1	2	
	0.08	0.3	0.1	2	
	0.04	0.2	0.1	2	
45/5/48.5/1.5	5.00	90.2	1.1	2	1.42
	2.50	76.7	0.0	2	
	1.25	38.5	0.9	2	
	0.63	8.5	0.5	2	
	0.31	1.5	0.3	2	
	0.16	0.5	0.0	2	
	0.08	0.5	0.1	2	
	0.04	0.5	0.2	2	
40/10/48.5/1.5	5.00	94.0	1.7	2	0.93
	2.50	89.7	1.2	2	
	1.25	66.5	0.8	2	
	0.63	24.5	0.2	2	

[1512]

LNP 조성	LNP (ug/mL)	평균	SD	N	EC50
	0.31	6.8	0.2	2	
	0.16	2.2	0.2	2	
	0.08	0.8	0.1	2	
	0.04	0.6	0.0	2	
30/10/58.5/1.5	5.00	4.7	0.2	2	6.43
	2.50	3.1	0.8	2	
	1.25	1.6	0.3	2	
	0.63	1.1	0.0	2	
	0.31	0.7	0.1	2	
	0.16	0.6	0.0	2	
	0.08	0.3	0.0	2	
	0.04	0.3	0.0	2	
30/5/63.5/1.5	5.00	52.0	1.6	2	3.19
	2.50	34.3	2.7	2	
	1.25	26.0	0.4	2	
	0.63	15.6	0.2	2	
	0.31	7.3	0.4	2	
	0.16	2.9	0.2	2	
	0.08	1.3	0.1	2	
	0.04	0.4	0.1	2	
55/5/38.5/1.5	5.00	67.0	2.0	2	2.68
	2.50	36.7	0.5	2	
	1.25	9.8	1.1	2	
	0.63	2.6	0.1	2	
	0.31	0.6	0.2	2	
	0.16	0.4	0.1	2	
	0.08	0.1	0.1	2	
	0.04	0.3	0.1	2	
55/10/33.5/1.5	5.00	89.2	0.6	2	2.30
	2.50	54.6	1.1	2	
	1.25	7.3	0.2	2	
	0.63	1.4	0.1	2	
	0.31	0.5	0.2	2	
	0.16	0.3	0.1	2	
	0.08	0.2	0.1	2	
	0.04	0.2	0.1	2	
65/5/28.5/1.5	5.00	0.2	0.1	2	0.50

[1513]

LNP 조성	LNP (ug/mL)	평균	SD	N	EC50
	2.50	0.2	0.0	2	
	1.25	0.3	0.0	2	
	0.63	0.4	0.1	2	
	0.31	0.2	0.0	2	
	0.16	0.1	0.1	2	
	0.08	0.3	0.0	2	
	0.04	0.3	0.1	2	
50/10/38.5/1.5 (N/P: 5.0)	5.00	95.6	0.1	2	1.17
	2.50	90.0	1.0	2	
	1.25	53.4	1.3	2	
	0.63	16.4	1.7	2	
	0.31	4.5	0.2	2	
	0.16	1.8	0.1	2	
	0.08	0.5	0.0	2	
	0.04	0.6	0.1	2	
50/10/38.5/1.5 (N/P: 7.0)	5.00	97.7	0.1	2	0.90
	2.50	93.5	0.2	2	
	1.25	73.0	0.9	2	
	0.63	24.0	0.2	2	
	0.31	5.5	0.1	2	
	0.16	1.5	0.5	2	
	0.08	0.9	0.3	2	
	0.04	0.6	0.1	2	

[1514]

표 60

지시된 LNP 제형으로의 비-활성화된 T 세포 처리 후 CD3 음성 세포의
평균 퍼센트

LNP 조성	LNP 투여량 (ug/mL)	평균 % CD3-	SD	N	EC50
50/10/38.5/1.5	5.00	69.7	0.9	2	1.21
	2.50	65.1	1.3	2	
	1.25	41.3	8.9	2	
	0.63	11.1	4.0	2	
	0.31	10.2	0.5	2	
	0.16	8.1	1.5	2	
	0.08	9.9	2.0	2	
	0.04	7.2	2.5	2	
50/5/43.5/1.5	5.00	47.6	3.6	2	4.71
	2.50	30.0	5.0	2	
	1.25	20.1	2.9	2	
	0.63	11.4	2.3	2	
	0.31	9.8	1.3	2	
	0.16	9.1	0.0	2	
	0.08	9.3	0.8	2	
	0.04	7.9	3.6	2	
45/15/38.5/1.5	5.00	83.1	1.5	2	1.36
	2.50	73.0	3.1	2	
	1.25	43.4	6.8	2	
	0.63	19.4	3.4	2	
	0.31	11.7	2.4	2	
	0.16	8.9	1.3	2	
	0.08	9.0	1.6	2	
	0.04	9.5	2.9	2	
45/5/48.5/1.5	5.00	49.0	1.7	2	2.99
	2.50	33.7	6.3	2	
	1.25	25.8	2.3	2	
	0.63	14.7	1.0	2	
	0.31	9.8	0.7	2	
	0.16	11.2	3.9	2	
	0.08	10.2	1.9	2	
	0.04	9.5	2.5	2	
40/10/48.5/1.5	5.00	60.5	3.2	2	0.66
	2.50	61.6	4.4	2	

[1515]

LNP 조성	LNP 투여량 (ug/mL)	평균 % CD3 ⁺	SD	N	EC50
	1.25	57.9	6.7	2	
	0.63	34.0	7.9	2	
	0.31	12.1	0.8	2	
	0.16	10.4	1.2	2	
	0.08	13.7	0.4	2	
	0.04	10.4	4.7	2	
30/10/58.5/1.5	5.00	11.0	0.1	2	해당 미요단
	2.50	11.3	2.9	2	
	1.25	8.0	0.5	2	
	0.63	11.3	0.5	2	
	0.31	10.3	0.7	2	
	0.16	9.3	1.3	2	
	0.08	10.8	0.8	2	
	0.04	10.7	5.1	2	
30/5/63.5/1.5	5.00	26.7	1.0	2	0.37
	2.50	18.9	0.1	2	
	1.25	19.6	1.5	2	
	0.63	23.0	1.2	2	
	0.31	15.4	0.5	2	
	0.16	11.8	3.5	2	
	0.08	12.5	0.3	2	
	0.04	9.9	3.4	2	
55/5/38.5/1.5	5.00	24.6	1.0	2	2.50
	2.50	18.0	2.4	2	
	1.25	10.1	2.2	2	
	0.63	12.4	3.2	2	
	0.31	9.5	3.2	2	
	0.16	10.4	1.3	2	
	0.08	11.4	1.5	2	
	0.04	12.4	2.7	2	
55/10/33.5/1.5	5.00	61.0	3.7	2	1.57
	2.50	53.6	6.5	2	
	1.25	26.5	7.3	2	
	0.63	12.4	2.4	2	
	0.31	13.1	5.7	2	
	0.16	9.9	2.9	2	
	0.08	0.4	1.5	2	

[1516]

LNP 조성	LNP 투여량 (ug/mL)	평균 % CD3 ⁺	SD	N	EC50
	0.04	10.1	3.0	2	
65/5/28.5/1.5	5.00	14.7	0.8	2	6.05
	2.50	8.6	1.6	2	
	1.25	10.9	2.9	2	
	0.63	10.7	1.1	2	
	0.31	12.0	3.8	2	
	0.16	10.4	4.8	2	
	0.08	10.6	0.6	2	
	0.04	8.9	2.2	2	
50/10/38.5/1.5 (N/P: 5.0)	5.00	74.4	2.3	2	1.30
	2.50	69.6	7.9	2	
	1.25	40.5	7.2	2	
	0.63	19.5	0.3	2	
	0.31	8.9	3.2	2	
	0.16	9.3	1.1	2	
	0.08	9.9	0.2	2	
	0.04	14.3	14.3	2	
50/10/38.5/1.5 (N/P: 7.0)	5.00	76.0	0.5	2	0.77
	2.50	68.4	2.1	2	
	1.25	65.4	3.8	2	
	0.63	27.9	4.9	2	
	0.31	12.1	1.9	2	
	0.16	9.3	0.5	2	
	0.08	10.5	2.2	2	
	0.04	0.0	0.0	2	

[1517]

[1518] 실시예 22. 선별된 LNP 조성물의 카고 비율 평가

[1519] 편집 효능을 평가하기 위해, T 세포를 다양한 비율의 Cas9 mRNA 및 TRAC 유전자를 표적화하는 sgRNA를 갖는 LNP 조성물로 처리하였다. 편집은 편집 후 CD3 음성 세포의 백분을 증가로 분석하였다. TRAC에 의해 암호화된 T 세포 수용체 알파 사슬은 T 세포 수용체/CD3 복합체 어셈블리 및 세포 표면으로의 전좌에 필요하다. 따라서, 게놈 편집에 의한 TRAC 유전자의 파괴는 T 세포의 세포 표면에서 CD3 단백질의 손실을 초래한다.

[1520] 실시예 22.1. 활성화된 T 세포에서의 카고 비율 평가

[1521] LNP 조성물은 CD3+ T 세포에서 LNP의 편집 효율에 대한 다양한 카고 비율의 효과를 평가하기 위해 시험관 내에서 테스트되었다. LNP는 Cas9(서열 번호 7)를 암호화하는 mRNA 및 인간 TRAC(G013006)(서열 번호 708)를 표적화하는 sgRNA를 전달했다. LNP는 각각 이온화가능한 지질 A/콜레스테롤/DSPC/PEG의 물비로 표현되는 50/10/38/1.5 또는 35/15/47.5/2.5의 지질 조성에서 실시예 1에 기술된 바와 같이 제형화하였다. sgRNA 대 Cas9 mRNA의 카고 비율은 중량 기준으로 1:2, 1:1, 2:1 또는 4:1이었다.

[1522] 실시예 21에 기재된 바와 같이 T 세포를 배양, 제조 및 활성화하였다. 활성화 48시간 후, 활성화된 T 세포를 실시예 21에 기재된 바와 같이 사전 인큐베이션된 LNP로 형질감염시켰다. 형질감염 7일 후, T 세포를 실시예 21에 기술된 바와 같이 유세포 분석법 분석에 의해 표현형을 결정하였다. 결과는 표 61 및 도 54에 제시되어 있다. 두 지질 제형의 LNP로 처리된 활성화된 T 세포에서 용량 의존적 편집이 관찰되었다.

표 61

다양한 카고 비율을 갖는 LNP 로의 활성화된 T 세포
처리 후 CD3 음성 세포 퍼센트

지질 조성	카고 비율	LNP (ug/mL)				
			평균	SD	N	EC50
50/10/38.5/1.5	1:2	5	95.4	0.6	2	0.98
		2.5	93.0	0.9	2	
		1.25	68.4	2.9	2	
		0.63	17.1	2.2	2	
		0.31	4.7	0.7	2	
		0.16	1.3	0.1	2	
		0.08	0.9	0.0	2	
		0.04	0.3	0.0	2	
	1:1	5	95.7	0.3	2	0.89
		2.5	92.8	1.0	2	
		1.25	74.4	1.0	2	
		0.63	22.1	2.6	2	
		0.31	5.4	0.3	2	
		0.16	1.8	0.4	2	
		0.08	0.8	0.1	2	
		0.04	0.4	0.1	2	
	2:1	5	95.4	0.6	2	0.89
		2.5	92.5	1.0	2	
		1.25	75.2	2.4	2	
		0.63	21.5	2.7	2	
		0.31	5.0	0.1	2	
		0.16	1.8	0.5	2	
		0.08	0.8	0.2	2	
		0.04	0.6	0.1	2	
	4:1	5	94.3	0.4	2	1.18
		2.5	89.2	0.2	2	
		1.25	52.4	0.2	2	
		0.63	11.3	1.2	2	
		0.31	2.4	0.2	2	
		0.16	0.7	0.1	2	
		0.08	0.7	0.2	2	
		0.04	0.4	0.1	2	
35/15/47.5/2.5	1:2	5	97.3	0.5	2	0.29
		2.5	96.3	0.3	2	
		1.25	93.8	0.6	2	

[1523]

지질 조성	카고 비율	LNP (ug/mL)				
			평균	SD	N	EC50
		0.63	84.7	0.8	2	
		0.31	53.8	2.3	2	
		0.16	22.2	0.4	2	
		0.08	8.6	0.2	2	
		0.04	2.6	0.0	2	
	1:1	5	97.2	0.8	2	0.19
		2.5	97.1	1.0	2	
		1.25	96.9	0.2	2	
		0.63	93.7	0.4	2	
		0.31	76.8	2.9	2	
		0.16	42.1	0.7	2	
		0.08	15.9	0.7	2	
		0.04	5.8	0.1	2	
	2:1	5	97.2	0.7	2	0.24
		2.5	97.1	0.4	2	
		1.25	96.0	0.4	2	
		0.63	92.4	0.8	2	
		0.31	67.1	1.2	2	
		0.16	25.4	1.3	2	
		0.08	7.3	0.3	2	
		0.04	2.4	0.1	2	
	4:1	5	97.6	0.3	2	0.21
		2.5	97.3	0.5	2	
		1.25	96.2	0.6	2	
		0.63	94.9	0.3	2	
		0.31	73.8	1.6	2	
		0.16	33.1	0.9	2	
		0.08	9.5	0.1	2	
		0.04	3.3	0.5	2	

[1524]

[1525]

실시예 22.2. 비-활성화된 T 세포에서의 카고 비율 평가

[1526]

LNP의 편집 효율에 대한 다양한 카고 비율의 효과를 비활성화된 CD3+ T 세포에서 테스트했다. **실시예 22.1**에 기재된 선택된 LNP 조성물을 본 연구에 사용하였다. **실시예 21**에 기재된 바와 같이 T 세포를 2명의 공여자로부터 얻었고 각 공여자로부터의 샘플을 제조하였다. 비-활성화된 T 세포를 **실시예 21**에 기재된 바와 같이 사전-인큐베이션된 LNP로 형질감염시키기 전에 24시간 동안 배양하였다. 형질감염 후 7일 후, T 세포는 **실시예 21**에 기재된 바와 같이 유세포 분석법 분석에 의해 표현형을 결정하였다.

[1527]

편집된 T 세포는 LNP 조성물의 편집 효율에 대한 각각의 카고 비율의 영향을 평가하기 위해 **실시예 21**에 기재된 바와 같이 유세포 분석법에 의해 표현형을 결정하였다. 결과는 **표 62** 및 **도 55a~b**에 제시되어 있다. 두 지질 제형의 LNP로 처리된 비활성화된 T 세포에서 용량 의존적 편집이 관찰되었다.

표 62

다양한 카고 비율을 갖는 LNP 로의 비-활성화된 T 세포 처리 후 CD3 음성 세포 퍼센트

지질 조성	카고 비율	LNP (ug/mL)	공여자 1				공여자 2			
			평균	SD	N	EC50	평균	SD	N	EC50
50/10/38.5/1.5	1:2	5	61.3	0.1	2	1.99	86.6	0.0	2	1.63
		2.5	44.1	0.1	2		70.2	0.0	2	
		1.25	13.3	0.0	2		36.7	0.0	2	
		0.63	4.9	0.0	2		11.5	0.0	2	
		0.31	2.1	0.0	2		12.3	0.1	2	
		0.16	1.5	0.0	2		13.5	0.0	2	
		0.08	1.5	0.0	2		11.4	0.0	2	
		0.04	1.6	0.0	2		7.8	0.0	2	
	1:1	5	65.5	0.0	2	1.86	84.1	0.0	2	1.70
		2.5	50.7	0.1	2		70.6	0.0	2	
		1.25	14.9	0.0	2		29.2	0.0	2	
		0.63	5.2	0.0	2		14.9	0.1	2	
		0.31	1.9	0.0	2		12.5	0.0	2	
		0.16	2.1	0.0	2		8.4	0.0	2	
		0.08	2.3	0.0	2		8.2	0.0	2	
		0.04	1.9	0.0	2		8.2	0.0	2	
	2:1	5	59.3	0.0	2	1.94	79.8	0.0	2	1.82
		2.5	43.5	0.1	2		63.1	0.1	2	
		1.25	13.9	0.0	2		25.6	0.0	2	
		0.63	2.4	0.0	2		9.8	0.0	2	
		0.31	2.4	0.0	2		7.7	0.0	2	
		0.16	2.5	0.0	2		9.9	0.0	2	
		0.08	2.1	0.0	2		10.2	0.0	2	
		0.04	3.1	0.0	2		9.7	0.0	2	
	4:1	5	42.6	0.1	2	2.96	64.1	0.0	2	2.62
		2.5	18.1	0.0	2		38.6	0.0	2	
		1.25	4.0	0.0	2		16.0	0.1	2	
		0.63	2.0	0.0	2		9.6	0.0	2	
		0.31	1.7	0.0	2		9.1	0.0	2	
		0.16	2.7	0.0	2		7.9	0.0	2	
		0.08	2.7	0.0	2		10.6	0.0	2	
		0.04	1.9	0.0	2		11.0	0.0	2	
35/15/47.5/2.5	1:2	5	71.4	0.0	2	0.65	91.3	0.0	2	0.51
		2.5	69.6	0.0	2		86.4	0.0	2	
		1.25	61.8	0.0	2		80.5	0.0	2	

[1528]

지질 조성	카고 비율	LNP (ug/mL)	공여자 1				공여자 2			
			평균	SD	N	EC50	평균	SD	N	EC50
		0.63	34.7	0.0	2		60.6	0.0	2	
		0.31	10.8	0.0	2		25.5	0.0	2	
		0.16	3.5	0.0	2		11.6	0.0	2	
		0.08	2.0	0.0	2		12.6	0.0	2	
		0.04	2.3	0.0	2		7.4	0.0	2	
	1:1	5	76.5	0.1	2	0.57	94.1	0.0	2	0.39
		2.5	80.0	0.0	2		91.4	0.0	2	
		1.25	70.9	0.0	2		90.7	0.0	2	
		0.63	45.8	0.0	2		72.4	0.0	2	
		0.31	15.9	0.0	2		40.0	0.0	2	
		0.16	5.3	0.0	2		17.9	0.0	2	
		0.08	3.9	0.0	2		9.7	0.0	2	
		0.04	2.8	0.0	2		8.8	0.0	2	
	2:1	5	69.2	0.1	2	0.66	92.6	0.0	2	0.61
		2.5	66.5	0.0	2		84.3	0.0	2	
		1.25	53.8	0.1	2		82.2	0.0	2	
		0.63	36.5	0.1	2		51.7	0.0	2	
		0.31	7.2	0.0	2		22.3	0.1	2	
		0.16	3.0	0.0	2		17.7	0.1	2	
		0.08	2.5	0.0	2		9.8	0.0	2	
		0.04	1.9	0.0	2		11.5	0.0	2	
	4:1	5	66.1	0.0	2	0.53	89.4	0.0	2	0.50
		2.5	65.0	0.1	2		87.1	0.0	2	
		1.25	58.8	0.0	2		79.9	0.0	2	
		0.63	44.4	0.1	2		64.5	0.0	2	
		0.31	7.8	0.0	2		22.8	0.1	2	
		0.16	2.9	0.0	2		9.7	0.0	2	
		0.08	2.4	0.0	2		14.5	0.1	2	
		0.04	2.9	0.0	2		10.5	0.0	2	

실시예 23. 지질 나노입자를 이용한 B 세포 편집

실시예 23.1. B 세포 활성화

최적의 B 세포 배양 및 유전자 편집을 위한 효율적인 지질 형질감염과 양립할 수 있는 활성화 조건을 결정하기 위해, 다양한 조건 하에서 배양된 B 세포에서 CD86 및 저밀도 지질단백질 수용체(LDLR)의 표면 발현을 비교하였다. CD86은 활성화 시 B 세포에서 상향조절되는 보조자극 수용체인 반면, LDLR은 ApoE-매개 LNP 섭취에 관여하는 것으로 나타났다.

건강한 인간 공여자 PBMC를 상업적으로 입수하였고(Hemacare) B 세포를 QuadroMACS 분리기(Miltenyi Biotec, 카탈로그, 130-091-051) 상에서 LS 컬럼(Miltenyi Biotec, 130-042-401)을 사용하는 제조사의 프로토콜에 따라 CD19 마이크로비드(Miltenyi Biotec, 카탈로그, 130-050-301)를 사용하여 CD19 양성 선택에 의해 단리하였다.

실시예 23.1.1. B 세포 배양 배지 제조

하기 사용된 B 세포 배양 배지 조성물은 표 63 및 64에 기재되어 있다. "IMDM 기본 배지"는 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 IMDM 배지로 구성된다. "StemSpan SFEM 기본 배지"는 1% 페니실린/스트렙토마이신이 보충된 StemSpan SFEM 배지로 구성된다. 위에서 언급한 성분 외에도 배지에는 혈청, 사이토카인 및 활성화 인자가 포함될 수 있다. 배지 성분은 표 63에 기재되어 있고, B 세포 배양 배지 조성은 표 64에 기재되어 있다.

표 63

배지 성분

배지 성분		농도	제조사	카탈로그 번호
기본	IMDM		Corning	10-016-CV
	페니실린/스트렙토마이신	1%	Corning	30-002-CI
기본	StemSpan SFEM		StemCell Technologies	9650
	페니실린/스트렙토마이신	1%	Corning	30-002-CI
혈청	소 태아 혈청 (FBS)	10%	Gibco	A3840201
	인간 AB 혈청 (HABS)	5%	Gemini Bio-Products	100-512
사이토카인	hIL-2	50 ng/ml	Peptotech	200-02
	hIL-4	200 U/ml	StemCell	78147.1
	hIL-10	50 ng/ml	Peptotech	200-10
	hIL-15	10 ng/ml	Peptotech	200-15
	hIL-21	20 ng/mL	Peptotech	200-21
활성화 인자	BAFF	10ng/ml	R&D	2149-BF-010
	rh 인슐린	5μg/ml	Sigma	91077C
	rh 트랜스페린	50 μg/mL 트랜스페린	Sigma	T8158
	MEGACD40L	1 또는 10 또는 100 ng/ml	Enzo Life Sciences	ALX-522-110-C010
	CpG ODN 2006	1 μg/mL	Invivogen	TLR-2006

[1536]

표 64

B 세포 배지 조성

B 세포 배지	기본 배지 (+ pen/strep)	사이토카인	보충 & 활성화 인자	혈청
1	StemSpan	없음	없음	10% FBS
2	StemSpan	IL-4	BAFF	10% FBS
3	StemSpan	IL-2, IL-10, IL-15	CpG ODN	10% FBS
4	StemSpan	IL-2, IL-10, IL-15, IL-21	인슐린, 트랜스페린	10% FBS
5	IMDM	없음	없음	10% FBS
6	IMDM	IL-4	BAFF	10% FBS
7	IMDM	IL-2, IL-10, IL-15	CpG ODN	10% FBS
8	IMDM	IL-2, IL-10, IL-15, IL-21	인슐린, 트랜스페린	10% FBS
9	StemSpan	IL-2, IL-10, IL-15	CpG ODN	5% HABS

[1537]

[1538] MACS 단리 후, 1, 10 또는 100 ng/ml MEGACD40L로 보충된 표 64에 기재된 바와 같은 B 세포 배지 1, 2, 3, 5, 6 또는 7에서 100,000 세포/웰로 이종으로 배양함으로써 B 세포를 활성화시켰다.

[1539] 활성화 후 5일째에, B 세포는 CD86 및 LDLR의 표면 발현을 결정하기 위해 유세포 분석법에 의해 표현형이 결정되었다. 간략하게, B 세포를 CD20(Biolegend, 302322), CD86(Biolegend, 374216) 및 LDLR(BD, 565653)을 표적화하는 항체와 함께 인큐베이션하였다.

[1540] 이어서 세포를 생존 염료(DAPI, Biolegend, 422801)로 염색하고 세척하고 Cytotflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. B 세포는 CD20 발현, CD20+ 세포에서의 CD86 및 LDLR 발현에 이어 크기 및 생존 상태에 따라 게이팅하였다. 표 65 및 도 56a-d는 B 세포 중 CD86+ 세포의 백분율 및 LDLR+ 세포의 백분율을 보여준다.

[1541] 기본 배지에서 100 ng/ml의 MEGACD40L은 추가 활성화제 또는 사이토카인 없이 CD86 또는 LDLR의 상향 조절을 유도했다. CD86+ 및 LDLR+ 세포는 MEGACD40L 의존적 방식으로 IL-4 및 BAFF를 첨가함에 따라 증가하였다. CpG ODN, IL-2, IL-10 및 IL-15를 보충하면 CD40L 수준에 관계없이 CD86+ 및 LDLR+ 세포의 비율이 높아진다. 이러한 추세는 IMDM 및 StemSpan 배지에서 일관되었다.

표 65

B 세포에서의 CD86 및 LDLR 발현

B 세포 배지	CD40L (ng/ml)	%CD86+		%LDLR+	
		평균	SD	평균	SD
#1 (StemSpan)	1	13.05	4.17	8.46	2.07
	10	18.50	0.57	13.90	0.99
	100	59.15	6.58	55.10	5.09
#2 (StemSpan + IL-4 + BAFF)	1	64.65	4.60	33.90	3.11
	10	74.50	3.11	37.95	1.06
	100	84.15	7.57	57.00	5.09
#3 (StemSpan+ IL-2/10/15+CpG ODN)	1	73.20	1.27	89.50	3.96
	10	77.10	4.81	83.85	12.94
	100	82.70	2.83	78.95	3.46
#5 (IMDM)	1	8.71	1.16	5.60	0.52
	10	10.87	2.45	8.23	2.14
	100	33.55	1.63	30.95	4.45
#6 (IMDM + IL-4 + BAFF)	1	52.65	1.06	33.15	0.64
	10	60.35	4.74	38.80	2.69
	100	88.15	0.78	62.55	2.33
#7 (IMDM + IL-2/10/15+CpG ODN)	1	81.85	1.06	76.35	1.63
	10	80.40	0.57	74.65	0.21
	100	77.45	1.20	71.70	2.26

[1542]

[1543]

실시예 23.2. B 세포 확장

[1544]

1차 활성화 후, B 세포는 다량의 단백질을 분비하는 능력을 얻기 위해 형질모세포로 분화된 다음 형질 세포로 분화되어야 한다. B 세포가 형질 세포로 분화되면 확장이 중단된다. 따라서, 조작 과정에서 1차 B 세포 활성화 및 형질모세포 분화(2차 활성화) 단계에서 B 세포 확장을 최대화하는 것이 중요하다. 개선된 B 세포 확장 및 형질 세포로의 분화를 위한 배지 조건을 결정하기 위해, 본 발명자들은 다양한 배지에서 B 세포를 배양하고 초기 배양 후 7일 및 14일에 배수 확장을 측정했다.

[1545]

간략하게, 실시예 23.1에 기술된 바와 같이 PBMC로부터 B 세포를 분리하였다. MACS 분리 후, CD19+ B 세포를 1, 10 또는 100 ng/ml MEGACD40L로 보충된 표 64에 기술된 바와 같은 B 세포 배지 3 또는 B 세포 배지 7에서 1,000,000개 세포/웰로 이중으로 배양하였다. B 세포를 형질모세포로 분화를 유도하고 확장을 측정하기 위해, B 세포를 1, 10 또는 100 ng/ml MEGACD40L이 보충된 B 세포 배지 4 또는 B 세포 배지 8에서 100,000 세포/웰로 배양하였다. 활성화 후 7일 및 14일에 Vi-CELL 세포 계수기(Beckman Coulter)를 사용하여 세포를 계수하고, 세포 수율을 활성화 시 시작 세포 계수로 나누어 배수 확장을 계산했다.

[1546]

확장 결과는 표 66 및 67과 도 57a-b에 제시되어 있다. 1차 확장의 경우, 배수 확장은 표 66 및 도 57a에서 볼 수 있는 바와 같이 100 ng/ml MEGACD40L에서 StemSpan에서 배양된 B 세포에 대해 가장 높았다. 배지에 관계없이 MEGACD40L의 양이 적을수록 확장이 훨씬 더 낮다. IMDM의 배양은 StemSpan에 비해 테스트한 모든 조건에서 확장을 낮추었다. StemSpan에서 B 세포 배양 및 형질모세포 분화는 더 높은 MEGACD40L 농도에서의 배양과 마찬가지로 IMDM에 비해 더 높은 배수 확장을 초래했다. 추가 테스트에서, FBS 대신 Stemspan 기본 배지와 인간 혈청을 사용하여 약 20배 확장이 이루어졌다.

표 66

1차 활성화 후 B 세포 배수 확장

확장	CD40L (ng/ml)	Stemspan		IMDM	
		복제 1	복제 2	복제 1	복제 2
1차 확장 7일	100	21.42	24.08	5.81	5.32
	10	10.5	8.12	3.22	2.59
	1	3.5	5.04	2.87	1.96
1차 확장 14일	100	33.81	41.58	14.21	17.5
	10	23.38	17.99	6.51	6.02
	1	8.82	10.43	2.94	2.8

[1547]

표 67

2 차 활성화 후 B 세포 배수 확장

확장	CD40L (ng/ml)	Stemspan		IMDM	
		복제 1	복제 2	복제 1	복제 2
2 차 확장 7 일	100	18.08	15.04	7.36	8.32
	10	7.68	5.76	4.8	3.52
	1	2.24	4.96	2.88	2.4
2 차 확장 14 일	100	42.68	32.34	10.78	15.4
	10	13.2	15.4	3.96	5.5
	1	14.08	2.64	2.42	1.738

[1548]

[1549] 실시예 23.3. 활성화된 B 세포의 지질 스크린

[1550] 상이한 이온화가능한 지질 또는 PEG 지질로 제형화된 LNP를 B 세포 편집 효능에 대해 테스트하였다.

[1551] 건강한 인간 공여자로부터의 류코팩을 상업적으로 입수하였고(Hemacare) B 세포를 MultiMACS Cell24 Separator Plus 기기에서 StraightFrom Leukopak CD19 마이크로비드 키트(Miltenyi, 130-117-021)를 사용하여 CD19 양성 선별에 의해 분리하였다. MACS 분리 후, CD19+ B 세포는 각각 100 ng/ml MEGACD40L이 보충된 B 세포 배지 3 또는 B 세포 배지 7에서 활성화되었다. 활성화 2일 후, B 세포를 Cas9 mRNA를 전달하는 LNP 및 TRAC를 표적화하는 gRNA G013006(서열 번호 708)으로 처리하였다. LNP는 일반적으로 각각 이온화가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 몰비로 표현되는 지질 조성물과 함께 표 68에 기재된 이온화가능한 및 PEG 지질을 사용하여 실시예 1과 같이 제조하였다. LNP는 10% FBS(Gibco, A3840201)가 보충된 IMDM 또는 StemSpan 기본 배지에서 15분 동안 10 µg/ml 총 RNA 카고에서 1 µg/ml ApoE3(Peprotech, 350-02)와 사전-인큐베이션되었다. 표 68에 표시된 대로, 사전-인큐베이션된 LNP를 B 세포에 1:1 비율 v/v로 첨가하여 B 세포 배지 3 또는 7에서 100 ng/ml MEGACD40L의 최종 농도를 만들고 총 RNA 카고의 LNP 용량을 5 µg/ml로 했다.

[1552] LNP 처리 5일 후, 세포를 수집하고 NGS 분석을 실시예 1에 기재된 바와 같이 수행하였다. 표 68 및 도 58a-b는 다양한 배지에서 LNP 처리 후 퍼센트 편집을 보여준다. 지질 A, 지질 C 또는 지질 D로 제형화된 LNP를 사용하여 효율적인 편집이 명백했다. 지질 구조에 대해서는 아래 표 90을 참조한다. 편집은 IMDM에 비해 StemSpan에서 배양된 B 세포에서 더 효율적이었다.

표 68

기재된 지질 조성물로 편집한 후 B 세포에서 평균 편집 퍼센트

배지	이온화가능한 지질	LNP		5 ug/ml	
		PEG 지질	지질 조성	평균	SD
IMDM	지질 A	2kDMG	50/10/38.5/1.5	5.50	0.71
	지질 C	2kDMG	50/10/38.5/1.5	13.00	0.00
	지질 D	2kDMG	50/10/38.5/1.5	32.00	0.00
	지질 E	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.00	0.00
	지질 F	2kDMG	50/10/38.5/1.5	0.50	0.71
	지질 G	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.00	0.00
	지질 A	2kDMG	50/9/38/3	5.50	0.71
	지질 E	2kDMG	50/9/38/3	0.00	0.00
	지질 G	2kDMG	50/9/38/3	1.00	0.00
	지질 A	지질 H	50/10/38.5/1.5	16.50	0.71
	지질 A	지질 J	50/10/38.5/1.5	7.00	0.00
	처리되지 않음			0.00	0.00
SFEM	지질 A	2kDMG	50/10/38.5/1.5	17.50	3.54
	지질 C	2kDMG	50/10/38.5/1.5	43.50	2.12
	지질 D	2kDMG	50/10/38.5/1.5	59.00	1.41
	지질 E	2kDMG	50/10/38.5/1.5	6.50	0.71
	지질 F	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.00	0.00
	지질 G	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.00	0.00
	지질 A	2kDMG	50/9/38/3	13.00	1.41
	지질 E	2kDMG	50/9/38/3	1.00	0.00
	지질 G	2kDMG	50/9/38/3	0.00	0.00
	지질 A	지질 H	50/10/38.5/1.5	30.00	1.41
	지질 A	지질 J	50/10/38.5/1.5	10.00	0.00
	처리되지 않음			0.00	0.00

[1553]

[1554] 실시예 23.4. LNP로의 B 세포 편집을 위한 ApoE 조건

[1555] ApoE3 또는 ApoE4와 사전 인큐베이션된 다양한 용량의 LNP를 사용하여 편집 효능을 결정하기 위해, B2M을 표적화하는 가이드로 B 세포에서 편집 후 B2M 단백질의 표면 발현을 평가하였다.

[1556] B 세포(Hemacare)를 해동하고, 1 ug/ml CpG ODN 2006(Invivogen, 카탈로그 tlrl-2006-1), 50 ng/ml IL-2(Peprotech, 카탈로그 200-02), 50 ng/ml IL-10(Peprotech, 카탈로그 200-10), 10 ng/ml IL-15(Peprotech, 카탈로그 200-15), 1 ng/ml MegaCD40L(Enzo Life Sciences, 카탈로그 ALX-522-110-0000), 1% 페니실린-스트렙토마이신 및 5% 인간 AB 혈청을 갖는 Stemspan SFEM 배지에서 활성화하였다. B 세포는 1 ng/mL MegaCD40L(Enzo Life Sciences, 카탈로그 ALX-522-110-0000) 및 1 ug/mL CpG ODN 2006(Invivogen, 카탈로그 tlrl-2006-1)의 존재 하에 활성화된 것으로 간주되었다. 활성화 2일 후, B 세포를 B2M을 표적화하는 Cas9 mRNA 및 gRNA G000529 (서열 번호 701)를 전달하는 LNP로 처리하였다. LNP는 일반적으로 각각 이온화 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 몰비로 표현되는 50/10/38.5/1.5의 지질 조성을 갖는 표 69에 기재된 이온화가능한 지질을 사용하여 실시예 1과 같이 제조하였다. LNP는 표 69에서 1.25 ng/ml의 ApoE3(Peprotech 350-02) 또는 ApoE4(Peprotech 350-04)와 함께 약 5분 동안 37°C에서 사전인큐베이션되었다. 사전-인큐베이션된 LNP는 B 세포에 표 69에 나타난 바와 같은 총 RNA 카고의 양으로 B 세포에 첨가되었다. LNP 처리 5일 후, 세포를 유세포 분석법으로 표현형을 결정하였다. 간략하게, B 세포는 B2M(Biolegend, 카탈로그 395806), CD19(Biolegend, 카탈로그 302205), CD20(Biolegend, 카탈로그 302322), CD86(Biolegend 카탈로그 305420)을 표적화하는 항체와 함께 인큐베이션되었다. 이어서 세포를 PBS에서 1:3703으로 희석된 DAPI(Thermo Fisher, 카탈로그 D1306)에서 세척하고 Cytotflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. B 세포는 크기, 단일체 및 살아있는 세포에 게이팅되었다.

[1557] 표 69 및 도 59는 ApoE3 또는 ApoE4와 사전 인큐베이션된 지질 A 또는 지질 D로 제형화된 LNP로 편집한 후 B2M 음성 B 세포 백분율을 나타낸다. 지질 A 또는 지질 D 이온화가능한 지질로 제형화된 LNP로 편집된 B 세포는 B2M 음성 세포의 비율이 증가한 것으로 나타났다.

표 69

ApoE3 또는 ApoE4와 사전 인큐베이션된 상이한 LNP 제형으로 편집 후 B2M 음성 B 세포의 평균 퍼센트

LNP 사전인큐베이션	총 RNA ug/ml	지질 A		지질 D	
		평균	SD	평균	SD
ApoE3	0	1.84	0.54	1.84	0.14
	2.5	53.50	1.56	37.00	0.42
	5	53.05	0.92	30.30	1.56
	10	50.00	0.57	20.50	1.13
ApoE4	0	1.27	0.30	1.91	0.44
	2.5	60.30	0.14	40.80	1.98
	5	51.45	3.32	27.75	2.62
	10	47.55	0.92	19.50	0.28

[1558]

[1559] 실시예 24. 지질 나노입자를 이용한 B 세포의 시간 경과 편집

[1560] B 세포 활성화와 LNP에 의한 편집 사이의 효과적인 간격을 결정하기 위해, B2M을 표적화하는 가이드로 B 세포에서 편집 후 B2M 단백질의 표면 발현을 평가하였다.

[1561] B 세포(Hemacare)를 해동시키고, 1 ug/ml CpG ODN 2006(Invivogen, 카탈로그 tlrl-2006-1), 50 ng/ml IL-2(Peprotech, 카탈로그 200-02), 50 ng/ml IL-10(Peprotech, 카탈로그 200-10), 10 ng/ml IL-15(Peprotech, 카탈로그 200-15), 1 ng/ml MegaCD40L(Enzo Life Sciences, 카탈로그 ALX-522-110-0000), 1% 페니실린-스트렙토마이신 및 5% 인간 AB 혈청을 갖는 Stemspan SFEM 배지에서 활성화시켰다. B 세포는 1 ng/mL MegaCD40L(Enzo Life Sciences, 카탈로그 ALX-522-110-0000) 및 1 ug/mL CpG ODN 2006(Invivogen, 카탈로그 tlrl-2006-1)의 존재 하에 활성화된 것으로 간주되었다. B 세포는 2개의 독립적인 실험에 걸쳐 간격을 두고 B2M을 표적화하는 Cas9 및 gRNA G000529(서열 번호 701)를 암호화하는 mRNA를 전달하는 LNP로 처리하였다. 첫 번째(표 70에 나타냄)는 해동(-1일) 편집, 다음 날 세포 활성화, 및 0일 및 활성화 후 5일까지 각각의 후속 날 편집을 포함했다. 두 번째(표 71에 표시됨)는 같은 날(0일)에 세포를 해동 및 활성화하고 6일부터 10일까지 편집을 수행하는 것을

포함했다.

[1562] 유세포 분석은 각 편집 후 6일에 개별적으로 수행하였다. LNP는 일반적으로 각각 이온화가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 몰비로 표현되는 지질 조성이 50/10/38.5/1.5인 표 70-71에 기재된 이온화가능한 지질을 사용하여 실시예 1과 같이 제조하였다. LNP는 1.25 ng/ml에서 ApoE4(Peprotech 350-04)와 함께 약 5분 동안 37℃에서 사전인큐베이션되었다. 사전-인큐베이션된 LNP를 최종 농도 2.5 ug/ml 총 RNA 카고 및 인간 혈청 최종 농도 2.5%로 B 세포에 첨가하였다. LNP 처리 6일 후, 세포를 유세포 분석법으로 표현형을 결정하였다. 간략하게, B 세포를 4c에서 20분 동안 B2M(Biolegend, 카탈로그 395806)을 표적화하는 항체와 함께 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 PBS에 희석된(3.8 uM) DAPI(Thermo Fisher, 카탈로그 D1306)로 세척하고, Cytotflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석하였다. B 세포는 단일체 및 살아있는 세포 상에서 게이팅되었고, B2M의 손실에 대해 LNP가 없는 음성 대조군과 비교하였다. 표 70-71 및 도 60a-b는 LNP 처리 후 B2M 음성 세포의 퍼센트를 보여준다. 활성화 당일부터 편집 후 10일까지 B 세포에서 효과적인 편집이 관찰되었으며, 3일과 6일 사이에 최고조에 달했다.

표 70

활성화 1 일 전부터 활성화 후 5 일까지의 간격으로 편집 후 평균 B2M 음성 세포

시점	지질 A		지질 D	
	평균	SD	평균	SD
-1 일	5.19	0.77	1.30	0.17
0 일	55.93	4.20	27.87	3.69
1 일	80.27	0.99	38.17	0.99
2 일	81.20	2.80	57.53	1.66
3 일	84.47	2.86	61.23	2.63
4 일	85.00	0.20	63.20	1.91
5 일	87.03	4.69	70.53	3.34

[1563]

표 71

활성화 후 6 내지 10 일의 간격으로 편집 후 평균 B2M 음성 세포

시점	평균	SD
6 일	86.10	2.55
7 일	79.77	1.70
8 일	75.07	6.82
9 일	62.03	7.17
10 일	52.47	5.15

[1564]

실시예 25. DNA 단백질 키나제 억제제를 사용하여 B 세포에서 편집

[1566] B 세포에서 편집 효율에 대한 DNA 단백질 키나제 억제제(DNAPKi)의 효과를 평가하였다.

[1567] 실시예 23.3에서와 같이 B 세포를 분리하고 필요할 때까지 동결시켰다. B 세포를 해동시키고 1 ng/ml MEGACD40L 이 보충된 표 64에 기재된 바와 같은 B 세포 배지 9에서 배양하였다. 배양 2일 후, 세포를 수확하고 인간 혈청이 없는 StemSpan 기본 배지에 100,000개 세포/100 µl로 재현탁하고 B2M을 표적화하는 Cas9(서열 번호 6) 및 gRNA G000529(서열 번호 701)를 암호화하는 mRNA를 전달하는 LNP로 처리하기 전에 B 세포 배지 9에 사용된 사이토카인 및 활성화 인자 콕테일의 최종 농도의 2배로 보충했다.

[1568] LNP는 일반적으로 각각 이온화 가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 몰비로 표현되는 지질 조성이 50/10/38.5/1.5인 실시예 1과 같이 제조되었다. LNP는 5% 인간 AB 혈청이 보충된 StemSpan 기본 배지(Gemini Bio-Medium 제품, 100-512)에서 37℃에서 15분 동안 1.25 µg/ml ApoE4(Peprotech, 350-04)와 함께 5 µg/ml 총 RNA 카고의 농도로 사전인큐베이션하였다. 사전-인큐베이션된 LNP를 최종 농도 2.5 ug/ml 총 RNA 카고로 B 세포에 첨가한 후, 0.25 ug/ml DNAPK 억제제 화합물 1, 화합물 3 또는 화합물 4를 첨가하였다.

[1569] LNP 처리 후 7일째에 B2M 표면 단백질의 존재에 대해 B 세포를 표현형화하였다. 이를 위해 B 세포를 CD86(Biolegend, 374216) 및 B2M(Biolegend, 316312)을 표적화하는 항체와 함께 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 생존 염료(Biolegend, 422801)로 염색하고, 세척하고, Cytotflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하고

FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. B 세포는 크기 및 생존 상태에 따라 게이팅되었고, 이어서 전체 살아있는 개체군에 대한 B2M 발현이 뒤따랐다. B2M 음성 세포 퍼센트는 표 72에 제시되어 있다. DNAPKi가 없는 경우와 비교하여 DNAPKi가 존재하는 경우 B2M 음성 B 세포의 백분율 증가가 관찰되었으며, 이는 증가된 유전자 편집을 나타낸다.

표 72

B2M을 표적화하는 DNAPKi 및 LNP로 편집한 후 B2M 음성 세포의 백분율.

샘플	% B2M-	
	평균	SD
억제제 없음	11.2	1.5
화합물 1	19.2	2.3
화합물 3	27.4	2.6
화합물 4	24.1	1.0
편집 없음	2.5	0.5

[1570]

[1571] 실시예 25.2. DNAPK 억제제를 사용하여 여러 공여자의 B 세포에서 편집

[1572] B 세포는 실시예 23.1에 기술된 바와 같이 3명의 공여자로부터 유래된 PBMC로부터 분리되었다. MACS 분리 후, CD19+ B 세포는 1 ug/ml CpG ODN 2006(Invivogen, TLR-2006), 2.5% 인간 AB 혈청(Gemini Bio-Products, 100-512), 1% 페니실린-스트렙토마이신(ThermoFisher, 15140122), 50 ng/ml IL-2(Peprotech, 200-02), 50 ng/ml IL-10(Peprotech, 200-10) 및 10 ng/ml IL-15(Peprotech, 200-15) 및 1 ng/ml CD40L(Enzo Life Sciences, ALX-522-110-C010)을 갖는 Stemspan 기본 배지에서 활성화되었다. 활성화 2일 후, B 세포를 B2M을 표적화하는 Cas9(서열 번호 6) 및 gRNA G000529(서열 번호 701)를 암호화하는 mRNA를 전달하는 LNP로 처리하였다. B 세포를 상기 기재된 바와 같이 완전한 Stemspan 배지에서 표 73에 나타난 바와 같이 삼중으로 웰당 50,000개의 세포로 플레이팅하였다.

[1573] LNP는 일반적으로 각각 이온화가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 물비로 표현되는 50/10/38.5/1.5의 지질 조성으로 실시예 1에서와 같이 제조되었다. LNP는 1 ug/ml CpG ODN 2006, 2.5% 인간 AB 혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 50 ng/ml IL-2, 50 ng/ml IL-10, 및 10 ng/ml IL-15, 1 ng/ml CD40L, 및 1.25 ug/mL ApoE4를 함유하는 Stemspan 배지로 37°C에서 15분간 사전인큐베이션하였다. 사전-인큐베이션된 LNP를 0.25ug/ml DNAPK 억제제 화합물 1 또는 화합물 4를 첨가하여 최종 농도 2.5 ug/ml 총 RNA 카고로 B 세포에 첨가하였다. LNP 첨가 72 시간 후, 세포를 세척하고, 1 ug/ml CpG ODN 2006, 2.5% 인간 AB 혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 50 ng/ml IL-2, 50 ng/ml IL-10, 및 10 ng/ml IL-15, 및 100 ng/ml CD40L을 함유하는 Stemspan 배지로 재현탁하고, 48-웰 플레이트로 옮겼다.

[1574] LNP 처리 7일 후, 세포를 유세포 분석법으로 표현형을 결정했다. 간략하게, B 세포를 CD19(Biolegend, 363010A), CD20(Biolegend, 302322), CD86(Biolegend, 374216) 및 B2M(Biolegend, 395806)을 표적화 하는 항체와 이어서 생존성 염료 DAPI(Biolegend, 422801)와 함께 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고 Cytoflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. B 세포는 크기 및 생존 상태에 따라 게이팅되었고, 이어서 전체 살아있는 집단에 대한 B2M 발현이 뒤따랐다. 표 73 및 도 61은 DNAPK 억제제로 편집한 후 B2M 음성 세포의 평균 퍼센트를 보여준다. DNAPK 억제제를 추가하면 편집 효율성이 약간 향상되었다.

표 73

DNAPK 억제제로 편집한 후 B2M 음성 세포의 평균 퍼센트

	편집되지 않음, 억제제 없음			억제제 없음			화합물 1			화합물 4		
	평균	SD	N	평균	SD	N	평균	SD	N	평균	SD	N
공여자 150	3.74	1.62	3	50.57	1.54	3	56.41	4.39	3	59.42	4.16	3
공여자 200	5.11	0.06	2	27.60	4.16	3	36.77	1.79	3	34.88	8.44	3
공여자 340	0.70	0.43	3	45.61	3.23	3	56.28	3.01	3	57.59	3.52	3

[1575]

[1576] 실시예 26. LNP 전달을 이용한 B 세포로의 삽입

[1577] LNP 및 AAV 핵산 전달의 조합을 사용하여 삽입 효능에 대해 B 세포를 평가하였다.

[1578] 실시예 23.3과 같이 B 세포를 단리하고, 1 ng/ml MEGACD40L이 보충된 표 64에 기술된 바와 같이 B 세포 배지 9에서 활성화되었다. 활성화 2일 후, B 세포는 B2M 유전자좌를 표적화하는 Cas9(서열 번호 6) 및 gRNA G000529(서열 번호 701)를 암호화하는 mRNA를 전달하는 LNP뿐만 아니라 EF1 α 프로모터에 의해 유도된 B2M 유전자좌(서열 번호 722)로의 GFP 주형 삽입을 위한 AAV6로 처리하였다. LNP는 일반적으로 각각 이온화가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 몰비로 표현되는 50/10/38.5/1.5의 지질 조성을 갖는 이온화가능한 지질로서 지질 A 및 지질 D를 사용하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다. LNP를 1 μ g/ml APOE3(Peprotech, 350-02)와 함께 5% 인간 AB 혈청(Gemini Bio-Products, 100-512)이 보충된 StemSpan 기본 배지에 첨가했다. 10만 개의 세포/웰을 인간 혈청이 없고 위에서 설명한 사이토카인/활성화 인자 콕테일 농도의 4배인 StemSpan 기본 배지에서 배양했다. LNP 혼합물을 B 세포와 1:1 v/v로 혼합하기 전에 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 세포와 LNP를 결합한 직후, AAV6를 B 세포-LNP 혼합물과 1:1 v/v, 1.5 x 10⁵ 게놈 복사의 MOI로 첨가하여 최종 농도 5 μ g/ml LNP를 생성했다.

[1579] 7일째에 B 세포를 GFP 발현에 대해 표현형을 결정하였다. 유세포 분석법에 의한 B 세포 표현형을 위해, B 세포를 CD19(Biolegend, 302218), CD20(Biolegend, 302322), CD86(Biolegend, 374216) 및 B2M(Biolegend, 316312)을 표적화하는 항체로 염색하였다. 이어서 세포를 생존 염료(Biolegend, 422801)로 염색하고, 세척하고, Cytotflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하였다. FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 결과를 분석하였다. B 세포는 크기와 생존율에 따라 게이팅되었으며, 전체 생존 인구에 대한 GFP 발현이 뒤따랐다. 표 74에 나타난 바와 같이, GFP를 발현하는 B 세포의 백분율은 지질 A로 처리한 후 7일째에 29.5%, 지질 D로 14.5%였다. 최소한의 GFP 발현은 처리하지 않은 음성 대조군 조건, LNP 단독, 또는 AAV 단독에서 관찰되었다.

표 74

LNP 및 AAV 처리 후 B2M 음성 퍼센트 및 GFP 양성 퍼센트

샘플	%B2M 음성		%GFP 양성	
	평균	SD	평균	SD
처리되지 않음	1.83	0.25	0.00	0.00
AAV 단독	1.46	0.50	2.28	0.66
지질 A 단독	62.35	0.35	0.00	0.00
지질 A+AAV	42.45	0.92	29.50	5.52
지질 D 단독	58.45	0.21	0.00	0.00
지질 D+AAV	27.05	2.76	14.25	0.07

[1580]

[1581] 실시예 27. 지질 나노입자를 이용한 NK 세포내 편집

[1582] 상이한 이온화가능한 지질 또는 PEG 지질로 제형화된 LNP를 NK 세포 편집 효능에 대해 테스트하였다.

[1583] 제조사 프로토콜에 따라 EasySep 인간 NK 세포 분리 키트(STEMCELL, 카탈로그 번호 17955)를 사용하여 상업적으로 입수한 류코팩으로부터 NK 세포를 단리하였다. 단리 후, NK 세포는 10% FBS, 500 U/mL IL-2, 5 ng/ml IL-15 및 10 ng/ml IL-2가 포함된 RPMI 1640 배지에서 K562-41BBL 피더 세포와 1:1 비율로 7일 동안 배양하였다.

[1584] 활성화 7일 후, NK 세포를 TRAC를 표적화하는 Cas9 HiBiT mRNA 및 gRNA G013006(서열 번호 708)을 전달하는 LNP로 처리하였다. LNP는 일반적으로 각각 이온화가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 몰비로 표현되는 지질 조성과 함께 표 75에 기술된 이온화가능한 및 PEG 지질을 사용하여 실시예 1과 같이 제조되었다. LNP를 10% FBS를 포함하는 RPMI 1640에서 약 15분 동안 37°C에서 사전인큐베이션하였다. 사전-인큐베이션된 LNP를 2.5 μ g의 총 RNA 카고로 3중으로 NK 세포에 첨가하였다. LNP 처리 7일 후, 실시예 1에 기재된 바와 같이 세포를 수집하고 NGS 분석을 수행하였다. 표 75 및 도 62는 지시된 LNP 제형으로 처리된 NK 세포에 대한 인텔 퍼센트를 나타낸다. 다중 지질 조성으로 편집이 이루어졌다. 지질 구조에 대해서는 아래 표 90을 참조한다.

표 75

다양한 지질 조성으로 편집한 후 NK 세포에서 평균 퍼센트 편집.

이온화가능한 지질	LNP		% 편집	
	PEG 지질	지질 조성	평균	SD
지질 A	2kDMG	50/10/38.5/1.5	57.93	2.02
지질 C	2kDMG	50/10/38.5/1.5	34.33	3.41
지질 D	2kDMG	50/10/38.5/1.5	38.90	1.39
지질 E	2kDMG	50/10/38.5/1.5	18.50	6.45
지질 F	2kDMG	50/10/38.5/1.5	0.20	0.10
지질 G	2kDMG	50/10/38.5/1.5	0.13	0.06
지질 A	2kDMG	50/9/38/3	19.83	2.83
지질 E	2kDMG	50/9/38/3	16.10	2.77
지질 G	2kDMG	50/9/38/3	4.20	0.20
지질 A	지질 H	50/10/38.5/1.5	17.23	4.31
지질 A	지질 J	50/10/38.5/1.5	41.80	5.99
처리되지 않음			0.00	0.00

[1585]

[1586] 실시예 28. 지질 나노입자를 이용한 NK 세포의 삽입 시간 경과에 따른 편집

[1587] NK 세포에서 게놈 삽입을 평가하기 위해, 세포를 AAVS1을 표적화하는 Cas9(서열 번호 6) 및 gRNA G000562(서열 번호 710)를 암호화하는 mRNA를 전달하는 LNP에 이어, AAVS1 편집 부위에 대한 상동성 부위(서열 번호 720 또는 서열 번호 721)의 영역에 측접하는 GFP 암호화 서열을 암호화하는 AAV로 처리하였다.

[1588] NK 세포를 실시예 27에서와 같이 단리하였다. 공여자 2의 경우, 인간 1차 NK 세포를 활성화시키고, K562-41BBL 세포를 피더 세포로서 10% FBS, 500U/mL IL-2 및 5 ng/ml IL-15를 함유하는 RPMI 1640 배지에서 1:1의 비율로 사용하여 확장시키고, 7일 동안, 동결보존한 후 실험 시 해동하였다. 공여자 3의 경우, NK 세포를 10% FBS, 500 U/mL IL-2 및 5 ng/ml IL-15가 포함된 RPMI 1640 배지에서 1:1의 비율로 K562-41BBL 세포를 7일 동안 사용하여 단리, 활성화 및 확장한 후 편집에 직접 사용했다. 공여자 4의 경우, 5% 인간 AB 혈청, 500 U/mL IL-2 및 5 ng/ml IL-15가 포함된 OpTmizer 배지에서 1:1의 비율로 K562-41BBL 세포를 사용하여 5일 동안 NK 세포를 단리, 활성화 및 확장한 다음, 편집에 직접 사용하였다. NK 세포를 2.5% 인간 AB 혈청, 1% 페니실린 및 스트렙토마이신, 500 U/mL IL-2 및 5 ng/ml IL-15를 함유하는 OpTmizer 배지에서 3중으로 웰당 100,000개 세포로 플레이팅 하였다. RPMI 1640 배지에서 편집하기 위해, LNP는 10% FBS, 500 U/mL IL-2 및 5 ng/ml IL-15가 포함된 RPMI 1640에서 약 15분 동안 37°C에서 10 ug/ml APOE3와 사전인큐베이션하였다. OpTmizer 배지에서 편집하기 위해 LNP를 2.5% 인간 AB 혈청, 500 U/mL IL-2 및 5 ng/ml IL-15가 포함된 OpTmizer 배지에서 약 15분 동안 37°C에서 10 ug/ml APOE3와 사전인큐베이션하였다. 사전 인큐베이션된 LNP를 2.5 ug/ml, 5 ug/ml 또는 10 ug/ml의 총 RNA 화물의 최종 농도로 동일한 배지에 현탁된 NK 세포에 3중으로 첨가하였다. 샘플의 하위 집합에 대해 편집 후 300,000 또는 600,000 게놈 복사본의 감염 다중도(MOI)에서 AAV가 추가되었다. 편집 후 6일째에 새로운 배지로 교체하면서 최대 14일 동안 세포를 인큐베이션하였다.

[1589] 실시예 28.1. NK 세포에서의 편집 효율

[1590] LNP 처리 후 매일, 실시예 1에 기술된 바와 같이 세포를 수집하고 NGS 분석을 수행하였다. 편집은 신선한 세포(공여자 3 및 4)에서 8일까지 및 냉동 세포(공여자 2) 세 가지 LNP 투여량 모두에서 실질적으로 고원인 것으로 나타났다. LNP 처리 후 14일째 종점 편집은 표 76 및 도 63에 제시되어 있다.

표 76

LNP 처리 후 14일에 LNP의 다양한 용량으로 처리된 NK 세포의 평균 편집 백분율

공여자	상태	2.5 ug/ml		5 ug/ml		10 ug/ml		편집되지 않음	
		평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
2	확장됨, 동결	84.23	0.91	85.83	0.49	85.63	0.32	0.27	0.12
3	새로 교체, 확장됨	94.03	0.31	96.60	0.36	96.20	0.17	0.20	0.00
4	새로 교체, 확장됨	94.87	0.35	95.90	0.17	95.43	0.21	0.10	0.00

[1591]

[1592] 실시예 28.2. NK 세포에서의 삽입 효율

[1593] LNP 처리 7일 후, 세포는 GFP 삽입률을 측정하기 위해 유세포 분석법에 의해 분석되었다. 간략하게, NK 세포를 CD3(Biolegend, 카탈로그 번호 317336) 및 CD56(Biolegend, 카탈로그 번호 318310)을 표적화하는 항체와 함께 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고 Cytotflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석하였다. NK 세포는 크기, CD3/CD56 상태 및 GFP 발현에 대해 게이팅되었다. 높은 GFP-발현 세포는 AAVS1 유전자좌에서 표적화된 GFP 삽입으로서 게이팅되었고, 낮은 GFP-발현 세포는 에피솜 보유로서 게이팅되었다. 표 77 및 도 64는 표적 삽입을 나타내는 높은 GFP 발현을 갖는 NK 세포의 퍼센트를 나타낸다. 추가 분석에서 LNP를 사용하여 NK 세포에서 순차적 유전자 파괴 및 서열 삽입 편집이 이루어졌다.

표 77

LNP 및 AAV 로 편집한 후 7일 동안 높은 GFP 발현을 갖는 NK 세포의 퍼센트

공여자	상태	평균	SD	N
2	AAV 없음	0.00	0.00	3
	AAV 단독, LNP 없음	1.47	0.41	3
	300K MOI	40.03	2.05	3
	600K MOI	40.63	3.91	3
3	AAV 없음	0.00	0.00	2
	AAV 단독, LNP 없음	1.24	0.48	2
	300K MOI	53.77	0.85	3
	600K MOI	58.40	0.92	3
4	AAV 없음	0.00	0.00	3
	AAV 단독, LNP 없음	1.63	0.18	3
	300K MOI	63.20	0.87	3
	600K MOI	67.13	1.55	3

[1594]

[1595] 실시예 29. DNAPK 억제제를 사용한 NK 세포로의 삽입

[1596] DNA 단백질 키나제 억제제(DNAPKi)가 인텔 및 삽입물에 미치는 영향에 NK 세포를 평가하였다. NK 세포를 DNA 단백질 키나제 억제제의 존재 하에 AAVS1을 표적화하는 Cas9(서열 번호 6) 및 gRNA G000562(서열 번호 710)를 암호화하는 mRNA를 전달하는 LNP로 처리하였다. 샘플의 하위집합은 또한 AAVS1 편집 부위(서열 번호 721)에 대한 상동성 영역에 측점하는 GFP 암호화 서열을 암호화하는 AAV로 처리하였다.

[1597] NK 세포를 실시예 27에서와 같이 단리하였다. 5% 인간 AB 혈청, 500 U/mL IL-2, 및 5 ng/ml IL-15을 갖는 OpTmizer 배지에서 피더 세포로서 K562-41BBL 세포를 사용하여 인간 1차 NK 세포를 3일 동안 활성화 및 확장시켰다. NK 세포를 표 78 및 79에 표시된 농도의 DNAPKi로 상기 기재된 바와 같이 보충된 OpTmizer 배지에서 웰당 50,000개의 세포로 3중 플레이팅하였다. 2.5% 인간 AB 혈청, 500 U/mL IL-2 및 5 ng/ml IL-15을 갖는 OpTmizer 배지에서 37°C에서 약 15분 동안 10 ug/ml APOE3과 함께 사전 인큐베이션하였다. 사전-인큐베이션된 LNP를 최종 농도 10 ug/ml의 총 RNA 카고(cargo)로 동일한 배지에 현탁된 NK 세포에 3중으로 첨가하였다. 샘플의 하위집합에 대해, AAVS1 편집 부위와 상동인 영역에 측점하는 AAV 암호화 GFP를 편집 후 600,000개의 게놈 카피의 감염 다중도(MOI)로 추가했다. LNP 처리 7일 후, 세포는 실시예 28에 기재된 바와 같이 유세포 분석법에 의해 표현형이 결정되었고 실시예 1에 기재된 바와 같이 NGS 분석을 위해 수집되었다.

[1598] 표 78, 79 및 도 65a 및 65b는 LNP, AAV 및 다양한 농도의 DNAPK 억제제 화합물 1 및 화합물 4로 처리한 후 퍼센트 편집을 보여준다. 인텔 형성 및 삽입 모두 DNAPK 억제제의 존재 하에 증가하였다.

표 78

다양한 용량의 DNAPKi에 의한 AAVSI에서의 평균 퍼센트 편집

샘플	0 uM		0.125 uM		0.25 uM		0.5 uM	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
편집되지 않음	0.67	0.60						
DNAPKi 없음	93.17	0.12						
화합물 1			96.10	1.01	96.97	0.21	98.13	0.65
화합물 4			96.77	0.67	97.37	0.06	97.67	1.55

[1599]

표 79

LNP, AAV 및 DNAPKi로 편집후 7 일후 높은 GFP 발현을 갖는 NK 세포의 퍼센트

샘플	0 uM		0.125 uM		0.25 uM		0.5 uM	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
AAV 단독	2.68	0.37						
DNAPKi 없음	74.93	4.09						
화합물 1			85.47	2.48	90.23	1.66	92.30	1.66
화합물 4			88.10	1.00	90.63	1.01	90.27	3.09

[1600]

[1601] 실시예 30. 지질 나노입자 전달 후 대식세포 세포내 Cas9 발현

[1602] 상이한 이온화가능한 지질 또는 PEG 지질로 제형화된 LNP를 대식세포 전달 효능에 대해 시험하였다.

[1603] 건강한 인간 공여자 PBMC를 상업적으로 입수하였고(Hemacare) 단핵구를 제조사의 프로토콜에 따라 CD14 마이크로비드, 인간(Miltenyi Biotec, 카탈로그 130-050-201)을 사용하여 CD14 양성 선별에 의해 분리하였다. 분리 후, CD14+ 단핵구 세포를 배양하고 조직 배양 플레이트(Falcon, 353072)에서 10 ng/mL GM-CSF(Stemcell, 78140.1)를 포함하는 RPMI-1640 배지에서 100,000개 세포/웰로 삼중으로 대식세포로 분화시켰다.

[1604] 분화 5일 후, 세포를 TRAC를 표적화하는 Hibt-태깅 Cas9(서열 번호 7) 및 gRNA G013006(서열 번호 708)을 암호화하는 mRNA를 전달하는 LNP로 처리하였다. LNP는 일반적으로 각각 이온화가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 물비로 표현되는 지질 조성물과 함께 표 80에 기술된 이온화가능한 및 PEG 지질을 사용하여 실시예 1과 같이 제조되었다. LNP를 10% FBS 및 10ug/mL ApoE3를 함유하는 RPMI 배지에서 약 15분 동안 5ug/mL 농도로 37℃에서 사전인큐베이션하였다. 세포 플레이트의 배지를 조심스럽게 제거하고 10% FBS, 1x Glutamax, 1x HEPES, 1% 페니실린/스트렙토마이신 및 10 ng/mL GM-CSF가 보충된 신선한 RPMI 배지로 교체했다. 사전-인큐베이션된 LNP를 1:1 v/v 비율로 대식세포에 첨가하여 2.5 ug/mL 총 RNA 카고의 최종 LNP 투여량을 3중으로 산출하였다. LNP 처리 24 시간 후 세포를 수확하고 제조사의 지시에 따라 Nano-Glo® HiBiT Lytic 검출 시스템(Promega, 카탈로그 N3030)을 사용하여 Cas9 단백질 수준을 측정했다. Biotek Neo2 플레이트 판독기를 사용하여 발광성을 측정했다. 선형 회귀는 표준 대조군의 단백질 번호 및 발광 판독값을 사용하여 GraphPad에 플로팅되어 선이 $X = 0, Y = 0$ 을 통과하도록 한다. $Y = ax + 0$ 방정식을 사용하여 세포 용해물당 단백질 수를 계산했다. 표 80 및 도 66은 1.5% PEG 2kDMG 조성물을 갖는 지질 A에 비해 다양한 지질 조성물로 형질감염된 대식세포 세포에서의 Cas9 단백질 발현을 보여준다. 편집은 대식세포에서 다중 지질 조성으로 이루어졌다. 지질 구조에 대해서는 아래 표 90을 참조한다.

표 80

지질 A, 1.5% 2kDMG PEG 조성에 비해 다양한 지질 조성으로 편집한 후 대식세포에서 세포당 Cas9 단백질의 평균 분자.

LNP			상대적 분자/세포	
이온화가능한 지질	PEG 지질	지질 조성	평균	SD
지질 A	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.00	n/a
지질 C	2kDMG	50/10/38.5/1.5	0.23	0.12
지질 D	2kDMG	50/10/38.5/1.5	2.14	0.10
지질 E	2kDMG	50/10/38.5/1.5	0.52	0.08
지질 F	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.10	0.07
지질 G	2kDMG	50/10/38.5/1.5	1.01	0.03
지질 A	2kDMG	50/9/38/3	0.88	0.43
지질 E	2kDMG	50/9/38/3	0.39	0.10
지질 G	2kDMG	50/9/38/3	0.99	0.22
지질 A	지질 H	50/10/38.5/1.5	2.43	0.91
지질 A	지질 J	50/10/38.5/1.5	2.12	0.37

[1605]

[1606]

실시예 31. 대식세포 및 단핵구에서의 편집

[1607]

LNP 편집 효율을 결정하기 위해, 단핵구-유래 대식세포 세포에 대한 편집 시간을 조사하였다. B2M 단백질의 표면 발현은 분화 초기에 B2M을 표적화하는 가이드로 평가하여 0일에 단핵구를 편집하거나 5일에 대식세포로의 분화가 끝날 때까지 평가했다.

[1608]

CD14+ 세포는 MultiMACS™ Cell24 Separator Plus 기기의 제조업체 프로토콜에 따라 StraightFrom® Leukopak® CD14 마이크로비드 키트, 인간(Miltenyi Biotec, 카탈로그, 130-117-020)을 사용하여 상업적으로 입수한 (Hemacare) 류코팩으로부터 분리하였다. MACS 분리 후, CD14+ 세포는 0일 또는 비-일에 편집을 위해 조직 배양 플레이트(Falcon, 353072) 상에서, 또는 CD14+ 분리 후 5일차에 편집하기 위한 비-조직 배양 플레이트(Falcon, 351172) 상에서, 10 ng/mL GM-CSF(Stemcell, 78140.1)가 포함된 RPMI-1640 배지에서 100,000개 세포/웰로 3중으로 배양하였다. 분화 및 성숙 과정 전반에 걸쳐 대식세포의 플레이트 접착력이 증가하기 때문에, 추가 유동 분석에 필요한 분리 용이성을 위해 대식세포 샘플에 비조직 배양 플레이트를 사용하였다.

[1609]

단리 당일 또는 CD14+ 세포 단리 5일 후 B2M을 표적화하는 Cas9(서열 번호 6) sgRNA G00529(서열 번호 701)를 암호화하는 mRNA를 전달하는 LNP로 세포를 처리하였다. LNP는 일반적으로 각각 이온화가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 몰비로 표현되는 50/10/38.5/1.5의 지질 조성으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조되었다. LNP를 1.25~10 ug/mL의 최종 농도 범위로 연속 희석하고 10 ug/mL의 ApoE3(Peprotech 350-02)와 함께 15분 동안 37℃에서 사전 배양했다. 사전 인큐베이션된 LNP를 표 81에 나타난 총 RNA 카고 용량으로 세포에 첨가하였다.

[1610]

LNP 처리 5일 후, 세포를 유세포 분석법으로 표현형을 결정하였다. 간략하게는, 세포를 0.05% 트립신 및 0.53 mM EDTA(Corning, 25-051-CI)와 함께 37℃에서 30분 동안 또는 현미경 확인으로 육안으로 측정할 때 세포가 플레이트에서 분리될 때까지 배양하여 단핵구 유래 대식세포를 배양 플레이트에서 분리했다. 분리된 세포를 새로운 플레이트(Corning, 3799)로 옮기고 PBS 및 배지로 세척하여 트립신을 불활성화시켰다. 세포를 실온의 암실에서 15분 동안 PBS 중의 LIVE/DEAD 바이올렛(Life Technologies, L34955)으로 추가로 염색하였다. 세포를 세척하고 CD11b(Biolegend, 301306), B2M(Biolegend, 316312) 및 CD86(Biolegend, 305420)을 표적화하는 항체와 함께 어두운 얼음에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 세포를 실온에서 20분 동안 시약 A(ThermoFisher, GAS001S100)와 함께 초기에 인큐베이션한 후 세포를 CD68(Biolegend, 333806)을 표적화하는 항체를 함유하는 시약 B(ThermoFisher, GAS002S100)와 함께 30분 동안 실온의 암실에서 인큐베이션함으로써 세포를 세척하고 고정 및 투과화시켰다. 이어서 세포를 세척하고 FACS 완충액에 재현탁하고 Cytotoflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. 세포는 크기, CD11b/CD68 양성 상태 및 B2M 음성 개체군에 따라 게이팅되었다. 표 81 및 도 67은 LNP로 처리된 세포에서 B2M 음성 세포 개체군의 증가된 백분율을 보여주며, 편집이 단핵구 및 대식세포 모두에서 효과적임을 입증한다. 대식세포에 비해 단핵구에서 이러한 조건 하에서 편집이 증가한다. 단핵구 및 대식세포에서의 편집은 또한 세포 또는 LNP가 혈청으로 준비되었을 때 관찰되었다.

표 81

LNP LNP로 편집한 후 평균 B2M 음성 세포

총 최종 RNA (ug/ml)	단핵구		대식세포	
	평균	SD	평균	SD
0	2.27	2.20	6.36	2.43
1.25	89.71	1.17	60.02	1.68
2.5	91.23	1.50	68.99	2.00
5	93.34	0.41	77.84	2.36

[1611]

[1612] 실시예 32. 지질 나노입자를 이용한 단핵구-유래 대식세포의 시간 경과 편집

[1613] 본 연구에서, 대식세포로의 단핵구 분화의 상이한 날에의 편집 효율은 2개의 혈청-조건(무혈청 및 5% 인간 혈청, 최종 2.5% 인간 혈청 농도를 산출함)을 이용하여 모니터링하였다.

[1614] 실시예 31에 기술된 바와 같이 CD14+ 세포를 분리하고 나중 사용을 위해 냉동시켰다. CD14+ 세포를 해동하고 표 2, 10 ng/mL GM-CSF(Stemcell, 78140.1)에 설명된 대로 비조직 배양 플레이트(Falcon, 351172)에서 2.5% 인간 AB 혈청을 포함하거나 포함하지 않은, OpTmizer 기본 배지에서 100,000개 세포/웰로 3중으로 배양하였다. 세포를 무혈청 또는 최종 2.5% 인간 AB 혈청-함유 배지에서 해동일부터 해동 후 8일까지 범위의 간격으로 B2M을 표적화하는 Cas9 mRNA 및 gRNA G000529(서열 번호 701)를 전달하는 LNP로 처리했다. LNP는 일반적으로 각각 이온화 가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 물비로 표현되는 50/10/38.5/1.5의 지질 조성으로 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조하였다. LNP는 10 ug/ml에서 ApoE3(Peprotech 350-02)와 함께 15분 동안 37°C에서 사전-인큐베이션되었다. 사전-인큐베이션된 LNP를 5 ug/ml 총 RNA 카고로 세포에 첨가하였다.

[1615] 각각의 LNP 처리 6일 후, 세포를 수집하고 실시예 1에 기재된 바와 같이 NGS 분석을 수행하였다. 표 82 및 도 68에 나타난 바와 같이, 대식세포 분화 및 성숙을 통해 강건한 편집이 달성되었으며, 편집은 CD14+ 세포의 해동 후 0일에서 8일까지 관찰되었다. 편집은 인간 혈청이 있거나 없는 배지를 사용하여 효과적이었다.

표 82

해동 후 간격에서 LNP 처리에 의한 평균 편집 퍼센트

시점 (일)	혈청-없음		2.5% 인간 혈청	
	평균	SD	평균	SD
0	75.80	1.31	96.27	0.21
1	94.03	2.47	96.27	1.10
2	89.43	0.64	93.10	1.35
3	77.90	0.99	93.13	2.41
4	88.63	1.07	92.80	3.91
5	87.03	3.00	94.17	1.31
6	90.40	1.15	93.33	0.97
7	85.73	4.50	92.90	0.26
8	81.00	1.37	89.17	1.11

[1616]

[1617] 실시예 33. 지질 나노입자를 이용한 대식세포에서의 일련의 편집

[1618] 이 연구에서 CIITA 또는 B2M을 표적화하는 가이드와 함께 LNP를 사용하여 단핵구 분화의 연속 편집 능력이 입증되었다. 분리된 CD14+ 단핵구는 CIITA 또는 B2M LNP 제형으로 해동 후 1일 및 2일에 편집되었다. 결과는 유세포 분석법으로 분석하였다.

[1619] 실시예 31에 기재된 바와 같이 CD14+ 세포를 분리하고 추후 사용을 위해 동결시켰다. 연구 0일에 냉동 세포를 해동하고 비조직 배양 플레이트(Falcon, 351172)에서 10 ng/mL GM-CSF(Stemcell, 78140.1)가 포함된 X-VIVO15 배지에서 100,000개 세포/웰로 3중 웰에서 배양하였다. 표 83에 나타난 바와 같이 해동 후 일에 Cas9(서열 번호 6) 및 B2M을 표적화하는 sgRNA G000529(서열 번호 701) 또는 CIITA를 표적으로 하는 sgRNA G013674(서열 번호 702)를 암호화하는 mRNA를 전달하는 LNP로 세포를 처리하였다. 해동 2일 후, 세포를 세척하고 표 83에 나타난 바와 같이 Cas9(서열 번호 6) 및 B2M을 표적화하는 sgRNA G000529(서열 번호 701) 또는 CIITA를 표적화하는 sgRNA G013674(서열 번호 702)를 암호화하는 mRNA를 전달하는 두 번째 LNP로 처리했다. LNP는 일반적으로 각각 이온화 가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 물비로 표현되는 50/10/38.5/1.5의 지질 조성으로 실시예 1과 같이

제조되었다. 5 ug/mL 총 RNA 카고의 LNP를 무혈청 또는 5% 인간 혈청 배지에서 10 ug/ml ApoE3(Peprotech 350-02)와 함께 37°C에서 15분 동안 사전인큐베이션하였다. 사전-인큐베이션된 LNP를 세포에 첨가하여 최종 총 RNA 카고 농도가 2.5 ug/mL이고 최종 혈청 농도가 0% 또는 2.5%가 되도록 했다.

[1620] 해동 8일 후, 세포는 유세포 분석법으로 표현형을 결정했다. 간략하게, 단핵구-유래 대식세포는 세포를 0.05% 트립신 및 0.53 mM EDTA(Corning, 25-051-CI)와 함께 37°C에서 30분 동안 또는 현미경 검증에 의해 세포가 플레이트로부터 분리될 때까지 배양함으로써 배양 플레이트로부터 분리되었다. 분리된 세포를 새로운 플레이트(Corning, 3799)로 옮기고 세척하여 트립신을 불활성화시켰다. 세포를 CD11b(Biolegend, 301306), B2M(Biolegend, 316312) 및 HLA-DR, DP, DQ(Biolegend, 361706)를 표적화하는 항체와 함께 어두운 곳에서 30분 동안 얼음 위에서 인큐베이션하였다. 이어서 세포를 세척하고 Cytoflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. 세포는 크기, 생존율, CD11b+ 개체군에 이어 B2M 음성 또는 HLA-DR, DP, DQ 음성 개체군에 게이팅되었다. 세포측정 데이터는 표 83 및 도 69a-b에 제시되어 있다. 이중 편집은 HLA-DR, DP, DQ 음성 및 B2M 음성 세포의 상당한 개체군이 무혈청 및 5% 인간 혈청 배지 조건 모두에서 2개의 LNP로 편집한 후 관찰되었기 때문에 성공적이었다.

표 83

일련의 LNP 처리 후 B2M 음성 세포 또는 HLA-DR, DP, DQ 음성 세포의 평균 퍼센트

혈청	1 일 편집	2 일 편집	% B2M 음성		% HLA-DR, DP, DQ 음성	
			평균	SD	평균	SD
무혈청 배지	0	0	1.95	1.84	11.28	5.12
	B2M	0	85.56	3.18	18.36	1.94
	CIITA	0	0.22	0.15	89.56	2.18
	B2M	CIITA	82.27	3.00	72.60	8.33
	CIITA	B2M	57.10	10.06	91.85	1.53
2.5% 인간 혈청	0	0	0.51	0.52	8.16	2.05
	B2M	0	81.42	0.87	28.75	9.31
	CIITA	0	0.00	0.00	77.75	4.39
	B2M	CIITA	86.77	1.65	54.88	3.62
	CIITA	B2M	63.56	2.93	69.04	4.44

[1621]

[1622] 실시예 34. 선별된 이온화가능한 지질로 단핵구 및 대식세포에서 편집

[1623] 선택된 이온화가능한 지질로 제형화된 LNP를 사용하여 편집 효능을 평가하기 위해, 단핵구 및 대식세포에서 NGS 및 유세포 분석법에 의해 편집을 평가하였다.

[1624] CD14+ 세포를 실시예 31에서와 같이 분리하고 향후 사용을 위해 냉동시켰다. CD14+ 세포를 해동하고 쉽게 분리할 수 있도록 비조직 배양 플레이트(Falcon, 351172)에서 10 ng/mL GM-CSF(Stemcell, 78140.1)를 사용하여 표 2에 설명된 대로 OpTmizer 기본 배지에서 100,000개 세포/웰로 삼중 배양하였다. 세포를 B2M을 표적화하는 Cas9(서열 번호 6) 및 gRNA G000529(서열 번호 701)를 암호화하는 mRNA를 전달하는 LNP로 처리하였다. 단핵구의 경우, LNP 추가는 조직 배양 플레이트에 플레이팅한 날과 같은 날 발생했다. 대식세포의 경우, 비조직 배양 플레이트(Falcon, 351172)에서 5일 배양 후 LNP 추가가 발생했다. LNP는 일반적으로 각각 이온화가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 물비로 표현되는 지질 조성이 50/10/38.5/1.5인 표 84 및 85에 나타난 이온화가능한 지질을 사용하여 실시예 1에서와 같이 제조하였다. LNP는 10 ug/ml에서 ApoE3(Peprotech 350-02)와 함께 15분 동안 37°C에서 사전인큐베이션하였다. 사전-인큐베이션된 LNP를 1:1 v/v 비율로 세포에 첨가하여, 2.5 ug/mL 또는 5 ug/mL의 최종 총 RNA 카고 용량을 산출하였다.

[1625] LNP 처리 6일 후, 단핵구-조작된 세포는 유세포 분석법에 의해 표현형이 결정되었고, 단핵구 및 대식세포-조작된 세포 둘 모두는 실시예 1에 기술된 바와 같이 NGS에 대해 수집되었다. 간략하게는, 실시예 31에 기재된 바와 같이 CD68, CD11b 및 HLA-ABC(Biolegend, 311432)를 표적화하는 항체와 세포를 인큐베이션하였다. B2M 대신에 HLA-ABC 표적화 항체를 사용하였다. 이어서 세포를 세척하고 Cytoflex 기기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. 세포는 크기, CD68+, CD11b+에 이어 HLA-ABC- 개체군에 게이팅하였다. 세포측정 데이터는 표 84 및 도 70에 제시되어 있다. NGS 편집 데이터는 표 85에 제시되어 있다. 지질 A 및 지질 D 제형 모두는 해동 후 0일 및 5일에 효과적인 편집을 나타냈다. RPMI 또는 XVIVO-15 배지에서 세포를 배양한 경우에도 편집이 관찰되었다.

표 84

다양한 이온화가능한 지질을 갖는 LNP 로 단백구를 편집한 후 세포에서 표면 단백질 녹아웃을 나타내는 세포의 평균 백분율

이온화가능한 지질	총 RNA (ug/ml)	%CD68+ CD11b+ HLA-ABC-	
		평균	SD
편집되지 않음	0	3.07	1.02
지질 A	2.5	80.08	3.14
지질 A	5	80.23	9.81
지질 D	2.5	58.48	11.52
지질 D	5	71.57	11.82

[1626]

표 85

다양한 이온화가능한 지질을 갖는 LNP 로 처리 후 세포내 평균 편집 백분율

이온화가능한 지질	총 RNA (ug/mL)	0일 편집		5일 편집	
		평균	SD	평균	SD
지질 A	2.5	85.70	3.51	93.13	3.15
지질 A	5	87.03	5.14	96.90	0.42
지질 D	2.5	81.77	1.50	77.77	3.23
지질 D	5	89.37	0.50	84.13	1.61

[1627]

[1628] 실시예 35. 지질 나노입자를 사용한 iPSC 편집

[1629] LNP를 통한 편집 효능을 결정하기 위해, 유도 만능 줄기 세포(iPSC)는 Cas9를 암호화하는 mRNA 및 B2M을 표적화하는 sgRNA를 전달하는 LNP로 처리한다.

[1630] TRBC1/2 유전자좌에서 편집된 인간 iPSC 세포는 상업적으로 입수된다. TRBC-편집 세포는 해동, 세척되고, 배지에 재현탁된다. 세포는 Geltrex(Thermo Fisher) 코팅된 플레이트에서 배지를 매일 교체하여 배양한다. 해동 5일 후, iPSC 세포를 해리하고 Geltrex 코팅된 96-웰 플레이트에 다시 플레이팅한다. 리플레이팅 후 24시간 후에 세포를 세척하고 배지에 재현탁한다. Cas9를 암호화하는 mRNA 및 B2M을 표적화하는 sgRNA를 전달하는 LNP는 37℃에서 15분 동안 ApoE3와 사전인큐베이션함으로써 제조된다. 사전-인큐베이션된 LNP 혼합물을 iPSC 세포로 옮긴다. 세포는 초기 LNP 노출 후 24시간 후에 세척되고 배지는 그 후 매일 재생된다. LNP 편집 후 3, 5 및 7일에 세포를 수집하고 B2M 유전자좌에서 게놈 편집을 위해 NGS로 분석한다.

[1631] 실시예 36. 혈청 배지 조건에서 평가된 LNP 조성물 활성

[1632] LNP 편집 효능을 평가하기 위해, LNP 조성물은 CD3 양성 T 세포에서 삽입 효율에 대한 대체 배지 조건의 효과를 평가하였다. T 세포를 Cas9 mRNA를 캡슐화하는 지질 성분 및 TRAC 유전자를 표적화하는 sgRNA의 다양한 물비를 갖는 LNP 조성물로 처리하였다. AAV6 바이러스 작제물은 TRAC 유전자좌(Vigene; 서열 번호 8)로의 부위-특이적 통합을 위해 상동성 아암에 측접해 있는 GFP 리포터를 암호화하는 상동성 방향성 복구 주형(HDRT)을 전달했다. TRAC 유전자 파괴는 T 세포 수용체 표면 단백질의 손실에 대해 유세포 분석법에 의해 평가하였다. 삽입은 GFP 발광에 대해 유세포 분석법에 의해 평가하였다.

[1633] LNP는 일반적으로 각각 이온화가능한 지질 A/콜레스테롤/DSPC/PEG의 물비로 표현된 표 86에 표시된 지질 조성을 사용하여 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조하였다. LNP는 인간 TRAC를 표적화하는 Cas9(서열 번호 6) 및 sgRNA G013006을 암호화하는 mRNA를 전달했다. sgRNA 대 Cas9 mRNA의 카고 비율은 중량 기준으로 1:2였다. LNP는 실시예 21에서와 같이 ApoE3와 사전인큐베이션하였다.

[1634] 실시예 21에 기술된 바와 같이, 하기 배지 변형으로 단일 공여자로부터의 T 세포를 제조하였다. T 세포를 2.5% 인간 AB 혈청(HABS), 2.5% CTS 면역 세포 SR(Gibco, 카탈로그 번호 A25961-01) 혈청 대체물(SR), 5% 혈청 대체물(SR) 또는 2.5% 인간 AB 혈청과 2.5% 혈청 대체물의 조합으로 보충된 배지로 플레이팅했다. T 세포는 실시예 21에 기술된 바와 같이 해동 24시간 후에 활성화되었다. 활성화 2일 후, T 세포는 실시예 21에 기술된 바와 같이 0.31 µg/ml, 0.63 µg/ml, 1.25 µg/ml, 및 2.5 µg/ml의 LNP로 형질감염하였다. TRAC 유전자좌(Vigene;

서열 번호 8)로의 부위-특이적 통합을 위한 상동성 아암이 측접해 있는 GFP 리포터를 암호화하는 AAV6를 3x10e5 바이러스 입자/세포의 감염 다중도(MOI)로 각 웰에 첨가하였다. DNA-의존성 단백질 키나아제의 소분자 억제제인 화합물 4를 0.25 uM로 첨가하였다. 24시간 후, 모든 세포를 5% HABS를 포함하는 배지로 나누었다.

[1635]

형질감염 5일 후, LNP 조성물의 삽입 효율을 평가하기 위해 실시예 21에 기술된 바와 같이 유세포 분석법 분석에 의해 T 세포를 표현형 결정하였다. 표 86은 CD3 음성 세포의 퍼센트를 보여준다. TRAC에 의해 암호화된 T 세포 수용체 알파 사슬은 T 세포 수용체/CD3 복합체 어셈블리 및 세포 표면으로의 전위에 필요하다. 따라서 게놈 편집에 의한 TRAC 유전자의 파괴는 T 세포의 세포 표면에서 CD3 단백질의 손실을 초래한다. 각 배지 조건에 대한 GFP 양성 T 세포의 평균 백분율은 표 87에 제시되어 있다. GFP 단백질을 발현하는 세포는 게놈으로의 성공적인 삽입을 나타낸다.

표 86

활성화된 T 세포를 AAV 및 지시된 LNP 제형으로 처리한 후 CD3 음성 T 세포 퍼센트.

조성	LNP (ug/ml)	2.5% HABS		2.5% SR		5% SR		2.5% HABS & 2.5% SR	
		평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
50/10/38.5/1.5	2.5	94.55	0.07	99.00	0.14	97.95	0.07	99.25	0.07
	1.25	92.25	0.35	96.05	1.20	92.10	2.55	95.95	0.21
	0.63	76.55	0.21	76.60	3.11	63.55	2.47	74.70	1.27
	0.31	48.35	1.34	25.95	1.20	16.55	2.47	41.55	1.20
35/15/47.5/2.5	2.5	99.40	0.00	98.80	0.42	98.65	0.07	98.70	0.14
	1.25	98.85	0.07	98.95	0.64	98.50	0.14	97.25	0.35
	0.63	94.10	0.28	96.80	0.42	95.25	0.35	84.60	1.41
	0.31	75.20	0.14	68.75	9.97	64.20	0.57	50.30	1.56

[1636]

표 87

활성화된 T 세포를 AAV 및 지시된 LNP 제형으로 처리한 후 GFP+ 세포 퍼센트.

조성	LNP (ug/mL)	2.5% HABS		2.5% SR		5% SR		2.5% HABS 및 2.5% SR	
		평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
50/10/38.5/1.5	2.5	94.6	0.0	95.4	0.4	93.7	0.6	90.0	0.1
	1.25	92.3	0.3	92.3	0.5	87.7	1.8	75.1	1.1
	0.63	76.6	0.1	76.3	1.3	63.1	1.8	31.2	2.6
	0.31	48.4	0.9	30.5	1.0	19.5	2.5	5.0	0.7
35/15/47.5/2.5	2.5	95.6	0.0	96.3	0.5	95.6	0.1	94.7	0.4
	1.25	94.8	0.5	96.0	1.4	95.6	0.0	91.1	0.2
	0.63	89.6	0.6	93.3	0.5	91.1	0.2	78.8	1.0
	0.31	74.7	0.1	75.0	0.0	64.4	0.4	48.8	1.2

[1637]

실시예 37. 지질 나노입자로 iPSC 편집

[1638]

LNP를 통한 편집 효율을 결정하기 위해, 유도 만능 줄기 세포(iPSC)를 Cas9를 암호화하는 mRNA 및 B2M을 표적화하는 sgRNA를 전달하는 LNP로 처리하였다.

[1639]

가이드 G014832(서열 번호 723)를 사용하여 Cas9 RNP로 전기천공에 의해 TRBC1 및 TRBC2 유전자좌에서 편집된 인간 iPSC 세포(Alstem, iPS11)는 재생 의학 상업화 센터에서 생산되었다. Geltrex(Thermo Fisher, A1413302)를 밤새 해동하고, DMEM/F-12(Thermo Fisher, 11330032)로 1:100 희석하고, 6-웰 플레이트(Falcon, 140675)의 1mL/웰에 적용했다. Geltrex 처리된 플레이트를 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하고 사용 전에 세척하였다.

[1640]

TRBC-편집된 iPSC를 해동하고, 세척하고, 실온 Essential 8(E8) 배지(Thermo Fisher, A1517001)에 재현탁하고, Geltrex-코팅된 6웰 플레이트의 2개 웰에서 37℃에서 배양하였다. 배지는 실온 E8로 매일 새로 교체하였다.

[1641]

해동 5일 후, 세포를 분할하기 3시간 전에 세포 배지를 교체하였다. iPSC를 2 mL/웰 PBS(Corning, 21-040-CM)로 세척하였다. 젠틀 세포 해리 시약(Gentle Cell Dissociation Reagent)(StemCell Technologies, 07174)을 0.5mL/웰로 첨가하고 고르게 분배하였다. 세포를 37℃에서 12분 동안 배양하고, 플레이트를 두드려 세포를 분리하고, 세포를 실온 E8 배지 1 mL에 재현탁했다. 위아래로 피펫팅하여 플레이트에서 세포를 수집했다. 추가 1 mL 배지를 사용하여 플레이트를 세척하고 모든 세포를 회수했다. 총 세포수는 혈구계산기로 얻었다. 96-웰 플레이트(Thermo Fisher, 353072)는 60 uL/웰 희석 Geltrex를 사용하여 상기와 같이 제조하였다. 세포를 200G에서 3

[1642]

분 동안 원심분리하고 10uM Rock 억제제 Y-27632 디히드로클로라이드(Tocris, 1254)가 포함된 80 uL 실온 E8 배지에서 15,000개 세포/웰의 세포 밀도로 Geltrex-코팅된 96-웰 플레이트에 플레이팅하였다. 37℃에서 24시간 인큐베이션한 후, 세포를 세척하고 40 uL 실온 E8 배지에 재현탁시켰다.

[1643] 세포를 B2M을 표적화하는 Cas9(서열 번호 6) 및 gRNA G000529(서열 번호 701)를 암호화하는 mRNA를 전달하는 LNP로 처리하였다. LNP는 일반적으로 각각 이온화 가능한 지질/콜레스테롤/DSPC/PEG의 물비로 표현되는 50/10/38.5/1.5의 지질 조성을 갖는 실시예 1과 같이 제조되었다. LNP는 gRNA 대 mRNA의 중량비가 1:2로 제조되었다. LNP는 37℃에서 15분 동안 10 ug/mL ApoE3와 함께 5 ug/mL에서 사전 인큐베이션되었다. LNP 혼합물을 iPSC 세포로 옮겨 웰당 총 RNA 카고 2.5 ug/mL의 최종 용량을 산출했다. LNP 첨가 24시간 후 세포를 세척하고 그 후 매일 배지를 새로 교체하였다. LNP 첨가 후 3, 5 및 7일에 세포를 수확하고 실시예 1에 기재된 바와 같이 NGS로 분석하였다. LNP 처리 후 iPSC에서 평균 편집 백분율을 표 88에 나타내었다.

표 88

LNP로 iPSC 처리 후 지시된 시점에서의 편집 퍼센트

일	편집되지 않음 세포		2.5 ug/mL LNP		N
	평균	SD	평균	SD	
3 일	0.07	0.06	96.03	1.46	3
5 일	0.03	0.06	95.10	1.47	3
7 일	0.20	0.26	98.60	0.44	3

[1644]

[1645] [표 89]

[1646]

서열 목록

서열 목록

하기 표 및 전체에서, 용어들 “mA,” “mC,” “mU,” 또는 “mG”는 2'-O-Me 로 변형된 뉴클레오타이드를 나타내기 위해 사용된다.

하기 표에서, “*”는 PS 변형을 나타내는데 사용된다. 본 출원에서, 용어 A*, C*, U*, 또는 G*는 PS 결합으로 다음(예를 들어, 3') 뉴클레오타이드에 연결된 뉴클레오타이드를 나타내기 위해 사용될 수 있다.

DNA 서열(T 포함)이 RNA 와 관련하여 참조되는 경우, T 는 U (문맥에 따라 수정되거나 수정되지 않을 수 있음)로 대체되어야 하며, 그 반대의 경우도 마찬가지인 것으로 이해된다.

하기 표에서, 단일 문자 코드는 펩티드 서열을 제공하기 위해 사용된다.

설명	서열 번호	서열
gRNA G000529	701	mG*mG*mC*CACGGAGCGAGACAUCUGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G013674	702	mU*mU*mC*UAGGGGCCCCAACUCCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G012086	703	mA*mG*mA*GUCUCUCAGCUGGUACAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G016239	707	mG*mG*mC*UCUGGCGCUGACGAUCUGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G013006	708	mC*mU*mC*UCAGCUGGUACACGGCAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G012738	709	mG*mG*mC*CACGGAGCGAGACAUCUGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G000562	710	mC*mC*mA*AUUCAGGAGACUAGGAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G015995	711	mU*mU*mA*CCCCACUUAACUAUCUUGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G016017	712	mC*mC*mA*UCUGCCCCAUGGGCUCGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
gRNA G016206	713	mC*mG*mC*UGUCAAGUCCAGUUCUAGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm

[1647]

[illegible]

설명	서열 번호	서열
		caaccgacttcgacagccagaccacgtgtccagagcaaggagcagcgtgtacatcaccgataagactgtgc tggacatgcggagcatgacttcaagagcaacagcggcgtgctgtcacaagagcgttgcgtcggcc aacgcttcaacaacagcattatcccgaagacacattctccaagtctgaagacagctgcgacgtgaagctg gtgaaagagcttcgagacagacacacactgaactccagaacctgagcgtgacgtggtctagaatcctgtg ctcaaggtgcccgttcaactgctgtagacacctgagactgtgtccactaactCGACTGTGCTT CTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCTTCCCTTCTTAATAAATGAGGAA CCCTGGAAGGTGCCACTGCCACTGTCTTCTTCTAATAAATGAGGAA ATTGCATCGCATGTTCTGAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGGGGTGG GGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAG GCATGCTGGGGATCGGGTGGGTCTATGGcttctgagcggaaagaaccagctggg ctctaggggtatcccactagctgtgtacagcgtgagagacttaatacagtgacagctgtctgctcctatcacc gatitgtattctcaacaagtgtctcaaaagtaaggatctgtgtgtatctatcagacaaaactgtgtcagacafga ggtctatgacttcaagaacacactgtctgtgctgagacaacaatctgacttgcattgtgcaaacgcttcaac aacagcattattccagaagacacttcttcccagccagtaaggcagcttctgtccttgcaggctgttctt gctcaggaatgccagcttctcccagagctctgtcaatgtgtctaaactcctctgattgtgtctgctgctt atccattgccacaaaccccttttactagaacagtgacgttctgtctgagtcagagaatgacacgggaa aaaaagcatgaaagaaaggtgagcagagaagcagctgcccagcctcagctctatctatgaaaccccta gtgtgaggttgagcactcctctctgacgctcgtcgtcactgaagccgcccgaagcccgggagctg ggcgaccttctgcccggctcagtgagcagcagcgcgcagagagagagtgccaa
pRNA G016200	718	mC*mC*mA*CAACCAAAAGGCCACACGUUUUAGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCAAGUUAUAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
pRNA G016086	719	mC*mG*mC*CCAGGUCCUACGUCUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCAAGUUAUAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAm CmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmC mGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
AAVS1 을 위한 AAV6-1008 GFP 삽입	720	tgcatacaccgtttttctgacaaccccagaatccctgtctcctgtctttagccacctctccatctctgttctt ttgctctgacaccccggtctctctgtgattcgggtcacctctactcttcttalttggcagctccctacccccttac ctctctagtctgtctagcttccagcccccgtctatggcatcttccaggggtccagagctcagctagtcttcttct ccaacccggggccctatgttccactcaggacagcattgttctgctccagggagctcgttcccgagctgggac cactttatattccagggccgttaattgtgactctgttctggtacttttctctccctccaccacagtgaggc cactaggacagagattgtgacagaaaagccccccttaggcctctctctccgagtaattcacaagaagact cgcccctgcttggggaatccagggagcgtgttaactcccactaacgtagaaccagagatcgtcgttcc cgcccctcaccgcccgtctctgcatcactgaggtgagagagcagcagctgtaggctcgtgagccctcagtg gggcagagcgacatcgcaccagctcccgagaagtggggggggggctggcaattgaaccgggtcctaga gaaggtgagcggggttaactgggaagtgatgtctgtactgctccgctttttccgaggtggggagaa ccgtatataagtcagtagtgcctgtaagcttcttttgcacgggtttccgcagaaacagtagtgccgt gtgtgttcccgagcgtgctctttacgggttatgcccgtgctgctgaattacttccacgcccctgtctg agtagtgattctgatccgagctcgggttgaaagtgtggaagatgcagagccttcgcttaaggagcccc ttgcctctgtcttgattgagcctgcttggcgcgtggggcccgcgctgcgaatctgttgaccctctgcgc ctgctcgtcttctgataaagctctagccattaaattttgatgactctgagcgttttttctgcaagatagt ctgttaaatcgggccaactctgcacactgtatttctgtttttggggccggggcggcagcggggccgtgct ccagcgcacatcttgacgagcggggcctgcagacgcagccacagaaatcgagcggggtagtctcaag ctgcccgcctctctgctgctgctgctgcccgcctgtatcgcccgcctggcggcgaagctggccc gtggcaccagttgctgagcggaaagatggccgttccggccctgctgagggagctcaaatggagagc cggcgtcggagagcgggctgggtgagtcacccacacaaaggaaaggcccttccgtctcagccgtcctt calgtgactccacggataccggcgccgttcagggacctcgtattgtctgagcttttggatagctgtcttga ggttgggggggggttttategatgagtttccacactagtgagtgagactgaagttaagccagcttg cacttgatgaattctcttgaatttgccttttgaatttggatttggcttcttcaagcctcagacagtggttcaaa gtttttttccatttcaggtctgtgacgctagcactccgactcaatctgaactcaagcttgaattctgacgtc gacgttaccgggggggggacccagcgtcgcacatggtgAGCAAGGGCGAGGAGCTG TTCACCGGGGTGGTGCCCATCTGCTGAGCTGGACGGCGACGTAAA CGGCCACAAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACC TACGGCAAAGCTGACCCGTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCC CGTGGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCGAGT GCTTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGCAGCTTCTTCAAG TCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTCAA

[1649]

설명	서열 번호	서열
AAVS1 을 위한 AAV6-231 GFP 삽입	721	GGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGC GACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGG AGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAACAG CCACAACGCTATATCATCGGCGGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAG GTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTCAGC TCGCCGACCACTACAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTG CTGCTGCCGACAACTACTGAGCAGCCAGTCCGCCCTGAGCAA AGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAGATGGTCTGCTGGAGTTCGTG ACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGtaagcg gcccgaactctagatataatcagccatacacattgttagaggtttacttctttaaanaacccacacccccc ctgaacctgaacataaataaagcaattgtttgttaactgtttattgcagctataatgtttacaataaagcaat agcatcacaaatttcacaaataaagcatttttttctgctcattctagttgtggtttccaaactcatcaatgtatctaaag gcgttagctctctgataattggtctaaacccacccctctgttagcagatcttattctgtgacacaccccccatttct ggagccatctctctctgagaaaccttaaggtttgttactgagcagcagagagagctcgtggaggagag cttgcagggagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag ctccagaaacctgagctctctgagcggccgtctggtgctgttactgactctggtgctgagcttcttactt ccaagaagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag gtcccaatttataatttctctccgtgctcagttttactgtgagataagccagtagccagcccggt
		gaccactttagctctactgactctgacgcccctctgacccactgtttcccttccagcaggtctgtcttctg acctgacttctctccctggcctgtgcccgttctgtctgagctgtggtccctggtctacactctacgctggcccag atcttccctgcccgcctcttctgagcttcttctctcactccttctccctgtctctgactgtttagtcccaagg atgtcttctggagcacttctctctgcccgtcagccagctgagctctgagcagatccctccctgtctggtc ctctccggcactctctctcctcaccacccacatccgtcttactctgctggttcccttctctctctgaggg ccgtgacatctctgtttcttagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag tgcacatcacccgtttttctggacaacccaaagtaacccgtctccctgttttagccactctcactctctgttct ttactgacacccgttctctgtgagtgagtgacactcactcacttctttaggagagctccctaccccccttact ctctgagctgtgtagctctctcagccccctgctagcactctcaggggtcagagagctagctgcttcttct ccaacccggccccttatgtcactcagagacagatgttctgctcctcagagagatctgtctccagagagagag cactttatctccagggccggttaattggtctgtgttctggtgactttatctgtccctcaccacacagtgaggc cactagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag aggactgcccctgctgtgagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag cgttcccccctcaccgccctctctgctatcactgagtgagagagagagagagagagagagagagagagagag gtcagtgagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag cctagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag gagaacgtatataatgacagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag gcccgtgtgtgttccggagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag gctgcagtagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag gccccttgcctctgctgagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag gcccgtctctgctgttctgataagctctcagcatttaaaattttgatgactgctgagcagcttttttctgcaag atagctctgtataatgagggccaaCafctgacactgctatttctgtttttggggccggagagagagagagag gtgctctcagagcagatgttgcggcagggcgggctcagcagcggccaccagagagagagagagagagagag ctcaagctgcccgcctgtctgtgctgagcctgcccgcctgtatctgcccgcctgtgagagagagagagag gcccgtcggcagcagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag ggagcggcggctcgggagagcggcggggtgagtagcaccacacaaagaaaaggccttctcctcagccg tcgcttctgactcacgagtagcggcggcgtcagcagcagctgattgttctgagcttggagtagctg tcttaggttggggagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagagag cttgcagctgagtagtattctctggaattgcccctttttaggttggatctgacttctcagcagagagagagag caaaattttttcttcattcagagtagctgacgtagcgtacccagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc agtcagagtagcggggccgggagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagcagc GCTGTTCAACGGGGTGGTGCCATCTGCTGAGAGCTGGACGGCGACG TAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGC CACTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTTATCTGACACACCGGCAAGC TGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCAACCCCTGACCTACGGCGTG CAGTGCTTCAGCGCTACCCGACACATGAAGCAGCAGCAGCTTCTT CAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCT TCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGA GGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTC AAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATA

[1650]

- 197 -

서열명	서열번호	서열
		CAGCGCGTACCCCGACCACATGAGGACGACGACTTCTTCAAGTCGC CCATGCCGCGAAGGCTACGCTCGGAGCGGCGCCACCTTCTTCAAGGAC GACGCGCAACTACAAGACGCCGCCGCGAGGTTGAAAGTTCGAGGGCGACA CCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAGGCGATCGACTTCAAGGAGCA CGGCAAGCACTCTGGGCGACAAGCTGGAGTACAACATACAAGCCAC AACGCTGTATATCATCGGCCGACAAGCAAGAAAGCGCATCAAGGTGA ACTTCAAGATCGGCCACAACATCGAGGACGCGAGGCTGCAGCTCGC CGACCACTACGACGAGAACCACCCCATCGGCGAGCGGCCCGCTGCG TGCCCGACAACCACTACTCGTAGCACCAGCTCGGCCCTGAGCAAGAGC CCCCAAGCAGAAAGCGGCATCATAGTCTGCTGGAGTGTCTGAGCCGC CGCGGGGATCACTCTTCGCGATGGCGAGCGCTGACAAAGTAATCTAGAc ctCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGGCCATGTGTGTTTGCCCTCCCC GTGCTTCTTGACTGCCAGTGGAAAGTGCCACTCCCACTGCTCTTCTAA TAAATATGAGGAAATTGCATTCGATTGTCTGAGTAGGTGTCAATTCTAT TCTGGGGGTGGGGTGGGCGAGCAGCAAGGAGGGAGGATTGGGA AGACAATAAGCAGGCATGCTGGGGATCGGGTGGGCTCTATGCGtttgagg cggaaagacacagctgggactctagggggtatcccACTAGTtctctgctcgtgctgtgctgc cgtcatctctcttctgctgaggtatcatcagctgtctctctctccctcgtctgtctctccgct ctgcacccctcttgctgctcgtctgctctctctgctgaactctctcaggtctctgtggccgcgctg ggctagtctcaaggctgctatctcggaagcagcgcggtgtaccttggaattgcaaggaggtatgcacaccgc ggacgcgcctactctctctctggcgaggagggagagcttggctacggc-gac-gggagagtgctggc acaaagctttaggagcgtctgataagctcagcagcgcgcgaggttgagggaggtctctctccgctcttcgcggggc ctctctcccccacgcgcctgaggtggagggagcgttagagc
G014832	723	m⁶m³m²m⁴UCUCGGAGAAUAGCAGAGGUUUUAGAmGmCmUmAmGm AmAmAmUmAmAmGmCAAGUUAAAAUUAGGCUAUGUCGUUAUCAmAm CmUmAmUmAmAmAmAmAmAmUmGmGmCmAmCmUmCmAmGmUmCm CmGmUmUmCmU⁺mU⁺mU⁺mU
ORF 암호화 Sp. Cas9	서열 번호 1	ATGGACAAGAAGTACAGCATCGGACTGGACATCGGAAACAAACAGCG TCGATGGGGAGCTATCACAGCAAGTAACAAGGTCCCGAGCAAGAA GTTCAAGGCTCTGGAAACACAGACAGCAGCATCAAGAAGAAC CTGATCGGAGCACTGCTGTCTGCAGACCGGAGAAACACAGCAAGCA ACAAGACTGAAGAGCAATACGAACAAGAAAGATACCAAGCAAGAAAGA ACAGAAATCTGCTACCTTGCAGGAAATCTTCAGAGCAAGAAATGGCAA GGTCGAGCAGCAGCTTCTTCCACAGACTGGAAGAAAGCTTCTGTGCG AAGAAGACAGAAGACAGCAAGACACCCGATCTTCGGAACAATCGT CGACGAAGTCGCATACCCAGCAAGTACCCGCAACTCTACCACCTG AGAAAGAAGCTGTGTCGACAGCAGACAGCAAGCGACAGCTGAGCTGA TCTACTCTGGCACTGGCACACATGATCAAGTTTCAGAGGACACTTCTGT ATCGAAGGAGACCTGAACCCCGGACATCAAGCTGCGCTGACAGCTGT TCATCCAGCTGTGTCGAGATATCAACACCGACTGTTCGAAAGAAACCCG ATCAACGCAAGAGAGCTGACGACGAAAGGCAATCTTGAGCGCAAGAC TGAGCAAGAGACGAAGACTGGAAACCTGATCGCACAGCTGCCGGG AGAAAAGAAAGAACCGGACTGTTCGGAAGACTGATCGCATGAGCGCTG GAGTGACACCCGAACTTCAAAGGCAACTCTGCAGCTGGCAGAAAGC CAAGGCTGCACTGAGCAAGGACACATACGACGACGACCTGGACA CTCTGCTGGCACAGATCGGAGCAACTGACCGACAGCCTGTCTGGAG CAAGAACAAGCTGAGCGACGACCTTCTGCTGAGGCAATCTTGAGAT CAACACAGAAATCACAAGGCAACCGCTGAGCGCAAGCATGATCAAG AGATACGACGAACACCAACGAGGACCTGCACACTGCTGAAGCCAGTGG TACAGCAGCAGCTGCCGGAAGAAAGTACAAGGAAATCTTCTTCGACCA GAGCAAGAAGCCGATACGCGAGATACATCGCAGCGAGGAGCAAGCCA GGAAAGAAATTCACAAGTTCTATCAAGCCGATCTCGGAAAGAAATGGAC GGAAACAGAAAGAACTGCTGGTCAAGCTGAACAGAGCAAGAAAGCTGTGA GAAAGCAGAGAAACTTCGACAACCGGAAGCATCTCCGACACCATGACA CTTGGGAGAACTGCACGCAATCTCTGAGAAGCAGGAAGAACTTCTAC CCGTTCTCTGAAGGACAACAGAGAAACATGAAAGAACTCTTGACAT TCAGAAATCCCGTACTACGTGGCAGCGCTGGCAAGAGGAACACCGGT ATTGCGATGGTGAACAAGAAAGGCGGAAGCAACAAATCAACACCGTGA

설명	서열 번호	서열
		A A C T T C G A A G A A G T C G T C G A C A A G G G A G C A A G C G C A C A G A G C T T C A T C G A A A G A A T G A C A A A C T T C G A C A A G A A C C T G C C G A A C G A A A A G G T C C T G C C G A A G C A C A G C C T G C T G T A C G A A T A C T T C A C A G T C T A C A A C G A A C T G C A A A G G T C A A G T A C G T C A C A G A A G G A A T G A G A A A G C C G G C A T T C C T G A G C G G A G A A C A G A A G A A G G C A A T C G T C G A C C T G C T G T T C A A G A C A A A C A G A A A G G T C A G A G T C A A G C A G C T G A A G G A A G A C T A C T T C A A G A A G A T C G A A T G C T T C G A C A G C G T C G A A A T C A G C G G A G T C G A A G A C A G A T T C A A C G C A A G C C T G G G A A C A T A C C A C G A C C T G C T G A A G A T C A T C A A G G A C A A G G A C T T C C T G G A C A A C G A A G A A A C G A A G A C A T C C T G G A A G A C A T C G T C C T G A C A C T G A C A C T G T T C G A A G A C A G A G A A A T G A T C G A A G A A A G A C T G A A G A C A T A C G C A C A C T G T T C G A C G A C A A G G T C A T G A A G C A G C T G A A G A G A A G A G A T A C A C A G G A T G G G G A A G A C T G A G C A G A A A G C T G A T C A A C G G A A T C A G A G A C A A G C A G A G C G G A A A G A C A A T C C T G G A C T T C C T G A A G A G C A C G G A T T C G C A A A C A G A A A C T T C A T G C A G C T G A T C C A C G C A C A G C C T G A C A T T C A A G G A A G A C A T C C A G A A G G C A C A G G T C A G C G G A C A G G G A G A C A G C C T G C A C G A A C A C A T C G C A A A C C T G G C A G G A A G C C C G G C A A T C A A G A A G G G A A T C C T G C A G A C A G T C A A G G T C G T C G A C G A A C T G G T C A A G G T C A T G G G A A G A C A C A A G C C G G A A A C A C T C G T C A T C G A A A T G G C A A G A G A A A C C A G A C A A C A G A A G G G A C A G A A G A A C A G C A G A G A A A G A A T G A A G A G A A T C G A A G A A G G A A T C A A G G A A C T G G G A A G C C A G A T C C T G A A G G A A C A C C C G G T C G A A A C A C A C A G C T G C A G A A C G A A A A G C T G T A C C T G T A C T A C C T G C A G A A C G G A A G A G A C A T G T A C G T C G A C C A G G A A C T G G A C A T C A A C A G A C T G A G C G A C T A C G A C G T C G A C A C A C A T C G T C C C G C A G A G C T T C C T G A A G G A C G A C A G C A T C G A C A A C A A G G T C C T G A C A A G A A G C G A C A A G A A C A G A G G A A A G A G C G A C A C G T C C C G A G C G A A G A A G T C G T C A A G A A G A T G A A G A A C T A C T G G A G A C A G C T G C T G A A C G C A A A C G T G A T C A C A G A G A A A G T T C G A C A A C C T G A C A A A G G C A G A G A G A G G A G G A C T G A G C G A A C T G G C A A A G G C A G G A T T C A T C A A G A G A C A G C T G G T C G A A A C A A G A C A G A T C A A A A G C A C G T C G C A C A G A T C C T G G A C A G C A G A A T G A A C A C A A A G T A C G A C G A A A C G A C A A G C T G A T C A G A G A A G T C A A G G T C A C A C A C T G A A G A G C A A G C T G G T C A G C G A C T T C A G A A A G G A C T T C A G T T C T A C A A G G T C A G A G A A T C A C A A C T A C C A C C A C G C A C A C G A C G C A T A C C T G A A C G C A G T C G T C G G A A C A G C A C T G A T C A A G A A G T A C C C G A A G C T G G A A A G C G A A T T C G T C T A C G G A G A C T A C A A G G T C T A C G A C G T C A G A A A G A T G A T C G C A A A G A G C G A A C A G G A A A T C G G A A A G G C A A C A G C A A A G T A C T T C T C A G C A A C A T C A T G A A C T T C T T C A A G A C A G A A A T C A C A C T G G C A A A C G G A G A A A T C A G A A A G A G A C C G C T G A T C G A A A C A A A C G G A G A A A C A G G A A A T C G T C T G G G A C A A G G G A A G A G A C T T C G C A A C A G T C A G A A A G G T C C T G A G C A T G C C G C A G G T C A A C A T C G T C A A G A A G A C A A G T C C A G A C A G A G G A T T C A G C A A G G A A A G C A T C C T G C C G A A G A G A A A C A G C G A C A A G C T G A T C G C A A G A A A G A A G G A C T G G G A C C C G A A G A A G T A C G G A G G A T T C G A C A G C C C G A C A G T C G C A T A C A G C G T C C T G G T C G T C G C A A A G G T C G A A A A G G G A A A G A G C A A G A A G C T G A A G A G C G T C A A G G A A C T G C T G G G A A T C A C A A T C A T G G A A A G A A G C A G C T T C G A A A A G A A C C C G A T C G A C T T C C T G G A A G C A A A G G G A T A C A A G G A A G T C A A G A A G G A C C T G A T C A T C A A G C T G C C G A A G T A C A G C C T G T T C G A A C T G G A A A A C G G A A G A A A G A G A A T G C T G G C A A G C G A G G A A C T G C A G A A G G G A A A C G A A C T G G C A C T G C C G A G C A A G T A C G T C A A C T T C C T G T A C C T G G C A A G C C A C T A C G A A A A G C T G A A G G G A A G C C C G G A A G A C A A C G A A C A G A A G C A G C T G T T C G T C G A A C A G C A C A A G C A C T A C C T G G A C A A A T C A T C G A A C A G A T C A G C G A A T T C A G C A A G A G A G T A T C C T G G C A G A C G C A A A C C T G G A C A A G G T C C T G A G C G A T A C A A C A A G C A C A G A G A C A A G C C G A T C A G A G A A C A G G C A G A A A C A T C A T C C A C C T G T T C A C A C T G A C A A A C C T G G G A G C A C C G C A G C A T T C A A G T A C T T C G A C A C A C A A T C G A C A G A A A G A G A T A C A C A A G C A C A A A G G A A G T C C T G G A C G C A A C A C T G A T C A C C A

[1653]

설명	서열 번호	서열
ORF 암호화 Sp. Cas9	서열 번호: 2	GAGCATCACAGGACTGTACGAAACAAGAATCGACCTGAGCCAGCTG GGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCCGAAGAAGAAGAGAAAGGTCTAG ATGGACAAGAAGTACTCCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCCGT GGGCTGGGCGGTGATACCGACGAGTACAAGGTGCCCTCCAAGAAG TTCAAGGTGCTGGGCAACACCGACCGGCACTCCATCAAGAAGAACC TGATCGGCGCCTGCTGTTTCGACTCCGGCGAGACCGCGAGGCCACC CGGCTGAAGCGGACCGCCGCGCGGTACACCGCGCGAAGAACC GGATCTGCTACCTGCAGGAGATCTTCCACGAGATGGCCAAAGGTG GACGACTCCTTCTCCACCGGCTGGAGGAGTCTTCTGTTGGAGGA GGACAAGAAGCAGGACCGGCAACCCATCTTCGGCAACATCTGGGAC GAGGTGGCTTACCAAGAGAAGTACCCACCATCTACCACTGGGA AGAAGCTGGTGGACTCCACCGACAAGGCGGACCTGCGGCTGATCTA CCTGGCCCTGGCCACATGATCAAGTTCGGGGCCACTTCTGATCG AGGGCGACCTGAACCCGACAACCTCCGACGTGGACAAGCTGTTTCATC CAGCTGGTGCAGACCTACAACAGCTGTTGAGGAGAAGCCCATCA ACGCTCCGGCGTGGACGCCAAGGCCATCTGTCGGCCCGGTGTCC AAGTCCGCGCGGTGGAGAACCTGATCGCCAGCTGCCCGCGAGA AGAAGAACGGCCTGTTTCGGCAACCTGATCGCCCTGTCTGGGCTG ACCCCAACTTCAAGTCAACTTCGACCTGGCCGAGGACGCCAAGCT GCAGCTGTCCAAGGACACCTACGACGACGACCTGGACAACCTGCTG GCCCAGATCGGCGACCAAGTACGCCGACCTGTTCTGGCCGCAAGAA CCTGTCCGACGCCATCTGCTGTCCGACATCTGCGGGTGAACACCG AGATCAACAAGGCCCTGTCGCCCTCCATGATCAAGCGGTACGAC GAGCACCAAGGACCTGACCTGCTGAAGGCTGTGGCGGACG AGCTGCCGAGAAGTACAAGGAGATCTTCTCGACCAAGTCAAGAA CGGCTACCGCGGTACATCGACGGCGGCGCTCCAGGAGGAGTCT ACAAGTTTCATCAAGCCATCTGGAGAAGATGGACGGCACCGAGGA GCTGCTGGTGAAGCTGAACCGGGAGGACCTGTCGGGAAGCAGCGG ACCTTCGACAACGGCTCCATCCCCACAGATCCACCTGGGCGAGCT GCACGCCATCTGCGGCGGACGAGGAGTCTACCCCTTCTGAAGG ACAACCGGGAGAAGATCGAGAAGATCTGACCTTCGGATCCCTA CTACGTGGGCCCCCTGGCCGCGGCAACTCCGGTTTCGCTGGATGA CCCGGAAGTCCGAGGAGACCATACCCCTGGAATTCGAGGAGGT GGTGACAAGGGCGCTCCGCCAGTCTTCATCGAGCGGATGACCA ACTTCGACAAGAACCTGCCCAACGAGAAGGTGCTGCCAAGCACTC CCTGCTGTACGAGTACTTACCGTGTACAACGAGCTGACCAAGGTGA AGTACGTGACCGAGGGCATCGGAAGCCGCTTCTGTCCGGCGA GCAGAAGAAGGCCATCGTGGACCTGCTGTCAAGACCAACCGGAAG GTGACCGTGAAGCAGCTGAAGGAGGACTACTTCAAGAAGATCGAGT GCTTCGACTCCGTGGAGATCTCCGCGTGGAGGACCGGTTCAACGCC TCCCTGGGACCTACCACGACCTGCTGAAGATCATCAAGGACAAGG ACTTCTGGACAACGAGGAGAACGAGGACATCTGGAGGACATCGT GCTGACCTGACCTGTTTCGAGGACCGGAGATGATCGAGGAGCGG CTGAAGACCTACGCCACCTGTTTCGACGACAAGGTGATGAAGCAGCT GAAGCGGCGCGGTACACCGGCTGGGGCGGCTGTCCCGGAAGCTG ATCAACGGCATCCGGGACAAGCAGTCCGGCAAGACCATCTGGACT TCCTGAAGTCCGACGGCTTCGCCAACCGGAATTCATGACGTGATC CACGACGACTCCCTGACCTTCAAGGAGGACATCCAGAAGGCCAGG TGTCGGCCAGGGCGACTCCCTGCACGAGCACATCGCCAACTGGCC GGCTCCCCCGCATCAAGAAGGGCATCCTGCAGACCGTGAAGGTGG TGGACGAGCTGGTGAAGGTGATGGGCGGCACAAGCCGAGAACAT CGTGATCGAGATGGCCCGGAGAACAGACCAACCAAGGGGCCAG AAGAAGTCCCGGAGCGGATGAAGCGGATCGAGGAGGGCATCAAGG AGCTGGGCTCCAGATCTGAAGGAGCACCCCGTGGAGAACACCA GCTGCAGAACGAGAAGCTGTACCTGTACTACCTGCAGAACGGCCGG GACATGTACGTGGACGAGGAGCTGGACATCAACCGGCTGTCCGACT ACGACGTGGACACATCGTGCCCAAGTCTTCTGAAGGACGACTCC ATCGACAACAAGGTGCTGACCCGGTCCGACAAGAACCGGGCAAGT

[1654]

설명	서열 번호	서열
		CCGACAACGTGCCCTCCGAGGAGGTGGTGAAGAAGATGAAGAACTA CTGGCGGCAGCTGCTGAACGCCAAGCTGATACCCAGCGGAAGTTC GACAACCTGACCAAGGCCGAGCGGGCGGCTGTCCGAGCTGGACA AGGCCGGCTTCATCAAGCGGCAGCTGGTGAGACCCGGCAGATCAC CAAGCACGTGGCCAGATCTGGACTCCGGATGAACACCAAGTAC GACGAGAACGACAAGCTGATCCGGGAGGTGAAGGTGATACCCCTGA AGTCCAAGCTGGTGTCGACTTCCGGAAGGACTTCCAGTTCTACAAG GTGCGGAGATCAACAATACCACCACGCCACGACGCTACCTGA ACGCCGTGGTGGGCACCGCCTGATCAAGAAGTACCCCAAGCTGA GTCCGAGTTGCTGTACGGCGACTACAAGGTGTACGACGTGCGGAAG ATGATCGCCAAAGTCCGAGCAGGAGATCGGAAGGCCACCGCAAGT ACTTCTTCTACTCCAACATCATGAATTTCTTCAAGACCGAGATCACCC TGGCCAACGGCGAGATCCGGAAGCGGCCCTGATCGAGACCAACGG CGAGACCGCGAGATCGTGTGGGACAAGGGCCGGGACTTCGCCACC GTGCGGAAGGTGCTGTCATGCCCAAGGTGAACATCGTGAAGAAGA CCGAGGTGCAGACCGCGGCTTCTCAAGGAGTCCATCTGCCCAAG CGGAATCCGACAAAGCTGATCGCCCGGAAGAAGGACTGGGACCCCA AGAAGTACGGCGGCTTCGACTCCCCACCGTGGCTACTCCGTGCTG GTGGTGCCAAAGGTGAGAAAGGCAAGTCCAAGAAGCTGAAGTCCG TGAAGGAGCTGCTGGCATCACCATCATGGAGCGGTCTCTCTCGAG AAGAACCCTCGACTTCTCGAGGCCAAGGGCTACAAGGAGGTGA AGAAGGACCTGATCATCAAGTGGCCAAAGTACTCCCTGTTTCGAGCTG GAGAACGGCCGGAAGCGGATGCTGGCCTCCGCCGGCGAGCTGCAGA AGGGCAACGAGCTGGCCCTGCCCTCCAAAGTACGTGAACCTCTGTATC CTGGCTCCCACTACGAGAAGCTGAAGGGCTCCCCGAGGACAACG AGCAGAAGCAGCTGTTCTGGAGCAGACAAGCACTACCTGGACGA GATCATCGAGCAGATCTCCGAGTTCTCCAAGCGGGTATCTGGCCG ACGCCAACCTGGACAAGGTGCTGTCCGCTACAACAAGCACCGGGA CAAGCCATCCGGGAGCAGGCCGAGAATCATCACTGTTTCAACC TGACCAACCTGGCGGCCCGCCGCTTCAAGTACTTCGACACCACC ATCGACCGGAAGCGGTACACCTCCACCAAGGAGGTGTTGGACGCCA CCCTGATCCACAGTCCATACCGGCTGTACGAGACCCGGATCGAC CTGTCCAGCTGGCGGCGACGGCGCGGCTCCCCAAGAAGAAGC GGAAGGTGTGA
Hibit 태그를 찾는 Cas9를 위한 오픈 리딩 프레임	서열 번호 3	AUGGACAAGAAGUACUCCAUCGGCCUGGACAUCGGCACCAACUCC GUGGGCUGGGCCGUGAUCACCGACGAGUACAAGGUGCCUCCAAAG AAGUUCAGGUGUGUGGCAACACCGACCGGCACUCCAUCAAGAAG AACCUGAUCGGCGCCUGCUGUUGACUCCGGCGAGACCGCGGAGG CCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGCGCGGUAACCCGGCGGAA GAACCGGAUCUGCUACCGCAGGAGAUUUCUCCAACGAGAUGGC CAAGUGGAGCAGUCCUUCUCCACCGGUGGAGGAGUCCUUCU GGUGGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCAUUUCGGCAA CAUCGUGGAGCAGGUGGCCUACACGAGAGUACCCCAACCAUCUA CCACCGUGGAGAAGAAGCUGGUGGACUCCACGACAAGGCCGACCU GCGGCGUAUCUACCGGCCUGGCCACAUGAUCAAGUCCGGGG CCACUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCGACAACUCCGACGUG GACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACAGCUGUUC GAGGAGAACCCAUCAACGCCUCCGGCGUGGAGCCAAAGGCCAUCC UGUCCGCCCGGCGUCCAAAGUCCCGCGGCGUGGAGAACCUGAUCCG CCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUUGUCCGGAACCCUGAU CGCCUUGUCCUGGGCCUGACCCCAACUUAAGUCCAACUUCGAC CUGGCCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGAC GACGACUGGACAACCUUGCUGGCCAGAUCCGGCGACCAAGACGCCG ACCUGUCCUGGGCCGCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGCUGUC CGACAUCUGCGGGUGAACACCGAGAUCAACCAAGGCCCCCGUCC GCCUCCAUAGUUAAGCGGUACGACGACCAACAGGACCGUACCC UGCUGAAGGCCUUGUGCGGACGACGUGCCCGAGAAGUACAAGG AGAUCUUCUCCGACAGUCCAAGAACGGCUACGCCGCUACAUCG

[1655]

설명	서열 번호	서열
		ACGGCGGCGCCUCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUAUCAAGCCCA UCCUGGAGAAGAUGGACGGCACCGAGGAGCUGGUGAAGCUGA ACCGGGAGGACCUUGCUGGGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGCU CCAUCCCCACCAGAUCCACUGGGCGAGCUGACGCCAUCCUGCG GCGCAGGAGGACUUCACCCUUCUGAAGGACAACCGGAGAA GAUCGAGAAGAUCCUGACCUUCCGGAUCCCUACUACGUGGGCCC CUGCCCCGGGCAACUCCCGGUUCGCUUGGAUGACCGGAAGUCCG AGGAGACCAUACCCCUUGGAACUUCGAGGAGGUGGUGACAAGG GCGCCUCCGCCAGUCCUUAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACA GAACCUGCCAACGAGAAGGUGCUGCCAAGCACUCCUGCUGUAC GAGUACUUCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUG ACCGAGGGCAUGCGGAAGCCCGCCUUCUGUCCGGCGAGCAGAAG AAGGCCAUUCGUGGACUUGCUGUUAAGACCAACCGGAAGGUGACC GUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUAAGAAGAUCCGAGUGCUUC GACUCCGUGGAGAUUCCCGGCGUGGAGGACCGGUUACAACGCCUCC CUGGGCACTUACCACGACCUUGCUAGAAGAUCAUAAAGGACAAGGAC UUCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCUUGGAGGACAUCGUG CUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGAGAUAGUAGGAGGCGG CUGAAGACCUACGCCACCUUUCGACGACAAGGUGAUGAAGCAG CUGAAGCGGCGGCGUACACCGGCUUGGGCGCGGCUUCCCGGAAG CUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUG GACUUCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCAGAACUUAUGCAG CUGAUCCACGACGACUCCUGACCUUAAGGAGGACAUCAGAAAG GCCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCUGCAGGACCAUCGCCA ACCUGGCGGCUUCCCGGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGU GAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCGGCAACAAGC CGAGAACAUCGUGAUCGAGAUGGCCCGGAGAACCAGACCCCA GAAGGGCCAGAAACUCCCGGAGCGGAUGAAGCGGAUCGAGGA GGGCAUCAAGGAGCUUGGCUCCAGAUCCUGAAGGAGCACCCCGU GGAGAACACCCAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUUGAUACCU GCAGAACGGCCGGGACAUGUACGUGGACCAAGGAGCUGGACAUCAA CCGGCUUCCGACUACGAGUGGACCAUCCUGUCCCGAGUCCUUC CUGAAGGACGACUCCAUCCGACAACAGGUGCUGACCCGGUCCGAC AAGAACCAGGGCAAGUCCGACAACGUGCCUCCGAGGAGGUGGUG AAGAAGAUAGAAGUACUUGGCGGACGUGCUAAGCCCAAGCUG AUCACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUAGCAAGGCCGAGCGGGC GGCCUGUCCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUAUCAAGCGGACGUG GUGGAGACCCGGCAGAUCCAAAGCAGUGGCCAGAUCCUGGAC UCCCGGAUGAACCAAGUACGACGAGAAGCACAAGCUGAUCGG GAGGUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAAGCUGGUGUCCGACUUC CGGAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUACAACUAC CACCACGCCACGACGCCUACCUAAGCGCGUGGUGGGCACCGCC UGAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGCG ACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUAGUCCCAAGUCCGAGC AGGAGAUCCGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACA UCAUGAACUUCUUAAGACCGAGAUACCCUGGCCAACGGCGAGA UCCGGAAGCGGCCCCUGAUCGAGACCACCGCGGAGACCGCGAGA UCGUGUGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGC UGUCCAUGCCCCAGGUGAACUUCUGAAGAAGACCGAGGUGCAGA CCGGCGGCUUCUCAAAGGAGUCCAUCCUGCCCAAGCGGAACUCCGA CAAGCUGAUCGCCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGG CGGCUUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCC AAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUGAAGGAG CUGUGGGCAUACCAUCAUGGAGCGGUCUCCUUCGAGAAGAAC CCCAUCCGACUUCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAG GACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACUCCUGUUCGAGCUGGAG AACGGCCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCCGCGAGCUGCAGAAG GGCAACGAGCUGGCCUUGCCUCCAAGUACGUGAACUUCUGUACC

[1656]

설명	서열 번호	서열
		UGGCCUCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCCCCGAGGACAACG AGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCUGGACG AGAUAUCGAGCAGAUCCGAGUUCUCCAAGCGGUGAUCCUGG CCGACGCCAACCGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCG GGACAAGCCCAUCCGGGAGCAGGCGGAGAACAUCAUCCACCUGU CAGCCUGACCAACCGGGGCGCCCGCCGCUCAAGUACUUCGAC ACCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUG GACGCCACCCUGAUCCACAGUCCAUACCGGCCUGUACGAGACCC GGAUCGACCGUCCAGCUGGGCGGCGACGCGCGCGGCUCCCCAA GAAGAAGCGGAAGGUGUCCGAGUCCGCCACCCCGAGUCCGUGUC CGGCGGCGGCGUGUACAAGAAGAUCCUCCA
사용되지 않음	서열 번호 4	
사용되지 않음	서열 번호 5	
Cas9 의 서열 번호 1~3 에 의해 암호화된 아미노산 서열	서열 번호 6	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF HRL EESFLVEEDKKHERHPFGNVDEVAHYEKYPTIYHLRKKLVDSTD KADLRLIYLALAHMKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFQLVQTYNQLFE ENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKN LSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQLPE KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFKPILEKMDGTEELLVKLN EDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTF RIPYYVGPLARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERM TNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLG TYHDLKKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMEERLKTYYAHLF DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSHEHIANLAGSPAICKGILQTV KVVDDELKVMGRHKPENIVEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGK ELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKMNYWRQ LLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELDKAGFIKRLVETRQITKHVAQIL DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSLLVSDFRKDFQFYKVRINNYYHHA HDAITLNAVVGTALEKYPKLESEFVYGDYKVIDVRKMAKSEQIEGKA TAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRLPIETNGETGEIVWDKGRDFAT VRKVLSPQVNVKKTETVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKK YGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKLLKSVKELGITIMERSSEKFNPD FLEAKGYKEVKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVNFYLASHYEKLGKSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKR VILADANLKVLSAYNKHDKPIREQAENIHLFTLNLGAPAAFKYFDT TIDRKRYTSTKEVLDA TLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKRKV *
Sp Cas9- Hbit 융합을 위한 아미노산 서열	서열 번호 7	MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF HRL EESFLVEEDKKHERHPFGNVDEVAHYEKYPTIYHLRKKLVDSTD KADLRLIYLALAHMKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFQLVQTYNQLFE ENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLG LTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKN LSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQLPE KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFKPILEKMDGTEELLVKLN EDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTF RIPYYVGPLARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERM TNFDKNLPNEKVLPHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLG TYHDLKKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMEERLKTYYAHLF DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR

[1657]

설명	서열 번호	서열
		NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSLHEHIANLAGSPAICKGILQTV KVVDEL VKVMGRHKPENIVEMARENQTTQKGQKNSRERMKRJEEGIK ELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYL YYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSDINKVL TRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNYWRQ LLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELDKAGFIKRLVETROITKHVAQIL DSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSILVSDFRKDFQFYKVRINNYHHA HDAYLNAVVGTALEKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMLAKSEQIEGKA TAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRLPIETNGETGEIVWDKGRDFAT VRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKK YGGFDSPTVAYSVLVVAKEVKGKSKLKSVELLGITMERSSEFEKNPID FLEAKGYKEVKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVNFLLYLASHYEKLGSPEDNEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKR VILADANLKVLSAYNKHDKPIREQAENIHLFTLNLGAPAAFKYFDT TIDRKRYTSTKEVLDA TLIHQSITGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKRRKV SESATPESVSGWRLFKKIS
HDRT를 위한 GFP 삽입 - GFP: P00894	서열 번호 8	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTCCCATCC TGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTACGCGTGT CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCGTAAG TTCAATGCAACACGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGT GACCAACCTGACCTACGGCGTGAGTGCTTACGGCGTACCCGACCC ACATGAAGCAGCAGCAGCTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAGGGTAC GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGA CCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCAT CGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGG CACAAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGC CGACAAGCAGAAAGACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCAC AACATCGAGGACGGCAGCGTGACGCTCGCCGACCACTACCAAGCAGA ACACCCCATCGGCGCAGCGCCCGTGTGCTGCGCCGACAACCACTAC CTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAAGCGCG ATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGCGGATCACTCTC GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
전체 HDRT 주형 - 이식유전자 WT1 TCR 및 TRAC 상동성 압	서열 번호 9	tgccaacataccataaacctccattctgctaataccagcctaagttgggagagaccaccagattccaagatga cagtttcttctgggctttttccatgctgctcttactctgccagattatattctgggtttgaagaagatccta ttaataaaaaaataaacagattatttaagtagccctgacattcagatttcttgatgacagaccagcctgacgt gaacgttctgaatcagctccttggccaagattgagctgtgctgtccctgagtcacagccatcacgagc agctgatttaagatgctattttccgtataaagcatgagacgtgacttccagcccccacagagcccccctgtt ccatcactgacatctgactccagcctggttgaggaagaagaagaatgagatcagtcctaacctgactcctt gtccacagATATCCAGAACCCCTGACCCCTGCGGCTCCGGTCCCGTCACT GGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCGGAGAAGTTGGGGGGAGG GGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAAC TGGGAAAGTGATGTCTGTACTGGCTCCGCTTTTTCCGAGGGTGG GGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTCTTTTT GCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTCC CGCGGGCTGGCTCTTTACGGGTATGGCCCTTGCGTGCCTTGAATT ACTTCCACGCCCTGGCTGACGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCG GGTTGGAAGTGGTGGGAGAGTTTCGAGGCCTTGCGCTTAAGGAGCC CCTTCGCTCTGTCTTGAGTTGAGGCTGGCTTGGGCGCTGGGGCCG CCGCGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGTCTCGCTGCTTCGA TAAGTCTCTAGCCATTTAAAATTTTGGATGACCTGCTGCGACGCTTTT TTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAAGATGTGACACTG GTATTTCCGTTTTTGGGGCCGCGGCGCGACGGGGCCCGTGGCTCC CAGCGCACATGTTCCGCGAGGCGGGGCTGCGACGCGCGCCACCGGA GAATCGGACGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCTGCTCTGGTGCCT GGCTCGCGCGCGCTGTATCGCCCGCCCTGGCGGCAAGGCTGGC CCGCTCGGACACAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCCGGCC CTGCTGACGGAGCTCAAAATGGAGGACGCGGCGCTCGGAGAGCG GGCGGTGAGTACCCACACAAAGGAAAGGGCCTTTCGCTCTCA GCCGTGCTTCTATGTGACTCCACGAGTACCGGGCGCGCTCCAGGCA

[1658]

설명	서열 번호	서열
		CCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACGTCGTCTTTAGGTTGGG GGAGGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGA CTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATCTCCTTGGAAATTG CCCTTTTGGAGTTGGATCTTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGG TTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCTGTAAGCGCCGCCACC ATGGGATCTTGGACACTGTGTGCGGTGCCCTGTGCATCCTGTTGGC CAAGCACACAGATGCCGGCTGATCCAGTCTCTAGACACGAAGTG ACCGAGATGGGCCAAGAAGTGACCCTGCGCTGCAAGCCTATCAGCG GCCACGATTACCTGTTCTGGTACAGACAGACCATGATGAGAGGCCCTG GAACCTGCTGATCTACTTCAACAACAACGTGCCCATCGACGACAGCGG CATGCCCCGAGGATAGATTAGCGCCCAAGATGCCCAACGCCAGCTTCA GCACCTGAAGATCCAGCCTAGCGAGCCAGAGATAGCGCCGTGTGA CTTCTGCGCCAGCAGAAAGACAGGCGGCTACAGCAATCAGCCOCAG CACTTTGGAGATGGCACCCGGCTGAGCATCCTGGAAGATCTGAAGA ACGTGTTCCCACTGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAG ATCAGCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTCTGGCCACCGGCTT CTATCCCGATCAGCTGGAAGTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAGAGG TGCACAGCGGGCTCAGCACCGATCCTCAGCCTCTGAAAGAGCAGCCC GCTCTGAACGACAGCAGATACTGCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGT CCGCCACCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTTCAAGTGGCAGGTG CAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAAGCATGAGTGGACCCAGGATAGAG CCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCTGCCAAGCCTGGGGCAGAGC CGATTGTGGCTTTACAGCGAGAGCTACACAGCGGCGTGTCTGTG CCACAATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACTCTGTACGCC GTGCTGGTGTCTGCCCTGGTGTCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGA TAGCAGGGGCGGCTCCGGTGCCACAACTTCTCCCTGCTCAAGCAGG CCGAGATGTGGAAGAGAACCTGGCCCTATGGAACCCCTGCTGAA GGTGTGAGCGGCACACTGCTGTGGCAGCTGACATGGGTCCGATCTC AGCAGCCTGTGCACTCTCTCAGGCCGTGATTCTGAGAGAAGCGGAG GACGCCGTGATCAACTGACAGCAGCTCTAAGGCCCTGTACAGCGTGCA CTGGTACAGACAGAAAGCACGGCGAGGCCCTGTGTTCTGTATGATCC TGCTGAAAGGCGCGGAGCAGAAAGGCCACGAGAAATCAGCGCCAG CTTCAACGAGAAGAAGCAGCAGTCCAGCCTGTACCTGACAGCCAGC CAGCTGAGCTACAGCGGCACCTACTTTTGGCACCCTGGATCAA CGACTACAAGCTGTCTTTGGAGCCGGCACCACAGTGACAGTGGGG CCAATATTCAAGACCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACAGC AAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCCTGTACCGACTTCGACAGCC AGACCAACGTGTCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGA TAAGACTGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGC GCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGATTTCGCCGTGCCCAACGCCCT CAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGTCTGAGA GCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACAC CAACCTGAACCTCCAGAACCTGAGCGTGATCGGCTTCAGAACTCTGC TGCTCAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCCTGAGACTGTGG TCCAGCTAACCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTGTTT GCCCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCACTG TCCTTCTCAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGG TGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGG AGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTC TATGGCTTCTGAGCGGGAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGTAT CCCCACTAGTGTGTACAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAG TCTGTCTGCCTATTACCGATTGTTGATTCTCAAAACAAATGTGTACAA AGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAAGTGTGTAGACAT GAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGTGTGGCCTGGAGCAAC AAATCTGACTTTGCATGTGCAAAACGCCCTTCAACAACAGCATTATCC AGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCA

[1659]

설명	서열 번호	서열
TCR β 사슬 pINT1066	서열 번호 10	cttatccattgccacaaacccctcttttactaagaacagtgcgcttcttgcagctccagagaatgacacggg aaaaagcagatgaagagaagctgagcaggagagggcagctggccagcctcagctctct MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHD YLFWYRQTMMRGLELLIYFNNVPIIDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI QPSEPRDSAVYFCASRKTGGYSNQPHFGDGTLSILEDLKNVFPPEVA VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQNPKNHFRQVQVYGLSENDE WTQDRAPVPTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSALVLMAMVKKRDSRG
TCR α 사슬 pINT1066	서열 번호 11	METLLKVLSTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDAVINCSKSKAL YSVHWYRQKHGEAPVFLMILLKGGEQKGHEKISAFNEKKQQSSLYLT ASQLSYSGTYFCGTAWINDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAV AWSNKSDFACANAFNNIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDNLNLFQ NLSVIGFRILLKVVAGFNLLMTLRLWSS*
TCR β- 링커-α 구성 pINT1066	서열 번호 12	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHD YLFWYRQTMMRGLELLIYFNNVPIIDSGMPEDRFSAKMPNASFSTLKI QPSEPRDSAVYFCASRKTGGYSNQPHFGDGTLSILEDLKNVFPPEVA VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDP QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQNPKNHFRQVQVYGLSENDE WTQDRAPVPTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSALVLMAMVKKRDSRGSGGATNLSLLKQAGDVEENPGPMET LLKVLSTLLWQLTWVRSQQPVQSPQAVILREGEDAVINCSKSKALYSV HWYRQKHGEAPVFLMILLKGGEQKGHEKISAFNEKKQQSSLYLTASQ LSYSGTYFCGTAWINDYKLSFGAGTTVTVRANIQNPDPAVYQLRDSKSS DKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNASAVAWS NKSDFACANAFNNIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEKSFETDNLNLFQNLVS IGFRILLKVVAGFNLLMTLRLWSS*
전체 HDRT 주형 - GFP T2A 삽입 GFP: P00894	서열 번호 13	GAGGGCCGCGGCGAGCCTGCTGACCTGCGGCGACGTGGAGGAGAAAC CGGCCCATGgtgAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGC CCATCCTGGTCTGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTTCAG CGTGTCGGCGGAGGGCGAGGGCGATGCCACTACGGCAAGCTGACC CTGAAGTTCACTGCAACACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCAC CCTCGTGACACCTGACCTACGGCGTGACGTCTTACGCGCTACC CCGACACATGAAGCAGCAGCACTTCTCAAGTCCGCCATGCCCGAA GGCTACGTCAGGAGGGCACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTA CAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAAC CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCC TGGGGCACAAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAACTCTATAT CATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATC CGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGACGCTGCGCGACCACTACC AGCAGAACACCCCATCGGGCAGGGCCCGTGCTGCTGCCGACAA CCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAG AAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCGCGGGAT CACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAacctGACGTGTGCTTCT AGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCGGTGCCTTCTTGACC CTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTCTTAATAAAATGAGGAAAT TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCAITCTATTCTGGGGGGTGGGG TGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGC ATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGcttctgagcggaaagaaccagctgggctct aggggggtatcccACTAGTCTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTG ACAAGTCTGTCTGCCTATTACCGGATTTTATTCTCAAAACAAATGTGT CACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACGTGTGTA GACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGA GCAACAAATCTGACTTTGCTATGTGCAACGCCTTCAACAAACAGCATT ATTCCAGAAACACCTTCTTCCCCAGCCCAGtaaggcgagcttggtgcttgcga gctcttcttcttctcaggaatgcccagcttctcccaagctctgctaatgcttcaaaactctctgattggtg

[1660]

설명	서열 번호	서열
eGFP ORF GFP: P00894, GFP P01018	서열 번호 14	gtctcggccttaccattgccaccaaaccctctttttactaagaacagtgagccttcttgcagtcagagagaatg acacgggaaaaaagcaatgaaagagaaggtggcagagagggcacgtgacccagcctcagctctct ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCCGGGGTGGTGCCCATCC TGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCCTGTGTC CGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAG TTATCTGCACCAACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGT GACCAACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTACGCCGTACCCCGACC ACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTAC GTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGA CCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCAT CGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGG CACAAGCTGGAGTACAACACAACGCCACAACGTCTATATCATGGC CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCAC AACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACGACGAGA ACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCCCGACAAACCACTAC CTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGCG ATCATGTGCTCTGGAGTTCGTGACCCGCCCGGGATCACTCTC GGCATGGACGAGCTGTACAAGTAA
전체 HDRT 주형 - B2M 상동성 암을 갖는 GFP GFP: P01018	서열 번호 15	agatcttaattcttgggttctgttttctgaatgaanaagcaggtccgagcagtttaactgctgggacacattag caagtcaattagcatctctggggcagctctgcaaaagcagggggcagccttaattgtcctcagcctgaagtcta gaatgagcccggtgtgtccaaagctggggcagcagcccgagatggagggcccgatgtacagacagcaaac tcaccagctctagtcatgctcttaaacatcacgagacttaagaaaggaactgaacgggaagtcctct cttaacctgacactgctgctgctgctgctggagacaggtgacggtccctggggccttctctgattgctggac gcttttaataaataagagcctcagcctgagcggcacttctgaagctgacacattggcccgagagGCTC CGTGTCCCGTCAGTGGCGAGAGCGCACATCCCCACAGTCCCGAG AAGTTGGGGGGAGGGGTCCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGT GGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATGTCTGTACTGGCTCCGCTT TTTCCCGAGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAAGTGTGCGCGT GAACGTCTTTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTG CCGTGTGTGTTCCCGCGGCTGGCCTCTTACCGGTTATGCGCCTT GCGTGCCTTGAATTACTTCCACGCCCTGGCTGCAGTACGTGATTCTT GATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTG CGCTTAAGGAGCCCTTCGCCCTGTGCTTGAGTTGAGGCTGGCTTG GGCGTGGGGCCCGCGGTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCTGT CTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTATAAATTTTGTGACCT GCTGCGACGCTTTTTTCTGCAAGATAGTCTTGAATACGGGCCA AGATgTGCACACTGGTAATTCGGTTTTTGGGGCCCGGGCGGGGACG GGGCCGTGCGTCCCAGCGCACATGTTCCGGCAGCGGGGCGCTGG AGCGCGGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGG CCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCCGGTGTATCGCCCGGCCCTG GGCGCAAGGCTGGCCCGGTGCGCACAGTTGCGTGAGCGGAAGA TGCCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAGGACGC GGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCAACCAACAAGGAAAAAG GGCTTTCCGTCTCAGCCGTGCTTCATGTGACTCCACGGAGTACC GGCGCGCTCCAGGCACCTCGATTAGTTCTCGAGCTTTTGGAGTACG TCGTCTTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATGCGATGGAGTTTCCCA CACTGAGTGGGTGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGT AATTCTCCTTGAATTGCGCTTTTGTAGTTTGATCTTGGTTCACTCT CAAGCCTCAGACAGTGGTCAAAGTTTTTTCTTCCATTTCAAGGTGTC GTGAaggCGGCCCCCGCCACCagtgtaAGCAAGGCGGAGGAGCTGTTAC CGGGGTGGTGCCATCCTGGTGGAGTGGACGGCGACGTAAACGGC CACAAAGTTACGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACG GCAAGCTGACCCCTGAAGTTTCACTGCAACACCGGCAAGCTGCCGTG CCCTGGCCACCCCTCGTACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTT CAGCCGCTACCCGACACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCG CCATGCCCAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCTCTTCTCAAGGAC GACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTGAGGGCGACA CCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGA

[1661]

설명	서열 번호	서열
		CGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAGCCAC AACGCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGA ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGC CGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGC TGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAGAC CCCAACGAGAAGCGCGATCAGTGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGC CGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAAGTAATCTAGAc cCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGGCCCCCCCC GTGCCTTCTTGACCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCTCTAA TAAAATGAGGAAATGCATCGCATGTCTGAGTAGGTGTCTATTCTAT TCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGA AGACAATAGCAGGCATGCTGGGATGCGGTGGGCTCTATGctttagg cgaaagaaccagctgggctctagggatccccACTAGTgtctcgtcctgagccttagctctgctg cgctactctcttctgctgctgagctatcagctgagctctctcctcctcctgctgctctctcctcct ctgcaacctctgtgacctgctgctctctcctcctgtaactcctctcctcctcctgctgctgctgctgctg gggctagtccaggctggaactcggggaagcgccgggggtgctgggagtgagggaagggggtgcgacccg ggacgctgctacttgcctcttgcggggagcagggagaccttggctctacgctgacgacgagggctcggg acaaagttagggctgctgataagctcagagcagccgaggttggggaggggtttctctcctccttgcggggcc tctgctctcccccagcagctgagtgaggggagcggtaggct
RNP를 위한 Cas9 아미노산 서열 이 서열에서 “*”는 정지 코돈을 지칭함	서열 번호 16	MDKKYISGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIG ALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSF HRL EESFLVEEDKKHERHPFGNTVDEVAYHEKYPTIYHLRKLLVDS KADLRLIYLALAHMKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDKLFIQLVQTYNQLFE ENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFNLIALLSLG LTPNFKSNFDLAEDAKQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAANK LSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMKRYDEHHQDLTLKALVRQQLPE KYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLN EDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTF RIPYYVGPLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEFVVDKGASASQSIERM TNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKVTEGMRKPAFLSGE QKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRPNASLG TYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMEERLKTAYAHF DDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDGFANR NFMQLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDLSHEHIANLAGSPAIKKGILQTV KVVDDELVKVMGRHKPENIVIEARENQTTQKGQKNSRERMKRIEEGK ELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDNRLSDYD VDHIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGSNDNPSEEVVKKMKNYWRQ LLNAKLITQRKFDNLTKAERGGSELDKAGFIKRLQVETRQITKHVAQIL DSRMNTKYDENDKLIREVKITLKSILVSDFRKDFQFYKVRINNYHHA HDAYLNAVVGTAIIKKYPKLESEFVYGDYKVVYDVRKMIKSEQIEGKA TAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKPLIETNGETGEIVWDKGRDFAT VRKVLSPQVNVVKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKK YGGFDSPTVAYSVLVVAKEKGSKKLKSVELLGHIMERSSEFEKNPID FLEAKGYKEVKDLIILPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALP SKYVYNFLYLASHYEKLKGSPEDEQQLFVEQHKHYLDEHEQISEFSKR VILADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENIHLFTLNLGAPAAFKYFDT TIDRKRYTSTKEVLDA TLHQSTIGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKRRKV *
Hibit 태그를 갖는 BC22n을 암호화하는 mRNA	서열 번호 17	GGGAAGCUCAGAAUAAACGCUCACCUUUGGCCGGAUCUGCCACCA UGGAGGCCUCCCCGCCUCCGGCCCCCGGCACCUGAUGGACCCCA CAUCUUCACCUCCACUUCACACACGGCAUCGGCCGGCACAAGACC UACCUUGUCUACGAGGUGGAGCGGCUUGGACAACGGCACCUCCGUG AAGAUGGACAGCACCAGGCGCUUCCUGCACACACAGGCAAGAAC CUGCUGUGCGGCUUCUACGCGCGGCACGCGGAGCUUGCGUUCUG GACCUUGUGCCUCCUGCAGCUGGACCCGCCAGCAUCUACCGGG UGACCUUGGUCAUCUCCUGGUCCCCUGCUUCUCCUGGGGCGUGCG CGCGAGGUGCGGCGCUUCCUGCAGGAGAACACCCACGUGCGGCU GCGGAUCUUCGCCGCCCGGAUCUACGAGUACGACCCCCUGUACAAG

[1662]

설명	서열 번호	서열
		GAGGCCCCGACAGUUCGCGGGACGCCGGCGCCAGGUGUCCAU AUGACCUACGACGAGUUCAGCACUCUGGGACACCUUCGUGGAC CACCAGGGCUGCCCUUCCAGCCUGGGACGGCCUGGACGAGCACU CCCAGGCCUGUCCGGCCGGCUGCGGGCCAUCCUGCAGAACAGGG CAACUCCGGCUCGAGACCCCGGCACCUCCGAGUCCGCCACCCCG GAGUCCGACAAGAGUACUCCAUCCGCGCCUGGCCAUCCGGACCAAC UCCGUGGGCUGGGCCGUGAUACCGACGAGUACAAGGUGCCUCC AAGAAGUUAAGGUGUCCGGCAACCCGACCCGGCACUCCAUCAAG AAGAACCUGAUCCGGCCUGCUGUCCGACUCCGGGAGACCCCGG AGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGGGGGGUAACCCCGGG GAAGAACCAGGACUCCGACUCCGAGGAGAUUCCUCCAAACGAGAU GGCCAAGGUGGACGACUCCUCCUCCACCGGCGGAGGAGUCCU CCUGGUGGAGGAGACAGAGACGAGCGGACCCCAUCUCCGG CAACAUCCGUGGACGAGGUGGCCUACACGAGAGUACCCCAACAU CUACCACUCCGGAGAGGUGGAGUCCACCGACAAAGGCCGA CCUGCGGCUGAUUACUCCGCGCCUGGCCCAUGAUCAAGUCCGG GGCCACUCCUGAUCGAGGGCGACCUGAACCCCGCAACUCCGACG UGGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACAGCUGU UCGAGGAGAACCCCAUACAAGCUCUCCGGCGUGGACGCCAAGGCCAU CCUGUCCGCCCGGCGUGUCCAAGUCCGGCGGCGGAGAACCCUGAU GCCCAGCUGCCCGGCGAGAGAGAAAGAACGGCCUGUCCGCAACUCC AUCGCCUGUCCUGGGCGUACCCCAACUUAAGUCCAAUCCG ACCUCCGCGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAAGGACACCUACG ACGACGACCUGGACAACCUUGCUGGGCCAGAUCCGGCGACAGUACGC CGACUCCUGUCCUGGCCGCAAGAACUCCUGCCGACGCAUCCUGCUG UCCGACAUCUCCGGGGUGAACCCGAGAUACCAAGGCCCGCCUGU CCGCCUCCAGUACAAGCGGUAAGCAGACACCCAGGACCUAGC CCUGUGAAGGCCUUGGUGCGGACGAGCUGCCCGAGAGUACAA GGAGAUUCCUCCGACGAGUCCAGAACCGGCUACCGCGGCUACAU CGACGGCGGCCUCCAGGAGGAGUUCUACAGUUAUACAGCC CAUCCUGGAGAGAUAGGACGCGACCCAGGAGCUGCUGGAGAGCU GAACCGGGAGGACCUUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUCCGACAAAG CUCCAUCCCCACCGAGAUCCACCUCCGGCGAGCUGCAGCCAUCCUG CGCGGCGAGGAGACUCCUACCCUCCUGAAGGACAAACCGGGAG AAGAUCCGAGAGAUCCUAGCUCUCCGAGUCCCUACUACGUGGGC CCCCUGGCCCGGGCAACUCCCGGUGCCUGGAGUACCCGGAAGU CCGAGGAGACCAUACCCCGGAGUCCUCCGAGCGGAGUCCAGUCCGA AGGGCGCCUCCGCCAGUCCUUAUCCGAGCGGAGUCCAAUCCGA CAAGAACCCUGCCCAACGAGAGGUGUCCCAAGCACUCCUCCUG UACGAGUACUCCACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUAC GUGACCGAGGGCAUCCGGAAGCCCGCCUCCUGUCCGGCGAGCAG AAGAAGGCCAUCCUGGACCUCCUGUUAAGACCAACCGGAAGGUG ACCGUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUCCUUAAGAGAUCCGAGUGC UUCGACUCCGUGGAGAUCCCGCGUGGAGGACCGGUUAACGCC UCCUGGGCACCUACCAACGACCUCCUGAAGAUCAUAAAGGACAA GACUCCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACUCCUGGAGGACAU GUGCUGACCCUGACCUUGUCCGAGGACCGGAGAUCCGAGGAG CGGCUGAAGACCUACGCCCACCUUCCGACGACAAAGGUGAUGAAG CAGCUGAAGCGGGCGGUAACCCGCGUCCGGCGCGGUGUCCCGG AAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUC CUGGACUCCUGAAGUCCGACCGCUCCGCAACCGGAACUUAUG CAGCUGAUCCACGACGACUCCUCCGACCUUAAGGAGGACAUCCAG AAGGCCAGGUGUCCGGCCAGGGCGACUCCUGCAGGACACAUCCG CCAAACUCCGGCGGCUCCCGGCAUACAAGAGGGAUCCUGCAGAC CGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAA GCCCAGAAACUCCUGAUGAGAUCCCGGGGAGAACAGACCAAC CCAGAAGGGCCAGAAAGAUCCCGGGAGCGGAUGAAGCGGAUCCGA GGAGGGCAUAAAGGAGCUGGGCUCCAGAUCCUGAAGGAGCACCC

[1663]

설명	서열 번호	서열
		CGUGGAGAACACCCACGCGCAGAACGAGAGCGUACCGUGUACUA CCUGACGAGACGGCCGGGACAUGAUCGUGGACAGCGUGGACUA CAACCGCGUGUCGACUACGACGUGGACACCAUCGCGCCACGUCU UUCUGAACGAGACUCCUACGACAAACAGGUGCUGACCCGGUCC GACAAGAAGACGGGGCAAGUCGACAAACGUGCCUCCGAGGAGGGUG UGAAGAAGAUGAAGAACUACUGCGGGACAGCUGUGAACGCCAAG CUGUACACCCAGCGGAAGUUCGACAAACCGUACCAAGGCCGAGCGG GCGGCGCUGUCGAGUGGACAAAGCGCGGCUUCAACAGCGCGAC CUGGUGGAGACCCGGGAGAACCAAGCACGUGGCCAGUCCU GACUCCCGGAGUAAACACCAAGUACGACGAGAAACGACAAAGCUGAU CGGAGGUGGAAAGGUGAUACCCUGAAGUCCAAAGCUGGUGUCCGAC UUCCGGGAAGGACUUCAGUUCUACAAAGGUGCGGGGAGUAACAAC UACCAACGACGCCACGACGCCUACGAGAACGCGGUGGGGCGGACCG CCGUGAUCAGAAGAUAACCCAAAGCUGGAGUGCAGGUUCUGUGUACG GCGACUACAAGGUGUAGACGAGUGCGGAAGUAUGCGCCAAAGCUGCG AGCAGGAGAUCCGGAAGGCCACCAGCAAGUACUUCUUAUCUCCA ACAUCUAGAACUUCUUAAGACCGGAGAUACCCUUGGCCAACGGCG GAUCCGCGGAAGCGGCGCCUGAUCGAGACCAACGCGGAGACCGGCG AGAUCGUGUGGGACAAGCGCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGG UGCUUGUCCUAGCCCGAGGUAACUUCUGUAGAAGAACCGGAGGUGC AGACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCUUCUGGCCAACGCGGAUCU CGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUA CGGGCGGCUUGACUUCGCCCAACCGUGGCUCAUCUGGUGUGUGGUG GCCAACGUGGAGGAAGAGGAGUCCAAAGACUGAAGCUGAAGUCGUGAAG GAGCUGUCGGGCAUACCCAUAUGGAGCGGCGUCCUUCUGGAGAAG AACCOCUACGACUUCUGGAGGCCAAGGGCUCAAAGAGGAGUGAAG AAGGACCUGAUCAUACGUCGCCAAGUACUCCUUGUUCGAGCUG GAGAACGCGCGGAAGCGGAUGUCUGGUCUCCGCGGCGGAGCUGCAG UAAGGCAACAGGAGCUGGCGGUGCCUCCAAGUACGUGAACUCCUG UACUCCGGCTUCCACUACGAGAGAACAGGGCUCGCCGAGGACA ACGAGCAGAAGACGUGUUCUGGAGCAGCACAAGCAACUACCUUGG ACGAGAUCAUCGAGCAGUCCCGGAGUCCUCCAAGCGGGUGAUCC UGGCGCGCCGCAACUUGGACAAGGUGUUCGCGGCUACAACAAGC ACCGGGACAAGGCCUACCGGGAGCAGGGCGGAGAACAUACCAUCU GUTUACCCUGAACAACCUGGCGCGCCCGCGCGCUUAAGUACUUC GACACCCAGUACGACGCGGAAGCGGUAACACCUCCACCAAGGAGGUGC UGAGCGCCACCCUGAUCACCAUGUCCAUACCGCGGCUAGACGAGAC CGGGAUGACCCUCCGUGGUGCGGGCGGCGCGGCGGCGGCGUCCCC AAGAAGAAGCGGAAGGUGUCGAGUCCGCGACCCCGGAGUCCUGU UCCGCGUGGCGGCGUUAAGAAGAUAUCCUGCAUCAGCAACCAAGCC UACAAGAACACCCGAUUGGAGUUCUUAAGCUCACUAAUACCAACU ACACUUAACAAAAUGUUGUCCUCAAUAAGUAGCCAUUCGUAUCU CGUCCUUAUAAAAAAGUUGUCCCCAAACAAUCCUUCGAGAAAAAA AAAAAAUGGAAAAAAGAAAAACGAAAAAAGGUAAGAAAA AAAAAAAUUAAAAAAAGAAAAAACUAAAAAAGAAAAACGAAAA AAAAAAACGUAAAAAAAGAAAAACUAAAAAAGAAAAAGUAAAA AAAAAAACCUAAAAAAGAAAAAAGUAAAAAAGAAAAAGGAAAA AAAAAAACGCAAAAAAAGAAAAAACAAAAAAGAAAAAUGCAAA AAAAAAAGUAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAA AAAAAAAGUAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAA AAAAAAAGUUUUAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGUUUUAAG
Hibit 태그를 갖는 B22n을 위한 오픈	서열 번호 18	AUGGAGGAGUCCCGGCGUCCGCGCCCGGCACUGGAGGACCCCG AUCAGUUCACCCUACAUCUACAACGCGUACGCGCGGACCAAGAC CUACCGUGUUCAGGAGGAGGCGGCGGCGGACCAACGCGACCCUCCG GAAGAGUGGACGACCGGGGCGUCCUGCAACCAACGCGGCAAGAA CGUCGUGGCGGCUUCACGCGGCGGACGCGGAGCGUGCGGCUUCUCCG GACUGUGUGGCUCCUCCGACGCGGCGGACCGCGGCGGAGUACCGG

[1664]

설명	서열 번호	서열
리딩 프레임		UGACCUGGUUCAUCUCCUGGUUCCCCUGCUUCUCCUGGGGCGCGC CGGCAGGUGCGGGCCUUCUUGCAGGAGAACACCCACGUGCGGCU GCGGAUCUUCGCGCGCCGGAUCUACGACUACGACCCCUGUACAAG GAGGCCUUGCAGUUGUUGCGGGACGCCGCGCCAGGUGUCCAUC AUGACCUACGACGAGUUCAGCACUUGGACACCUUCGUGGAC CACAGGGCUGCCCCUCCAGCCUUGGACGGCCUGGACGAGCACU CCCAGGCCUUGUCCGCGCGGCGUUGGGGCAUCCUGCAGAACAGGG CAACUCCGGCUCGAGACCCCGGCAUCCGAGUCCGCCACCCCG GAGUCCGACAAGAAGUACUCCUCCGCGCUGGCCAUCCGACCAAC UCCGUGGGCUGGGCCGUGAUACCGACGAGUACAAGGUGCCUCC AAGAAGUUAAGGUGCUGGGCAACACCGACCGGCACUCCAUAAG AAGAACCUUAUCGGGCGCCUGCUUUCGACUCCGGCGAGACCGCG AGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCCCGCGCGGUGUACCCGGCG GAAGAACCAGAUUCGUUACCGUAGGAGAUUCUCCAACGAGAU GGCCAAGGUGACGACUCCUUCUCCACCGCGUGGAGGAGUCCU CCUGGUGAGGAGGACAAGAAGCACGAGCGGCACCCCAUCUCCG CAACAUCGUGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCACCAU CUACCACUUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGGCCGA CCUGCGGCUGAUCUACUUGGCCUUGGCCACAUGAUCAAGUUCGG GGCCACUUCUGAUCCGAGGCGGACCUAACCACGACACUCCGACG UGGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUGGAGACCUACAACGAGCUG UCGAGGAGAACCCCAUACCGCCUCCGGCUGGAGCGCAAGGCCAU CCUGUCCGCCCGGCGUCCAAGUCCCGCGCGUGGAGAACCUAUC GCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGCCUUGUCCGGCAACUUG AUCGCCUGUCCUGGGCCUGACCCCAACUUAAGUCCAACUUCG ACCUGGCGAGGAGCGCAAGCUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACG ACGACGACUUGGACAACUUGCGCCAGAUCCGGCGACCAUACGC CGACCUUUCUGCGCGCAAGAACCUUGCCGACCGCAUCCUGCUG UCCGACUCCUGCGGUGAACACCGAGAUACCAAGGCCCCUUGU CCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACACAGGACCUGAC CCUGCUGAAGGCCUUGGUGCGGACGACUCCCGAGAGUACAA GGAGAUUCUUCGACGAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAU CGACGGCGGCGCCUCCAGGAGGAGUUCUACAAGUUAUACAAGCC CAUCCUGGAGAGAUUGGACGGCACCGAGGAGCUGCUGGUGAAGC GAACCGGAGGACUUGCUGCGGAAGCAGCGGACCUUGCAACCGG CUCCAUCCCCACAGAUCCACUUGGGCGAGCUGCACGCCAUCCUG CGGCGGACGAGGAGUUCUACCCUUCUUAAGGACAAACCGGGAG AAGAUCGAGAAGAUCUGACCUUCCGGAUCCCUACUACGUGGGC CCCUGGCCCGGGCAACUCCCGUUGCCUGGAGUACCGGAAGU CCGAGGAGACCAUACCCCGUGAACUUCGAGGAGGUGGUGGACA AGGGCGCUCGCCAGUCCUUAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGA CAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGCUGCCCAAGCACUCCUUGC UACGAGUACUACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUAC GUGACCGAGGGCAUCCGGAAGCCCGCCUUCUGUCCGGCGAGCAG AAGAAGGCCAUCCUGGACCUUGUUAAGACCAACCGGAAGGUG ACCUGAAGCAGCUGAAGGAGGACUACUUAAGAAGUCCGAGUGC UUCGACUCCGUGGAGAUCCCGGCGUGGAGGACCGGUAACCGCC UCCUGGGCACCUACACGACCUUGUGAAGAUCAUACAGGACAAG GACUUCUGGACAACGAGGAGAACGAGGACUCCUGGAGGACAU GUGCUGACCUUGACCUUGUUGGAGGACCGGAGAUGAUCCGAGGAG CGGCUGAAGACCUACGCCACCUUGUUCGACGACAAGGUGAUGAAG CAGCUGAAGCGGGCGGCGUACACCGGCUUGGGCGCGGUGUCCCG AAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUC CUGGACUUCUGAAGUCCGACGGCUUCGCGAACCGGAACUUAUG CAGCUGAUCCACGACGACUCCUGACCUUAAGGAGGACAUCCAG AAGGCCAGGUGUCCGGCCAGGGGACUCCUGCACGAGCACAUCCG CCAACCUGGCGCGCUCCCGGCAUACAAGAGGGCAUCCUGGAGAC CGUGAAGGUGGUGGAGCAGCUGGUGAAGGUGAUGGGCCGGCACAA

[1665]

서명	서열 번호	서열
Hbit 태그를 갖는 BC22n을 위한 아미노산 서열		GGCCGAGAAACUCGUGAUCGAGUAGGCCCGGGGAGAACAGACCAC CCGAAGAGGCCCAAGAAAGUCCCGGAGCGCGAAGGCGGAGUCGA GGAGGGGCAUCAAGGAGCGUGGGUCUCCGAGAUCCUGAAGGAGCACCC CGUGGAGAACACCCAGCUGCGAGAACGAGGAAGCUGAACUGUACUA CCUGCGAAGACGGCCGGGACAGUAGUCGUGGACCGACGAGGUCAGUAC CAACCGCGUGUCGACUACGACGUGGACCAACUACUGUGCCCAAGUCC UUCUGAAGGAGCACTUCCAUCCGACAAACAGGUGUCUACCCCGGUCC GACAAGAACCGGGGCAAGUCCGACAACUGCGCCUCCGAGGAGGUG GUGAAGAAGAUAGAAGACUACUGGCGGCGAGCUGUGUAACGCCAAG CUGAUCACCCAGCGGAAGUUCGACAAACUUGACCAAGCGGCGAGCGG GGCGGGCUGUCCGAGUGGACAAAGGGCGGCUUACAAGCGCGAGC CUGGUGGAGACCGCGGAGAUACCAAGCAGUGGCGCCAGAUCCUG GACUUCGCGGAGUAGAACCAAGUACGAGGAGAACGACAAGCGUAUC CGGGAGGUGAAGGUGUACACCCUGAAGUCCAAAGCUGUGUGGCGGAC UUCGCGAAGGACTUCCAGUUCUACAGGCGGGGAGAUACCAAC UACCACACGCGCCACGACGCCUACCGUAGACGCGUGUGGGCACCG CCUGUAUCAAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUCCGUAUCG CGCAGUCAAGGUGUACGACGUGCGGGAAGAUAGUCCGCAAGUCCG AGCAGAUUCGAGCGCAAGGCCACCGCGCAAGUACUUCUUAACUCCA ACAUCUAGUACUUCUACAAGACGAGAUACCCUUGGCCAACGGCG AGAUCCGGAAGGCGGCCUUCAGUCCGAGACCAACGCGGAGACCGGG AGAUUCUGUGGGACAGGGCGGGGAGUUCGCCACCGUGCGGAAGG UGCUGUCCAUGGCCCGAGGUAACAUCUGAAGAAGACCGAGGUGC AGACCGCGGGCUUCCAAGGAGUCUACUUGCGCCAAGGGGAACUC CGACAAGCUGAUCCGCGCGGAAGGAGACUGGAGACCCCAAGAAGUA CGCGGCGUCGACUCCCGCCAGGUGGCCUACUCCGUGUGGUGUG GCCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCUCAAAGACUGAAGUCCGUGAAG GAGCUGCUGGGCAUACCAUACUGGAGCGGUCCUUCUUCGGAAG AACCACAUCGACUUCUGGAGGCGCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAG AAGGACUGAUCAUACAGCGGCCAAGUACUCCUGUUCGACGUG GAGAAACGGCGGGAAGCGGAAGUCUGGCCUCCGCGGCGAGCUGCAG AAGGGCAACGAGCUGGCGCCUGCCUCCAAUGACGUGAACUCCUG UACUGGCGCUCUCCACUAGUAGAAGCUGAAGGCGUCCCGGAGGACA ACGACGAGAAGCAGCTUUCUGUGGACGAGCAGCAUACGUCC ACGAGACUAGCAGCAGAUUCUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUC UGGCGCAGCGCAACCUUGGACAGGUGUCUGUCCGCCUACAACAAGC ACCGGGACAAAGCCUACCGGGAGAGGCGCGGAGAACAUCAUCCACCU GUUACAACCUAGACCAACUGCGGGCGCCCGCCGCUUCAAAGUACUUC GACACCCACCAUACGACCGGGAAGCGGUACACUCCACCAAGGAGGUGC UGGAGCGCCACCCUGAUCCACCAAGUACUACACCGCGGUGUACGAGAC CCGGAUCCAGCCUGUCCACUGCGGGCGGCGACGGCGGCGGCUCCGCC AAGAAGAAGCGGAAGGUGUCGAGUCCGACGCCACCCCGAGUCCGUG UCCGCGUGGCGGCGUGUACAAGAAGAUCCUGA
	19	MEASPSGPRHMLDPHFTSNFNNGIHRKTYLYCYEVERLDNGTSTVKM DQHRGFLHNGAKNLICFGYHGRHILRFLLDVPSLQDPAQYIRVTWTFIS WSPFCVSGMTCYGEVRAFLQENTHYIRLRFIAARIYDYDPLYKEALQMLRD AQAQSYIMTYDEFKHICWDFTFVHDQCGPFGAOWDLDDEHSQALSGRLRA LQONQSGNSTPTGTSSEAPESDKKYYSIGLAIQTSNVGVAWITDEYKVPK KKFKVLGNTDRHSIKSNLJGALLFDSGETAEATRLKTRARRYTRRNKR ICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLESFLVEEDKKHERHPFGNIVDEVAY HEKYITYIHLRKLVLSDTDKADRLIYLAALAHMKFRFHLIEGDLNPD NSDVPDQLFIQLVQTYNDQLFEENPNAAGSVDAKAILSARLSKRSLRENLIA QLPGEKKNLFGNLIALLSLGLTPNFKSNDFLEADAKQLSKDTYDDDLN NLLAQIGDQYADMLFLAAKNLQAILSDILSRNVTETIKAPLSAKRKYRD EHHQDLTLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEIFYKF IKPILEMDGTEELLVKNLRNLDLRKQRTFDNGSPHQHILGELHAILRE QEDFYPLKDNREKIEKILTRIPFYVYGLPARNSRFAWMTRKSEETIPI WNFEFVVDKGSASOFSIERMTNFDNKNPEKVLPKHSHLYEYFTVYNY

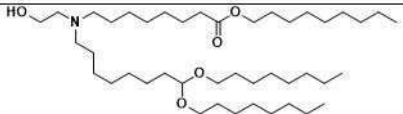
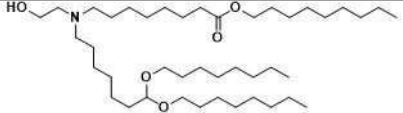
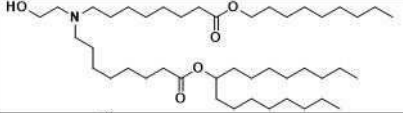
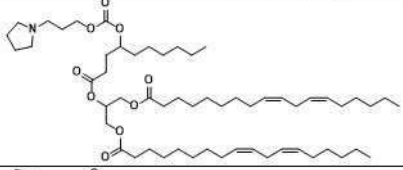
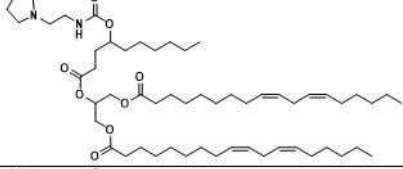
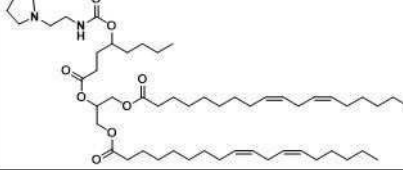
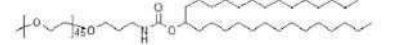
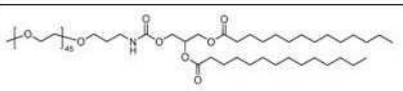
[1666]

설명	서열 번호	서열
		LTVKYVYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKK IECFDSVEISGVEDRFANS.LGTYHDL.LKIKKDKFLDNEENEDIVLT LTLFDREMEERLKTAYAH.FDDKVMQKLRRTYTGWGR.LSRK.LINGIR DKOSQKLT.DFLKSGDQANRNMQLIHDDSL.TFKEDIQAQVSGGDSL HEHIAN.LGSPA.IKKG.LQTVKV.VDLVKVMGRHKPENVIEMARENOT TOKGQKNSR.MRKIEEGIK.GSOLKEHPVENTQLQNEK.LY.YY.LQN GRDMY.VDQELDINRLSDYVDHVPSQSLKDDSDKNVLTRSDKNRGK SDPVPSEEVVKMKNM.WQOLLNKLITQKFDNL.TK.AERGGL.SELDK AGNIKQK.VETR.QKTHVQAQLDSR.MNTKYDENDK.LIREKV.VITLKS.KLV GDFKPDF.QFYK.VREIN.NYHHAIDA.YLNA.VGTALIK.YPKLESEF.VYG DYKVV.VDKMIAKSEQIEGAT.KAK.YFYF.NSNFFKTEITL.ANGEIRKRP LIETNGETGEIV.DKGRDFAT.VRKVL.SMPQV.NIVKKE.TEVQTGGFSKSI LPKRN.SDKL.IARKKDWDPKY.YGGFDSPTVAYS.VL.VVAK.VEKGKSKSL KSVKELL.GITL.MERSSEFKN.DIFLEAKGYKE.VKDKLILKPKYLS.FELEN GRKRM.LASAGE.QKGNEL.LPSKYV.NFVL.LASHYKE.LK.GSPEDNEQKQ LFVEQHKHYL.DIEIE.QISEFSKRLV.ADAN.DKVL.SAYN.KHRDK.PIREQA ENIHLFTL.NL.GAPAFKYF.VDITDRKRYTSTKEVLD.LIHQSITGLYE TRIDL.SQLGGGCGSPKKRKRVASTPESVSGWR.LFKKIS
UGI를 암호화하는 mRNA	서열 번호 20	GGGAGACCGAAGGUGGCAUGCCGACGCGGUGCGGCGUCCAGCGGCUC UGCUUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGUGAGCCUUAUUGCGAUGCCGCC ACCAUGGACGACGAGAGAGAGAGAAAGUGUGCGGAGGAGAACACA AACCCUGUCGGACAUCACUGCAAAAGGAAACAGGAAGAACGAGCUGGUC AUCCGAGGAUAUCGUAUGUGUGUGUGCGCGGAGAAAGUCGAGAAAGUC UUCGGAAGAACAGCCGGAUUCGCGAACUCCGACGACACAGCAUAC GACGAUAUCGACAGCAGCAAAACGUCUAGCUGCGUGACAUCCGCGACGA CCGGAUAACAAAGCCUGGGCAGCUGUCACUCCAGGACUGCAAGCAAGGA GAAAACAAAGUAACAAGAUUGUGUGUAUGUCUAGACACUACAUUUAA AAGCAUCGUCAGCCUACCAUGGAGAAUAAGAGAAAGAAAUAAGAGAU CAUAUGCUUAUUCACUUCUUUUUUUUUUUGUGUGGUAAGACCA ACACCCUGUCUAAAACAAUAAUUUUUUUUUAUCAUUUGCCUUCU UUUCUUGUGUCUCAAUAUAAUAAAAAUUGGAAAGAACCCUGAGUC UAG
UGI를 위한 리딩 프레임	서열 번호 21	AUGGCGACGAAGAAGAAAGAAAGGUGCGGAGGAGGAAGGACCAAC UCUGCGGACAUCGAGAAAGAAAGGAAACAGGAAGACGUGGUAUC CAGGAUAUCGUAUGUGUGUGUGCGCGGAGAAUAGCUGGAAGCAUC GGAAAGACACCGGAAUCGCGACUCCUGGUAACCAAGCAACACGAC GAAUCGACAGACGAAAACGUCACUGCUGCUGACAUCCGACGCACCG GAUAUCACGCCUGGCGACGUGCAGUCUCCGAGACUCCAGCAACCGGAA AACAAGAUACAAGUUGCGUGA
UGI를 위한 아미노산 서열	서열 번호 22	MTNLSDIEKETGKLVQIESILMLPEEVEENKIMSGKSPESDILVHTAYDEST DENVMILLTSDAPEYKPAVLVIQDSNGENKIMSGSGKRTADGSEFESP KKKRPKE

[1667]

표 90

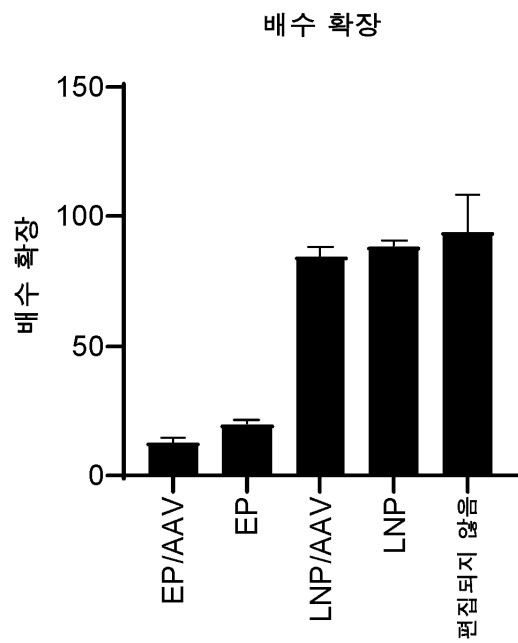
지질 목록

지질 ID	출원	화합물 ID	구조
지질 B	WO2020/072605 A1	화합물 1	
지질 C	WO2020/072605 A1	화합물 10	
지질 D	WO2020/072605 A1	화합물 18	
지질 E	WO2020/118041 A1	화합물 45	
지질 F	WO2020/118041 A1	화합물 50	
지질 G	WO2020/118041 A1	화합물 85	
지질 H	WO2015/095340 A1	S024	
지질 J	WO2015/095340 A1	S029	

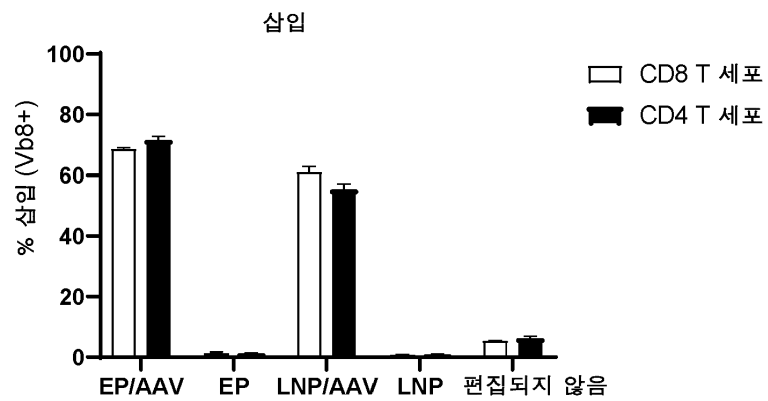
[1668]

도면

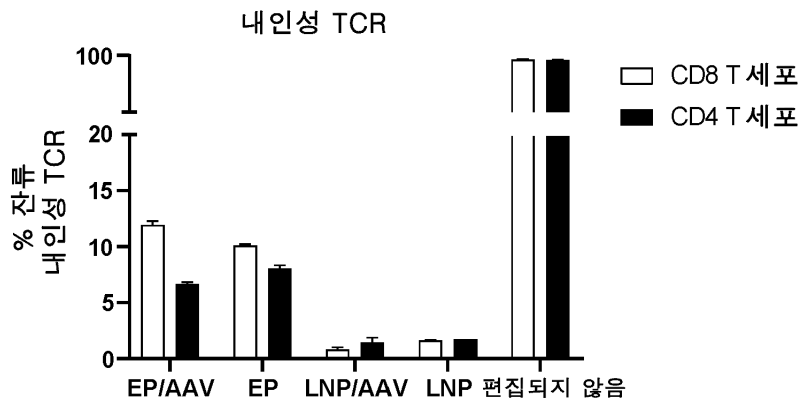
도면1



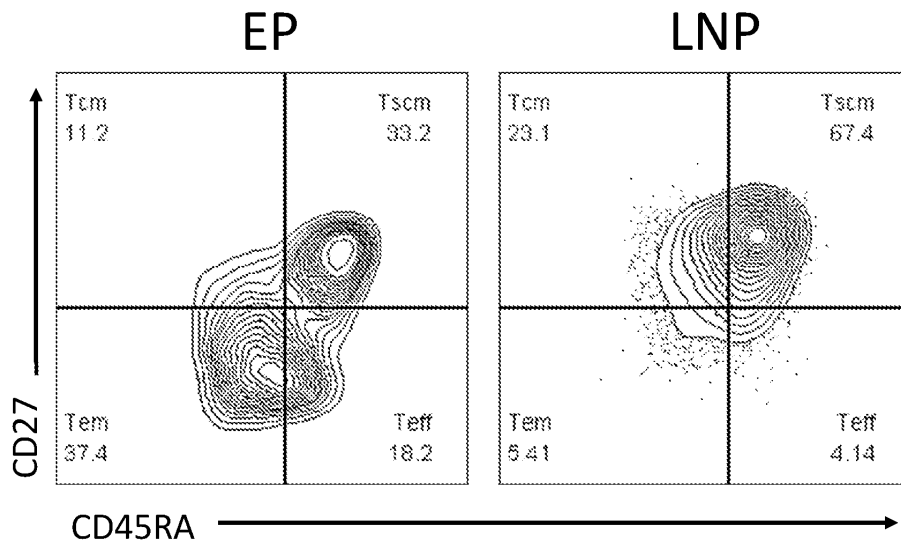
도면2



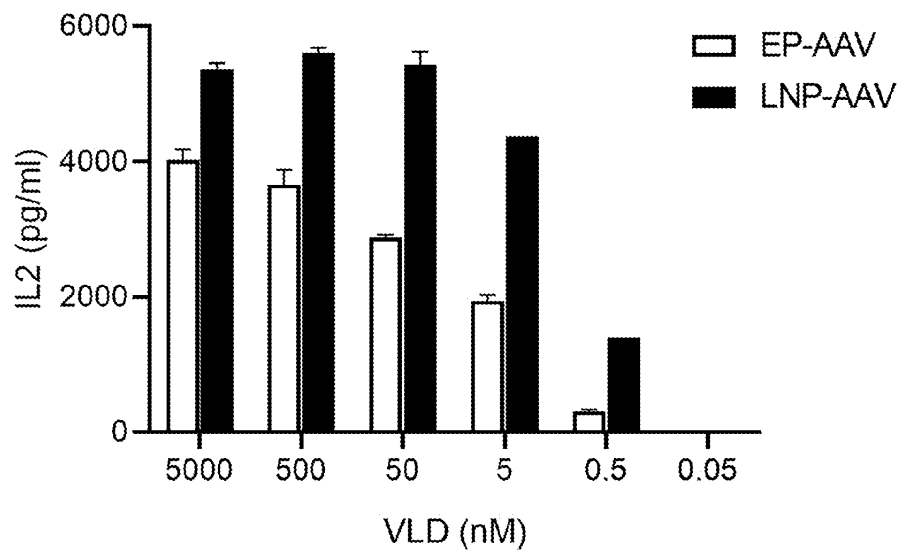
도면3



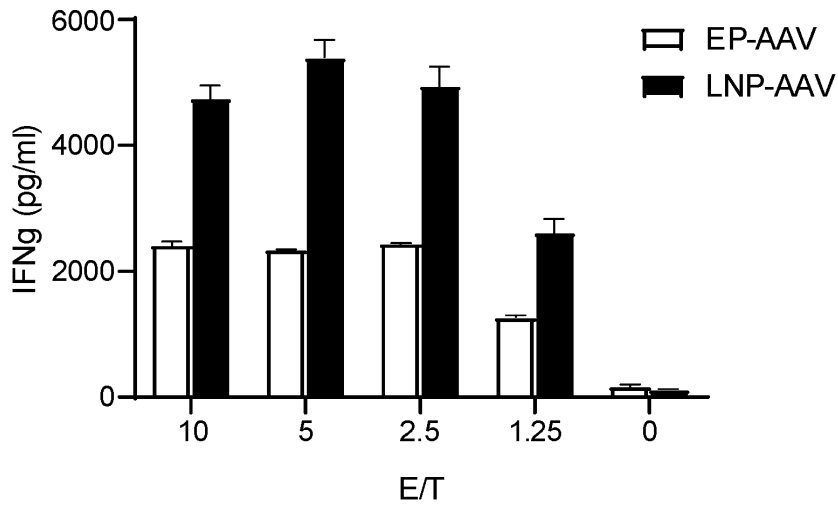
도면4



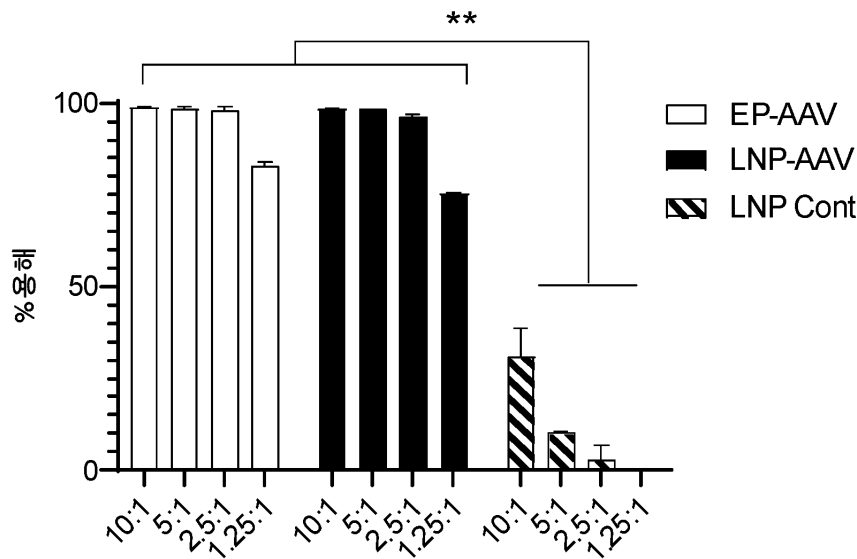
도면5



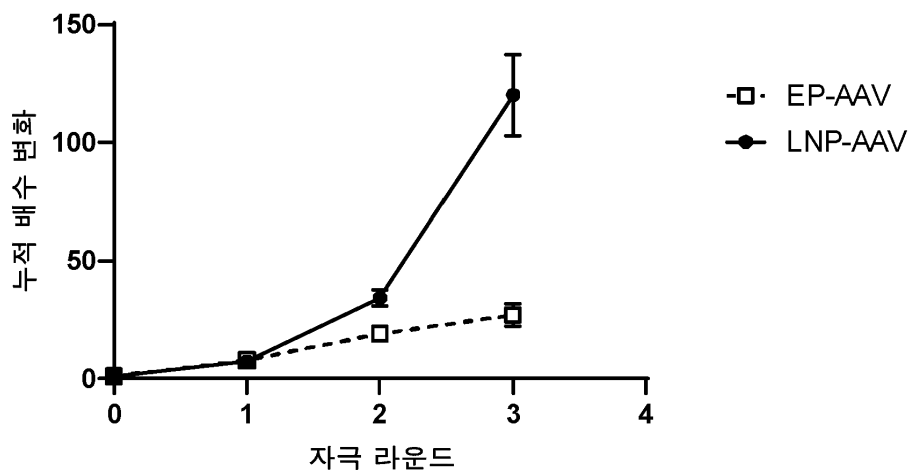
도면6



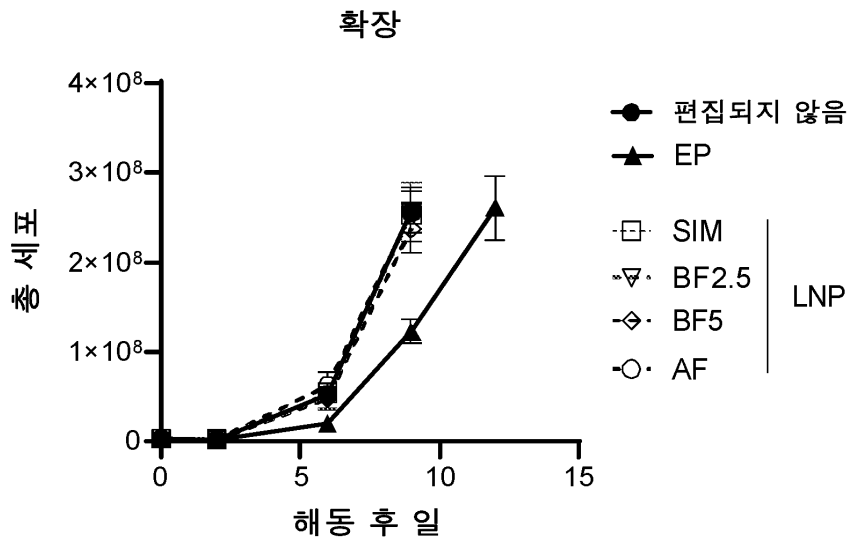
도면7



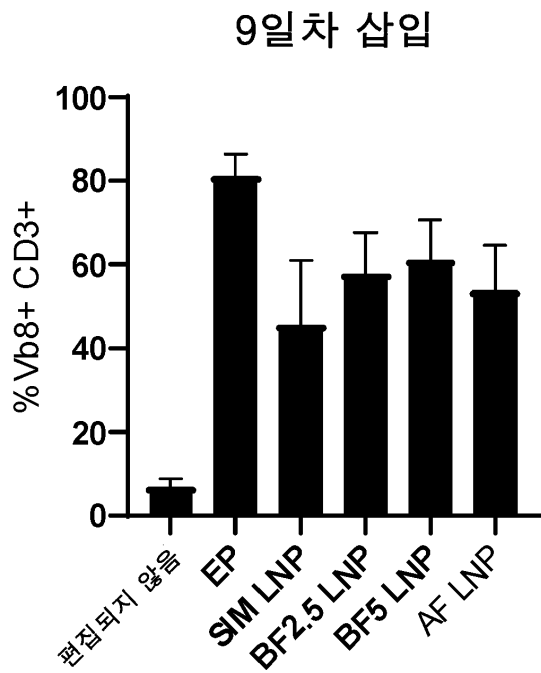
도면8



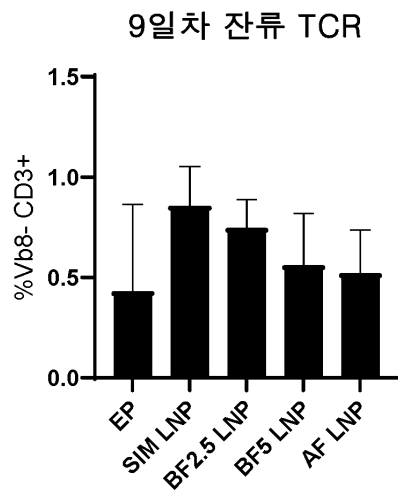
도면9



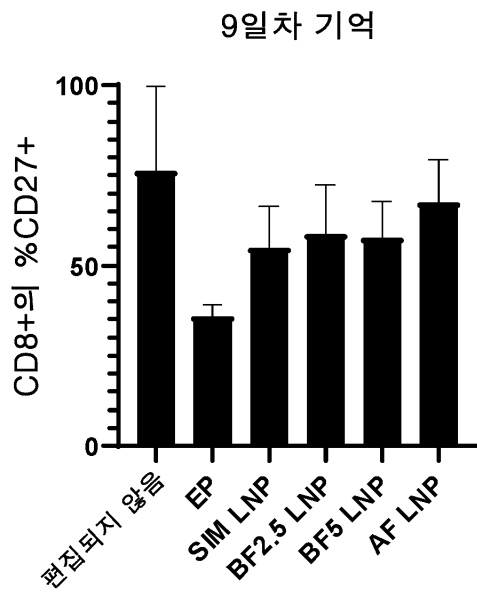
도면10



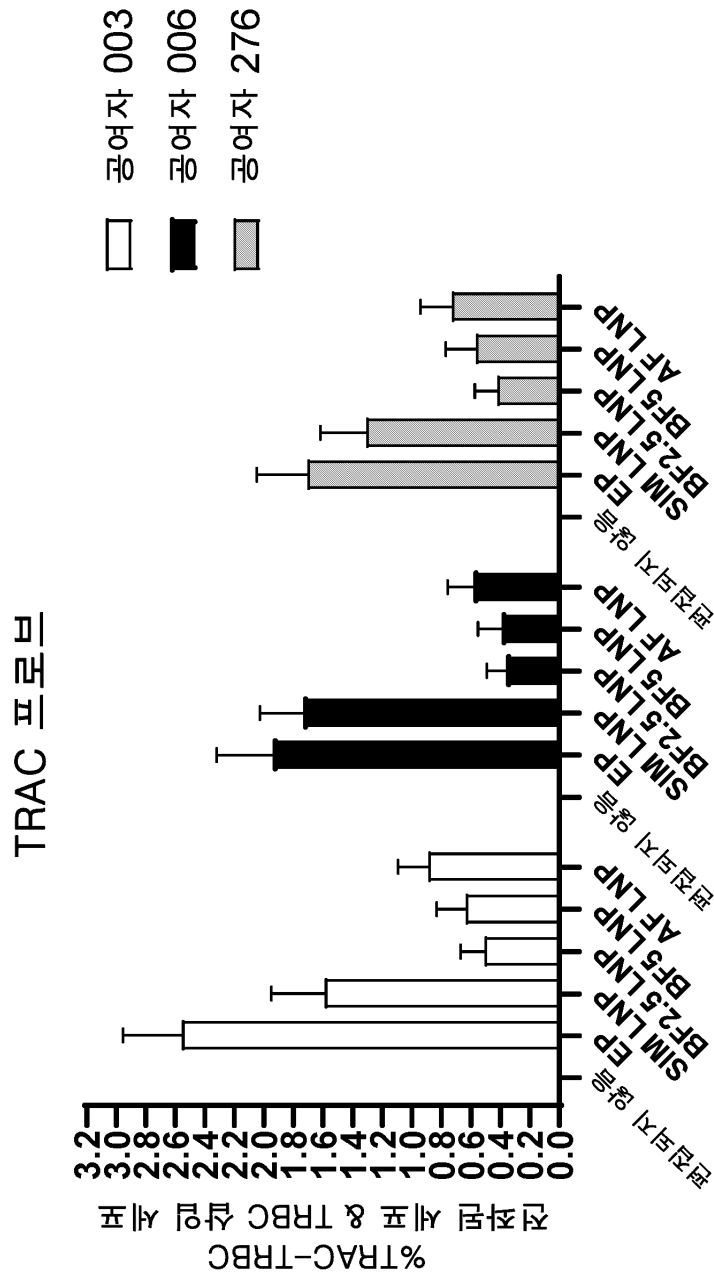
도면11



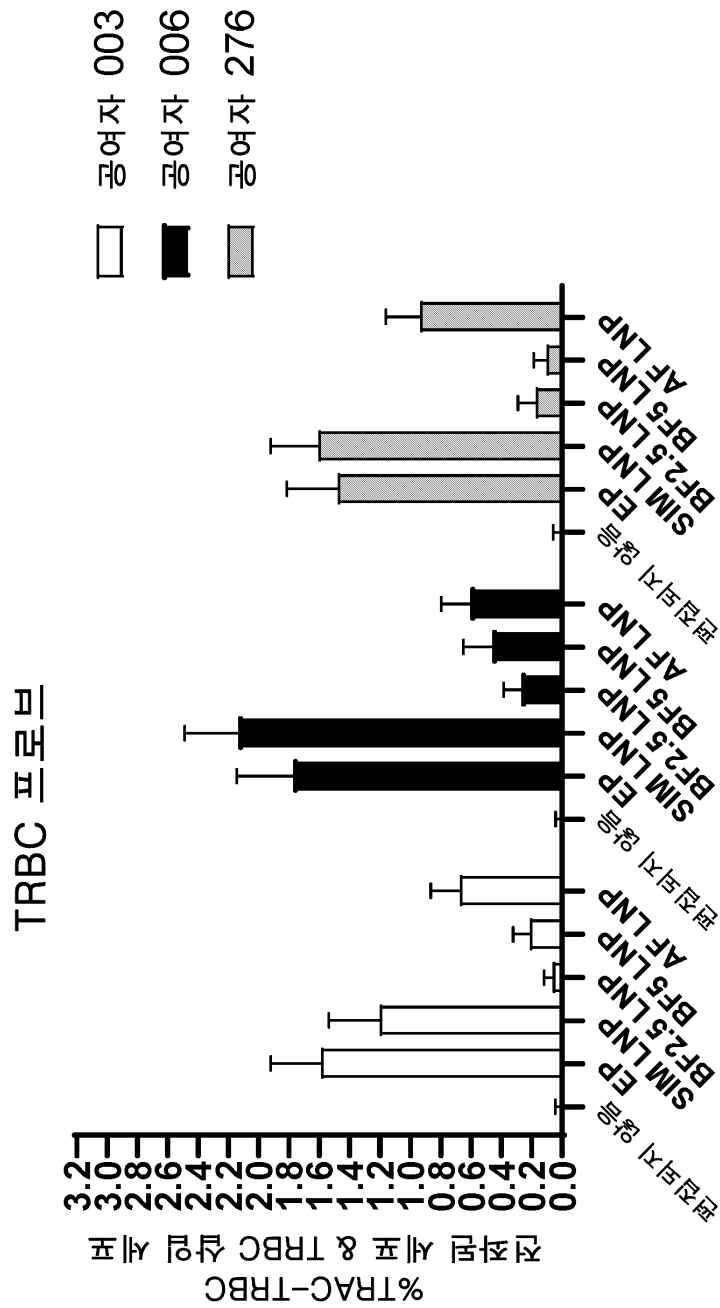
도면12



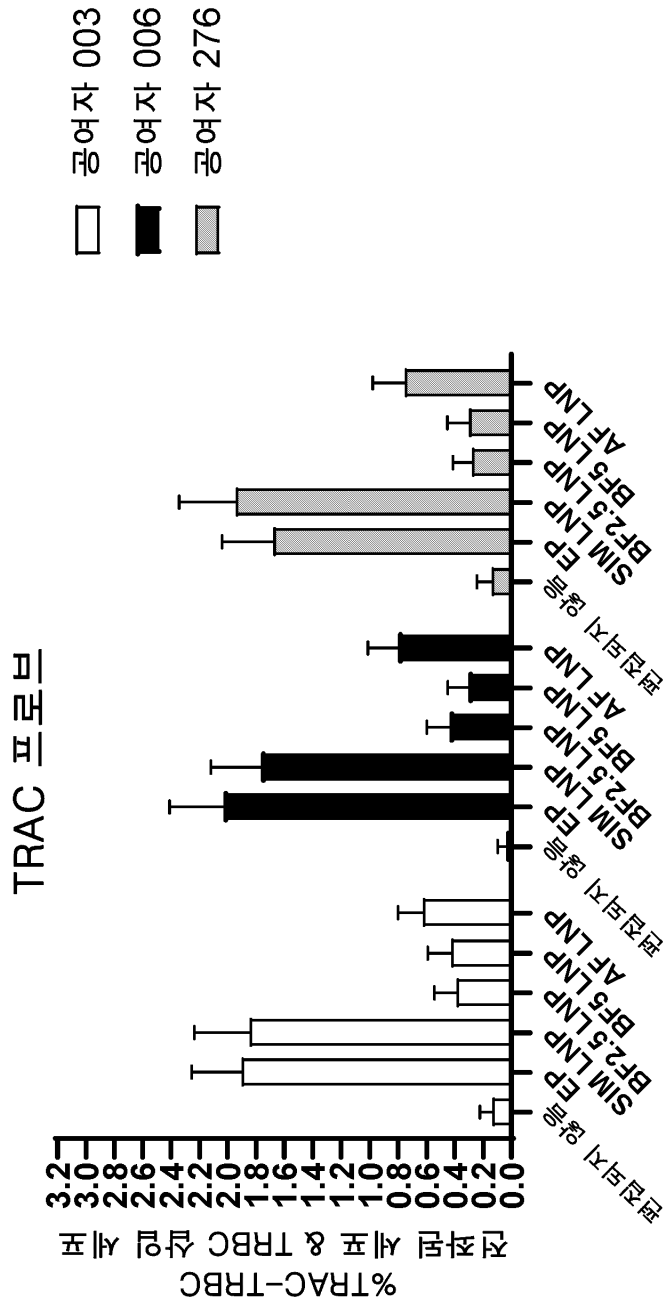
도면13a



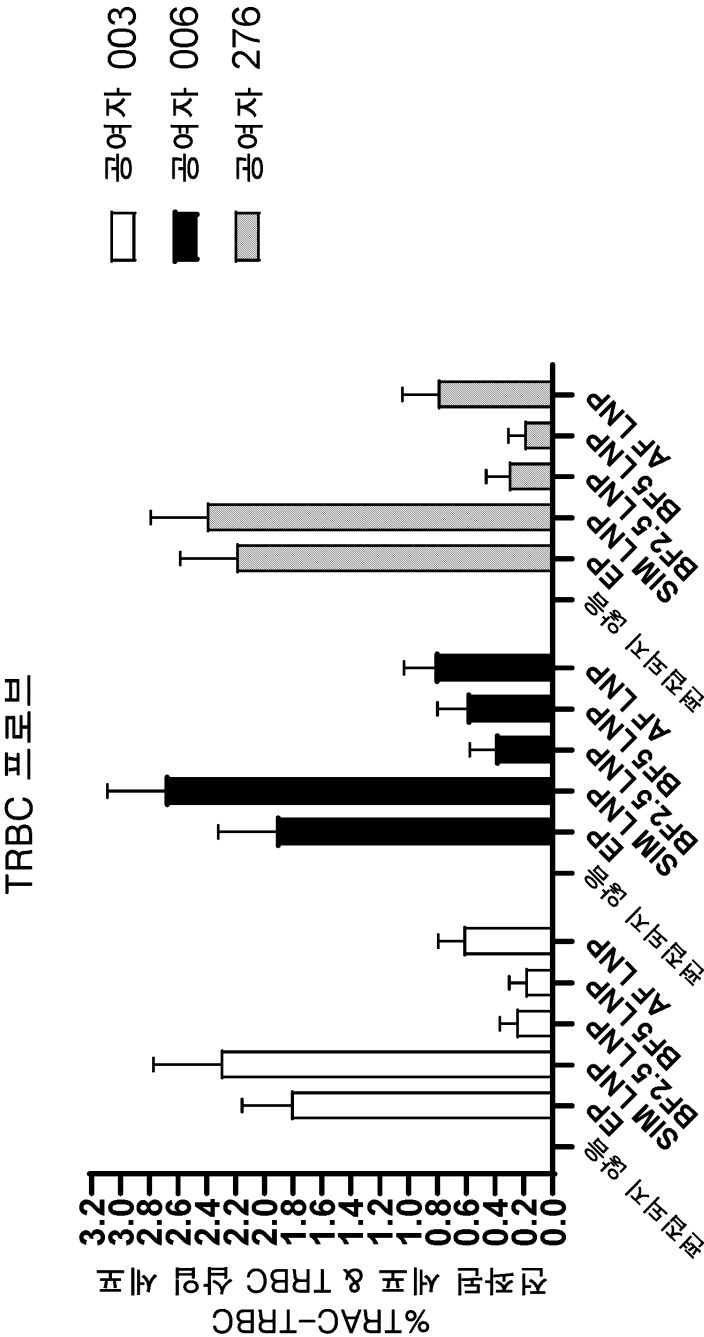
도면13b



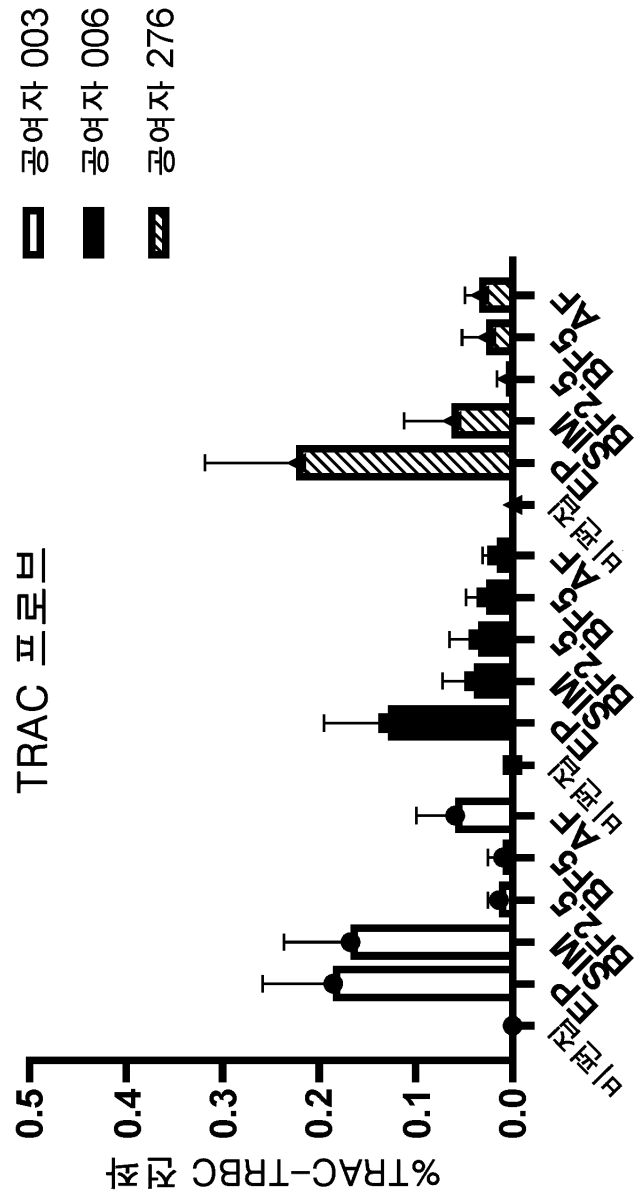
도면14a



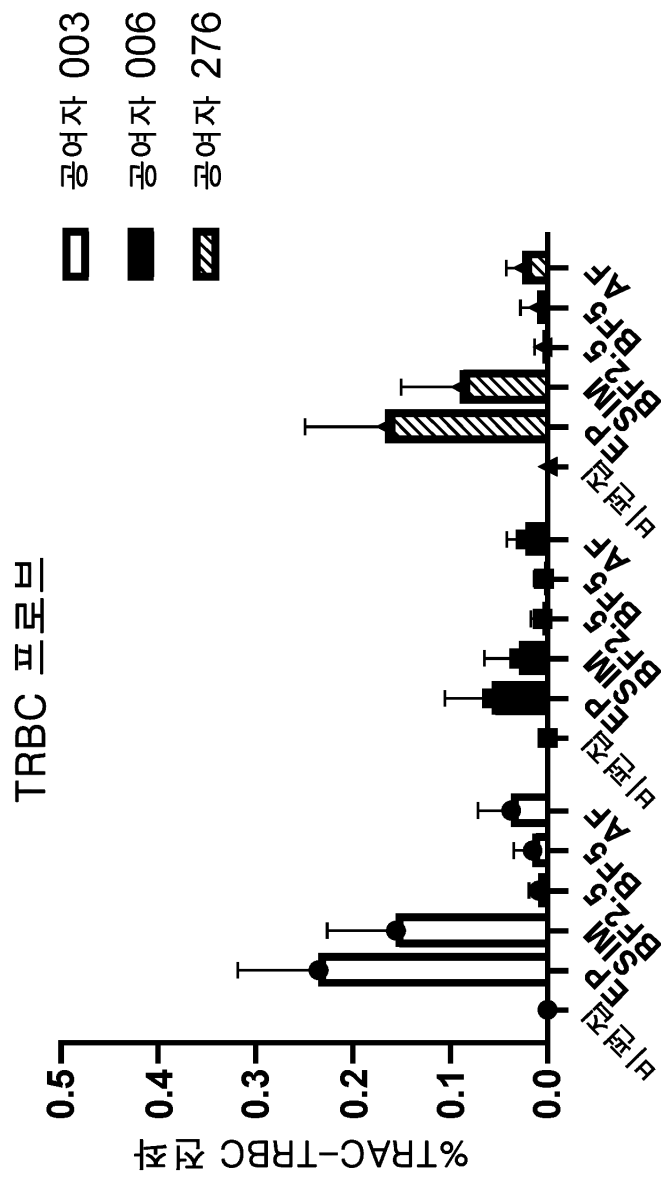
도면14b



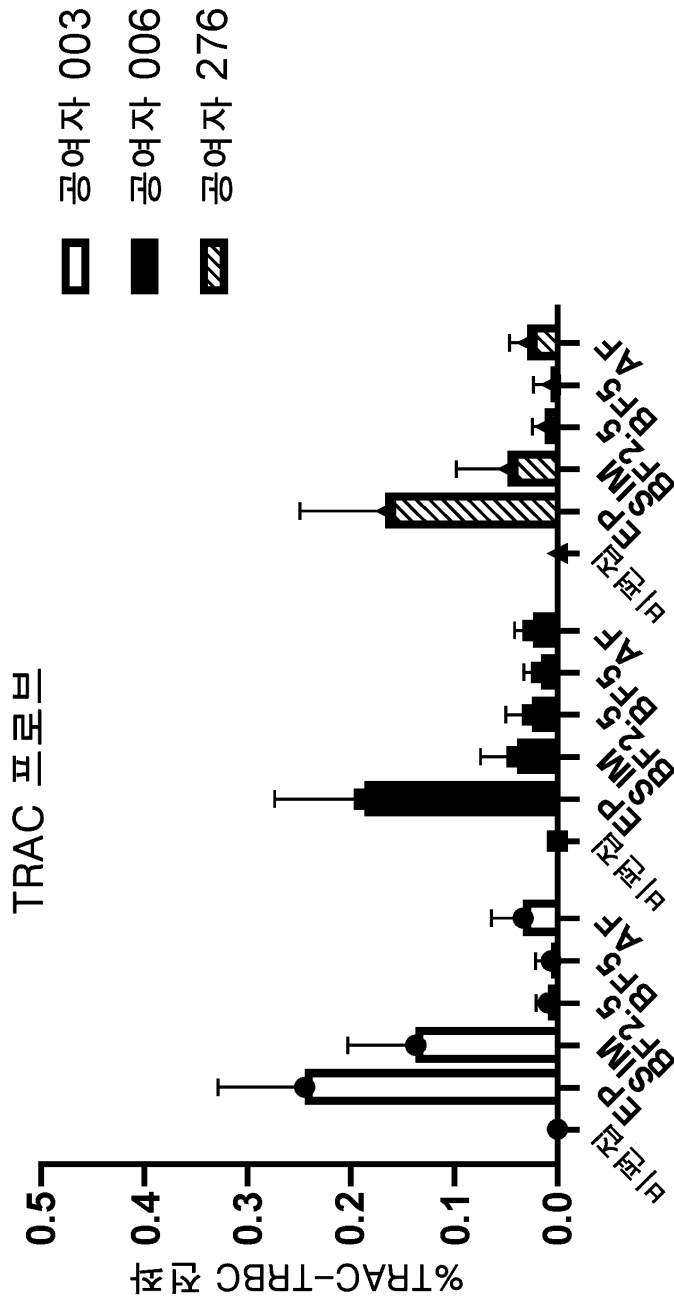
도면14c



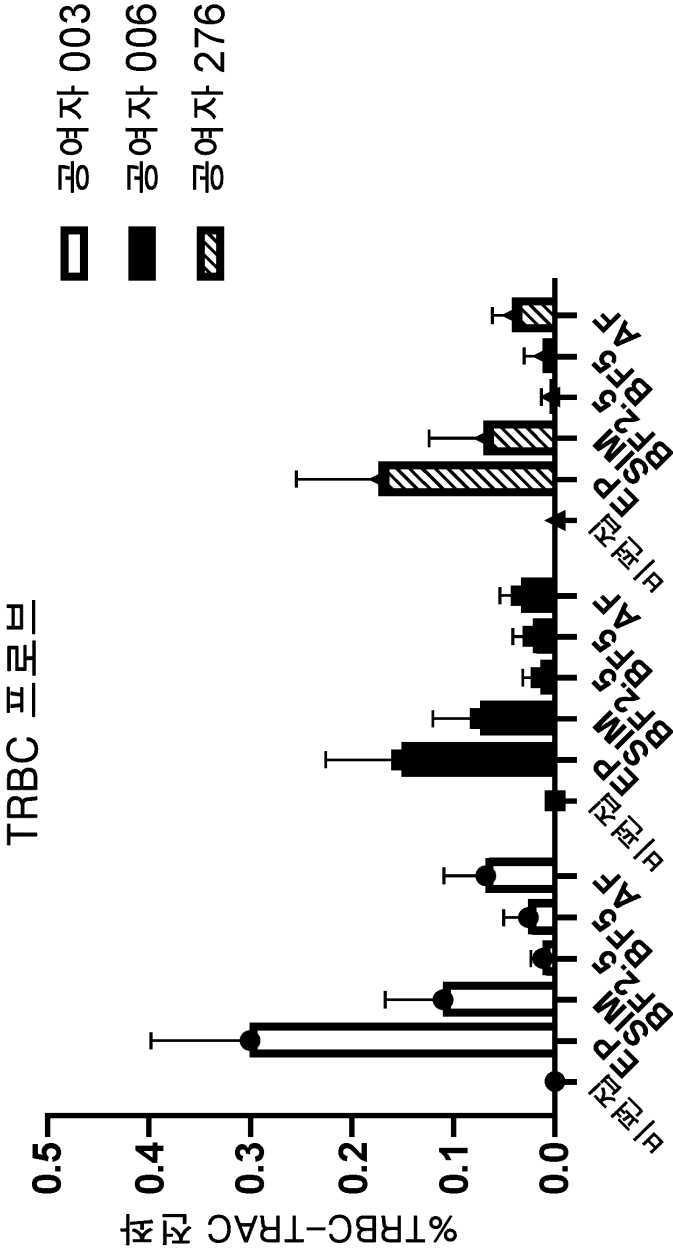
도면14d



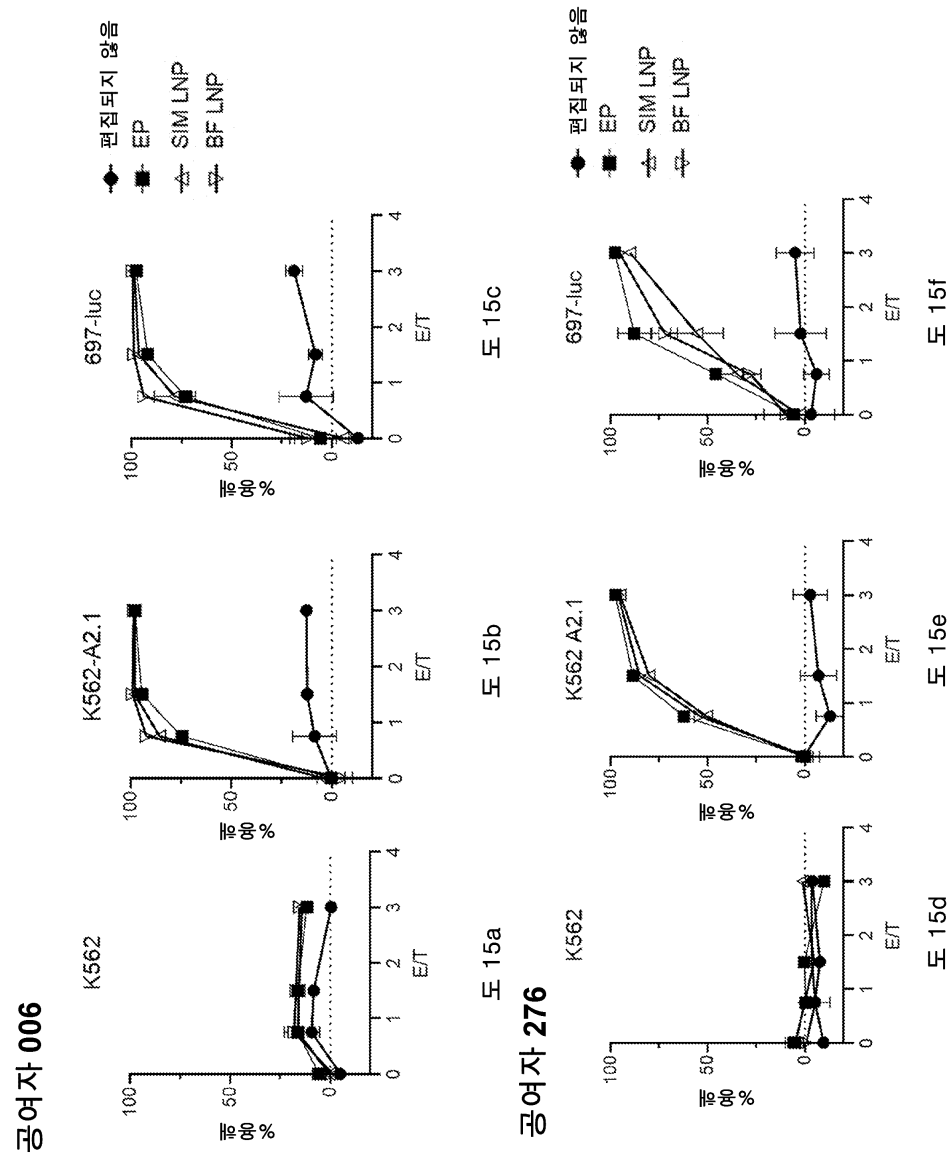
도면14e



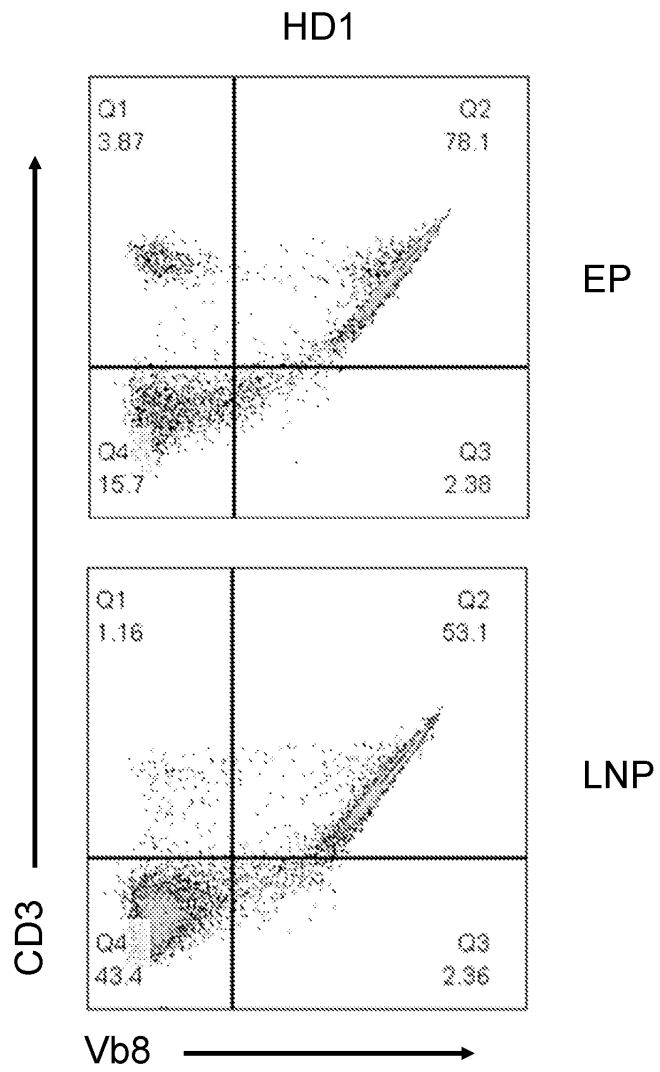
도면14f



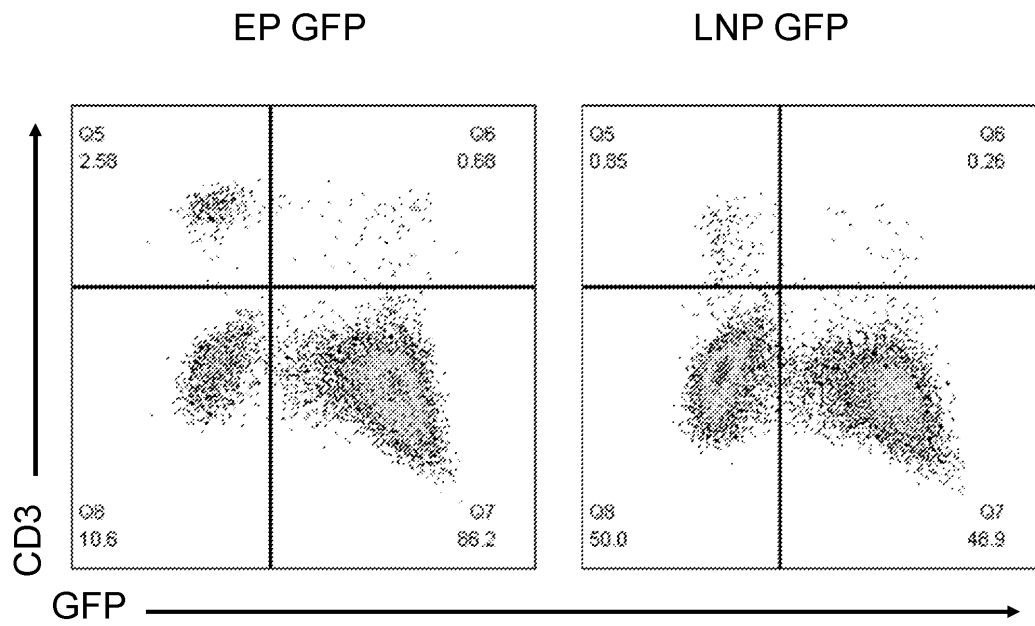
도면15



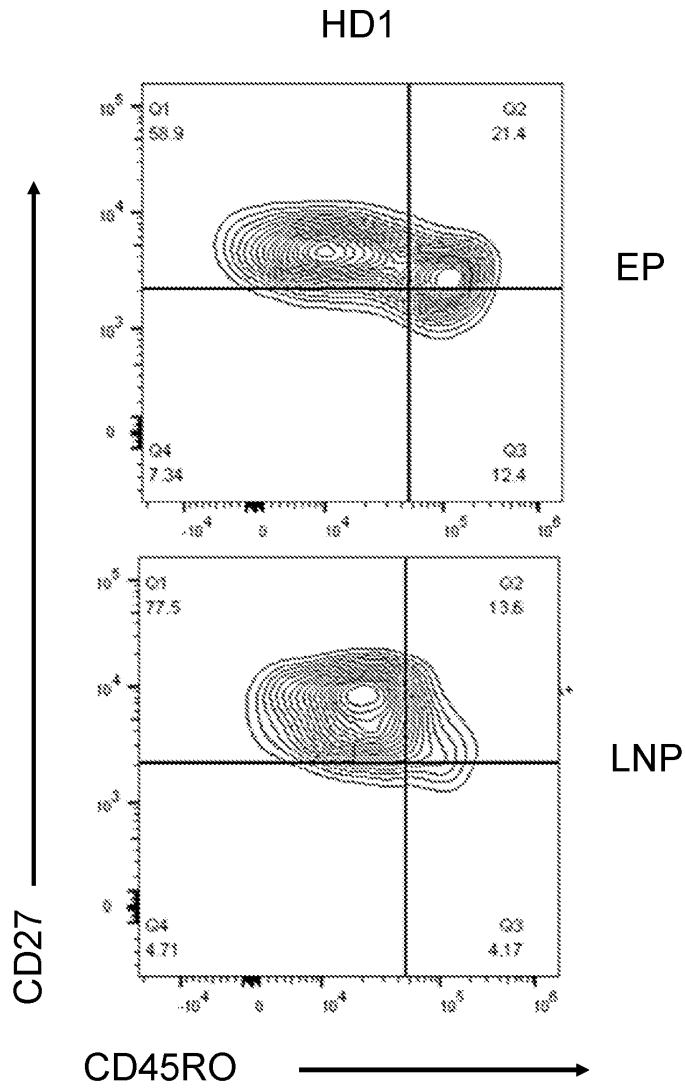
도면16



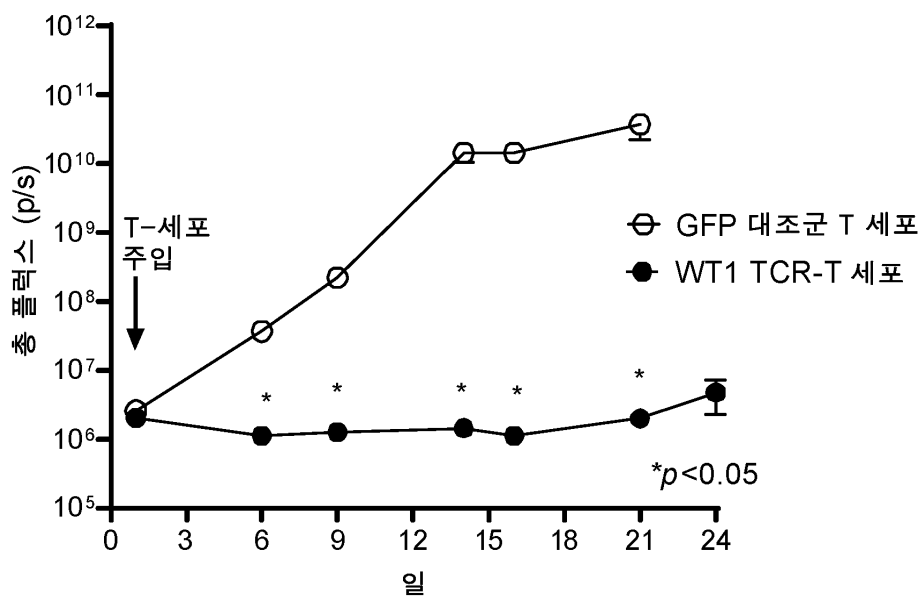
도면17



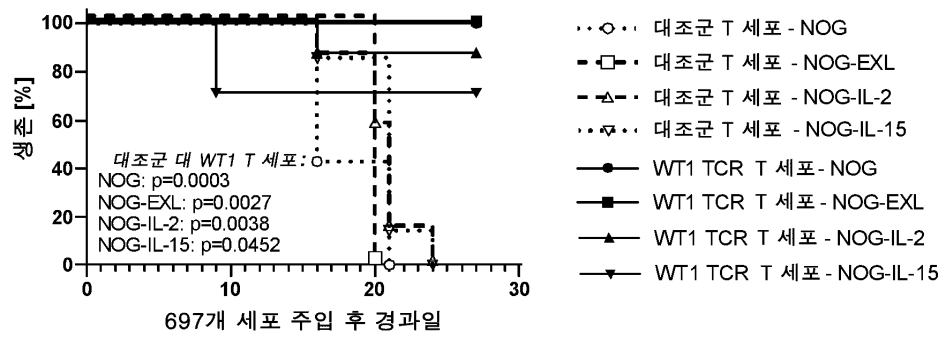
도면18



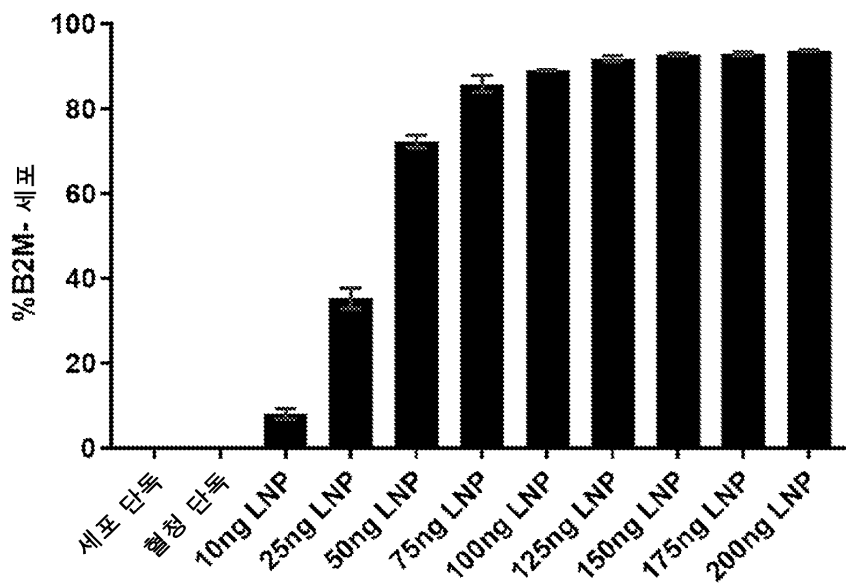
도면19



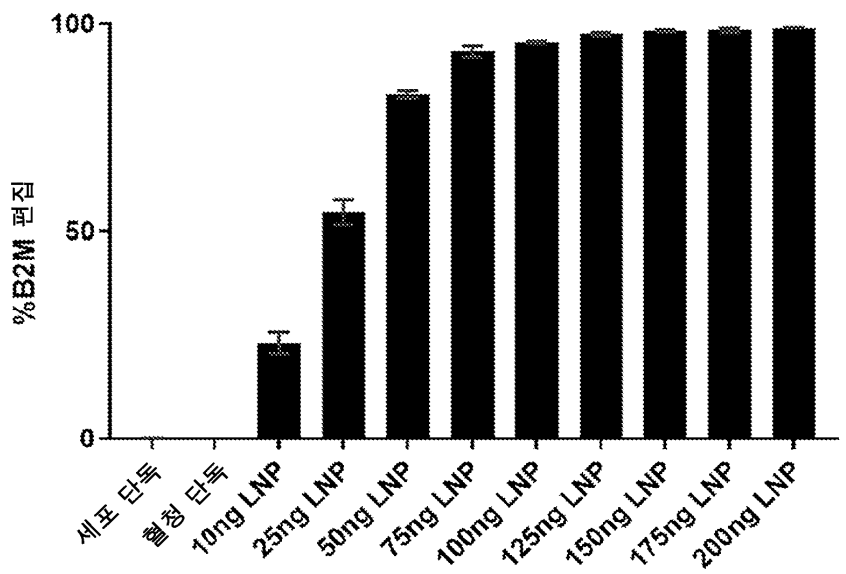
도면20



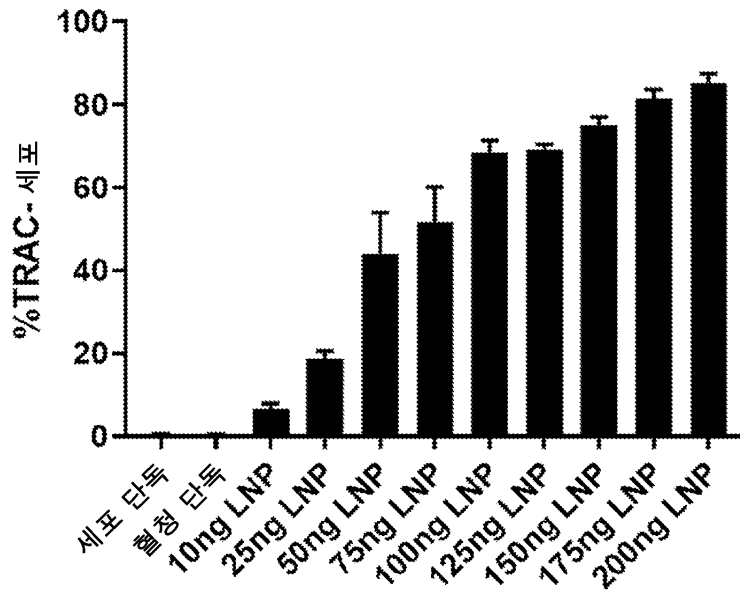
도면21a



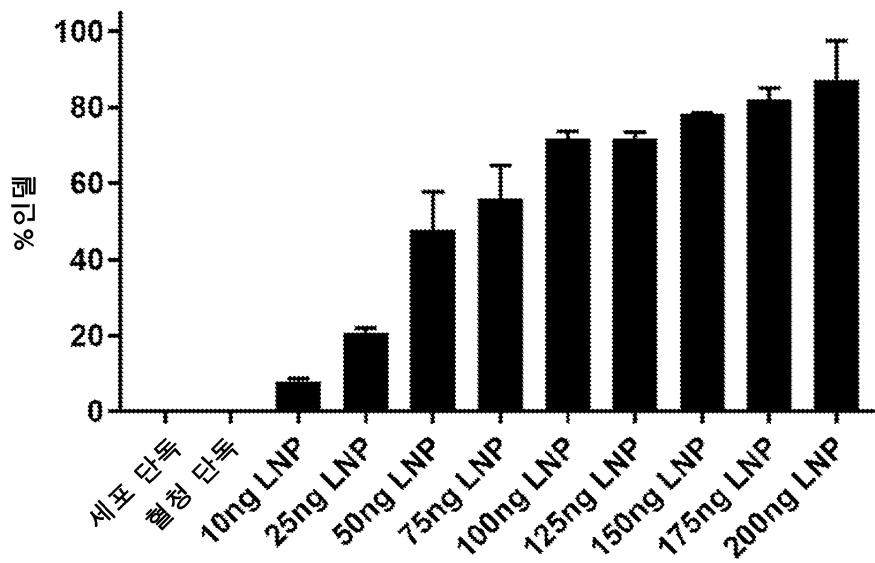
도면21b



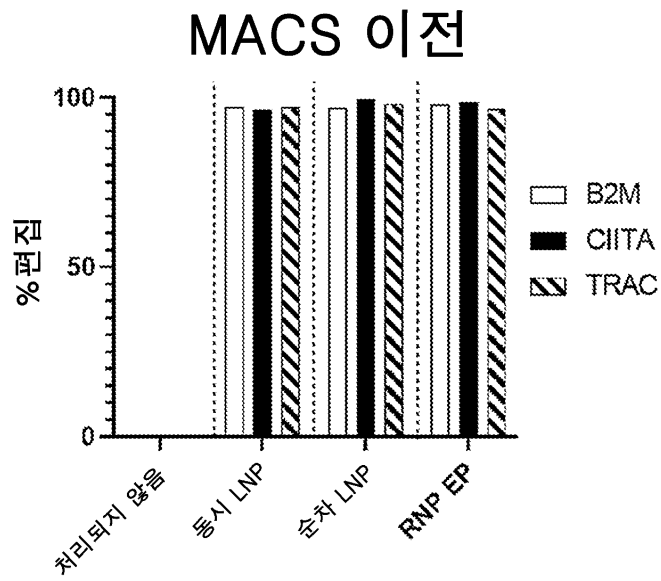
도면22a



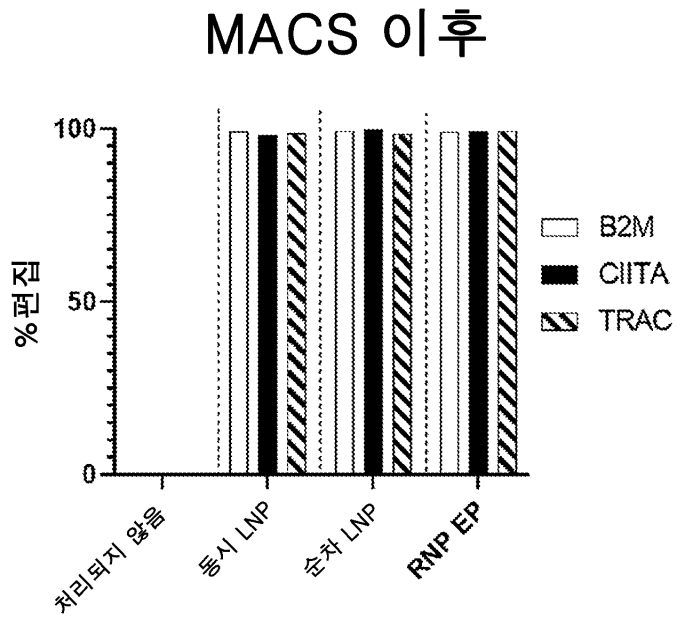
도면22b



도면23a

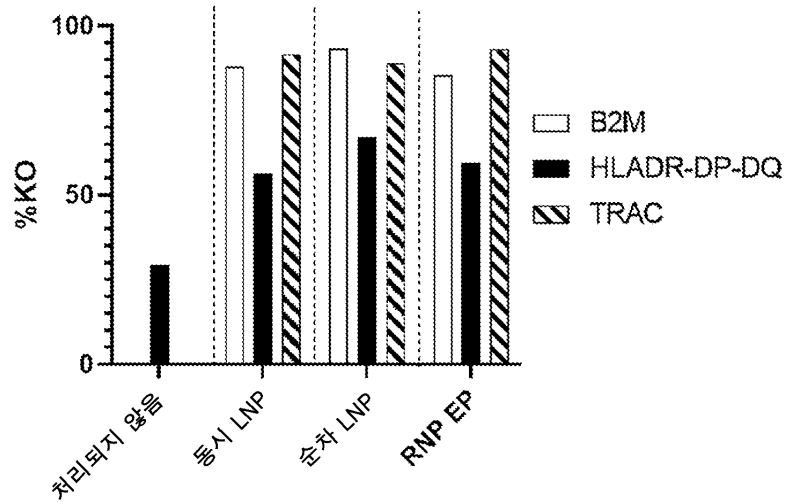


도면23b



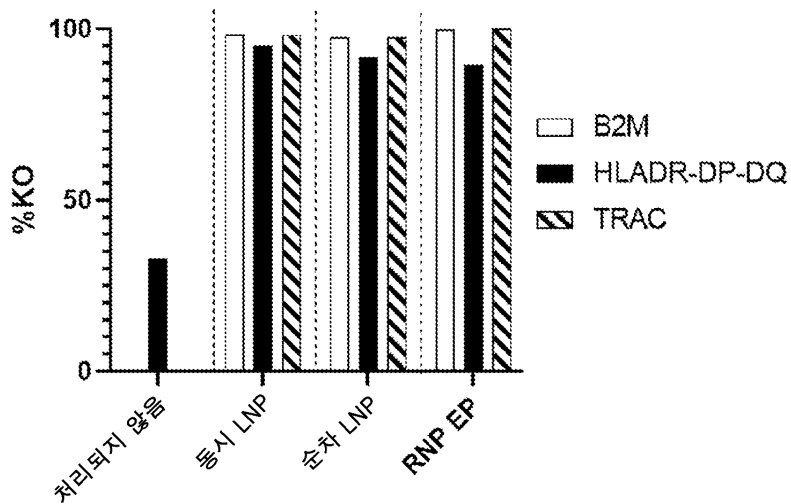
도면24a

MACS 이전

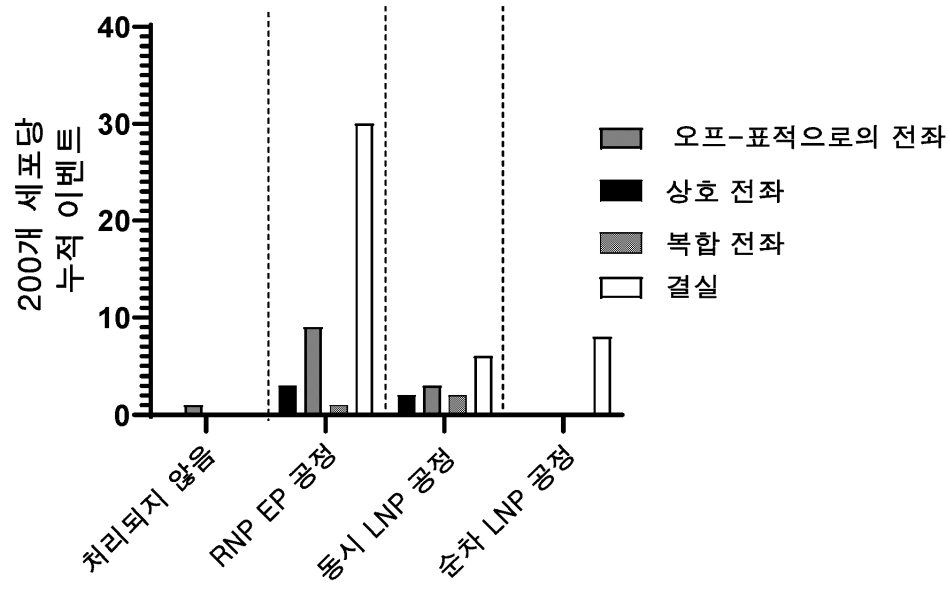


도면24b

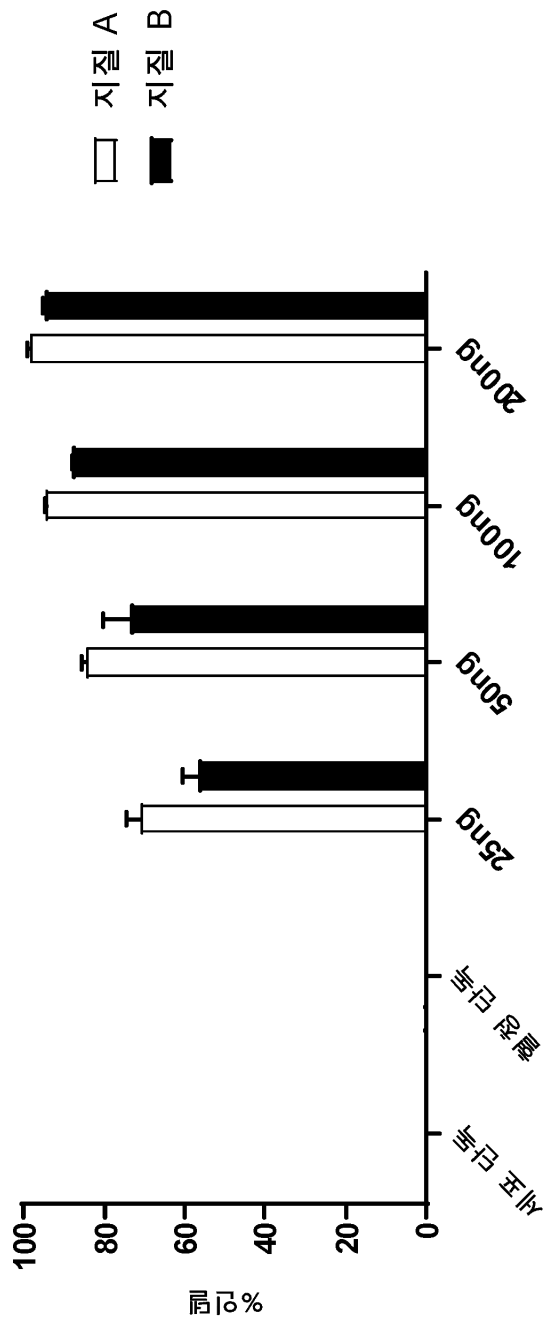
MACS 이후



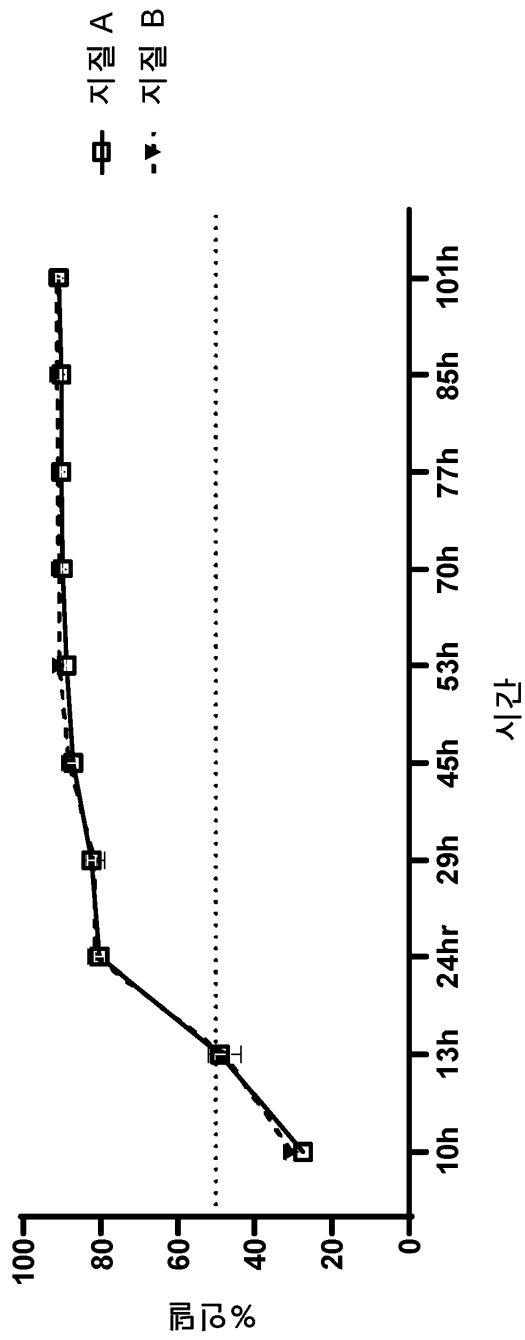
도면25



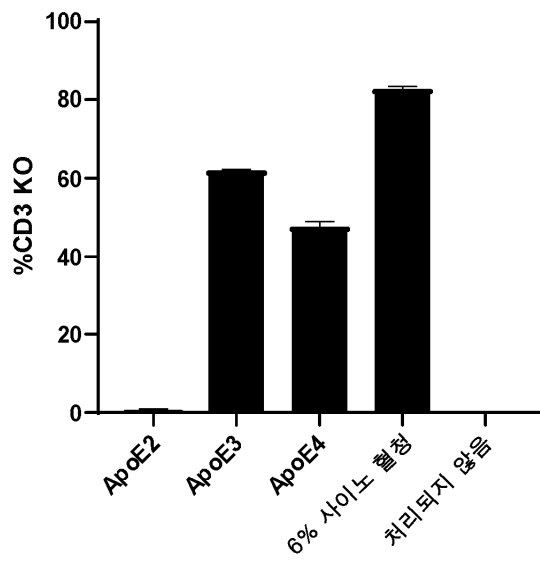
도면26



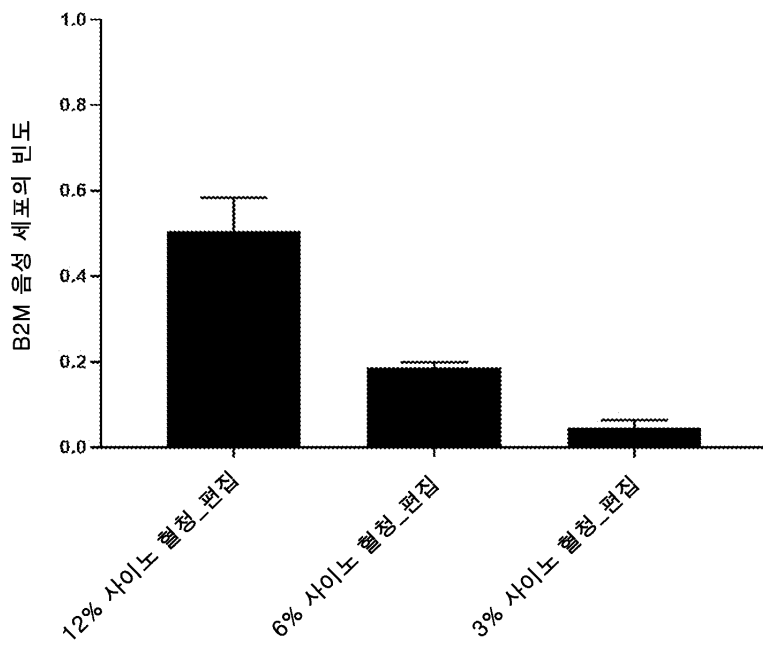
도면27



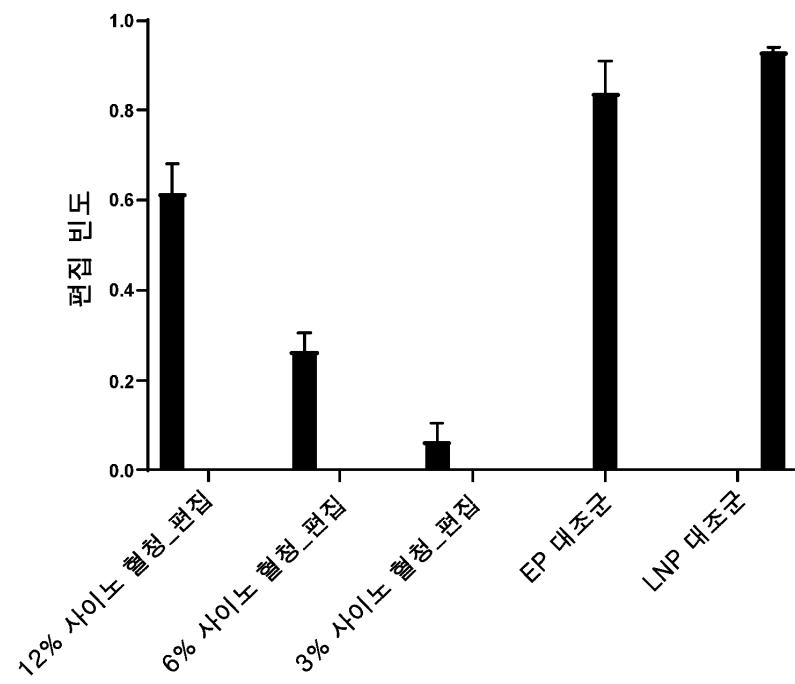
도면28



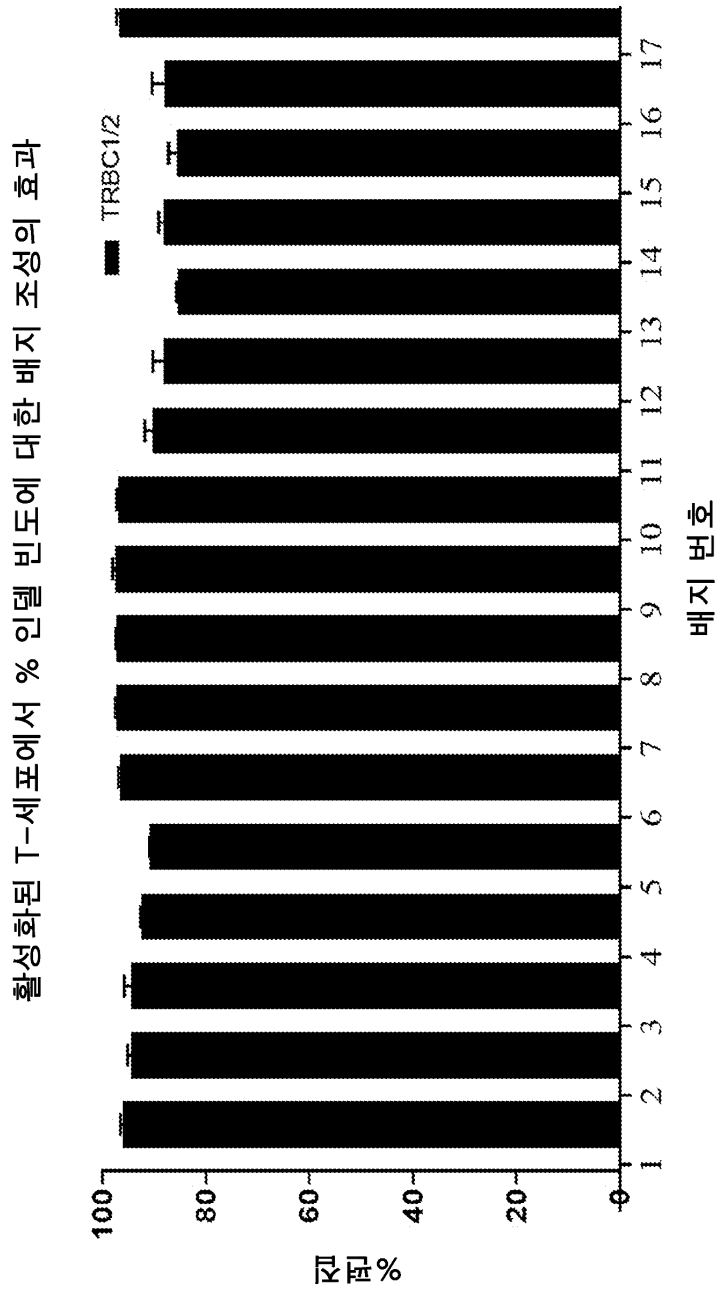
도면29



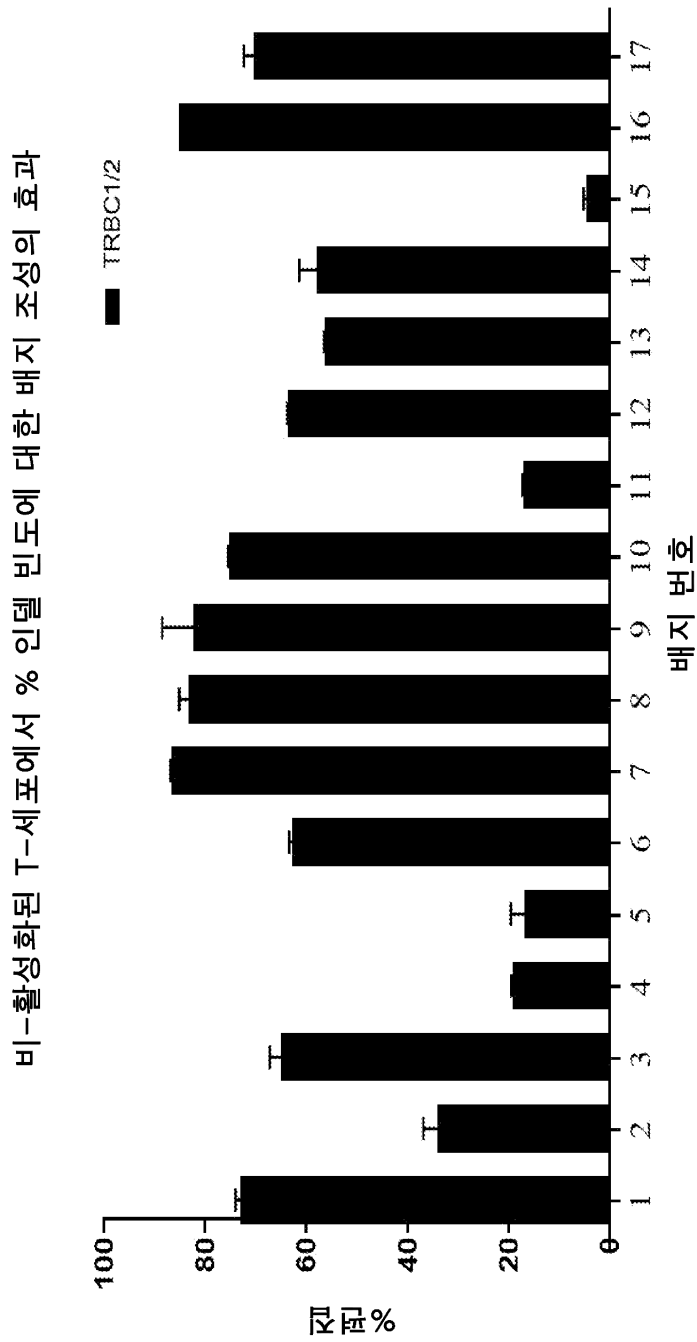
도면30



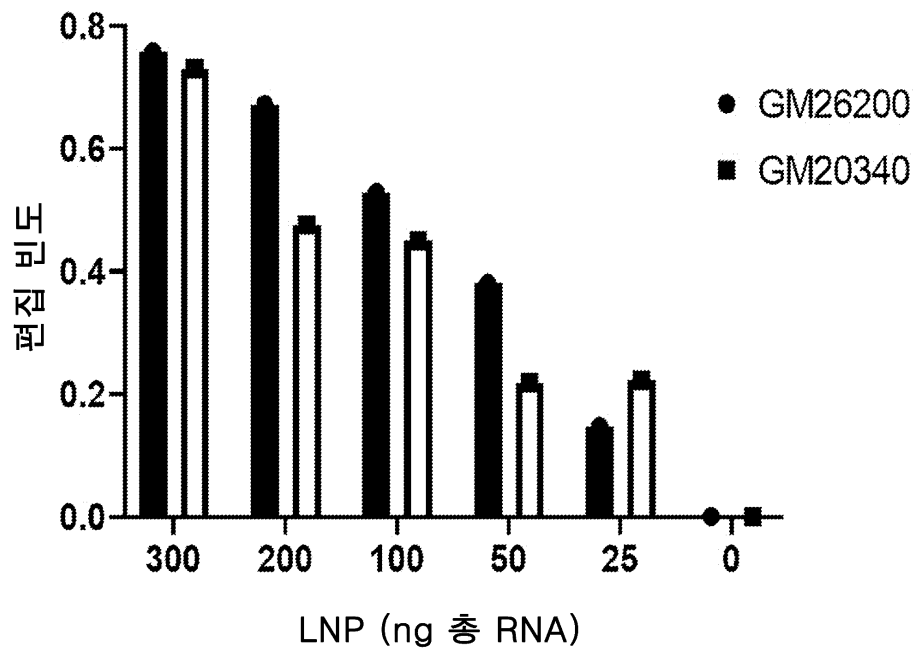
도면31



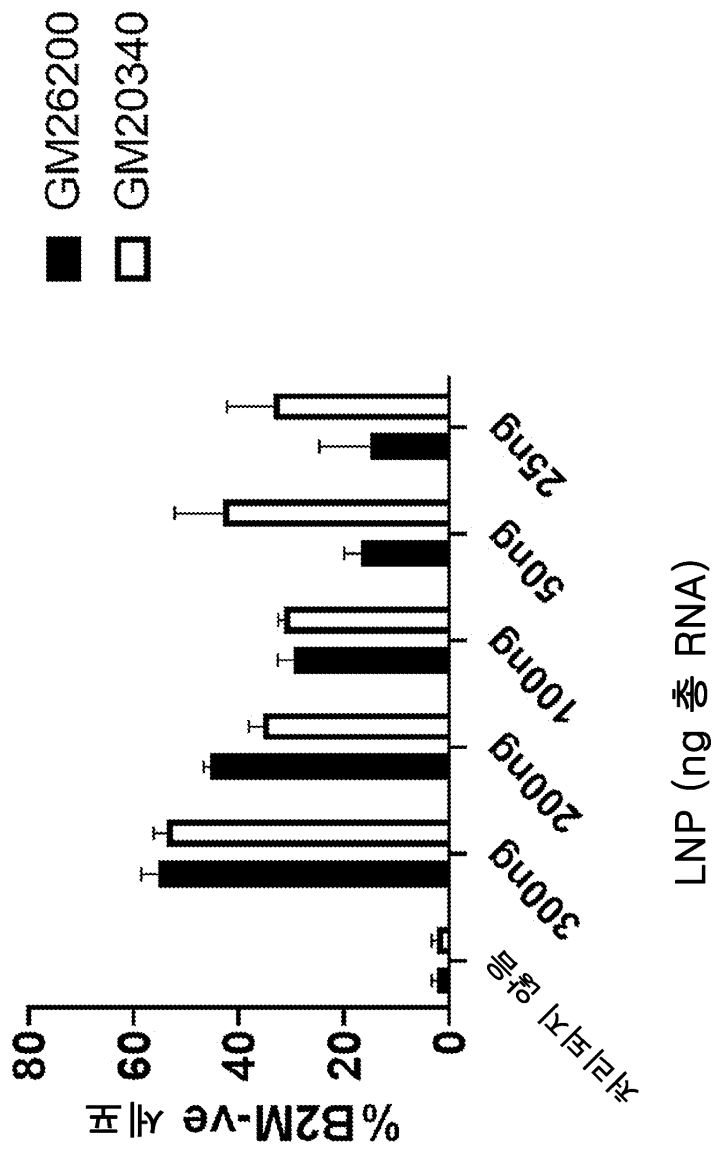
도면32



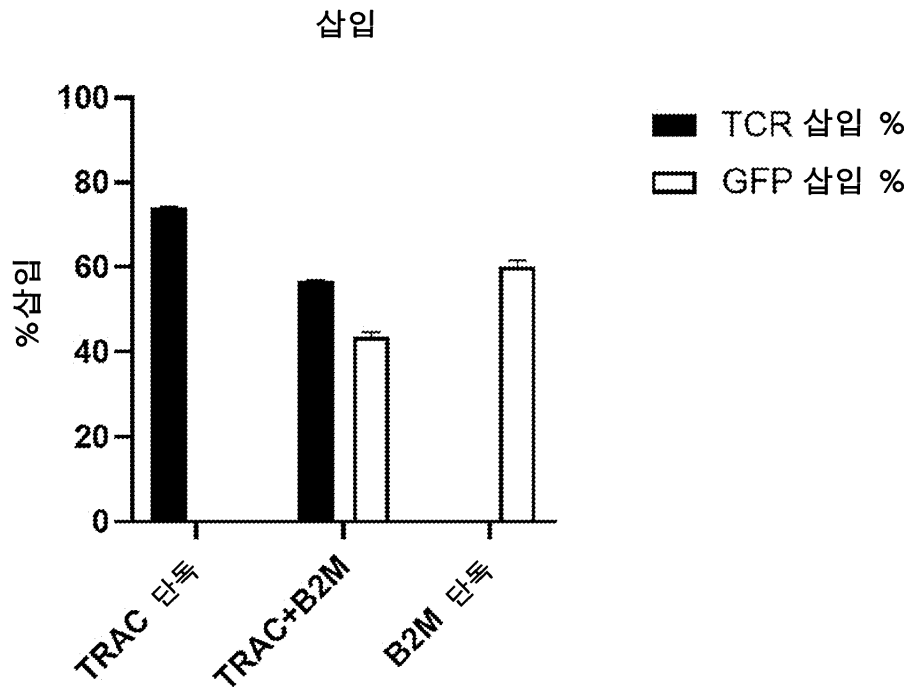
도면33



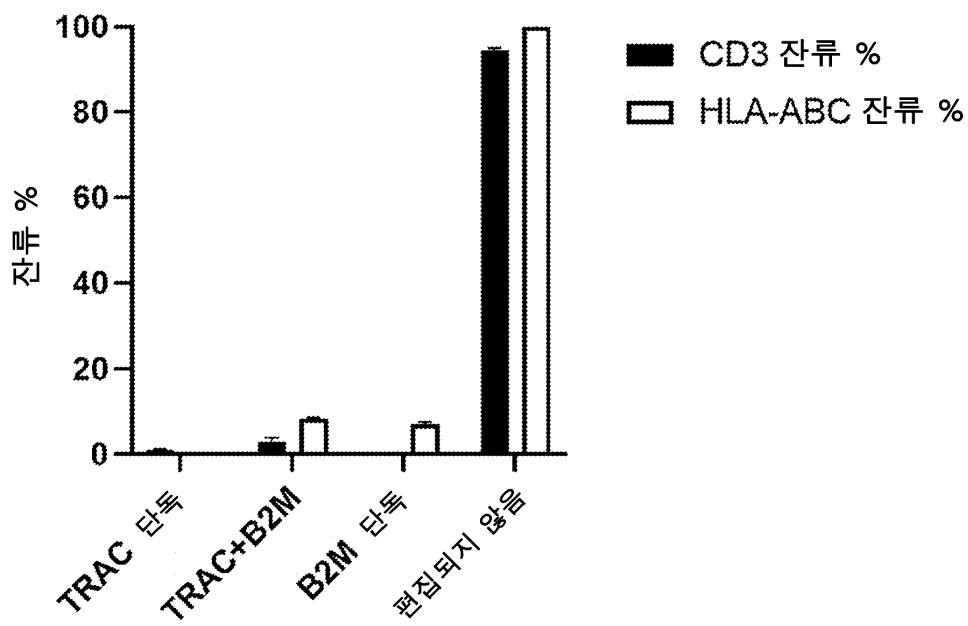
도면34



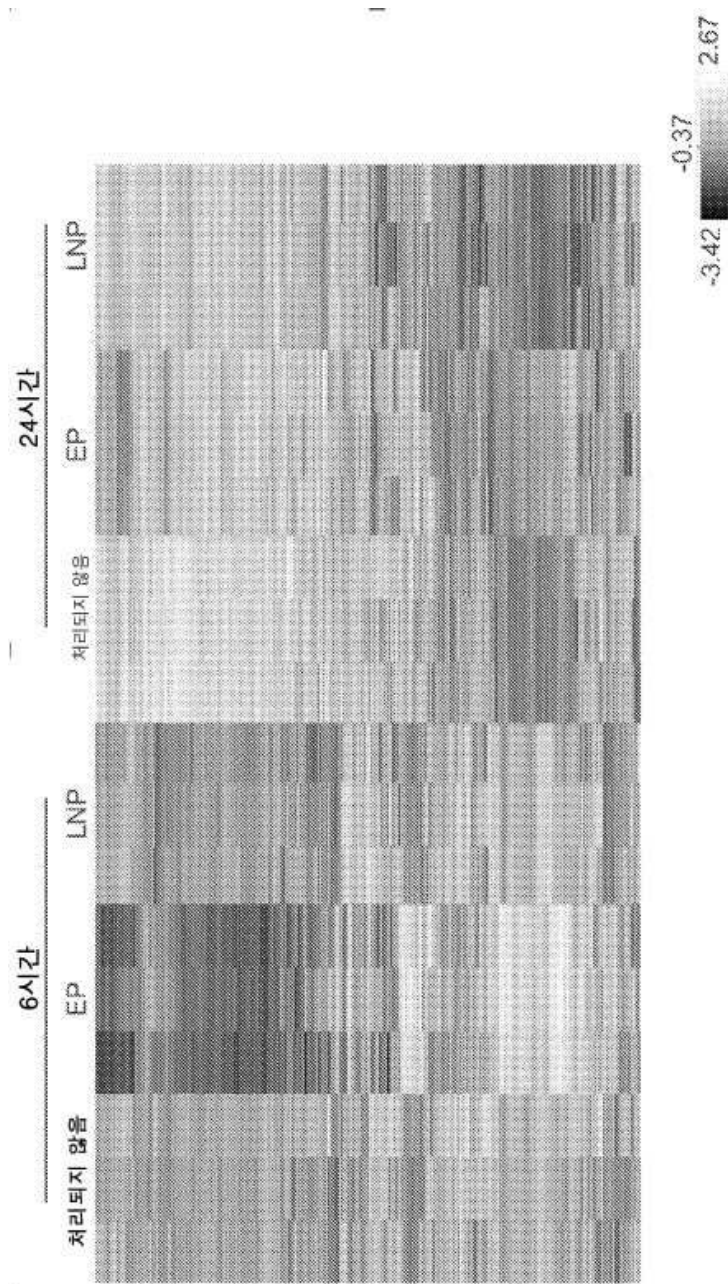
도면35



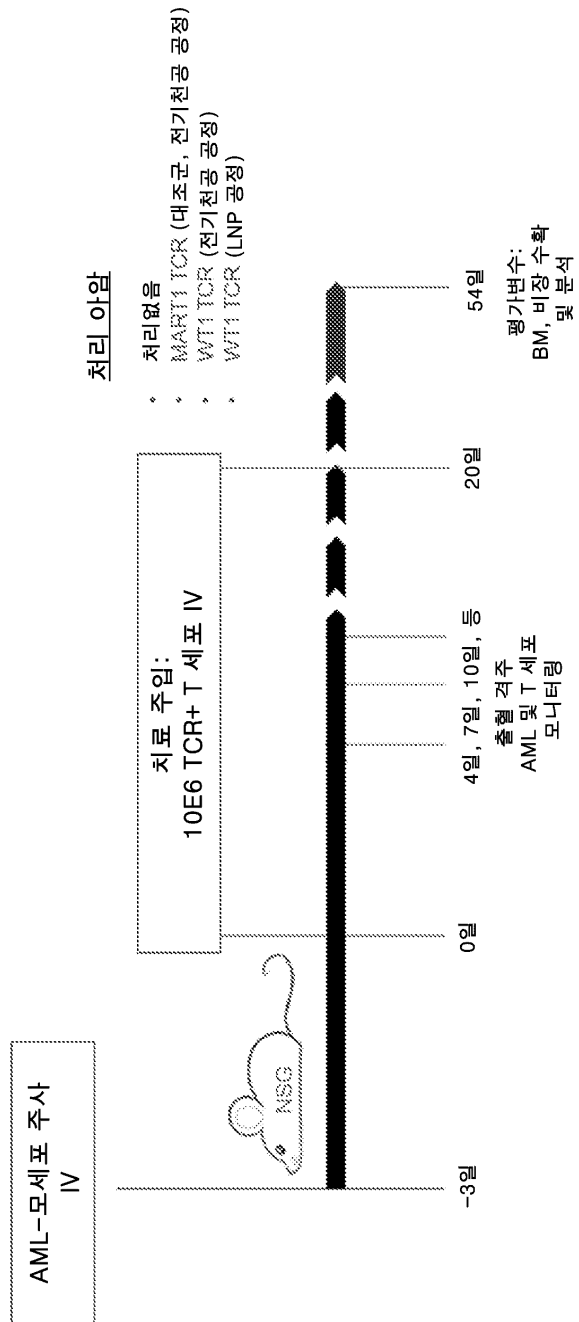
도면36



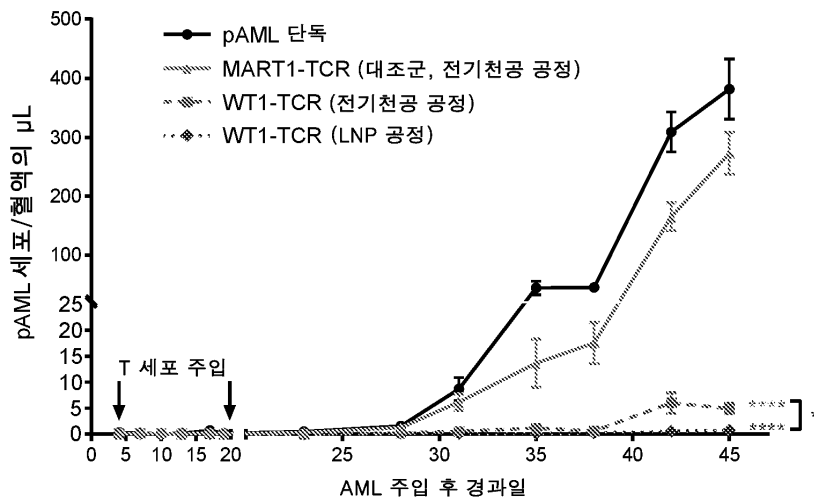
도면37



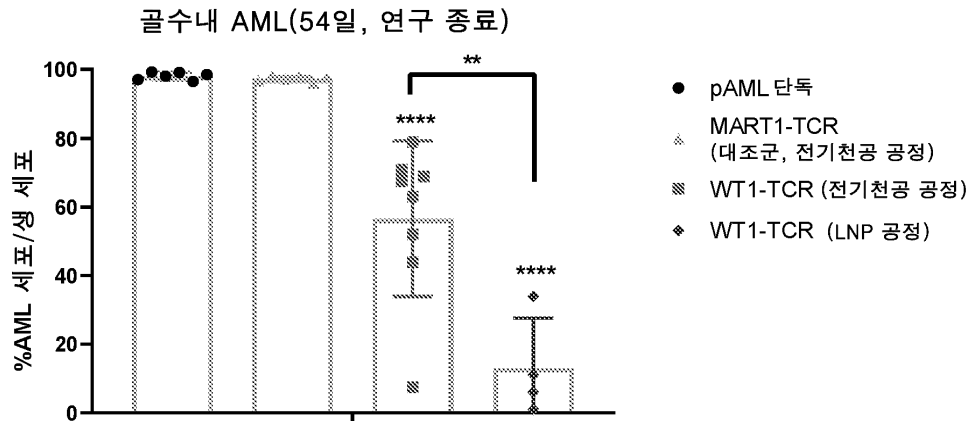
도면38a



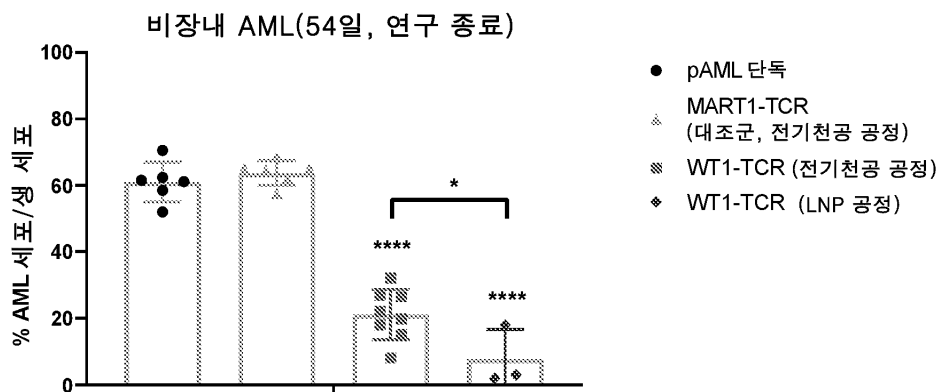
도면38b



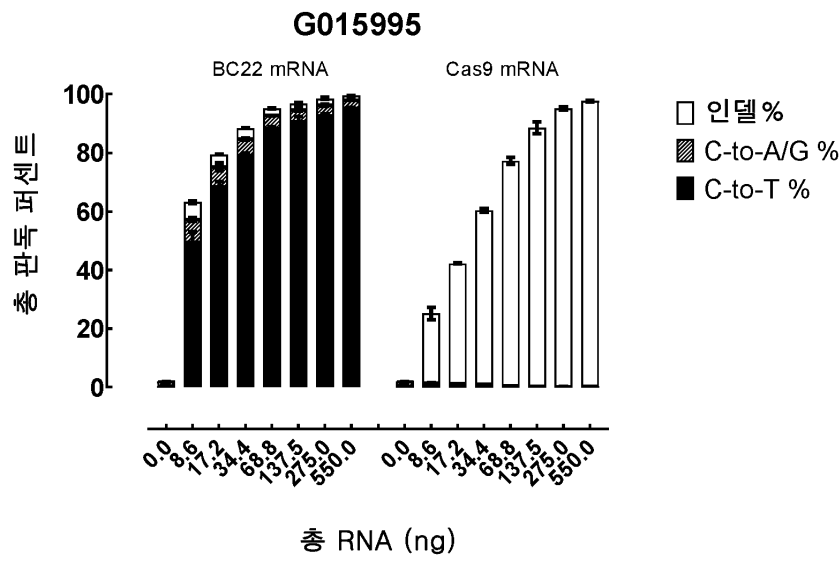
도면38c



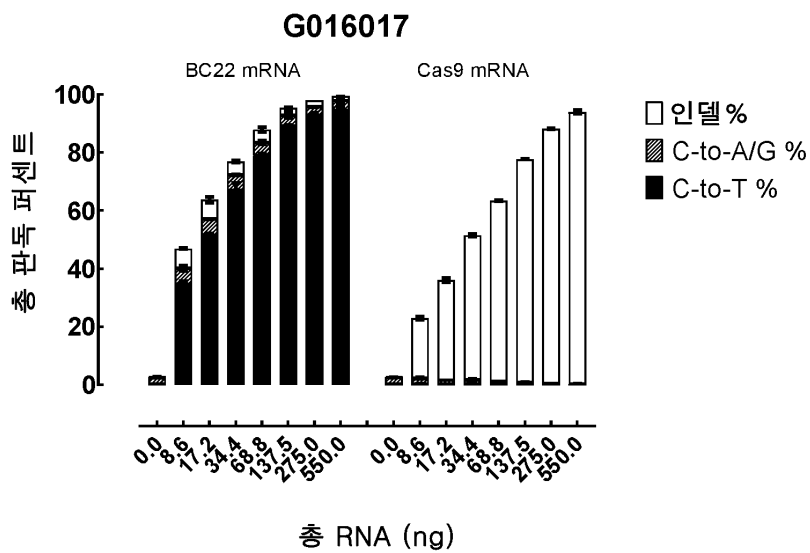
도면38d



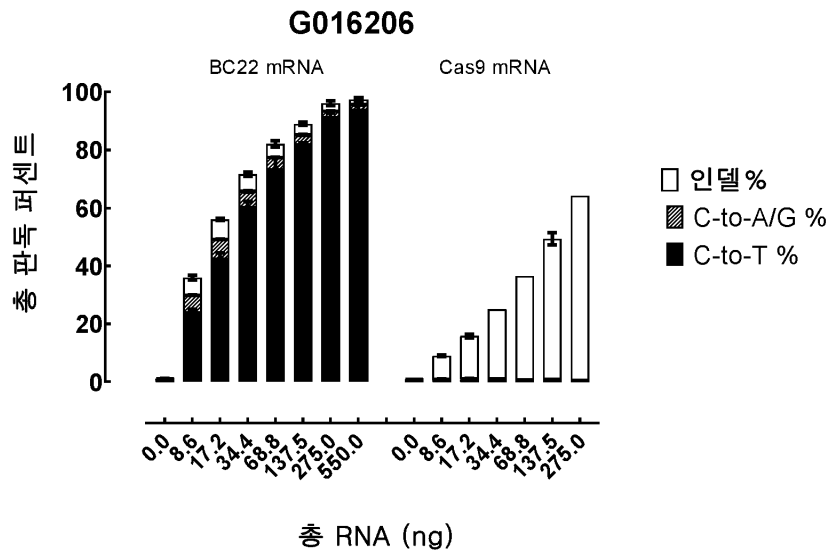
도면39a



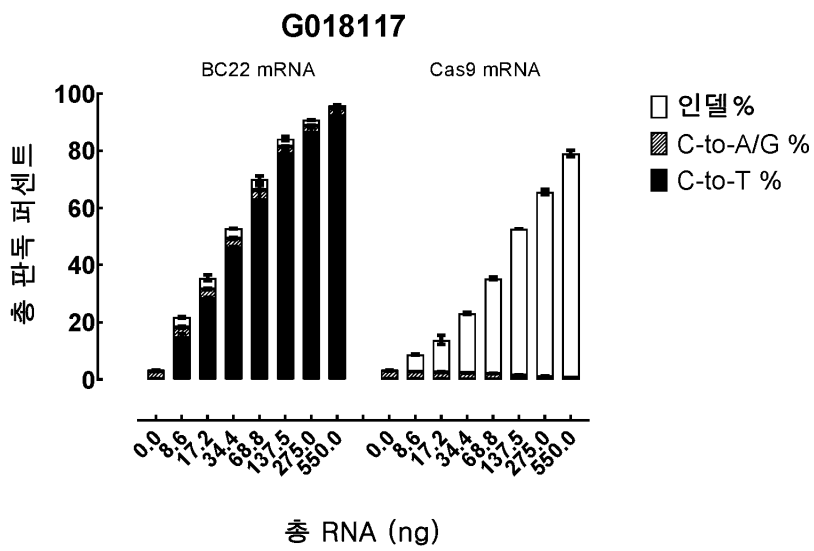
도면39b



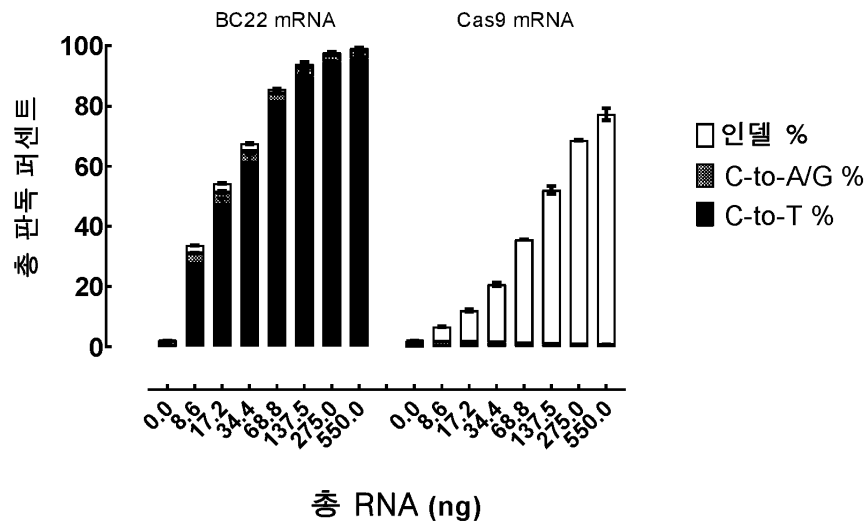
도면39c



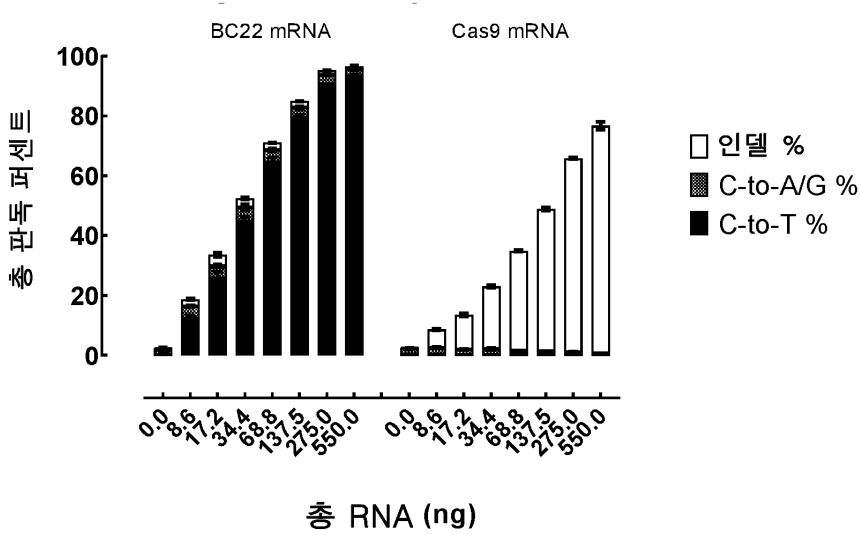
도면39d



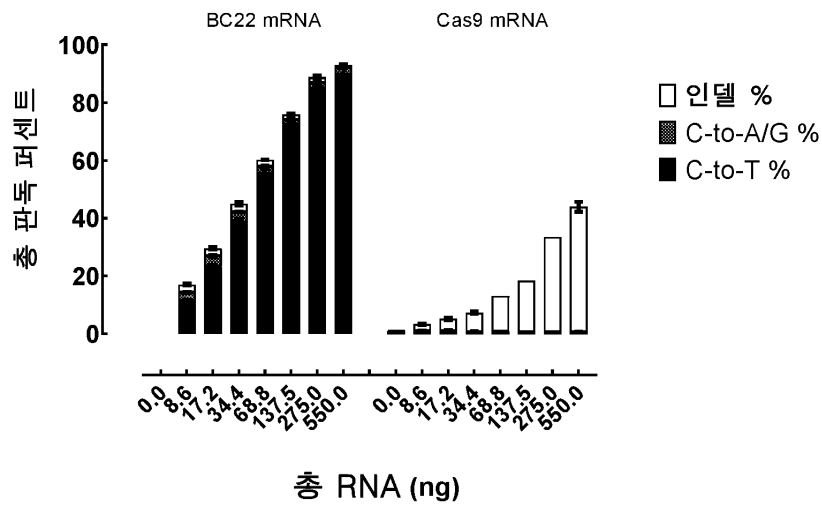
도면40a



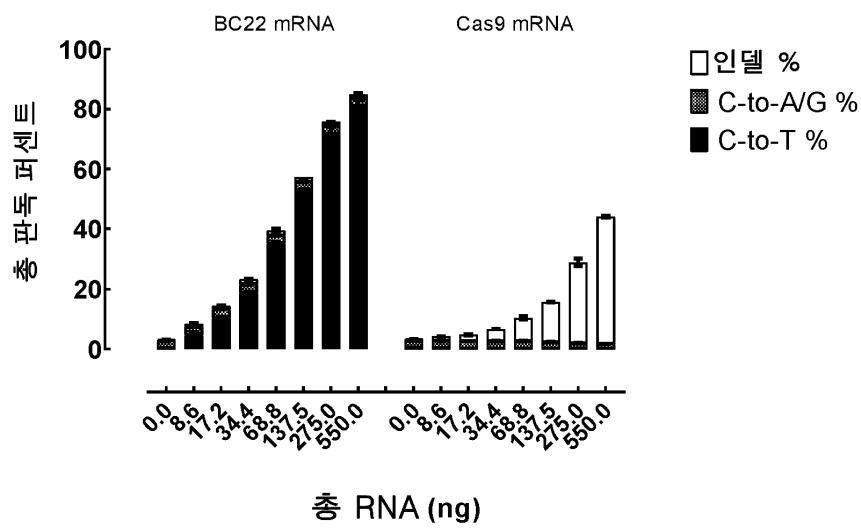
도면40b



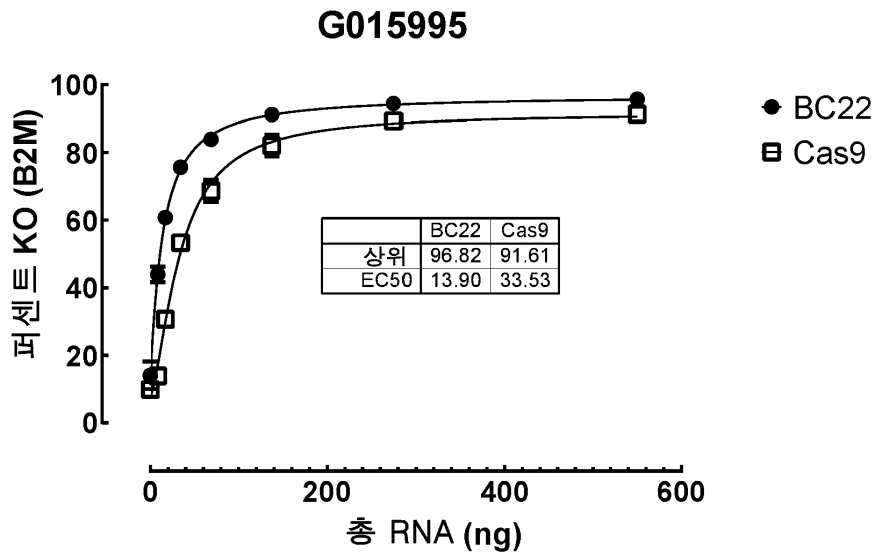
도면40c



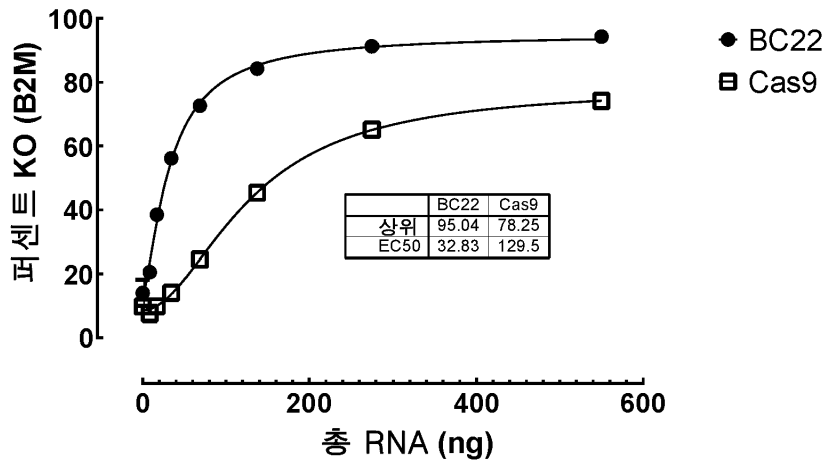
도면40d



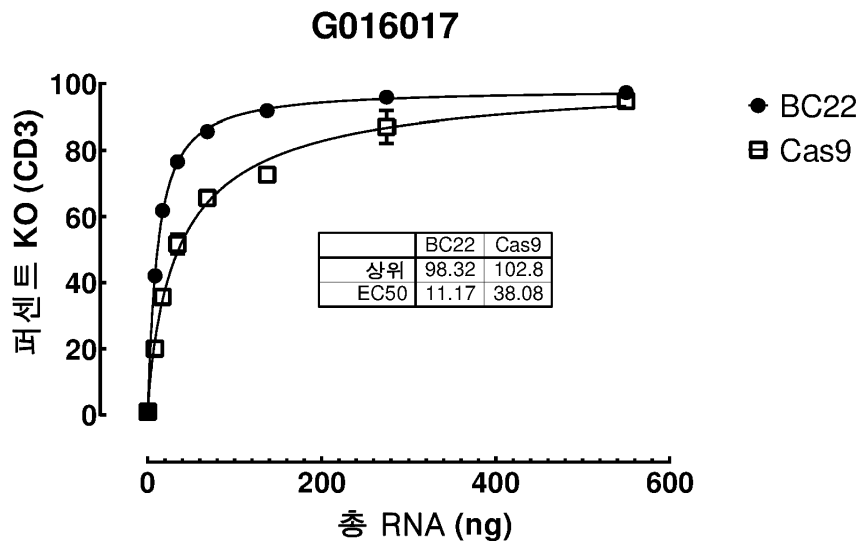
도면41a



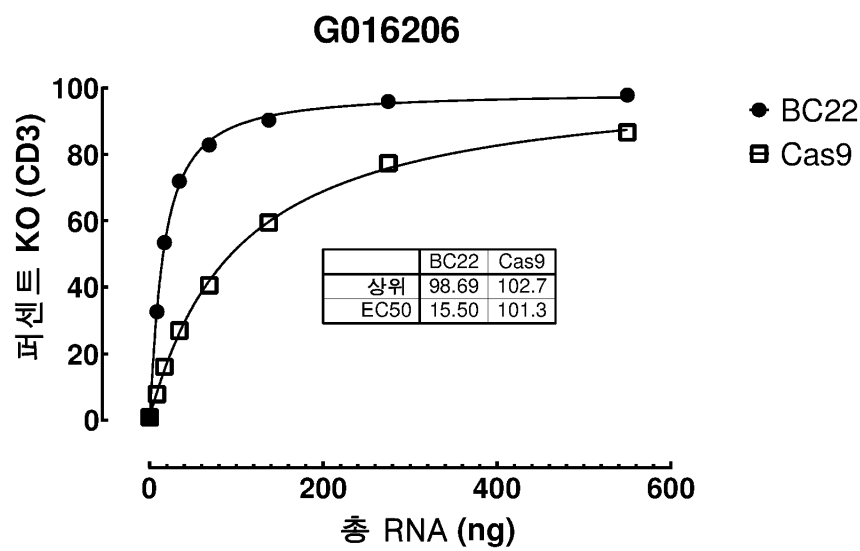
도면41b



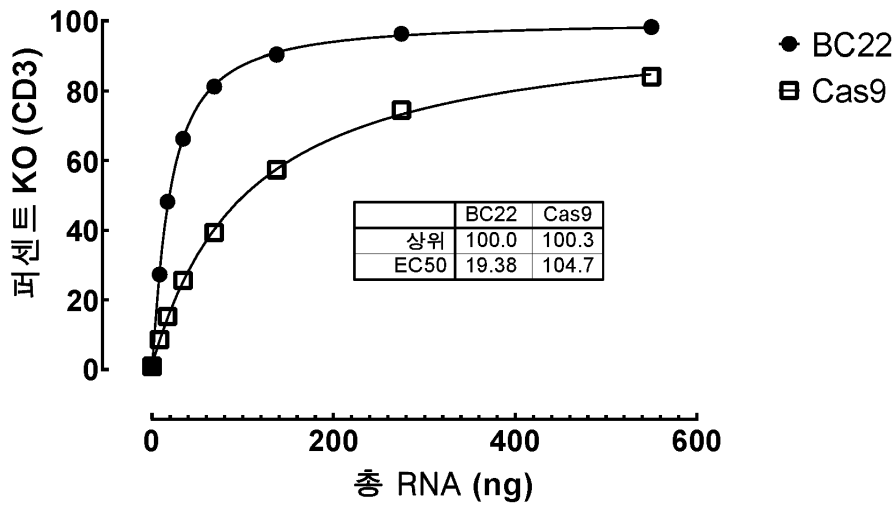
도면41c



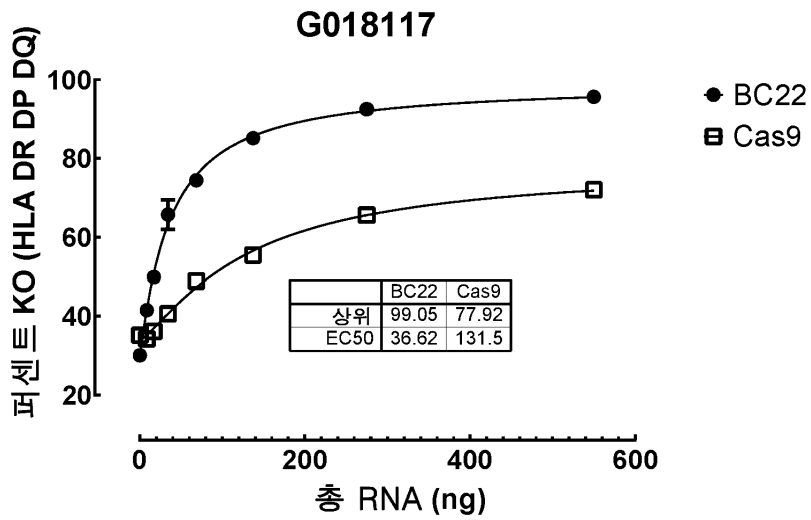
도면41d



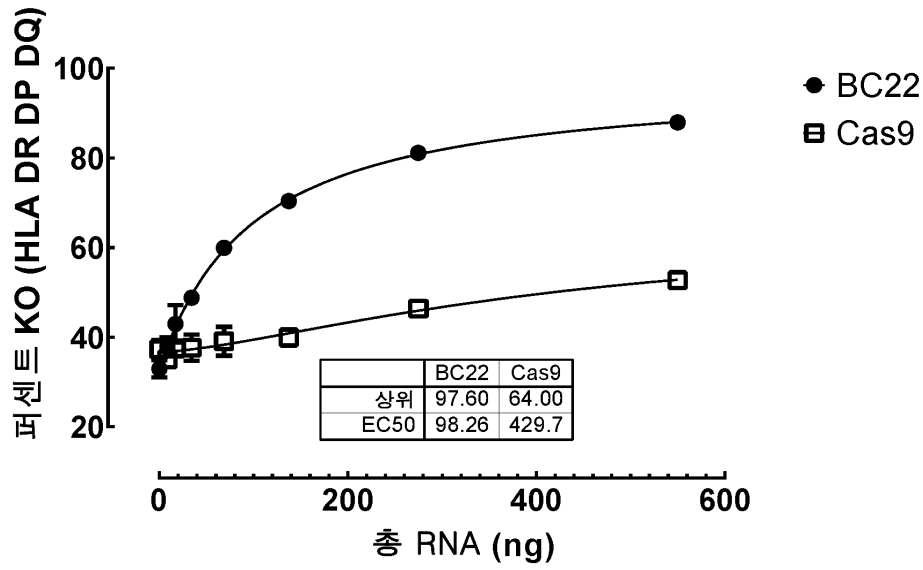
도면41e



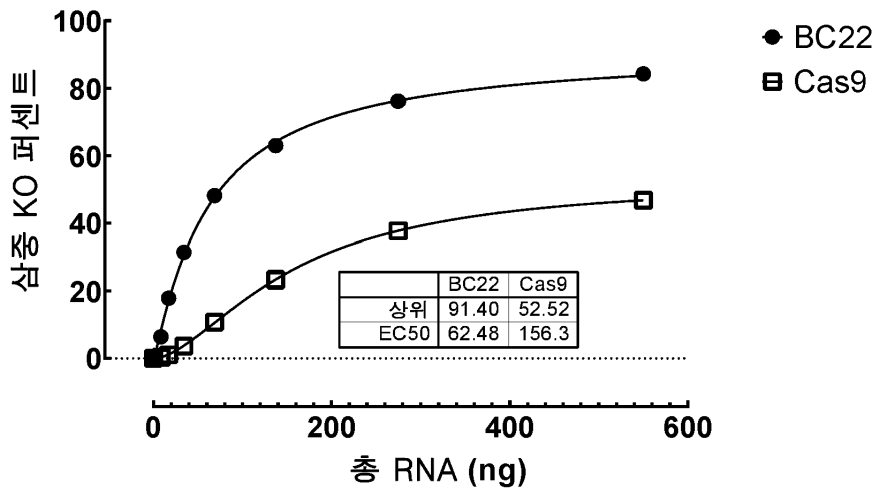
도면41f



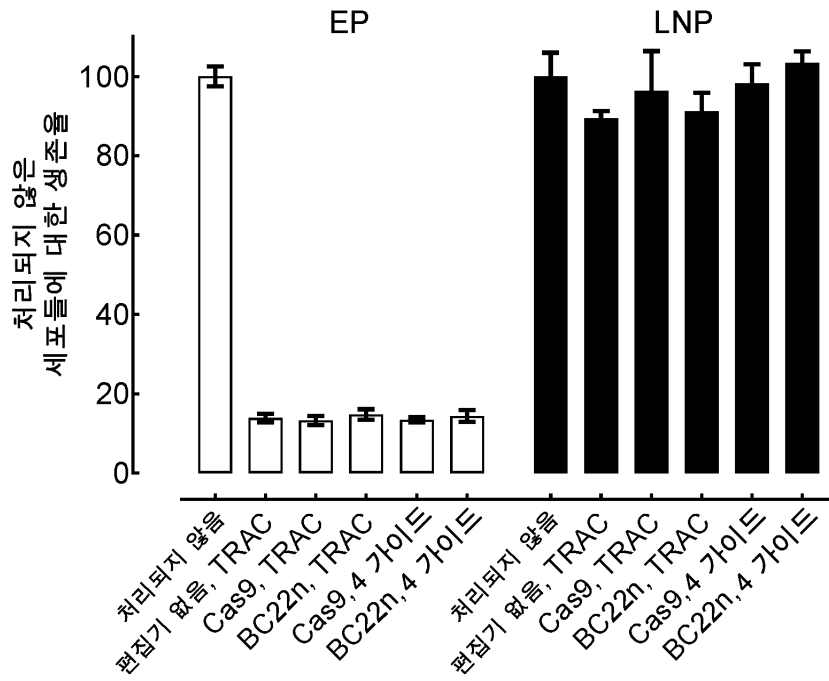
도면41g



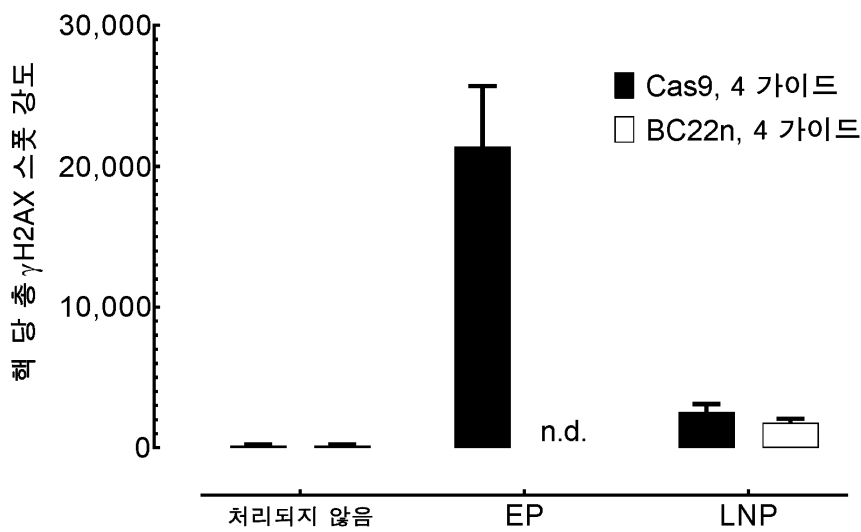
도면41h



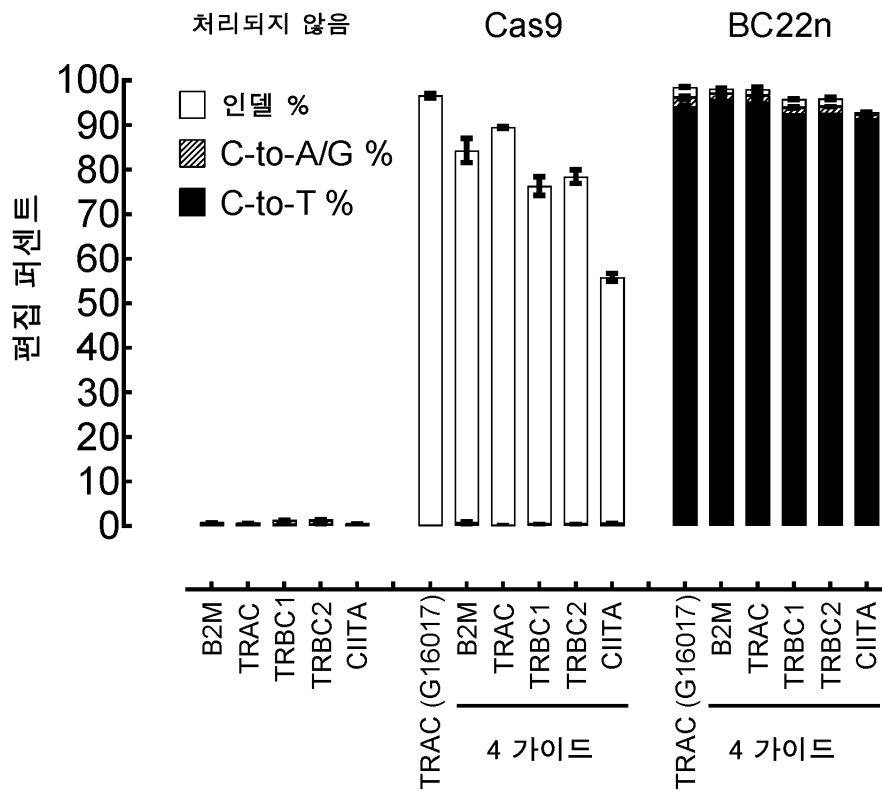
도면42



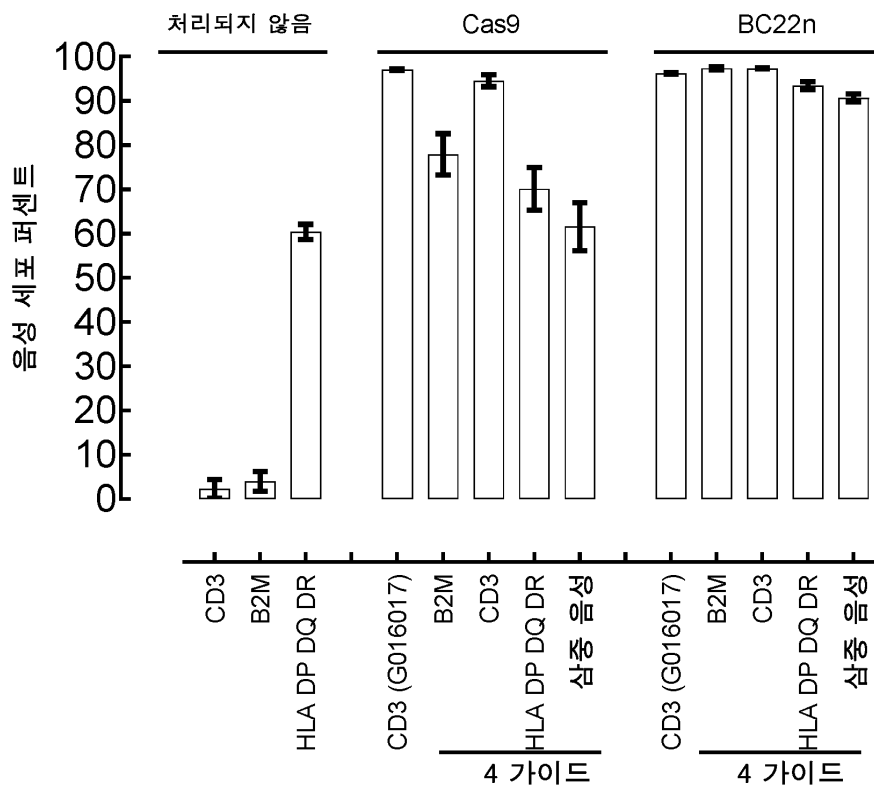
도면43



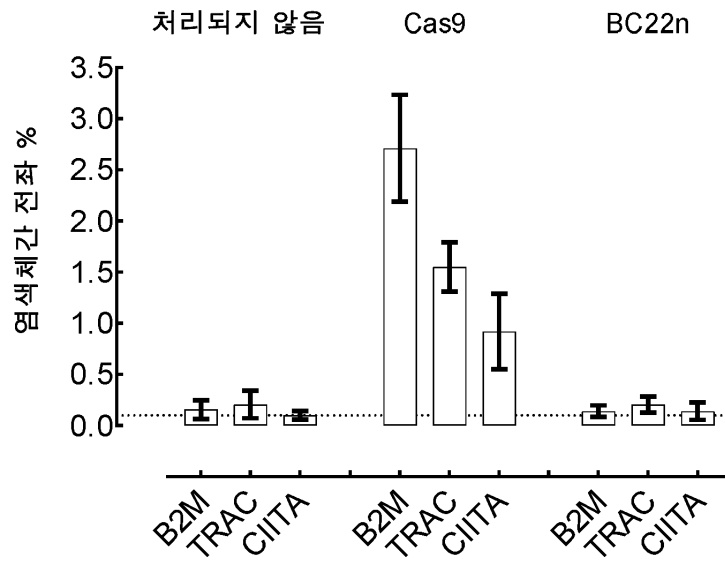
도면44



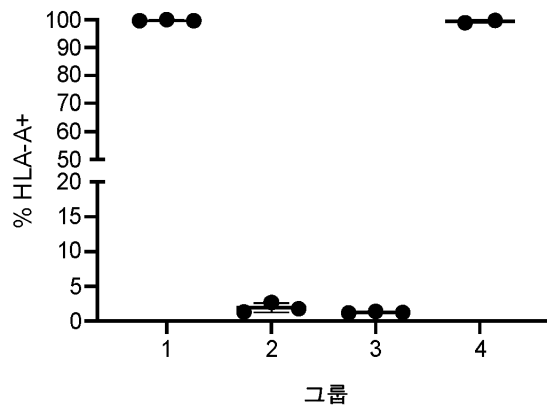
도면45



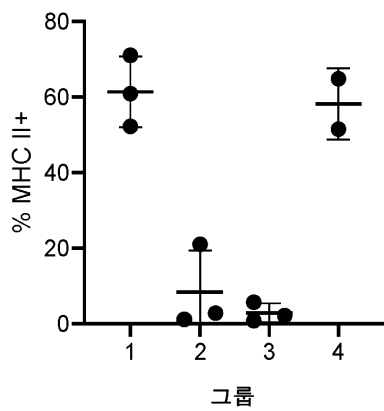
도면46



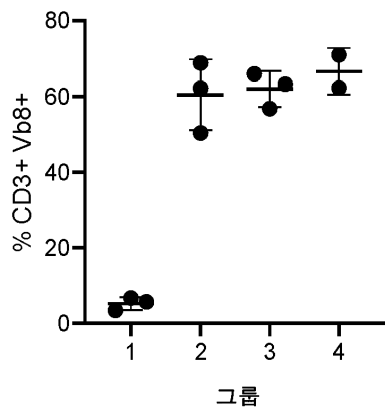
도면47a



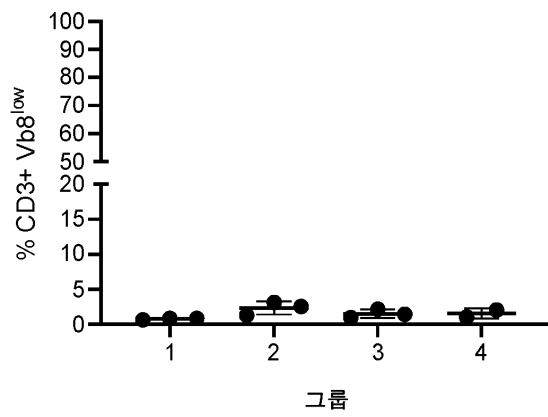
도면47b



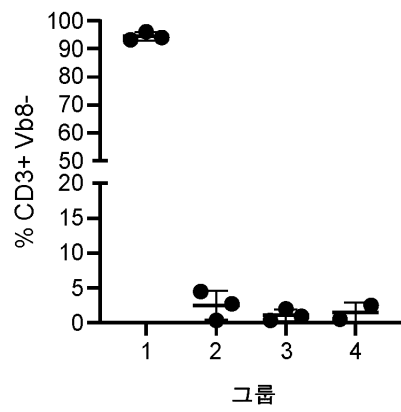
도면47c



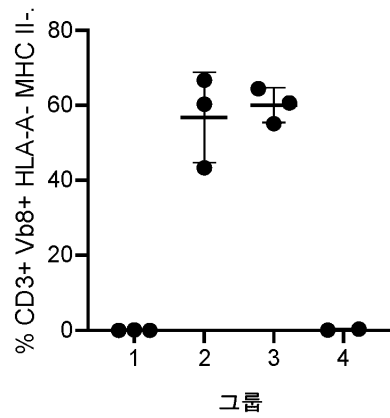
도면47d



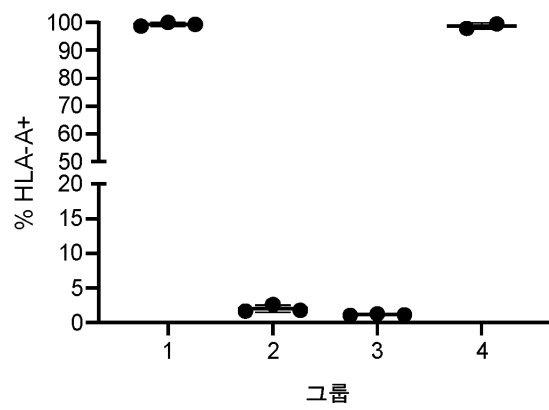
도면47e



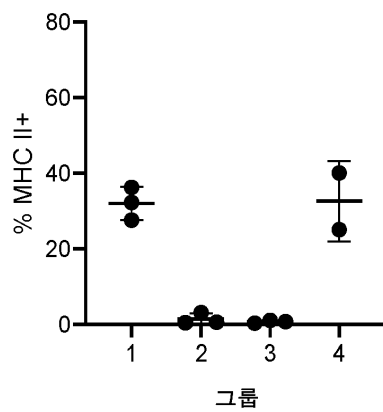
도면47f



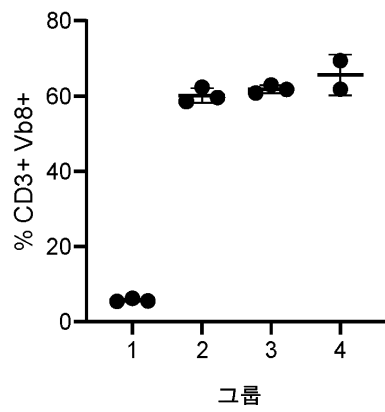
도면48a



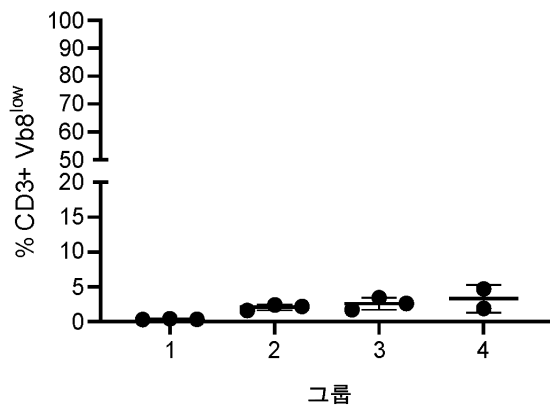
도면48b



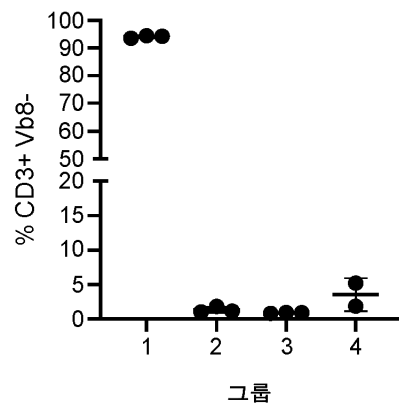
도면48c



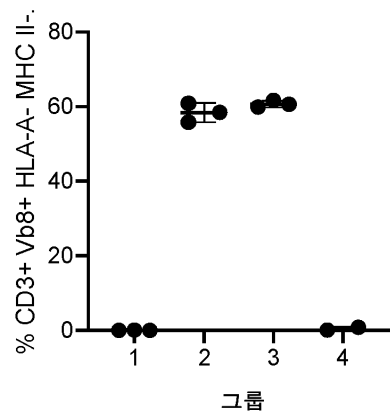
도면48d



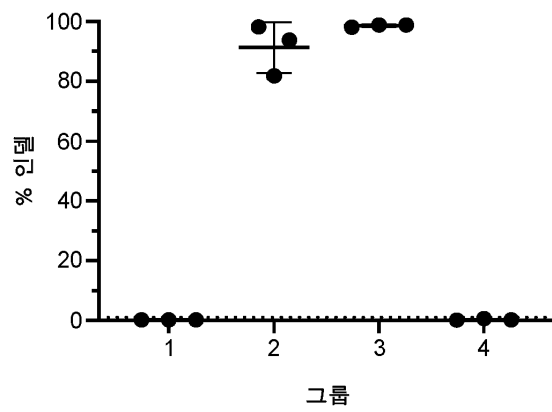
도면48e



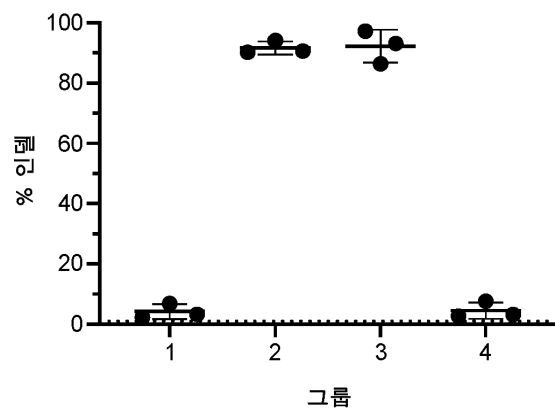
도면48f



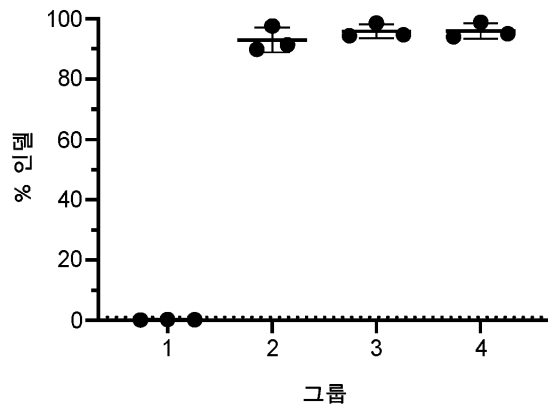
도면49a



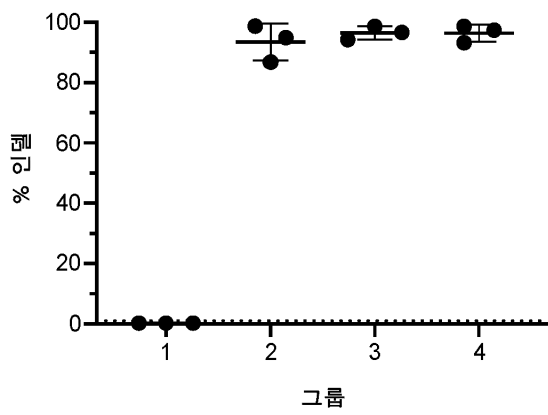
도면49b



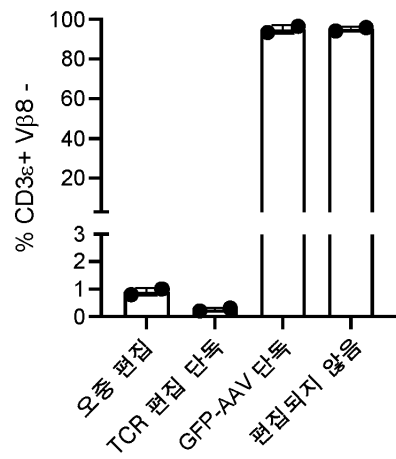
도면49c



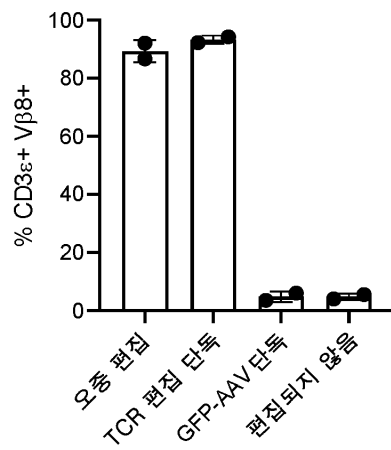
도면49d



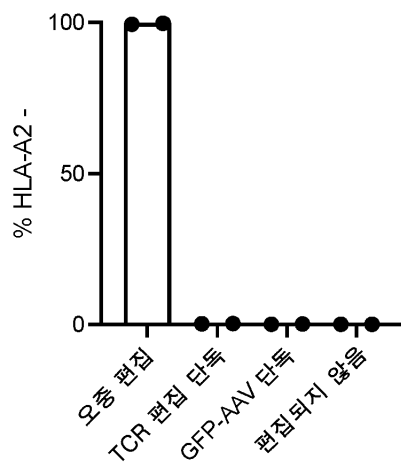
도면50a



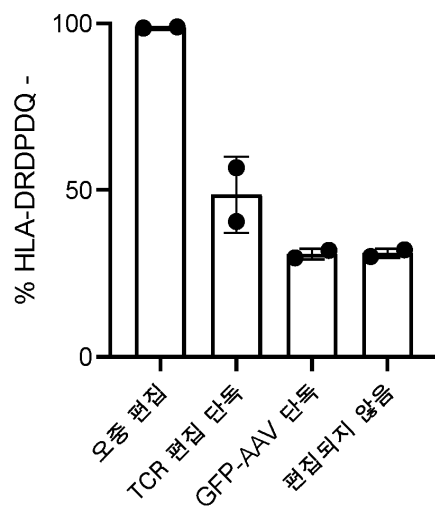
도면50b



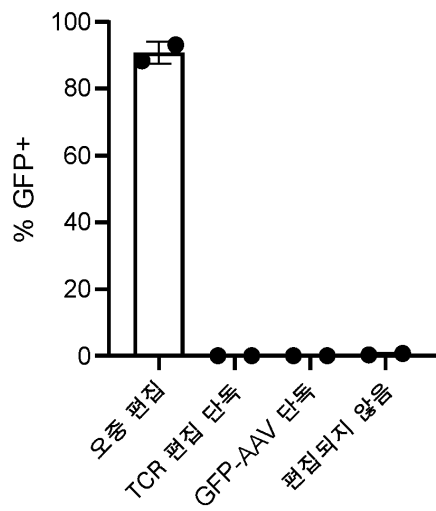
도면50c



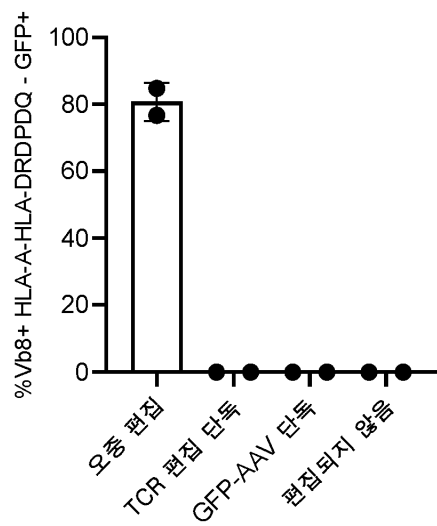
도면50d



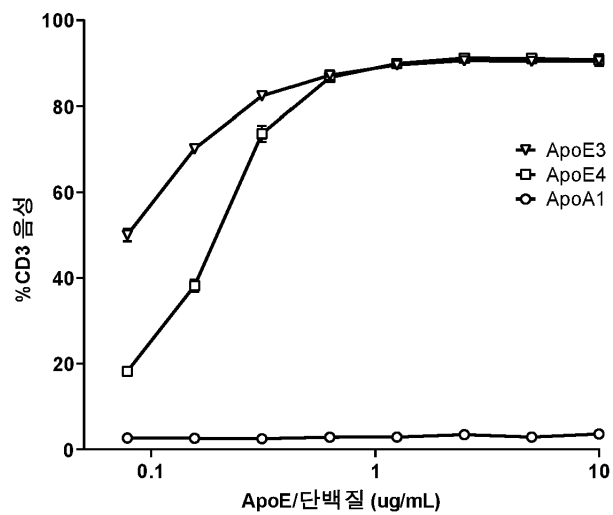
도면50e



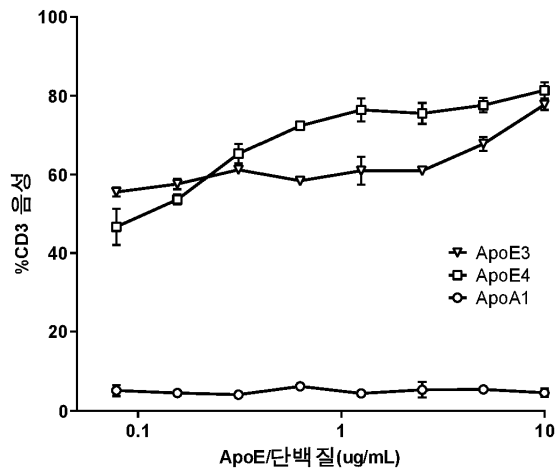
도면50f



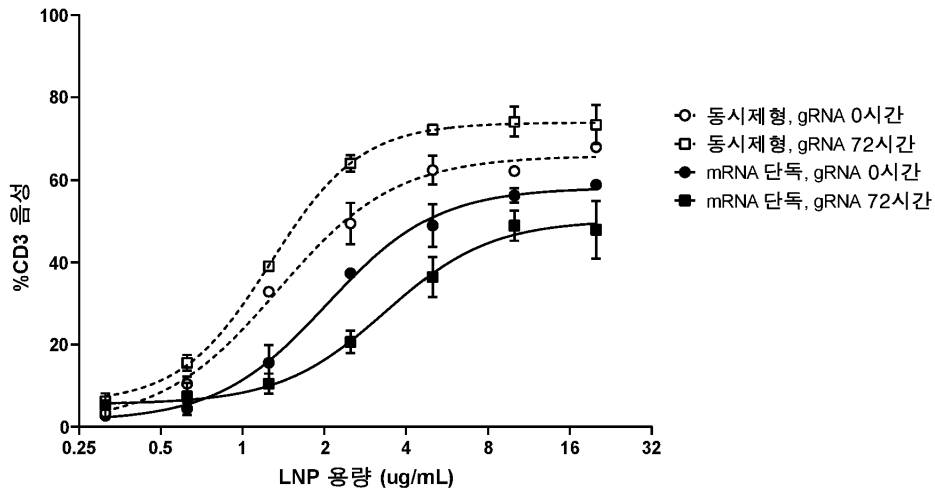
도면51a



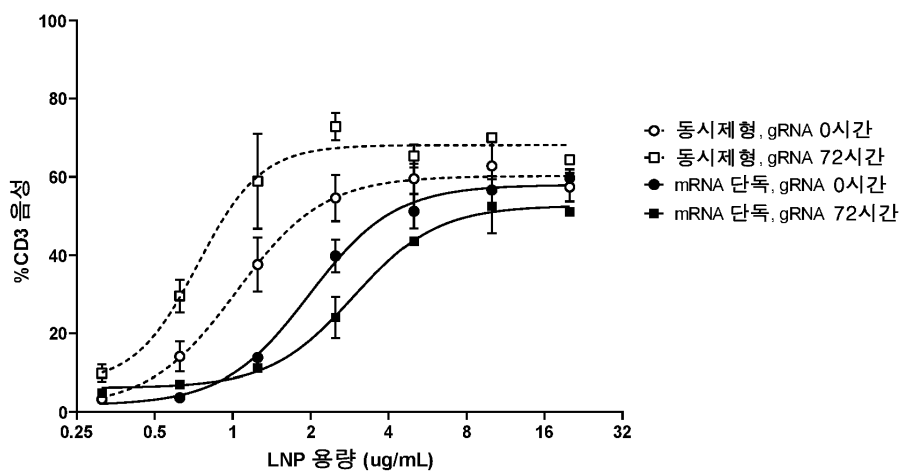
도면51b



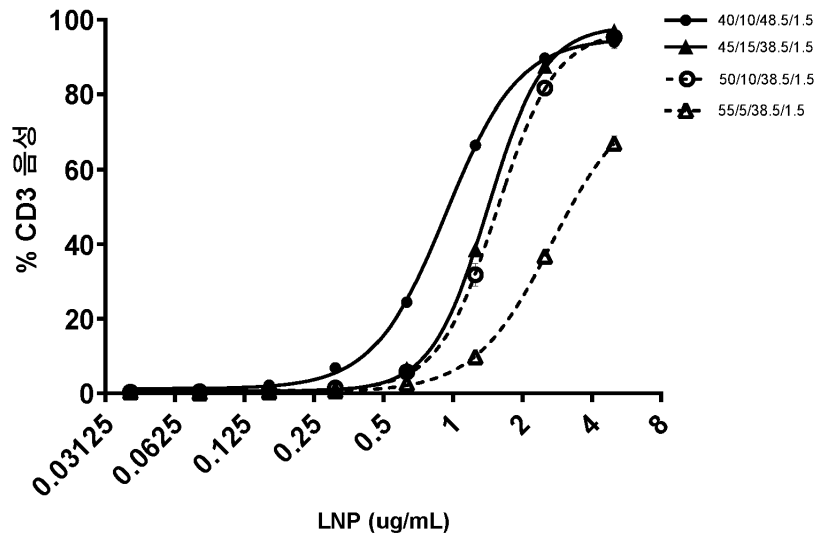
도면52a



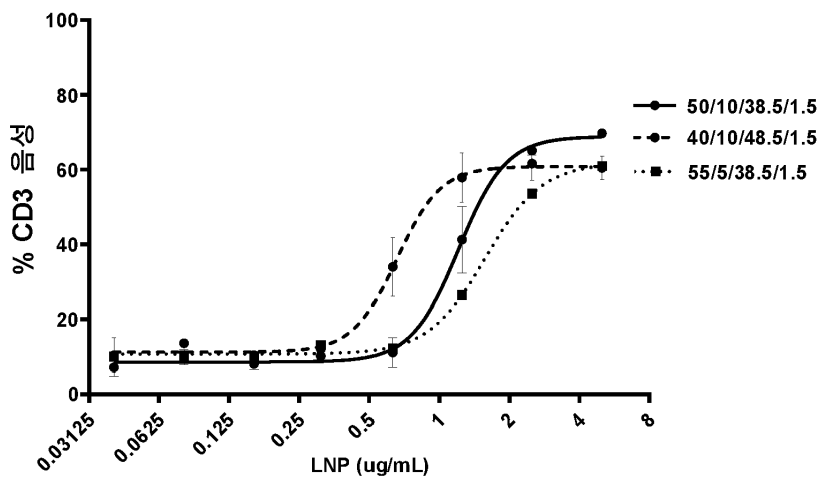
도면52b



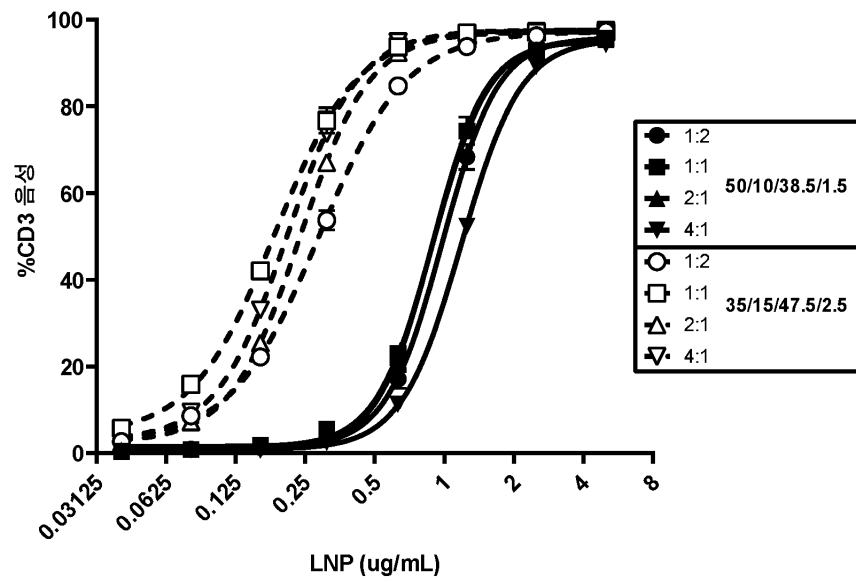
도면53a



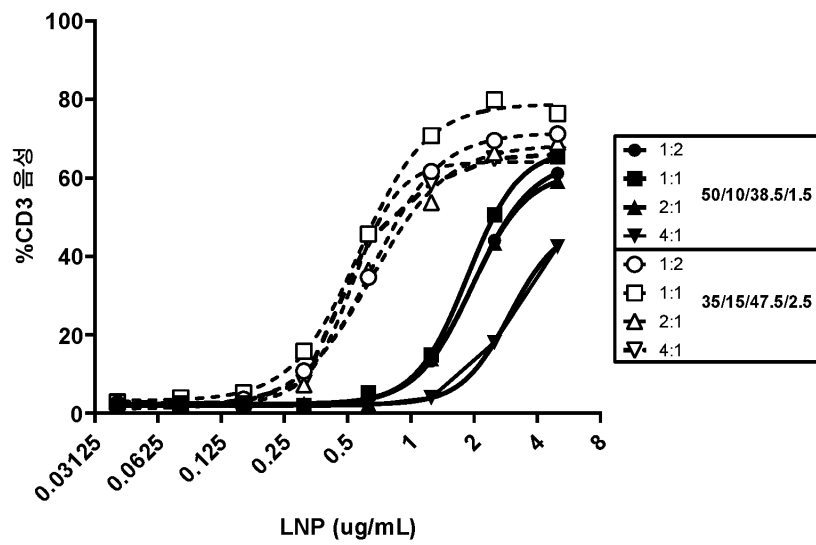
도면53b



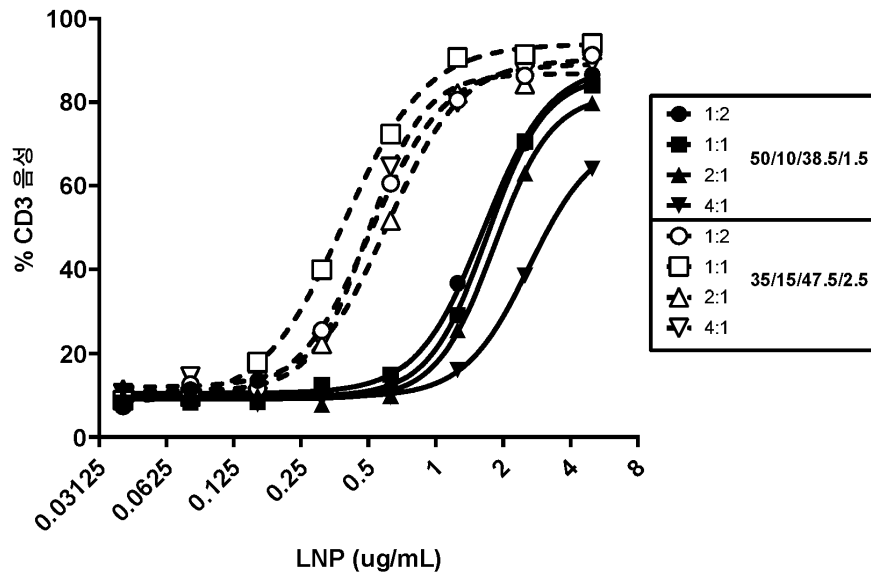
도면54



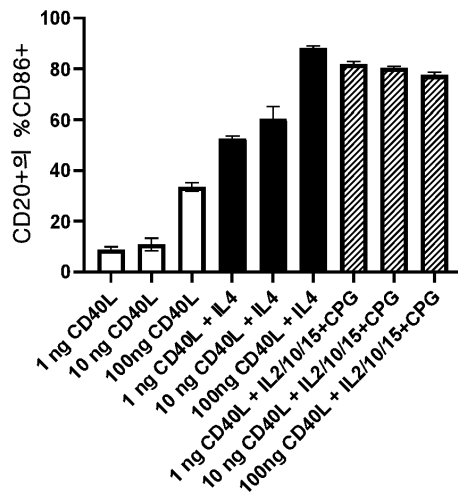
도면55a



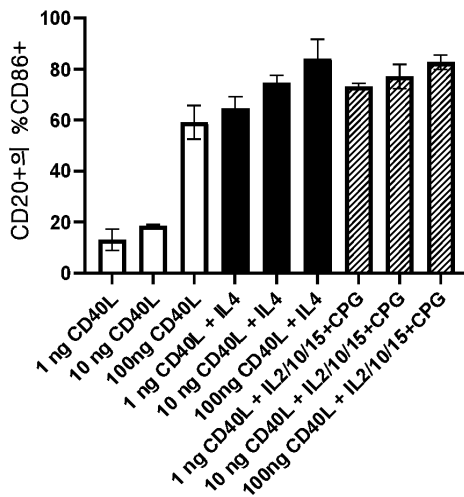
도면55b



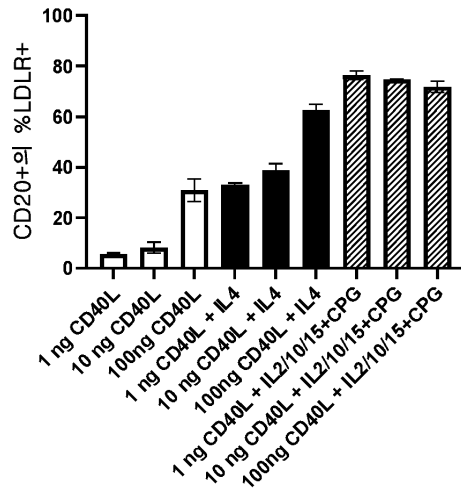
도면56a



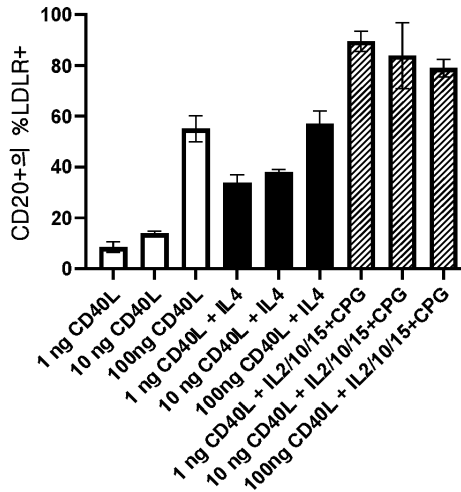
도면56b



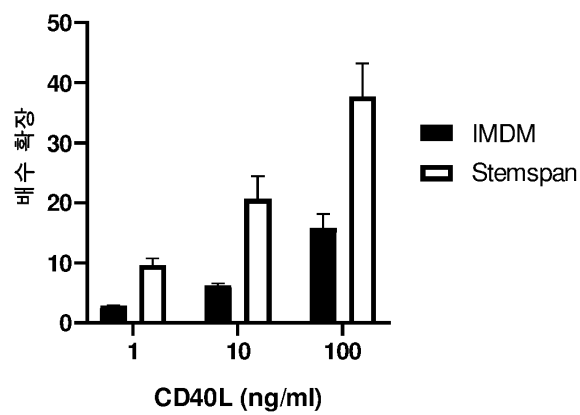
도면56c



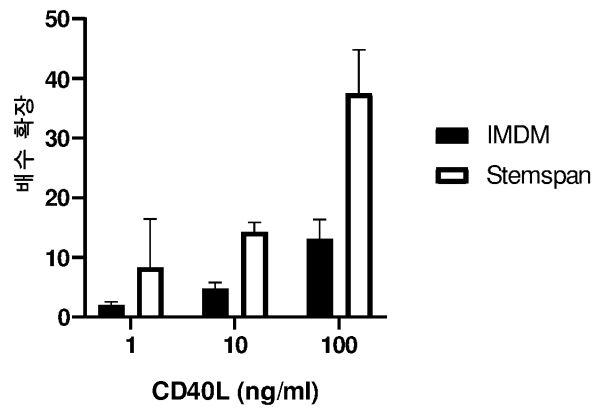
도면56d



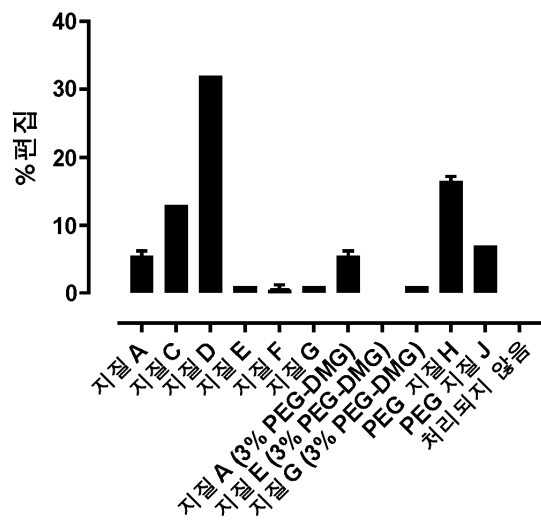
도면57a



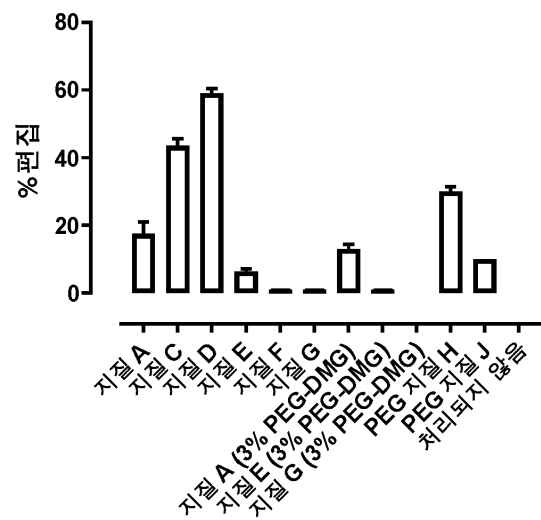
도면57b



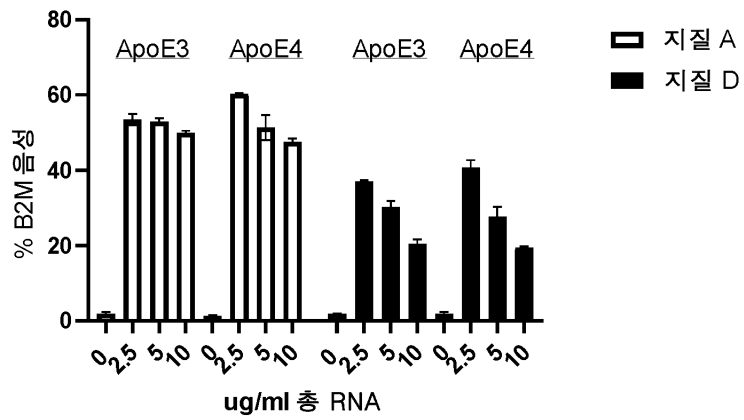
도면58a



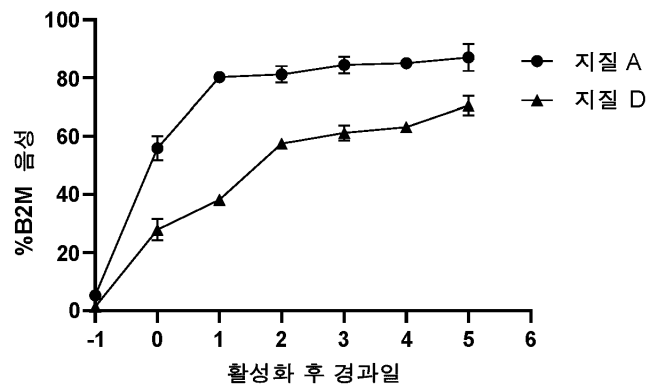
도면58b



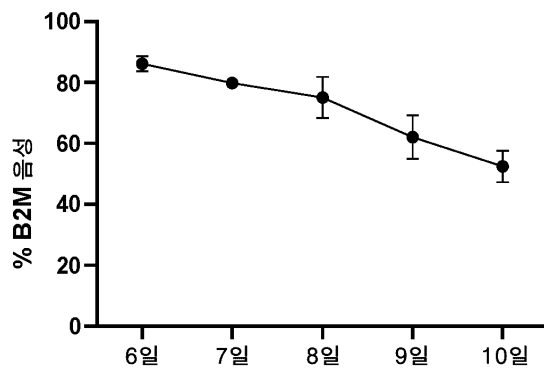
도면59



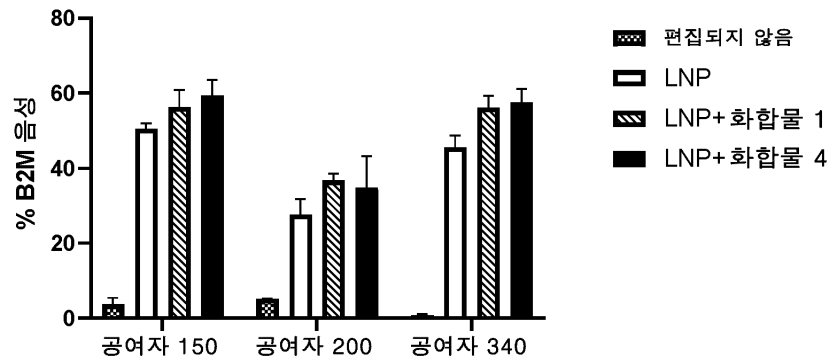
도면60a



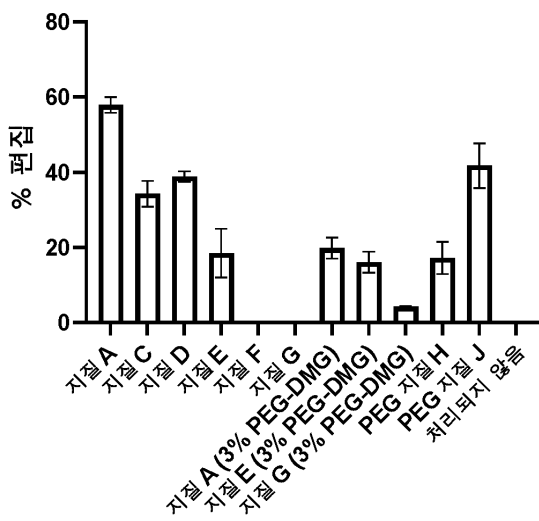
도면60b



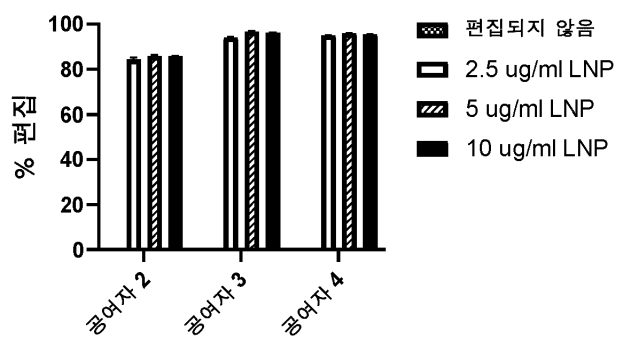
도면61



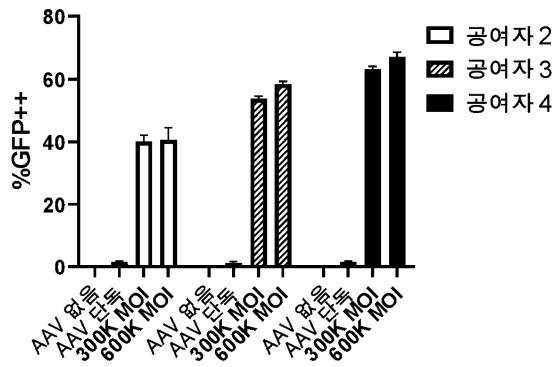
도면62



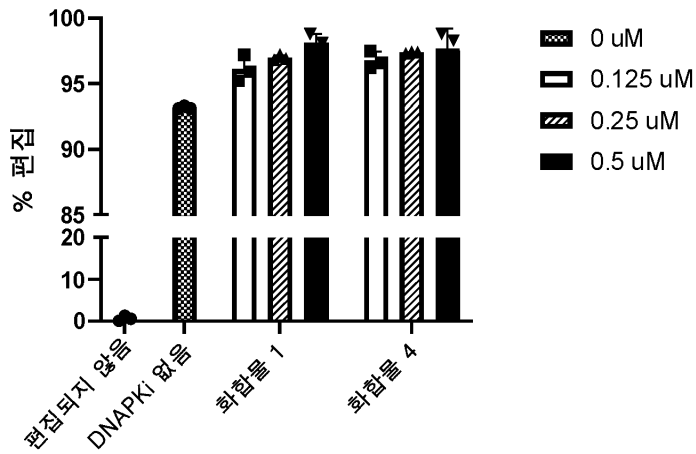
도면63



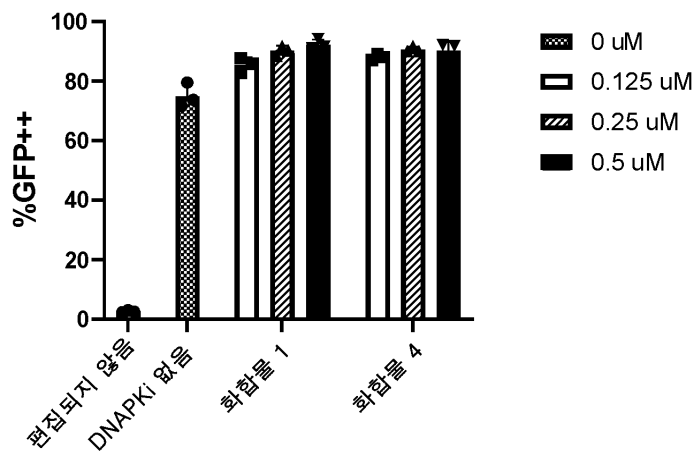
도면64



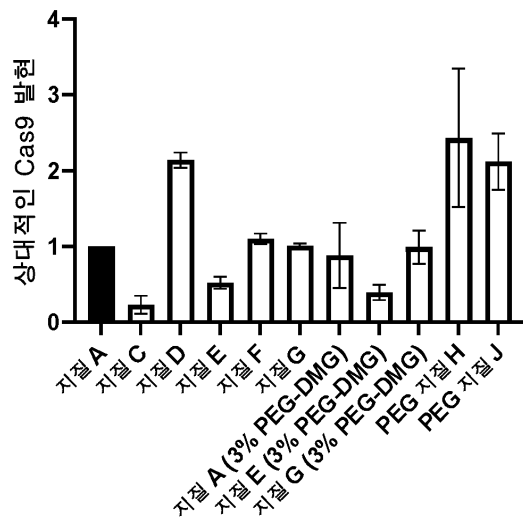
도면65a



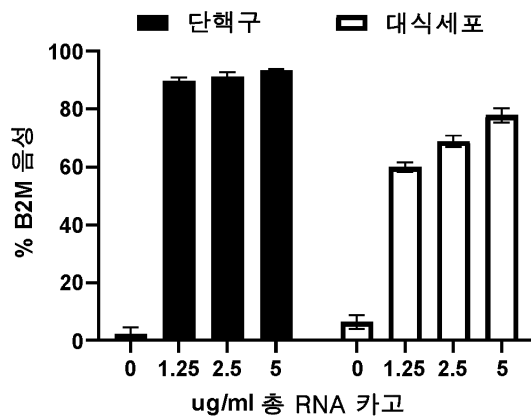
도면65b



도면66



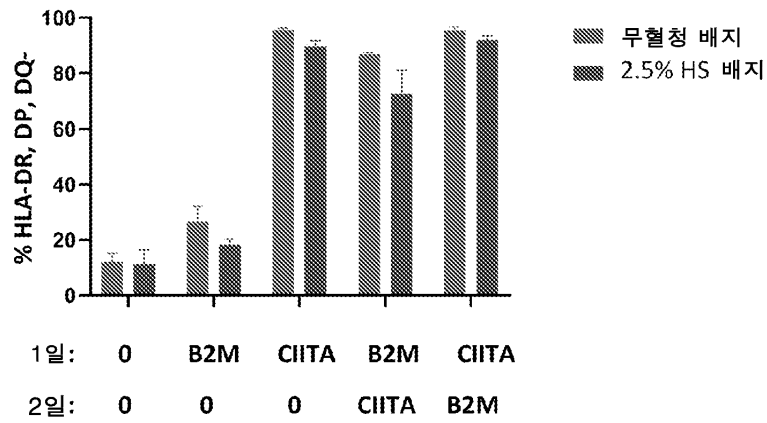
도면67



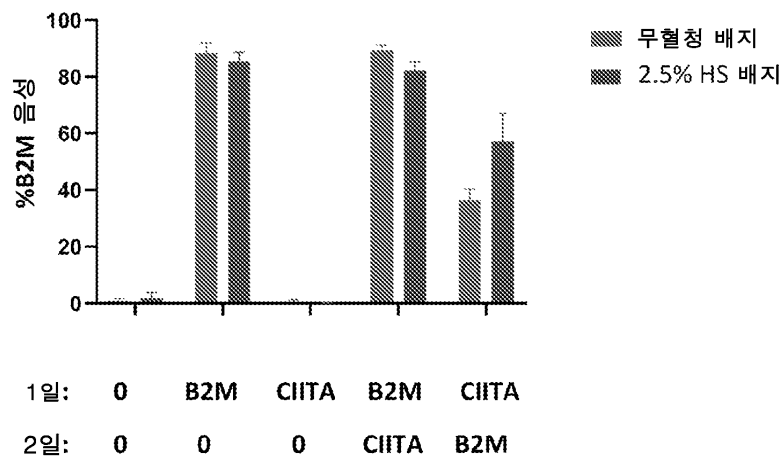
도면68



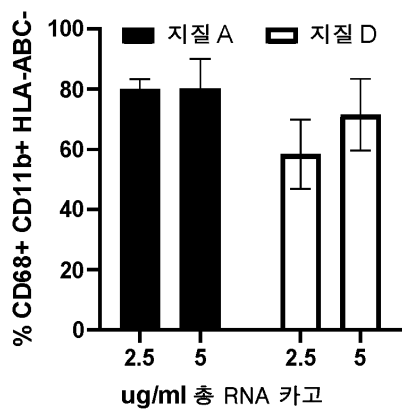
도면69a



도면69b



도면70



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> INTELLIA THERAPEUTICS, INC.

<120> METHODS OF IN VITRO CELL DELIVERY

<130> 01155-0035-00PCT

<150> US 63/016,913

<151> 2020-04-28

<150> US 63/121,781

<151> 2020-12-04

<150> US 63/124,058

<151> 2020-12-11

<150> US 63/130,100

<151> 2020-12-23

<150> US 63/165,619

<151> 2021-03-24

<150> US 63/176,221

<151> 2021-04-17

<160> 723

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: ORF encoding Sp. Cas9

<400> 1

atggacaaga agtacagcat cggactggac atcggaacaa acagcgctcg atgggcagtc	60
atcacagacg aatacaaggt cccgagcaag aagttcaagg tcctgggaaa cacagacaga	120
cacagcatca agaagaacct gatcggagca ctgctgttcg acagcggaga aacagcagaa	180
gcaacaagac tgaagagaac agcaagaaga agatacacia gaagaaagaa cagaatctgc	240
tacctgcagg aaatcttcag caacgaaatg gcaaaggctg acgacagctt cttccacaga	300
ctggaagaaa gcttcctggt cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gatcttcgga	360
aacatcgctg acgaagtgcg ataccacgaa aagtaccgca caatctacca cctgagaaag	420

aagctggctg acagcacaga caaggcagac ctgagactga tctacctggc actggcacac	480
atgatcaagt tcagaggaca cttcctgac gaaggagacc tgaacccgga caacagcgac	540
gtcgacaagc tgttcatcca gctgtgtccag acatacaacc agctgttcga agaaaacccg	600
atcaacgcaa gcggagtcga cgcaaaggca atcctgagcg caagactgag caagagcaga	660

agactggaac acctgatcgc acagctgccg ggagaaaaga agaacggact gttcggaaac	720
ctgatcgcac tgagcctggg actgacaccg aacttcaaga gcaacttcga cctggcagaa	780
gacgcaaagc tgcagctgag caaggacaca tacgacgacg acctggacaa cctgctggca	840
cagatcggag accagtacgc agacctgttc ctggcagcaa agaacctgag cgacgcaatc	900
ctgctgagcg acatcctgag agtcaacaca gaaatcacia aggcaccgct gagcgcaagc	960
atgatcaaga gatacgacga acaccaccag gacctgacac tgctgaaggc actggtcaga	1020
cagcagctgc cggaaaagta caaggaaatc ttcttcgacc agagcaagaa cggatacgca	1080
ggatacatcg acggaggagc aagccaggaa gaattctaca agttcatcaa gccgatcctg	1140
gaaaagatgg acggaacaga agaactgctg gtcaagctga acagagaaga cctgctgaga	1200
aagcagagaa cattcgacaa cggaagcatc ccgcaccaga tccacctggg agaactgcac	1260
gcaatcctga gaagacagga agacttctac ccgttcctga aggacaacag agaaaagatc	1320
gaaaagatcc tgacattcag aatcccgtag tacgtcggac cgctggcaag aggaaacagc	1380
agattcgcat ggatgacaag aaagagcgaa gaaacaatca caccgtggaa cttcgaagaa	1440
gtcgtcgaca agggagcaag cgcacagagc ttcatcgaaa gaatgacaaa cttcgacaag	1500
aacctgccga acgaaaaggt cctgccgaag cacagcctgc tgtacgaata cttcacagtc	1560
tacaacgaac tgacaaaggt caagtacgtc acagaaggaa tgagaaagcc ggcattcctg	1620
agcggagaac agaagaaggc aatcgtcgac ctgctgttca agacaaacag aaaggtcaca	1680
gtcaagcagc tgaaggaaga ctacttcaag aagatcgaat gcttcgacag cgtcgaaatc	1740
agcggagtcg aagacagatt caacgcaagc ctgggaacat accacgacct gctgaagatc	1800
atcaaggaca aggacttctt ggacaacgaa gaaaacgaag acatcctgga agacatcgtc	1860
ctgacactga cactgttcga agacagagaa atgatcgaag aaagactgaa gacatacgca	1920
cacctgttcg acgacaaggt catgaagcag ctgaagagaa gaagatacac aggatgggga	1980
agactgagca gaaagctgat caacggaatc agagacaagc agagcggaaa gacaatcctg	2040
gacttctga agagcgacgg attcgcaaac agaaacttca tgcagctgat ccacgacgac	2100
agcctgacat tcaaggaaga catccagaag gcacaggtca gcggacaggg agacagcctg	2160
cacgaacaca tcgcaaacct ggcaggaagc ccggcaatca agaagggaat cctgcagaca	2220
gtcaaggctg tcgacgaact ggtcaaggct atgggaagac acaagccgga aaacatcgtc	2280
atcgaatgg caagagaaaa ccagacaaca cagaaggagc agaagaacag cagagaaaga	2340
atgaagagaa tcgaagaagg aatcaaggaa ctgggaagcc agatcctgaa ggaacacccg	2400
gtcgaaaaca cacagctgca gaacgaaaag ctgtacctgt actacctgca gaacggaaga	2460

gacatgtacg tcgaccagga actggacatc aacagactga gcgactacga cgtcgaccac 2520

atcgtcccg agagcttctt gaaggacgac agcatcgaca acaaggtcct gacaagaagc 2580

gacaagaaca gaggaagag cgacaacgtc ccgagcgaag aagtcgtcaa gaagatgaag 2640

aactactgga gacagctgct gaacgcaaag ctgatcacac agagaaagtt cgacaacctg 2700

acaaaggcag agagaggagg actgagcgaa ctggacaagg caggattcat caagagacag 2760

ctggtcgaaa caagacagat cacaagcac gtcgcacaga tcctggacag cagaatgaac 2820

acaaagtacg acgaaaacga caagctgatc agagaagtca aggtcatcac actgaagagc 2880

aagctggtca gcgacttcag aaaggacttc cagttctaca aggtcagaga aatcaacaac 2940

taccaccag cacacgacgc atacctgaac gcagtcgtcg gaacagcact gatcaagaag 3000

taccgaagc tggaagcga attcgtctac ggagactaca aggtctacga cgtcagaaag 3060

atgatcgaa agagcgaaca ggaaatcgga aaggcaacag caaagtactt cttctacagc 3120

aacatcatga acttcttcaa gacagaaatc aactggcaa acggagaaat cagaaagaga 3180

ccgctgatcg aaacaaacgg agaaacagga gaaatcgtct gggacaaggg aagagacttc 3240

gcaacagtca gaaaggtcct gagcatgccg caggtcaaca tcgtcaagaa gacagaagtc 3300

cagacaggag gattcagcaa ggaaagcatc ctgccgaaga gaaacagcga caagctgatc 3360

gcaagaaaga aggactggga cccgaagaag tacggaggat tcgacagccc gacagtcgca 3420

tacagcgtcc tggctgtcg aaaggtcgaa aagggaaga gcaagaagct gaagagcgtc 3480

aaggaactgc tggaatcac aatcatggaa agaagcagct tcgaaaagaa cccgatcgac 3540

ttcttgaag caaagggata caaggaagtc aagaaggacc tgatcatcaa gctgccgaag 3600

tacagcctgt tcgaactgga aaacggaaga aagagaatgc tggcaagcgc aggagaactg 3660

cagaagggaa acgaactggc actgccgagc aagtacgtca acttctgta cctggcaagc 3720

cactacgaaa agctgaaggg aagcccgga gacaacgaac agaagcagct gttcgtcgaa 3780

cagcacaagc actacctgga cgaaatcatc gaacagatca gcgaattcag caagagagtc 3840

atcctggcag acgcaaactc ggacaaggtc ctgagcgcac acaacaagca cagagacaag 3900

ccgatcagag aacaggcaga aaacatcatc cacctgttca cactgacaaa cctgggagca 3960

ccggcagcat tcaagtactt cgacacaaca atcgacagaa agagatacac aagcacaag 4020

gaagtcttg acgcaacact gatccaccag agcatcacag gactgtacga aacaagaatc 4080

gacctgagcc agctgggagg agacggagga ggaagccga agaagaagag aaaggtctag 4140

<210> 2

<211> 4140

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: ORF encoding Sp. Cas9

<400> 2

atggacaaga agtactccat cggcctggac atcggcacca actccgtggg ctgggccgtg	60
atcaccgacg agtacaaggt gccctccaag aagttcaagg tgctgggcaa caccgaccgg	120
cactccatca agaagaacct gatcggcgcc ctgctgttcg actccggcga gaccgccgag	180
gccacccggc tgaagcggac cgcccggcgg cggtaaccc ggcggaagaa ccggatctgc	240
tacctgcagg agatcttctc caacgagatg gccaaagttg acgactcctt cttccaccgg	300
ctggaggagt ctttcctggt ggaggaggac aagaagcacg agcggcaccc catcttcggc	360
aacatcgtgg acgaggtggc ctaccacgag aagtaccca ccatctacca cctgcggaag	420
aagctggtgg actccaccga caaggccgac ctgcggtga tctacctggc cctggccac	480
atgatcaagt tccggggcca cttctgtatc gagggcgacc tgaacccga caactccgac	540
gtggacaagc tgttcatcca gctggtgcag acctacaacc agctgttcga ggagaacccc	600
atcaacgcct ccggcgtgga cgccaaggcc atcctgtccg cccggctgtc caagtcccgg	660
cggctggaga acctgatcgc ccagctgccc ggcgagaaga agaacggcct gttcggcaac	720
ctgatcgcct tgtccctggg cctgaccccc aacttcaagt ccaacttcga cctggccgag	780
gacgccaagc tgcagctgtc caaggacacc tacgacgacg acctggacaa cctgctggcc	840
cagatcggcg accagtacgc cgacctgttc ctggccgcca agaacctgtc cgacccatc	900
ctgctgtccg acatcctgcg ggtgaacacc gagatcacca agccccctt gtccgcctcc	960
atgatcaagc ggtacgacga gcaccaccag gacctgacct tgcigaaggc cctggtgcgg	1020
cagcagctgc ccgagaagta caaggagatc ttcttcgacc agtccaagaa cggctacgcc	1080
ggctacatcg acggcggcgc ctcccaggag gatttctaca agttcatcaa gcccacctg	1140
gagaagatgg acggcaccga ggagctgctg gtgaagctga accgggagga cctgctgcgg	1200
aagcagcgga ctttcgacaa cggtccatc ccccaccaga tccacctggg cgagctgcac	1260
gccatcctgc ggcggcagga ggacttctac cccttctga aggacaaccg ggagaagatc	1320
gagaagatcc tgaccttccg gatccctac tacgtgggcc ccctggcccg gggcaactcc	1380
cggttcgcct ggaatgacccg gaagtccgag gagaccatca cccctggaa cttcgaggag	1440
gtggtggaca agggcgctc cgcccagtc ttcacgagc ggatgaccaa cttcgacaag	1500
aacctgccc acgagaaggt gctgcccga cctccctgc tgtacgagta cttaccgtg	1560

tacaacgagc tgaccaaggt gaagtacgtg accgagggca tgcggaagcc cgccttcctg	1620
tccggcgagc agaagaaggc catcgtggac ctgctgttca agaccaaccg gaaggtgacc	1680
gtgaagcagc tgaaggagga ctacttcaag aagatcgagt gcttcgactc cgtggagatc	1740
tccggcgtgg aggaccggtt caacgcctcc ctgggcacct accacgacct gctgaagatc	1800
atcaaggaca aggacttcct ggacaacgag gagaacgagg acatcctgga ggacatcgtg	1860
ctgaccctga cctgtttcga ggaccgggag atgatcgagg agcggctgaa gacctacgcc	1920
cacctgttcg acgacaaggt gatgaagcag ctgaagcggc ggcggtacac cggctggggc	1980
cggctgtccc ggaagctgat caacggcatc cgggacaagc agtccggcaa gaccatcctg	2040
gacttcctga agtccgacgg cttcgccaac cggaacttca tgcagctgat ccacgacgac	2100
tccttgacct tcaaggagga catccagaag gcccggtgt cggccaggc cgactccctg	2160
cacgagcaca tcgccaacct ggccggctcc ccgccatca agaaggcat cctgcagacc	2220
gtgaaggtgg tggacgagct ggtgaaggtg atgggccggc acaagcccga gaacatcgtg	2280
atcgagatgg cccgggagaa ccagaccacc cagaagggcc agaagaactc cggggagcgg	2340
atgaagcga tcgaggagg catcaaggag ctgggctccc agatcctgaa ggagcacccc	2400
gtggagaaca ccagctgca gaacgagaag ctgtacctgt actacctgca gaacggccgg	2460
gacatgtacg tggaccagga gctggacatc aaccggctgt ccgactacga cgtggaccac	2520
atcgtgcccc agtcttctt gaaggacgac tccatcgaca acaagggtgt gacccggtcc	2580
gacaagaacc ggggcaagtc gcacaacgtg ccctccgagg aggtggtgaa gaagatgaag	2640
aactactggc ggacgtgct gaacccaag ctgatcccc agcggaaagt cgacaacctg	2700
accaaggccg agcggggcgg cctgtccgag ctggacaagg ccggcttcat caagcgcag	2760
ctggtggaga cccggcagat caccaagcac gtggcccaga tcctggactc ccggtgaac	2820
accaagtacg acgagaacga caagctgatc cgggaggtga aggtgatcac cctgaagtec	2880
aagctggtgt ccgacttccg gaaggacttc cagttctaca aggtgcggga gatcaacaac	2940
taccaccag cccacgacg ctacctgaac gccgtggtgg gcaccgcct gatcaagaag	3000
tacccaagc tggagtccga gttcgtgtac ggcgactaca aggtgtacga cgtgcggaag	3060
atgatcgcca agtccgagca ggagatcggc aaggccaccg ccaagtactt cttctactcc	3120
aacatcatga actttctcaa gaccgagatc accctggcca acggcgagat ccggaagcgg	3180
cccctgatcg agaccaacgg cgagaccggc gagatcgtgt gggacaaggg ccgggacttc	3240
gccaccgtgc ggaaggtgct gtccatgcc caggtgaaca tcgtgaagaa gaccgaggtg	3300

cagaccggcg gcttctccaa ggagtcctatc ctgcccgaagc ggaactccga caagctgac 3360
gcccgaaga aggactggga cccaagaag tacggcggtc tcgactcccc caccgtggcc 3420
tactccgtgc tgggtgtggc caaggtggag aagggaagt ccaagaagct gaagtccgtg 3480
aaggagctgc tgggcatcac catcatggag cggtcctcct tcgagaagaa ccccatcgac 3540
ttcctggagg ccaagggcta caaggaggtg aagaaggacc tgatcatcaa gctgcccgaag 3600
tactccctgt tcgagctgga gaacggccgg aagcggtgc tggcctccgc cggcgagctg 3660
cagaagggca acgagctggc cctgccctcc aagtacgtga acttcctgta cctggcctcc 3720

cactacgaga agctgaaggc ctccccgag gacaacgagc agaagcagct gtctgtggag 3780
cagcacaagc actacctgga cgagatcatc gagcagatct ccgagttctc caagcgggtg 3840
atcctggccg acgccaacct ggacaagggtg ctgtccgcct acaacaagca ccgggacaag 3900
cccatccggg agcaggccga gaacatcatc cacctgttca cctgaccaa cctgggcgcc 3960
cccgcgcct tcaagtactt cgacaccacc atcgaccgga agcggtagac ctccaccaag 4020
gaggtgctgg acgccacct gatccaccag tccatcaccg gcctgtacga gaccgggac 4080
gacctgtccc agctgggcgg cgacggcggc ggctcccca agaagaagcg gaaggtgtga 4140

<210> 3

<211> 4197

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: open reading frame for Cas9 with Hibt tag

<400> 3

auggacaaga aguacuccau cggccuggac aucggcacca acuccguggg cugggccgug 60
aucaccgacg aguacaaggu gccuccaag aaguucaagg ugcugggcaa caccgaccgg 120
cacuccauca agaagaaccu gaucggcgcc cugcuguuuc acuccggcga gaccgcccag 180
gccacccggc ugaagcggac cgcccggcgg cgguacacc ggcggaagaa ccggaucugc 240
uaccugcagg agaucuucuc caacgagaug gccaaaggugg acgacuccuu cuuccaccgg 300

cuggaggagu ccuuccuggu ggaggaggac aagaagcacg agcggcaccc caucuucggc 360
aacaucgugg acgagguggc cuaccacgag aaguaccca ccaucuacca ccugcggaag 420
aagcuggugg acuccaccga caaggccgac cugcggcuga ucuaccuggc ccuggccac 480
augaucaagu uccggggcca cuuccugauc gagggcgacc ugaaccccga caacuccgac 540
guggacaagc uguucaucca gcuggugcag accuacaacc agcuguucga ggagaacccc 600
aucaacgccu ccggcgugga cgccaaggcc auccuguccg cccggcuguc caagucccg 660

cggcuggaga accugaucgc ccagcugccc ggcgagaaga agaacggccu guucggcaac 720

cugaucgccc uguccuggg ccugaccccc aacuucaagu ccaacuucga ccuggccgag 780

gacgccaagc ugcagcuguc caaggacacc uacgacgacg accuggacaa ccugcuggcc 840

cagaucggcg accaguacgc cgaccuguuc cuggccgcca agaaccuguc cgacgccauc 900

cugcuguccg acauccugcg ggugaacacc gagaucacca agggcccccu guccgccucc 960

augaucaagc gguacgacga gcaccaccag gaccugaccc ugcugaaggc ccuggugcgg 1020

cagcagcugc ccgagaagua caaggagauc uucucgacc aguccaagaa cggcuacgcc 1080

ggcuacaucg acggcggcgc cuccaggag gaguucuaca aguucaucaa gcccauccug 1140

gagaagaugg acggcacga ggagcugcug gugaagcuga accgggagga ccugcugcgg 1200

aagcagcgga ccuucgacaa cggcucauc cccaccaga uccaccuggg cgagcugcac 1260

gccauccugc ggcggcagga ggacuucua cccuuccuga aggacaaccg ggagaagauc 1320

gagaagaucg ugaccuuccg gaucuccuac uacgugggcc ccugggccg ggcaacucc 1380

cgguucgccc ggaugacccg gaaguccgag gagaccauca ccccuggaa cuucgaggag 1440

gugguggaca agggcgccuc cgcccagucc uucaucgagc ggaugacaa cuucgacaag 1500

aaccugccca acgagaaggu gcugcccaag cacucccugc uguacgagua cuucaccgug 1560

uacaacgagc ugaccaaggu gaaguacgug accgagggca ugcggaagcc cgccuuccug 1620

uccggcgagc agaagaaggc caucguggac cugcuguuca agaccaaccg gaaggugacc 1680

gugaagcagc ugaaggagga cuacuuaag aagaucgagu gcuucgacuc cguggagauc 1740

uccggcgugg aggaccgguu caacgccucc cugggcaccu accacgaccu gcugaagauc 1800

aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgag gagaacgagg acauccugga ggacaucgug 1860

cugaccugca cccuguucga ggaccgggag augaucgagg agcggcugaa gaccuacgcc 1920

caccuguucg acgacaaggu gaugaagcag cugaagcggc ggcgguacac cggcuggggc 1980

cggcuguccc ggaagcugau caacggcauc cgggacaagc aguccggcaa gaccauccug 2040

gacuuccuga aguccgacgg cuucgccaac cggaacuua ugcagcugau ccacgacgac 2100

ucccugaccu ucaaggagga cauccagaag gccaggugu ccggccaggg cgacuccug 2160

cacgagcaca ucgccaaccu ggccggcucc cccgccauca agaagggcau ccugcagacc 2220

gugaaggugg uggacgagcu ggugaaggug augggccggc acaagcccga gaacaucgug 2280

aucgagaugg cccgggagaa ccagaccacc cagaagggcc agaagaacuc ccgggagcgg 2340

augaagcgga ucgaggaggg caucaaggag cugggcuccc agauccugaa ggagcacccc 2400

guggagaaca cccagcugca gaacgagaag cuguaccugu acuaccugca gaacggccgg 2460

gacauguacg uggaccagga gcuggacauc aaccggcugu ccgacuacga cguggaccac 2520

aucgugcccc aguccuuccu gaaggacgac uccaucgaca acaaggugcu gacccggucc 2580

gacaagaacc ggggcaaguc cgacaacgug ccuuccgagg agguggugaa gaagaugaag 2640

aacuacuggc ggcagcugcu gaacgccaag cugaucaccc agcggaaguu cgacaaccug 2700

accaaggccg agcggggcgg ccuguccgag cuggacaagg ccggcuucau caagcggcag 2760

cugguggaga cccggcagau caccaagcac guggcccaga uccuggacuc ccggaugaac 2820

accaaguacg acgagaacga caagcugauc cgggagguga aggugaucac ccugaagucc 2880

aagcuggugu ccgacuuccg gaaggacuuc caguucuaca aggugcggga gaucaacaac 2940

uaccaccacg cccacgacgc cuaccugaac gccguggugg gcaccgccc uaucaagaag 3000

uacccaagc uggaguccga guucguguac ggcgacuaca agguguacga cgugcggag 3060

augaucgcca aguccgagca ggagaucggc aaggccaccg ccaaguacuu cuucacucc 3120

aacauauga acuuuuaa gaccgagauc acccugcca acggcgagau ccggaagcgg 3180

ccccugaucg agaccaacgg cgagaccggc gagaucgugu gggacaaggg ccgggacuuc 3240

gccaccgugc ggaaggugcu guccaugccc caggugaaca ucgugaaga gaccgaggug 3300

cagaccggcg gcuucuccaa ggaguccauc cugccaagc ggaacuccga caagcugauc 3360

gcccggaga aggacuggga cccaagaag uacggcggcu ucgacucucc caccgugcc 3420

uacuccgugc ugguggugc caagguggag aagggaagu ccaagaagcu gaaguccgug 3480

aaggagcugc ugggcaucac caucauggag cgguccuccu ucgagaaga ccccaucgac 3540

uuccuggagg ccaaggguca caaggaggug aagaaggacc ugaucauaa gcugccaag 3600

uacuccugc ucgagcugga gaacggccgg aagcggauc uggccuccgc cggcgagcug 3660

cagaaggga acgagcugc ccugccucc aaguacuga acuuuccgua ccuggccucc 3720

cacuacgaga agcugaaggg ccccccgag gacaacgagc agaagcagcu guucguggag 3780

cagcacaagc acuaccugga cgagaucauc gagcagauc ccgaguucuc caagcgggug 3840

auccggccg acgccaaccu ggacaaggug cuguccccu acaacaagca ccgggacaag 3900

cccauccggg agcaggcca gaacaucauc caccuguuca ccugacca ccugggcgcc 3960

cccgccgcu ucaaguacuu cgacaccacc aucgaccgga agcgguacac cuccaccaag 4020

gaggugcugg acgccaccu gauccaccag uccaucaccg gccuguacga gaccgggac 4080

gaccugucc agcugggcgg cgacggcggc ggcucccca agaagaagc gaaggugucc 4140

gaguccgcca ccccgaguc cguguccggc ugccggcugu ucaagaagau cuccuga 4197

<210> 4

<400> 4

000

<210> 5

<400> 5

000

<210> 6

<211> 1379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: amino acid sequence encoded by SEQ ID NOs: 1-3 of Cas9

<400> 6

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile

35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu

50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys

100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr

115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp

130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His

145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro

165 170 175
 Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
 180 185 190
 Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
 195 200 205
 Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn

 210 215 220
 Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
 245 250 255
 Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
 260 265 270
 Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp

 275 280 285
 Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
 290 295 300
 Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
 325 330 335
 Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe

 340 345 350
 Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
 355 360 365
 Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
 370 375 380
 Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
 385 390 395 400
 Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu

 405 410 415

Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
420 425 430
Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
435 440 445
Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
450 455 460
Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
465 470 475 480
Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
485 490 495
Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
500 505 510
Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
515 520 525
Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
530 535 540
Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
545 550 555 560
Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
565 570 575
Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
580 585 590
Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
595 600 605
Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
610 615 620
Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
625 630 635 640
His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
645 650 655
Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp

660 665 670
 Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
 675 680 685
 Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
 690 695 700
 Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
 705 710 715 720
 His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly

 725 730 735
 Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
 740 745 750
 Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
 755 760 765
 Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
 770 775 780
 Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro

 785 790 795 800
 Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 805 810 815
 Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
 820 825 830
 Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
 835 840 845
 Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg

 850 855 860
 Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
 865 870 875 880
 Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
 885 890 895
 Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
 900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr

915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp

930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser

945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg

965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val

980 985 990

Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe

995 1000 1005

Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala

1010 1015 1020

Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe

1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala

1040 1045 1050

Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu

1055 1060 1065

Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val

1070 1075 1080

Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr

1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys

1100 1105 1110

Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro

1115 1120 1125

Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val

1130 1135 1140

Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys

1145 1150 1155
Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser

1160 1165 1170
Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys

1175 1180 1185
Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu

1190 1195 1200
Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala Gly

1205 1210 1215
Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val

1220 1225 1230
Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser

1235 1240 1245
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys

1250 1255 1260
His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys

1265 1270 1275
Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala

1280 1285 1290
Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn

1295 1300 1305
Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala

1310 1315 1320
Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser

1325 1330 1335
Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr

1340 1345 1350
Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp

1355 1360 1365
Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1370 1375

<210> 7

<211> 1398

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: amino acid sequence for Sp Cas9-Hibit fusion

<400> 7

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile

35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu

50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys

100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr

115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp

130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His

145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro

165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr

180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala

195 200 205
 Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 210 215 220
 Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
 245 250 255
 Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
 260 265 270

 Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
 275 280 285
 Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
 290 295 300
 Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
 325 330 335

 Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
 340 345 350
 Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
 355 360 365
 Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
 370 375 380
 Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
 385 390 395 400

 Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
 405 410 415
 Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
 420 425 430
 Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
 435 440 445

Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp
450 455 460

Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
465 470 475 480

Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
485 490 495

Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
500 505 510

Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
515 520 525

Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
530 535 540

Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
545 550 555 560

Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
565 570 575

Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
580 585 590

Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
595 600 605

Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
610 615 620

Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
625 630 635 640

His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
645 650 655

Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
660 665 670

Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
675 680 685

Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe

690					695					700									
Lys	Glu	Asp	Ile	Gln	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Gly	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu				
705					710					715					720				
His	Glu	His	Ile	Ala	Asn	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Lys	Lys	Gly				
725					730					735									
Ile	Leu	Gln	Thr	Val	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Leu	Val	Lys	Val	Met	Gly				
740					745					750									
Arg	His	Lys	Pro	Glu	Asn	Ile	Val	Ile	Glu	Met	Ala	Arg	Glu	Asn	Gln				
755					760					765									
Thr	Thr	Gln	Lys	Gly	Gln	Lys	Asn	Ser	Arg	Glu	Arg	Met	Lys	Arg	Ile				
770					775					780									
Glu	Glu	Gly	Ile	Lys	Glu	Leu	Gly	Ser	Gln	Ile	Leu	Lys	Glu	His	Pro				
785					790					795					800				
Val	Glu	Asn	Thr	Gln	Leu	Gln	Asn	Glu	Lys	Leu	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu				
805					810					815									
Gln	Asn	Gly	Arg	Asp	Met	Tyr	Val	Asp	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Asn	Arg				
820					825					830									
Leu	Ser	Asp	Tyr	Asp	Val	Asp	His	Ile	Val	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Lys				
835					840					845									
Asp	Asp	Ser	Ile	Asp	Asn	Lys	Val	Leu	Thr	Arg	Ser	Asp	Lys	Asn	Arg				
850					855					860									
Gly	Lys	Ser	Asp	Asn	Val	Pro	Ser	Glu	Glu	Val	Val	Lys	Lys	Met	Lys				
865					870					875					880				
Asn	Tyr	Trp	Arg	Gln	Leu	Leu	Asn	Ala	Lys	Leu	Ile	Thr	Gln	Arg	Lys				
885					890					895									
Phe	Asp	Asn	Leu	Thr	Lys	Ala	Glu	Arg	Gly	Gly	Leu	Ser	Glu	Leu	Asp				
900					905					910									
Lys	Ala	Gly	Phe	Ile	Lys	Arg	Gln	Leu	Val	Glu	Thr	Arg	Gln	Ile	Thr				
915					920					925									
Lys	His	Val	Ala	Gln	Ile	Leu	Asp	Ser	Arg	Met	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asp				
930					935					940									

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser
 945 950 955 960
 Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg
 965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val
 980 985 990
 Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe
 995 1000 1005
 Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala
 1010 1015 1020
 Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe
 1025 1030 1035

Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala
 1040 1045 1050
 Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu
 1055 1060 1065
 Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val
 1070 1075 1080
 Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr
 1085 1090 1095

Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys
 1100 1105 1110
 Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro
 1115 1120 1125
 Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val
 1130 1135 1140
 Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys
 1145 1150 1155

Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser
 1160 1165 1170
 Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys

1175	1180	1185
Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile	Ile Lys Leu Pro Lys	Tyr Ser Leu
1190	1195	1200
Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg	Lys Arg Met Leu Ala	Ser Ala Gly
1205	1210	1215
Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu	Leu Ala Leu Pro Ser	Lys Tyr Val
1220	1225	1230
Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser	His Tyr Glu Lys Leu	Lys Gly Ser
1235	1240	1245
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys	Gln Leu Phe Val Glu	Gln His Lys
1250	1255	1260
His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile	Glu Gln Ile Ser Glu	Phe Ser Lys
1265	1270	1275
Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala	Asn Leu Asp Lys Val	Leu Ser Ala
1280	1285	1290
Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys	Pro Ile Arg Glu Gln	Ala Glu Asn
1295	1300	1305
Ile Ile His Leu Phe Thr Leu	Thr Asn Leu Gly Ala	Pro Ala Ala
1310	1315	1320
Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr	Ile Asp Arg Lys Arg	Tyr Thr Ser
1325	1330	1335
Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala	Thr Leu Ile His Gln	Ser Ile Thr
1340	1345	1350
Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile	Asp Leu Ser Gln Leu	Gly Gly Asp
1355	1360	1365
Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys	Lys Arg Lys Val Ser	Glu Ser Ala
1370	1375	1380
Thr Pro Glu Ser Val Ser Gly	Trp Arg Leu Phe Lys	Lys Ile Ser
1385	1390	1395

<210> 8

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: GFP insert for HDRT GFP: P00894

<400> 8

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac	60
ggcgacgtaa acggccacaa gttagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac	120
ggcaagctga cctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc	180
ctcgtgacca cctgacctc cggtgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag	240
cagcagcact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc	300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg	360
gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac	420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac	480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc	540
gacctactac agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac	600
tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc	660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa	720

<210> 9

<211> 4305

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Full HDRT template - transgenic WT1 TCR and TRAC
homology arms

<400> 9

tgccaacata ccataaacct cccattctgc taatgcccag cctaagttgg ggagaccact	60
ccagattcca agatgtacag tttgctttgc tgggctttt tcccatgcct gcctttactc	120
tgccagagtt atattgctgg ggttttgaag aagatcctat taaataaaag aataagcagt	180
attattaagt agccctgcac ttcaggtttc cttgagtggc aggccaggcc tggccgtgaa	240
cgttcactga aatcatggcc tcttgcccaa gatgatagc ttgtgcctgt cctgagtc	300
cagtccatca cgagcagctg gtttctaaga tgctatttcc cgtataaagc atgagaccgt	360
gacttgccag cccacagag cccgccctt gtccatcact ggcatctgga ctccagcctg	420
ggttggggca aagagggaaa tgagatcatg tcctaaccct gatcctcttg tcccacagat	480
atccagaacc ctgacctgc ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca	540

cagtccccga gaagttagggg ggaggggtcg gcaattgaac cggtagcctag agaaggtggc 600
 gcggggtaaa ctgggaaagt gatgtcgtgt actggctccg cctttttccc gagggtagggg 660
 gagaaccgta tataagtgca gtagtcgccg tgaacgttct ttttcgcaac gggtttgccg 720

 ccagaacaca ggtaagtgcc gtgtgtggtt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg 780
 gcccttgctg gccttgaatt acttccacgc ccttggtcgc agtacgtgat tcttgatccc 840
 gagcttcggg ttggaagtgg gtgggagagt tcgaggcctt gcgcttaagg agccccctcg 900
 cctcgtgctt gatttaggc ctggcttggg cgttggggcc gccgcgtgcg aatctggtgg 960
 caccttcgcg cctgtctcgc tgttttcgat aagtctctag ccatttaaaa tttttgatga 1020
 cctgtcgcga cgcttttttt ctggcaagat agtctttaa atgcgggcca agatgtgcac 1080
 actggtatctt cggtttttgg ggccgcgggc ggcgacgggg cccgtgcgtc ccagcgcaca 1140

 tgttcggcga ggccggggcct gcgagcgcgg ccaccgagaa tcggacgggg gtagtctcaa 1200
 gctggccggc ctgctctggt gcctggcctc gcgccgccgt gtatcgcccc gccctgggcg 1260
 gcaaggctgg cccggtcggc accagttgcg tgagcggaag gatggccgt tccccgccct 1320
 gctgcaggga gctcaaaatg gaggacgcgg cgtcgggag agcggggcggg tgagtacccc 1380
 acacaaagga aaagggcctt tccgtcctca gccgtcgtt catgtgactc cacggagtag 1440
 cgggcgccgt ccaggcacct cgattagttc tcgagctttt ggagtacgtc gtcttttagt 1500
 tggggggagg ggttttatgc gatggagttt cccacactg agtgggtgga gactgaagtt 1560

 aggccagctt ggcacttgat gtaattctcc ttggaatttg ccttttttga gtttgatct 1620
 tggttcattc tcaagcctca gacagtgtt caaagttttt ttcttccatt tcaggtgtcg 1680
 tgatgcggcc gccaccatgg gatcttggac actgtgttgc gtgtccctgt gcatcctggt 1740
 ggccaagcac acagatgccg gcgtgatcca gtctcctaga cacgaagtga ccgagatggg 1800
 ccaagaagtg accctgcgt gcaagcctat cagcgccac gattacctgt tctggtacag 1860
 acagaccatg atgagaggcc tggaaactgt gatctacttc aacaacaacg tgcccatcga 1920
 cgacagcggc atgcccagg atagattcag cgccaagatg cccaacgcca gcttcagcac 1980

 cctgaagatc cagcctagcg agcccagaga tagcgccgtg tacttctgcg ccagcagaaa 2040
 gacaggcggc tacagcaatc agccccagca ctttgagat ggcacccggc tgagcatcct 2100
 ggaagatctg aagaacgtgt tcccacctga ggtggccgtg ttcgagcctt ctgaggccga 2160
 gatcagccac acacagaaag ccacactcgt gtgtctggcc accggcttct atcccgatca 2220
 cgtggaactg tcttggtggg tcaacggcaa agaggtgcac agcggcgtca gcaccgatcc 2280
 tcagcctctg aaagagcagc ccgctctgaa cgacagcaga tactgcctga gcagcagact 2340

gagagtgtcc gccacattct ggcagaaccc cagaaaccac ttcagatgcc aggtgcagtt 2400

ctacggcctg agcgagaacg atgagtggac ccaggataga gccaagcctg tgacacagat 2460

cgtgtctgcc gaagcctggg gcagagccga ttgtggcttt accagcgaga gctaccagca 2520

gggcgtgctg tctgccacaa tctgttacga gatcctgctg ggcaaagcca ctctgtacgc 2580

cgtgtcgggt tctgccctgg tgctgatggc catggtcaag cggaaggata gcaggggcgg 2640

ctccggtgcc acaaacttct ccctgctcaa gcaggccgga gatgtggaag agaaccctgg 2700

ccctatggaa accctgctga aggtgctgag cggcacactg ctgtggcagc tgacatgggt 2760

ccgatctcag cagcctgtgc agtctcctca ggccgtgatt ctgagagaag gcgaggacgc 2820

cgatgatcaac tgcagcagct ctaaggccct gtacagcgtg cactgggtaca gacagaagca 2880

cggcgaggcc cctgtgttcc tgatgatcct gctgaaaggc ggcgagcaga agggccacga 2940

gaagatcagc gccagcttca acgagaagaa gcagcagctc agcctgtacc tgacagccag 3000

ccagctgagc tacagcgga cctacttttg tggcaccgcc tggatcaacg actacaagct 3060

gtctttcgga gccggcacca cagtacagc gggggccaat attcagaacc ccgatcctgc 3120

cgtgtaccag ctgagagaca gcaagagcag cgacaagagc gtgtgcctgt tcaccgactt 3180

cgacagccag accaacgtgt cccagagcaa ggacagcgac gtgtacatca ccgataagac 3240

tgtgctggac atgcggagca tggacttcaa gagcaacagc gccgtggcct ggtccaacaa 3300

gagcgatttc gcctgcgcca acgccttcaa caacagcatt atccccgagg acacattctt 3360

cccaagtctt gagagcagct ggcagctgaa gctgggtgaa aagagcttcg agacagacac 3420

caacctgaac ttccagaacc tgagcgtgat cggcttcaga atcctgctgc tcaaggtggc 3480

cggcttcaac ctgctgatga ccctgagact gtgggtccagc taacctcgac tgtgccttct 3540

agttgccagc catctgttgt ttgcccttcc ccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc 3600

actcccactg tcttttcta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt 3660

cattctattc tgggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat 3720

agcaggcagt ctggggatgc ggtgggctct atggcttctg aggcggaaag aaccagctgg 3780

ggctctaggg ggatcccca ctatcgtgt accagctgag agactctaaa tccagtgaca 3840

agtctgtctg cctattcacc gattttgatt ctcaaacaaa tgtgtcaca agtaaggatt 3900

ctgatgtgta tatcacagac aaaactgtgc tagacatgag gtctatggac ttcaagagca 3960

acagtgtgtt ggctggagc aacaaatctg actttgcatg tgcaaagcc ttcaacaaca 4020

gcattattcc agaagacacc ttcttccca gccaggtaa gggcagcttt ggtgccttcg 4080

caggctgttt ccttgcttca ggaatggcca ggttctgccc agagctctgg tcaatgatgt 4140
 ctaaaactcc tctgattggg ggtctcggcc ttatccattg ccacaaaac cctcttttta 4200
 ctaagaaaca gtgagccttg ttctggcagt ccagagaatg acacgggaaa aaagcagatg 4260
 aagagaaggt ggcaggagag ggcacgtggc ccagcctcag tctct 4305

<210> 10

<211> 314

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TCR beta chain pINT1066

<400> 10

Met Gly Ser Trp Thr Leu Cys Cys Val Ser Leu Cys Ile Leu Val Ala
 1 5 10 15

Lys His Thr Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr
 20 25 30

Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His
 35 40 45

Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu
 50 55 60

Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu
 85 90 95

Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 100 105 110

Ser Arg Lys Thr Gly Gly Tyr Ser Asn Gln Pro Gln His Phe Gly Asp
 115 120 125

Gly Thr Arg Leu Ser Ile Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro
 130 135 140

Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln
 145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val
 165 170 175

Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser
180 185 190

Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg
195 200 205

Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn
210 215 220

Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu
225 230 235 240

Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val
245 250 255

Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser
260 265 270

Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu
275 280 285

Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met
290 295 300

Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
305 310

<210> 11

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TCR alpha chain pINT1066

<400> 11

Met Glu Thr Leu Leu Lys Val Leu Ser Gly Thr Leu Leu Trp Gln Leu

1 5 10 15

Thr Trp Val Arg Ser Gln Gln Pro Val Gln Ser Pro Gln Ala Val Ile
20 25 30

Leu Arg Glu Gly Glu Asp Ala Val Ile Asn Cys Ser Ser Ser Lys Ala
35 40 45

Leu Tyr Ser Val His Trp Tyr Arg Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Val
50 55 60

Phe Leu Met Ile Leu Leu Lys Gly Gly Glu Gln Lys Gly His Glu Lys

65 70 75 80

Ile Ser Ala Ser Phe Asn Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser Leu Tyr Leu

85 90 95

Thr Ala Ser Gln Leu Ser Tyr Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Gly Thr Ala

100 105 110

Trp Ile Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr

115 120 125

Val Arg Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg

130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp

145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr

165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser

180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe

195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser

210 215 220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn

225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu

245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

260 265 270

<210> 12

<211> 608

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: TCR beta-linker-alpha configuration pINT1066

<400> 12

```

Met Gly Ser Trp Thr Leu Cys Cys Val Ser Leu Cys Ile Leu Val Ala
1           5           10           15
Lys His Thr Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr
           20           25           30
Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His

           35           40           45
Asp Tyr Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu
           50           55           60
Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro
65           70           75           80
Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu
           85           90           95
Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala

           100           105           110
Ser Arg Lys Thr Gly Gly Tyr Ser Asn Gln Pro Gln His Phe Gly Asp
           115           120           125
Gly Thr Arg Leu Ser Ile Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro
           130           135           140
Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln
145           150           155           160
Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val

           165           170           175
Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser
           180           185           190
Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg
           195           200           205
Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn
           210           215           220
Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu

           225           230           235           240

```

Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val
 245 250 255
 Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser
 260 265 270
 Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu
 275 280 285
 Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met
 290 295 300
 Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ala Thr Asn
 305 310 315 320
 Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 325 330 335
 Met Glu Thr Leu Leu Lys Val Leu Ser Gly Thr Leu Leu Trp Gln Leu
 340 345 350
 Thr Trp Val Arg Ser Gln Gln Pro Val Gln Ser Pro Gln Ala Val Ile
 355 360 365
 Leu Arg Glu Gly Glu Asp Ala Val Ile Asn Cys Ser Ser Ser Lys Ala
 370 375 380
 Leu Tyr Ser Val His Trp Tyr Arg Gln Lys His Gly Glu Ala Pro Val
 385 390 395 400
 Phe Leu Met Ile Leu Leu Lys Gly Gly Glu Gln Lys Gly His Glu Lys
 405 410 415
 Ile Ser Ala Ser Phe Asn Glu Lys Lys Gln Gln Ser Ser Leu Tyr Leu
 420 425 430
 Thr Ala Ser Gln Leu Ser Tyr Ser Gly Thr Tyr Phe Cys Gly Thr Ala
 435 440 445
 Trp Ile Asn Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr
 450 455 460
 Val Arg Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
 465 470 475 480
 Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp

485 490 495
 Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
 500 505 510
 Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
 515 520 525
 Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
 530 535 540
 Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser

545 550 555 560
 Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
 565 570 575
 Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
 580 585 590
 Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 595 600 605

<210> 13

<211> 1556

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Full HDRT template - GFP T2A insert GFP: P00894

<400> 13

gagggccgcg gcagcctgct gacctgcggc gacgtggagg agaatcccgg ccccatggtg 60
 agcaaggcgc aggagctgtt caccgggggtg gtcccatcc tggtcgagct ggacggcgac 120
 gtaaacggcc acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg gcatgccac ctacggcaag 180
 ctgacctga agttcatctg caccaccggc aagctgcccg tgccttgcc caccctctg 240
 accacctga cctacggcgt gcagtgttc agccgctacc ccgaccacat gaagcagcac 300
 gacttcttca agtccgcat gcccgaggc tacgtccagg agcgaccat cttcttcaag 360

 gacgacggca actacaagac ccgcgccgag gtgaagttcg agggcgacac cctggtgaac 420
 cgcacgagc tgaaggcat cgacttcaag gaggacggca acatcctggg gcacaagctg 480
 gagtacaact acaacagcca caacgtctat atcatggccg acaagcagaa gaacggcatc 540
 aaggtgaact tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca gcgtgcagct cgccgaccac 600
 taccagcaga acaccccat cggcgacggc cccgtgtctg tgcggacaa cactacctg 660

agcaccagct ccgcccctgag caaagacccc aacgagaagc gcatcacat ggtcctgctg 720
gagttcgtga ccgccgccgg gatcactctc ggcatggacg agctgtacaa gtaacctcga 780

ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgctgct tecttgacct 840
tggaaggctg cactccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 900
tgagtaggctg tcattctatt ctgggggggtg ggggtgggca ggacagcaag ggggaggatt 960
gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cgggtgggctc tatggcttct gaggcggaaa 1020
gaaccagctg gggctctagg gggatatccc actagtcgtg taccagctga gagactctaa 1080
atccagtac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat tctcaaaca atgtgtcaca 1140
aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg ctagacatga ggtctatgga 1200

cttcaagagc aacagtgtct tggcctggag caacaaatct gactttgcat gtgcaaacgc 1260
cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc agcccaggta agggcagctt 1320
tggtgccttc gcaggctgtt tecttgcttc aggaatggcc aggttctgcc cagagctctg 1380
gtcaatgatg tctaaaactc ctctgattgg tggctctggc cttatccatt gccacaaaa 1440
ccctcttttt actaagaaac agtgagcctt gttctggcag tccagagaat gacacgggaa 1500
aaaagcagat gaagagaagg tggcaggaga gggcacgtgg cccagcctca gtctct 1556

<210> 14
<211> 720
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: eGFP ORF GFP: P00894, GFP P01018

<400> 14

atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60
ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120
ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
ctcgtgacca cctgacctc cggcgtgcag tgettcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
cagcagcact tcttcaagtc cgccatgcc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
ttcaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360

gtgaaccgca tcgagctgaa gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480
ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600

tacctgagca cccagtccgc cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc 660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcggca tggacgagct gtacaagtaa 720
<210> 15
<211> 3105
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Full HDRT template - GFP with B2M homology arms GFP:

P01018

<400> 15
agatcttaat ctctcgggtt tccgttttct cgaatgaaaa atgcaggtcc gagcagttaa 60
ctggctgggg caccattagc aagtcaacta gcatctctgg ggccagtctg caaagcgagg 120
gggcagcctt aatgtgcctc cagcctgaag tcctagaatg agcgcccggg gtcccaagct 180
ggggcgcgca cccagatcg gagggcgccg atgtacagac agcaaaactca cccagtctag 240
tgcatgcctt cttaaacatc acgagactct aagaaaagga aactgaaaac gggaaagtcc 300
ctctctctaa cctggcactg cgtcgtctggc ttggagacag gtgacggtcc ctgcgggcct 360

tgtcctgatt ggctgggcac gcgtttaata taagtggagg cgtcgcgctg gcgggcattc 420
ctgaagctga cagcattcgg gccgagaggc tccggtgccc gtcagtgggc agagcgacac 480
tcgcccacag tccccgagaa gttgggggga ggggtcggca attgaaccgg tgcctagaga 540
aggtggcgcg gggtaaactg ggaaagtgat gtcgtgtact ggctccgcct ttttcccag 600
ggtgggggag aaccgtatat aagtgcagta gtcgccgtga acgttctttt tcgcaacggg 660
tttgccgcca gaacacaggt aagtccgtg tgtggttccc gcgggcctgg cctctttacg 720
ggttatggcc cttgcgtgcc ttgaattact tccacgcccc tggctgcagt acgtgattct 780

tgatcccag cttcgggttg gaagtgggtg ggagagttcg aggccttgcg cttaaaggagc 840
cccttcgcct cgtgcttagg ttgaggcctg gcttgggcgc tggggccgcc gcgtgcgaat 900
ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgctgc tttcgataag tctctagcca tttaaaattt 960
ttgatgacct gctgcgacgc tttttttctg gcaagatagt cttglaaatg cgggccaaga 1020
tgtgcacact ggtatttcgg tttttggggc cgcggggcggc gacggggccc gtgcgtccca 1080
gcgcacatgt tcggcgagcg ggggcctgcg agcgcgccca ccgagaatcg gacgggggta 1140
gtctcaagct ggccggcctg ctctgggtgcc tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc 1200

ctgggcggca agcttggccc ggtcggcacc agttgcgtga gcggaaagat ggccgcttcc 1260
cggccctgct gcagggagct caaaatggag gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga 1320

gtcacccaca caaaggaaaa gggcctttcc gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac 1380
ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctcga ttagttctcg agcttttgga gtacgtcgtc 1440
tttaggttgg ggggaggggt tttatgcgat ggagtttccc cacactgagt ggggtggagac 1500
tgaagtagg ccagcttggc acttgatgia attctccttg gaatttgccc tttttgagtt 1560
tggatcttgg ttcatctca agcctcagac agtgggtcaa agtttttttc ttccatttca 1620

gggtgtcgtga cggccggccc cgccaccatg gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg 1680
gtggtgcccc tcttggtcga gctggacggc gacgtaaag gccacaagtt cagcgtgtcc 1740
ggcgaggggc agggcgatgc cacctacggc aagctgaccc tgaagttcat ctgcaccacc 1800
ggcaagctgc ccgtgccctg gcccaccctc gtgaccaccc tgacctacgg cgtgcagtgc 1860
ttcagccgtc accccgacca catgaagcag cagcattct tcaagtcgc catgcccga 1920
ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc aaggacgacg gcaactaaa gaccgcgcc 1980
gaggtgaagt tcgaggcgca caccctggtg aaccgcatcg agctgaagg catcgacttc 2040

aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc 2100
tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc atcaagtgta acttcaagat ccgccacaac 2160
atcgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc agaacacccc catcgcgac 2220
ggccccgtgc tgctgccga caaccactac ctgagcacc agtccgccct gagcaaagac 2280
cccaacgaga agcgcatca catggtcctg ctggagtctg tgaccgccgc cgggatcact 2340
ctcgcatgg acgagctgta caagtaatct agacctcagc tgtgccttct agttgccagc 2400
catctgttgt ttccccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg 2460

tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcatgtct gagiaggtgt cattctattc 2520
tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg 2580
ctggggatgc ggtgggtct atggttctg aggcggaaag aaccagctgg ggctctaggg 2640
ggtatcccca ctagtgtct cgctccgtgg ccttagctgt gctcgcgcta ctctctttt 2700
ctggcctgga ggctatccag cgtgagtctc tctaccctc ccgtctggt ccttctctc 2760
ccgtctgca cctctgtgg ccctcgctgt gctctctcgc tccgtgactt cccttctca 2820
agttctctt ggtggccgc cgtggggcta gtccagggt ggatctcggg gaagcggcgg 2880

ggtggcctgg gattggggaa gggggtgcgc acccgggacg gcgctactt gcccctttcg 2940
gcggggagca ggggagacct ttggcctacg gcgacgggag ggtcgggaca aagtttaggg 3000
cgtcgataag cgtcagagcg ccgaggttgg gggaggggtt ctcttccgt ctttcgcggg 3060
gcctctggct cccccagcgc agctggagtg ggggacgggt aggt 3105

<210> 16

<211> 1379

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Cas9 amino acid sequence for RNP

<400> 16

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val
1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro
165 170 175

Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr
180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala
195 200 205

Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn
 210 215 220
 Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn
 225 230 235 240
 Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe
 245 250 255
 Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp
 260 265 270

 Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp
 275 280 285
 Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp
 290 295 300
 Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser
 305 310 315 320
 Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys
 325 330 335

 Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe
 340 345 350
 Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser
 355 360 365
 Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp
 370 375 380
 Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg
 385 390 395 400

 Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu
 405 410 415
 Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe
 420 425 430
 Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile
 435 440 445
 Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp

450 Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu
 465 470 475 480
 Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
 485 490 495
 Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
 500 505 510
 Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
 515 520 525

 Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
 530 535 540
 Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
 545 550 555 560
 Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
 565 570 575
 Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
 580 585 590

 Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
 595 600 605
 Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
 610 615 620
 Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
 625 630 635 640
 His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
 645 650 655

 Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
 660 665 670
 Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
 675 680 685
 Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
 690 695 700

Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
705 710 715 720

His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
725 730 735

Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro
785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu
805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg
820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys
835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg
850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys
865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys
885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp
900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr
915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp
930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser

945	950	955	960
Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg			
	965	970	975
Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val			
	980	985	990
Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe			
	995	1000	1005
Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala			
	1010	1015	1020
Lys Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe			
	1025	1030	1035
Tyr Ser Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala			
	1040	1045	1050
Asn Gly Glu Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu			
	1055	1060	1065
Thr Gly Glu Ile Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val			
	1070	1075	1080
Arg Lys Val Leu Ser Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr			
	1085	1090	1095
Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys			
	1100	1105	1110
Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro			
	1115	1120	1125
Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val			
	1130	1135	1140
Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys Ser Lys Lys Leu Lys			
	1145	1150	1155
Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met Glu Arg Ser Ser			
	1160	1165	1170
Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys Gly Tyr Lys			
	1175	1180	1185

Glu Val	Lys Lys Asp Leu Ile	Ile Lys Leu Pro Lys	Tyr Ser Leu
1190	1195	1200	
Phe Glu	Leu Glu Asn Gly Arg	Lys Arg Met Leu Ala	Ser Ala Gly
1205	1210	1215	
Glu Leu	Gln Lys Gly Asn Glu	Leu Ala Leu Pro Ser	Lys Tyr Val
1220	1225	1230	
Asn Phe	Leu Tyr Leu Ala Ser	His Tyr Glu Lys Leu	Lys Gly Ser
1235	1240	1245	
Pro Glu	Asp Asn Glu Gln Lys	Gln Leu Phe Val Glu	Gln His Lys
1250	1255	1260	
His Tyr	Leu Asp Glu Ile Ile	Glu Gln Ile Ser Glu	Phe Ser Lys
1265	1270	1275	
Arg Val	Ile Leu Ala Asp Ala	Asn Leu Asp Lys Val	Leu Ser Ala
1280	1285	1290	
Tyr Asn	Lys His Arg Asp Lys	Pro Ile Arg Glu Gln	Ala Glu Asn
1295	1300	1305	
Ile Ile	His Leu Phe Thr Leu	Thr Asn Leu Gly Ala	Pro Ala Ala
1310	1315	1320	
Phe Lys	Tyr Phe Asp Thr Thr	Ile Asp Arg Lys Arg	Tyr Thr Ser
1325	1330	1335	
Thr Lys	Glu Val Leu Asp Ala	Thr Leu Ile His Gln	Ser Ile Thr
1340	1345	1350	
Gly Leu	Tyr Glu Thr Arg Ile	Asp Leu Ser Gln Leu	Gly Gly Asp
1355	1360	1365	
Gly Gly	Gly Ser Pro Lys Lys	Lys Arg Lys Val	
1370	1375		
<210> 17			
<211> 5399			
<212> RNA			
<213> Artificial Sequence			
<220><223> Synthetic: mRNA encoding BC22n with Hibit tag			
<400> 17			

gggaagcuca gaauaaacgc ucaacuugg ccggaucugc caccauggag gccucccccg 60

ccuccggccc ccggcaccug auggaccccc acaucuucac cuccaacuuc aacaacggca 120

ucggccggca caagaccuac cugugcuacg agguggagcg gcuggacaac ggcaccuccg 180

ugaagaugga ccagcaccgg gccuuccugc acaaccaggc caagaaccug cugugcggcu 240

ucuacggccg gcacgccgag cugcgggucc uggaccuggu gccuccccug cagcuggacc 300

ccgccagau cuaccgggug accugguuca ucuccugguc cccugcuuc uccuggggcu 360

gcgccggcga ggugcgggcc uuccugcagg agaacacca cgugcggcug cggauucuug 420

ccgccggau cuacgacuac gacccccugu acaaggaggc ccugcagaug cugcgggacg 480

ccggcgccca gguguccauc augaccuacg acgagucaa gcacugcugg gacaccuucg 540

uggaccacca ggugcggccc uuccagcccu gggacggccu ggacgagcac ucccaggccc 600

uguccggccg gcugcgggcc auccugcaga accagggcaa cuccggcucc gagacccccg 660

gcaccuccga guccgccacc cccgaguccg acaagaagua cuccaucggc cuggccaucg 720

gcaccaacuc cgugggcugg gccgugauc cgcacgagua caaggugccc uccaagaagu 780

ucaaggugcu gggcaacacc gaccggcacu ccuacaaga gaaccugauc ggcgccucg 840

uguucgacuc cggcgagacc gccgaggcca cccggcugaa gcggaccgcc cggcggcggg 900

acaccggcg gaagaaccgg aucugcuacc ugacggagau cuucccaac gagauggcca 960

agguggacga cuccuucuc caccggcugg aggaguccuu ccugguggag gaggacaaga 1020

agcacgagcg gcaccccauc uucggcaaca ucguggacga gguggccuac cacgagaagu 1080

acccaccuau cuaccaccug cggaagaagc ugguggacuc caccgacaag gccgaccugc 1140

ggcugaucua ccuggcccug gcccauga ucaaguuccg gggccacuuc cugaucgagg 1200

gcgaccugaa ccccgacaac uccgacgugg acaagcuguu cauccagcug gugcagaccu 1260

acaaccagcu guucgaggag aaccccauca acgccuccgg cguggacgcc aaggccauc 1320

uguccgcccg gcuguccaag ucccggcggc uggagaaccu gaucgccag cugcccgcg 1380

agaagaagaa cggccuguc ggcaaccuga ucgccuguc ccugggccug accccaacu 1440

ucaaguccaa cuucgaccug gccgaggacg ccaagcugca gcuguccaag gacaccuacg 1500

acgacgaccu ggacaaccug cuggcccaga ucggcgacca guacgccgac cuguuccugg 1560

ccgcaagaa ccuguccgac gccauccugc uguccgacau ccugcgggug aacaccgaga 1620

ucaccaaggc ccccgucc gccuccauga ucaagcggua cgacgagcac caccaggacc 1680

ugaccugcu gaaggccug gugcggcagc agcugcccga gaaguacaag gagaucuucu 1740

ucgaccaguc caagaacggc uacgccggcu acaucgacgg cggcgccucc caggaggagu	1800
ucuacaaguu caucaagccc auccuggaga agauggacgg caccgaggag cugcugguga	1860
agcugaaccg ggaggaccug cugcggaagc agcggaccuu cgacaacggc uccaucacccc	1920
accagaacca ccugggcgag cugcacgcca uccugcggcg gcaggaggac uucuaccccu	1980
uccugaagga caaccgggag aagaucgaga agauccugac cuuccggauc cccuacuacg	2040
ugggcccccu ggcccggggc aacucccggu ucgccuggau gacccggaag uccgaggaga	2100
ccaucacccc cuggaacuuc gaggaggugg uggacaaggg cgccuccgcc caguccuua	2160
ucgagcggau gaccaacuuc gacaagaacc ugcccaacga gaaggugcug cccaagcacu	2220
cccugcugua cgaguacuuc accguguaca acgagcugac caaggugaag uacgugaccg	2280
agggcaugcg gaagcccgcc uuccuguccg gcgagcagaa gaaggccauc guggaccugc	2340
uguucaagac caaccggaag gugaccguga agcagcugaa ggaggacuac uucaagaaga	2400
ucgagugcuu cgacuuccug gagaucuccg gcguggagga ccgguuac gccucccugg	2460
gcaccuacca cgaccugcug aagaucaca aggacaagga cuuccuggac aacgaggaga	2520
acgaggacau ccuggaggac aucgugcuga ccugacccu guucgaggac cgggagauga	2580
ucgaggagcg gcugaagacc uacgcccacc uguucgacga caaggugaug aagcagcuga	2640
agcggcgggc guacaccggc uggggccggc ugucccggaa gcugaucaac ggcauccggg	2700
acaagcaguc cggcaagacc auccuggacu uccugaaguc cgacggcuuc gccaaccgga	2760
acuucaugca gcugauccac gacgacuccc ugaccuucaa ggaggacauc cagaaggccc	2820
agguguccgg ccagggcgac ucccugcacg agcacauccg caaccuggcc ggcucccccg	2880
ccaucaagaa gggcauccug cagaccguga agguggugga cgagcuggug aaggugaugg	2940
gccggcacia gcccagaac aucgugaucg agauggcccg ggagaaccag accaccaga	3000
agggccagaa gaacucccg gagcggauga agcggauca ggagggauc aaggagcugg	3060
gcucccagau ccugaaggag caccgcgugg agaacacca gcugcagaac gagaagcugu	3120
accguacua ccugcagaac ggccgggaca uguacugga ccaggagcug gacaucaacc	3180
ggcuguccga cuacgacgug gaccacaucg ugccccaguc cuuccugaag gacgacucca	3240
ucgacaaca ggugcugacc cgguccgaca agaaccgggg caaguccgac aacgugcccu	3300
ccgaggaggu ggugaagaag augaagaacu acuggcggca gcugcugaac gccaaagcuga	3360
ucaccagcg gaaguucgac aaccugacca aggccgagcg gggcgccug uccgagcugg	3420
acaaggccgg cuucaucaag cggcagcugg uggagaccg gcagauacc aagcacgugg	3480
cccagauccu ggacucccg augaacacca aguacgacga gaacgacaag cugaucggg	3540
aggugaaggu gaucaccug aaguccaagc ugguguccga cuuccggaag gacuuccagu	3600

ucuacaaggu gcgggagauc aacaacuacc accacgcca cgacgccuac cugaacgccg 3660
 uggugggcac cgccugauc aagaaguacc ccaagcugga guccaguuc guguacggcg 3720
 acuacaaggu guacgacgug cggaagauga ucgccaaguc cgagcaggag aucggcaagg 3780
 ccaccgcaa guacuucuc uacuccaaca ucaugaacuu cuucaagacc gagaucaccc 3840

 uggccaacgg cgagauccgg aagcggcccc ugaucgagac caacggcgag accggcgaga 3900
 ucguguggga caagggccgg gacuucgcca ccgugcggaa ggugcugucc augccccagg 3960
 ugaacaucgu gaagaagacc gaggugcaga ccggcggcuu cuccaaggag uccauccugc 4020
 ccaagcggaa cuccgacaag cugaucgccc ggaagaagga cugggacccc aagaaguacg 4080
 gcggcuucga cuccccacc guggccuacu ccgugcuggu gguggccaaug guggagaagg 4140
 gcaaguccaa gaagcugaag uccgugaagg agcugcuggg caucaccauc auggagcggg 4200
 ccuccuucga gaagaacccc aucgacuucc uggaggccaa gggucaacaag gaggugaaga 4260

 aggaccugau caucaagcug cccaaguacu ccuguucga gcuggagaac ggccggaagc 4320
 ggaugcuggc cuccgccggc gagcugcaga agggcaacga gcuggcccug ccuccaagu 4380
 acgugaacuu ccuguaccug gccuccacu acgagaagcu gaagggcucc ccgaggaca 4440
 acgagcagaa gcagcugucc guggagcagc acaagcacua ccuggacgag aucaucgagc 4500
 agaucuccga guucuccaag cgggugaucc uggccgacgc caaccuggac aaggugcugu 4560
 ccgccuacaa caagcaccgg gacaagccca uccgggagca ggccgagaac aucauccacc 4620
 uguucacccu gaccaaccug ggcgcccccg ccgccucaa guacuucgac accaccaucg 4680

 accggaagcg guacaccucc accaaggagg ugcuggacgc caccugauc caccagucca 4740
 ucaccggccu guacgagacc cggaucgacc ugucccagcu gggcggcgac ggcggcggu 4800
 ccccaagaa gaagcggag guguccgagu ccgccacccc cgaguccgug uccggcuggc 4860
 ggcuguucaa gaagaucucc ugacuagcac cagccucaag aacaccgaa uggagucucu 4920
 aagcuacaua auaccaacuu acacuuuaca aauguuguc ccccaaaug uagccauucg 4980
 uaucugcucc uauuaaaag aaaguucuu cacauucucu cgagaaaaa aaaaaaugga 5040
 aaaaaaaaa acggaaaaa aaaaaggua aaaaaaaaa auauaaaaa aaaaaacaua 5100

 aaaaaaaaa acgaaaaa aaaaacgua aaaaaaaaa cucaaaaaa aaaaagaua 5160
 aaaaaaaaa ccuaaaaaa aaaaugua aaaaaaaaa gggaaaaa aaaaacgca 5220
 aaaaaaaaa caaaaaaa aaaaugca aaaaaaaaa ucgaaaaa aaaaucua 5280
 aaaaaaaaa cgaaaaaa aaaacccaa aaaaaaaaa acaaaaaa aaaaugaaa 5340
 aaaaaaaag uuaaaaaa aaacugaaa aaaaaaaau uuaaaaaa aaaaucua 5399

<210> 18

<211> 4839

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Open reading frame for BC22n with Hibit tag

<400> 18

auggaggccu cccccgccuc cgccccccgg caccugaugg acccccacau cuuaccucc	60
aacuuaaca acggcaucgg ccggcacaag accuaccugu gcuacgaggu ggagcggcug	120
gacaacggca ccuccgugaa gauggaccag caccggggcu uccugcacia ccaggccaag	180
aaccugcugu gcggcuucua cgcccgccac gccgagcugc gguuccugga ccuggugccc	240
ucccugcagc uggacccccg ccagauacuac cgggugaccu gguucaucuc cugguccccc	300
ugcuuuccu ggggugcgc cgccgaggug cgggccuucc ugcaggagaa caccacgug	360
cggcugcgga ucuucgccc cggaucuac gacuacgacc ccuguacaa ggaggcccug	420
cagaugcugc gggacgccgg cgcccaggug uccaucauga ccuacgacga guucaagcac	480
ugcugggaca ccuucguga ccaccaggc ugcccuucc agcccuggga cggccuggac	540
gagcacuccc agggccugc cgcccgccug cgggccaucc ugcagaacca gggaacucc	600
ggcuccgaga cccccggcac cuccgagucc gccaccccc aguccgacaa gaaguacucc	660
aucggccugg ccaucggcac caacuccgug ggucgggccg ugaucaccga cgaguacaag	720
gugcccucca agaagucaa ggugcugggc aacaccgacc ggcacuccau caagaagaac	780
cugaucggcg ccucguguu cgacuccggc gagaccgcc aggccaccg gcugaagcgg	840
accgcccggc ggcgguacac ccggcggaag aaccggauu gcuaccugca ggagauuuc	900
uccaacgaga ugccaaggu ggacgacucc uuuccacc ggucggagga guccuuccug	960
guggaggagg acaagaagca cgagcggcac ccaucuucg gcaacaucgu ggacgaggug	1020
gccuaccacg agaaguacc caccuacuac caccugcgga agaagcuggu ggacuccacc	1080
gacaaggccg accugcggu gaucuaccug gccucggccc acaugauca guuccggggc	1140
cacuuccuga ucgaggcgga ccugaacccc gacaacuccg acguggacaa gcuguuauac	1200
cagcuggugc agaccuacaa ccagcuguuc gaggagaacc ccaucaacgc cuccggcgug	1260
gagccaagg ccauccuguc cgcccgccug uccaagucc ggcgcgugga gaaccugauc	1320
gcccgagcug ccggcgagaa gaagaacggc cuguucggca accugaucgc ccuguccug	1380
ggccugaccc ccaacuuaa guccaacuuc gaccuggcc aggacgcaa gcugcagcug	1440
uccaaggaca ccuacgacg cgaccuggac aaccugcugg ccagaucgg cgaccaguac	1500
gccgaccugu uccuggccgc caagaaccug uccgacgcca uccugcugc cgacaucug	1560

cgggugaaca ccgagaucac caaggcccc cuguccgcu ccaugaucaa gcgguacgac	1620
gagcaccacc aggaccugac ccugcugaag gccugggugc ggagcagcu gcccagaag	1680
uacaaggaga ucuucuuga ccaguccaag aacggcuacg ccggcuacau cgacggcggc	1740
gccucccagg aggaguucua caagucauc aagcccaucc uggagaagau ggacggcacc	1800
gaggagcugc uggugaagcu gaaccgggag gaccugcugc ggaagcagcg gaccuucgac	1860
aacggcuca uccccacca gauccaccug ggagcagcugc acgccauccu gcggcggcag	1920
gaggacuucu acccuuccu gaaggacaac cgggagaaga ucgagaagau ccugaccuuc	1980
cggaucccu acucguggg ccccgugcc cggggcaacu cccgguucgc cuggaugacc	2040
cggaaguccg aggagaccu caccuccugg aacuucgagg agguggugga caaggcgcc	2100
uccgcccagu ccuucacga gcggaugacc aacuucgaca agaaccugcc caacgagaag	2160
gugcugccca agcacuccu gcuguacgag uacuucaccg uguacaacga gcugaccaag	2220
gugaaguacg ugaccgaggg caugcggaag cccgccuucc ugucggcgga gcagaagaag	2280
gccaucgugg accugcuguu caagaccaac cggaagguga ccgugaagca gcugaaggag	2340
gacuacuua agaagauga gugcuucgac uccguggaga ucuccggcgu ggaggaccgg	2400
uucaacgcu cccugggcac cuaccacgac cugcugaaga ucaucaagga caaggacuuc	2460
cuggacaacg aggagaacga ggacaucug gaggacaucg ugcugaccu gaccuguuc	2520
gaggaccggg agaugauga ggagcggcug aagaccuacg cccaccuguu cgacgacaag	2580
gugaugaagc agcugaagc gcggcgguc accggcuggg gccggcuguc ccggaagcug	2640
aucaacggca uccgggacaa gcaguccggc aagaccuucc uggacuuccu gaaguccgac	2700
ggcuucgcca accggaacuu caugcagcug auccacgacg acuccugac cuucaaggag	2760
gacauccaga aggcccaggu guccggccag ggcgacucc ugcacgagca caugccaac	2820
cuggccggcu ccccgccau caagaaggc auccugcaga ccgugaaggu gguggacgag	2880
cuggugaagg ugaugggccg gcacaagccc gagaacaucg ugaucgagau ggcccgggag	2940
aaccagacca ccagaaggg ccagaagaac ucccgggagc ggaugaagcg gaucgaggag	3000
ggcaucaagg agcugggcuc ccagaucug aaggagcacc ccguggagaa caccagcug	3060
cagaacgaga agcuguaccu guacuaccug cagaacggcc gggacaugua cguggaccag	3120
gagcuggaca ucaaccggcu guccgacuac gacguggacc acaucgugcc ccaguccuuc	3180
cugaaggacg acuccaucga caacaaggug cugaccggg cgcacaagaa cggggcaag	3240
uccgacaacg ugcccucca ggagguggug aagaaugaaga agaacuacug gcggcagcug	3300

cugaacgcc a gcugaucac ccagcggaag uucgacaacc ugaccaaggc cgagcggggc 3360

ggccuguccg agcuggacaa ggccggcuuc aucaagcggc agcuggugga gacccggcag 3420

aucaccaagc acguggccca gauccuggac ucccggauga acaccaagua cgacgagaac 3480

gacaagcuga uccgggaggu gaaggugauc acccugaagu ccaagcuggu guccgacuuc 3540

cgggaaggacu uccaguucua caaggugcgg gagaucaaca acuaccacca cggccacgac 3600

gccuaccuga acgccguggu gggcaccgcc cugaucaaga aguaccccaa gcuggagucc 3660

gaguucgugu acggcgacua caagguguac gacgugcggg agaugaucgc caaguccgag 3720

caggagaucg gcaaggccac cgccaaguac uucuucuacu ccaacaucau gaacuucuuc 3780

aagaccgaga ucacccuggc caacggcgag auccggaagc ggccccugau cgagaccaac 3840

ggcgagaccg gcgagaucgu gugggacaag ggccgggacu ucgccaccgu gcggaaggug 3900

cuguccaucg cccaggugaa caucgugaag aagaccgagg ugcagaccgg cggcuucucc 3960

aaggagucca uccugcccaa gcggaacucc gacaagcuga ucgcccgaa gaaggacugg 4020

gacccaaga aguacggcgg cuucgacucc cccaccgugg ccuacuccgu gcugguggug 4080

gccaaggugg agaagggcaa guccaagaag cugaaguccg ugaaggagcu gcugggcauc 4140

accaucaugg agcgguccuc cuucgagaag aaccccaucg acuuccugga ggccaagggc 4200

uacaaggagg ugaagaagga ccugaucauc aagcugccca aguacuccu guucgagcug 4260

gagaacggcc ggaagcggaug gcuggccucc gccggcgagc ugcagaaggg caacgagcug 4320

gcccugcccu ccaaguacgu gaacuuccug uaccuggccu cccacuacga gaagcugaag 4380

ggcuccccg aggacaacga gcagaagcag cuguucgugg agcagcaca gcacuaccug 4440

gacgagauca ucgagcagau cuccgaguuc uccaagcggg ugauccuggc cgacgccaac 4500

cuggacaagg ugcuguccgc cuacaacaag caccgggaca agcccauccg ggagcaggcc 4560

gagaacauc uccaccuguu caccugacc aaccugggcg ccccgccgc cuucaaguac 4620

uucgacacca ccaucgaccg gaagcggua accuccacca aggaggugcu ggacgccacc 4680

cugauccacc aguccaucac ggccugua gagaccgga ucgaccuguc ccagcugggc 4740

ggcgacggcg gcggcucucc caagaagaag cggaaggugu ccgaguccgc ccccccgag 4800

uccguguccg gcuggcgguu guucaagaag aucuccuga 4839

<210> 19

<211> 1612

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Amino acid sequence for BC22n with Hibit tag

<400> 19

Met Glu Ala Ser Pro Ala Ser Gly Pro Arg His Leu Met Asp Pro His

1 5 10 15
Ile Phe Thr Ser Asn Phe Asn Asn Gly Ile Gly Arg His Lys Thr Tyr
20 25 30
Leu Cys Tyr Glu Val Glu Arg Leu Asp Asn Gly Thr Ser Val Lys Met
35 40 45
Asp Gln His Arg Gly Phe Leu His Asn Gln Ala Lys Asn Leu Leu Cys
50 55 60
Gly Phe Tyr Gly Arg His Ala Glu Leu Arg Phe Leu Asp Leu Val Pro

65 70 75 80
Ser Leu Gln Leu Asp Pro Ala Gln Ile Tyr Arg Val Thr Trp Phe Ile
85 90 95
Ser Trp Ser Pro Cys Phe Ser Trp Gly Cys Ala Gly Glu Val Arg Ala
100 105 110
Phe Leu Gln Glu Asn Thr His Val Arg Leu Arg Ile Phe Ala Ala Arg
115 120 125
Ile Tyr Asp Tyr Asp Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Leu Gln Met Leu Arg

130 135 140
Asp Ala Gly Ala Gln Val Ser Ile Met Thr Tyr Asp Glu Phe Lys His
145 150 155 160
Cys Trp Asp Thr Phe Val Asp His Gln Gly Cys Pro Phe Gln Pro Trp
165 170 175
Asp Gly Leu Asp Glu His Ser Gln Ala Leu Ser Gly Arg Leu Arg Ala
180 185 190
Ile Leu Gln Asn Gln Gly Asn Ser Gly Ser Glu Thr Pro Gly Thr Ser

195 200 205
Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Ala
210 215 220
Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys
225 230 235 240

Val Pro Ser Lys Lys Phe Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser
245 250 255

Ile Lys Lys Asn Leu Ile Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr
260 265 270

Ala Glu Ala Thr Arg Leu Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg
275 280 285

Arg Lys Asn Arg Ile Cys Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met
290 295 300

Ala Lys Val Asp Asp Ser Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu
305 310 315 320

Val Glu Glu Asp Lys Lys His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile
325 330 335

Val Asp Glu Val Ala Tyr His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu
340 345 350

Arg Lys Lys Leu Val Asp Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile
355 360 365

Tyr Leu Ala Leu Ala His Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile
370 375 380

Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile
385 390 395 400

Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn
405 410 415

Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys
420 425 430

Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys
435 440 445

Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro
450 455 460

Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu
465 470 475 480

Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile

485 490 495
Gly Asp Gln Tyr Ala Asp Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp
500 505 510
Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys

515 520 525
Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln
530 535 540
Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys
545 550 555 560
Tyr Lys Glu Ile Phe Phe Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr
565 570 575
Ile Asp Gly Gly Ala Ser Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro

580 585 590
Ile Leu Glu Lys Met Asp Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn
595 600 605
Arg Glu Asp Leu Leu Arg Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile
610 615 620
Pro His Gln Ile His Leu Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln
625 630 635 640
Glu Asp Phe Tyr Pro Phe Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys

645 650 655
Ile Leu Thr Phe Arg Ile Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly
660 665 670
Asn Ser Arg Phe Ala Trp Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr
675 680 685
Pro Trp Asn Phe Glu Glu Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser
690 695 700
Phe Ile Glu Arg Met Thr Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys

705 710 715 720
Val Leu Pro Lys His Ser Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn
725 730 735

Glu Leu Thr Lys Val Lys Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala
 740 745 750
 Phe Leu Ser Gly Glu Gln Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys
 755 760 765
 Thr Asn Arg Lys Val Thr Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys
 770 775 780
 Lys Ile Glu Cys Phe Asp Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg
 785 790 795 800
 Phe Asn Ala Ser Leu Gly Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys
 805 810 815
 Asp Lys Asp Phe Leu Asp Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp
 820 825 830
 Ile Val Leu Thr Leu Thr Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu
 835 840 845
 Arg Leu Lys Thr Tyr Ala His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln
 850 855 860
 Leu Lys Arg Arg Arg Tyr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu
 865 870 875 880
 Ile Asn Gly Ile Arg Asp Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe
 885 890 895
 Leu Lys Ser Asp Gly Phe Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His
 900 905 910
 Asp Asp Ser Leu Thr Phe Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser
 915 920 925
 Gly Gln Gly Asp Ser Leu His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser
 930 935 940
 Pro Ala Ile Lys Lys Gly Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu
 945 950 955 960
 Leu Val Lys Val Met Gly Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu
 965 970 975
 Met Ala Arg Glu Asn Gln Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg

980	985	990
Glu Arg Met Lys Arg Ile Glu Glu	Gly Ile Lys Glu Leu	Gly Ser Gln
995	1000	1005
Ile Leu Lys Glu His Pro Val	Glu Asn Thr Gln Leu	Gln Asn Glu
1010	1015	1020
Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu	Gln Asn Gly Arg Asp	Met Tyr Val
1025	1030	1035
Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn	Arg Leu Ser Asp Tyr	Asp Val Asp
1040	1045	1050
His Ile Val Pro Gln Ser Phe	Leu Lys Asp Asp Ser	Ile Asp Asn
1055	1060	1065
Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp	Lys Asn Arg Gly Lys	Ser Asp Asn
1070	1075	1080
Val Pro Ser Glu Glu Val Val	Lys Lys Met Lys Asn	Tyr Trp Arg
1085	1090	1095
Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu	Ile Thr Gln Arg Lys	Phe Asp Asn
1100	1105	1110
Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly	Gly Leu Ser Glu Leu	Asp Lys Ala
1115	1120	1125
Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu	Val Glu Thr Arg Gln	Ile Thr Lys
1130	1135	1140
His Val Ala Gln Ile Leu Asp	Ser Arg Met Asn Thr	Lys Tyr Asp
1145	1150	1155
Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg	Glu Val Lys Val Ile	Thr Leu Lys
1160	1165	1170
Ser Lys Leu Val Ser Asp Phe	Arg Lys Asp Phe Gln	Phe Tyr Lys
1175	1180	1185
Val Arg Glu Ile Asn Asn Tyr	His His Ala His Asp	Ala Tyr Leu
1190	1195	1200
Asn Ala Val Val Gly Thr Ala	Leu Ile Lys Lys Tyr	Pro Lys Leu
1205	1210	1215

Glu Ser	Glu Phe Val Tyr	Gly Asp Tyr Lys Val Tyr	Asp Val Arg
1220		1225	1230
Lys Met	Ile Ala Lys Ser	Glu Gln Glu Ile Gly Lys	Ala Thr Ala
1235		1240	1245
Lys Tyr	Phe Phe Tyr Ser	Asn Ile Met Asn Phe Phe	Lys Thr Glu
1250		1255	1260
Ile Thr	Leu Ala Asn Gly Glu	Ile Arg Lys Arg Pro	Leu Ile Glu
1265		1270	1275
Thr Asn	Gly Glu Thr Gly Glu	Ile Val Trp Asp Lys	Gly Arg Asp
1280		1285	1290
Phe Ala	Thr Val Arg Lys Val	Leu Ser Met Pro Gln	Val Asn Ile
1295		1300	1305
Val Lys	Lys Thr Glu Val Gln	Thr Gly Gly Phe Ser	Lys Glu Ser
1310		1315	1320
Ile Leu	Pro Lys Arg Asn Ser	Asp Lys Leu Ile Ala	Arg Lys Lys
1325		1330	1335
Asp Trp	Asp Pro Lys Lys Tyr	Gly Gly Phe Asp Ser	Pro Thr Val
1340		1345	1350
Ala Tyr	Ser Val Leu Val Val	Ala Lys Val Glu Lys	Gly Lys Ser
1355		1360	1365
Lys Lys	Leu Lys Ser Val Lys	Glu Leu Leu Gly Ile	Thr Ile Met
1370		1375	1380
Glu Arg	Ser Ser Phe Glu Lys	Asn Pro Ile Asp Phe	Leu Glu Ala
1385		1390	1395
Lys Gly	Tyr Lys Glu Val Lys	Lys Asp Leu Ile Ile	Lys Leu Pro
1400		1405	1410
Lys Tyr	Ser Leu Phe Glu Leu	Glu Asn Gly Arg Lys	Arg Met Leu
1415		1420	1425
Ala Ser	Ala Gly Glu Leu Gln	Lys Gly Asn Glu Leu	Ala Leu Pro
1430		1435	1440
Ser Lys	Tyr Val Asn Phe Leu	Tyr Leu Ala Ser His	Tyr Glu Lys

1445 1450 1455
 Leu Lys Gly Ser Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val
 1460 1465 1470
 Glu Gln His Lys His Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser
 1475 1480 1485
 Glu Phe Ser Lys Arg Val Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys
 1490 1495 1500
 Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu

1505 1510 1515
 Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly
 1520 1525 1530
 Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp Thr Thr Ile Asp Arg Lys
 1535 1540 1545
 Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala Thr Leu Ile His
 1550 1555 1560
 Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Ser Gln

1565 1570 1575
 Leu Gly Gly Asp Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
 1580 1585 1590
 Ser Glu Ser Ala Thr Pro Glu Ser Val Ser Gly Trp Arg Leu Phe
 1595 1600 1605
 Lys Lys Ile Ser

1610

<210> 20

<211> 589

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: mRNA encoding UGI

<400> 20

gggagaccca agcuggcuag cucccgcagu cggcguccag cggcucugcu uguucgugug 60

ugugucguug caggccuuau ucggauccgc caccauggga ccgaagaaga agagaaaggu 120

cggaggagga agcacaaacc ugucggacau caucgaaaag gaaacaggaa agcagcuggu 180

cauccaggaa ucgauccuga ugcugccgga agaagucgaa gaagucaucg gaaacaagcc 240
 ggaaucggac auccuggucc acacagcaua cgacgaauucg acagacgaaa acgucaugcu 300
 gcugacaucg gacgcaccgg aaauacaagcc gugggcacug gucauccagg acucgaacgg 360
 agaaaacaag aucaagaugc ugugauaguc uagacaucau auuuuuuagc aucucagccu 420
 accaugagaa uaagagaaag aaaaugaaga ucaauagcuu auucaucucu uuuucuuuuu 480

cguuggugua aagccaacac ccugucuaaa aaacauaaau uucuuuauc auuuugccuc 540
 uuuucucugu gcuucauuu auaaaaaag gaaagaaccu cgagucuag 589

<210> 21

<211> 291

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Open reading frame for UGI

<400> 21

augggaccga agaagaagag aaaggucgga ggaggaagca caaaccuguc ggacaucauc 60
 gaaaaggaaa caggaaagca gcuggucauc caggaaucga uccugaugcu gccggaagaa 120
 gucgaagaag ucaucggaaa caagccggaa ucggacauc ugguccacac agcauacgac 180

gaaucgacag acgaaaacgu caugcugcug acaucggacg caccggaaua caagccgugg 240
 gcacugguca uccaggacuc gaacggagaa aacaagauca agaucgug a 291

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Amino acid sequence for UGI

<400> 22

Met Thr Asn Leu Ser Asp Ile Ile Glu Lys Glu Thr Gly Lys Gln Leu

1 5 10 15

Val Ile Gln Glu Ser Ile Leu Met Leu Pro Glu Glu Val Glu Glu Val

20 25 30

Ile Gly Asn Lys Pro Glu Ser Asp Ile Leu Val His Thr Ala Tyr Asp

35 40 45

Glu Ser Thr Asp Glu Asn Val Met Leu Leu Thr Ser Asp Ala Pro Glu

50 55 60

Tyr Lys Pro Trp Ala Leu Val Ile Gln Asp Ser Asn Gly Glu Asn Lys
65 70 75 80
Ile Lys Met Leu Ser Gly Gly Ser Lys Arg Thr Ala Asp Gly Ser Glu
85 90 95

Phe Glu Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu
100 105

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: SV40 NLS

<400> 23

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: SV40 NLS

<400> 24

Pro Lys Lys Lys Arg Arg Val

1 5

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic: NLS

<400> 25

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys

1 5 10 15

<210> 26

<211> 10

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Kozak sequence

<400> 26

gccrccaugg 10

<210> 27

<211> 13

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: Kozak sequence

<400> 27

gccgccrcca ugg 13

<210> 28

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: sgRNA sequence

<220><221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> 2'-O-Me and PS bond

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> n is any natural or non-natural nucleotide

<220><221> modified_base

<222> (29)..(40)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (69)..(100)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (97)..(99)

<223> PS bond

<400> 28

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu

100

<210> 29

<400> 29

000

<210> 30

<400> 30

000

<210> 31

<400> 31

000

<210> 32

<400> 32

000

<210> 33

<400> 33

000

<210> 34

<400> 34

000

<210> 35

<400> 35

000

<210> 36

<400> 36

000

<210> 37

<400> 37

000

<210> 38

<400> 38

000

<210> 39

<400> 39

000

<210> 40

<400> 40

000

<210> 41

<400> 41

000

<210> 42

<400> 42

000

<210> 43

<400

> 43

000

<210> 44

<400> 44

000

<210> 45

<400> 45

000

<210> 46

<400> 46

000

<210> 47

<400> 47

000

<210> 48

<400> 48

000

<210> 49

<400> 49

000

<210> 50

<400> 50

000

<210> 51

<400> 51

000

<210> 52
<400> 52
000
<210> 53
<400> 53
000
<210> 54
<400> 54
000
<210> 55
<400> 55
000
<210> 56
<400> 56
000
<210> 57
<400> 57
000
<210> 58
<400> 58
000
<210> 59
<400> 59
000
<210> 60
<400> 60

000
<210> 61
<400> 61
000
<210> 62
<400> 62
000
<210> 63

<400> 63
000
<210> 64
<400> 64
000
<210> 65
<400> 65
000
<210> 66
<400> 66
000
<210> 67
<400> 67
000
<210> 68
<400> 68
000
<210> 69
<400> 69
000
<210> 70
<400> 70
000
<210> 71
<400> 71
000
<210> 72
<400> 72
000
<210> 73
<400> 73
000
<210> 74
<400> 74
000
<210> 75

<400> 75
000
<210> 76
<400> 76
000
<210> 77
<400> 77
000

<210> 78
<400> 78
000
<210> 79
<400> 79
000
<210> 80
<400> 80
000
<210> 81
<400> 81
000
<210> 82
<400> 82
000
<210> 83
<400> 83
000
<210> 84
<400> 84
000
<210> 85
<400> 85
000
<210> 86
<400> 86

000

<210> 87

<400> 87

000

<210> 88

<400> 88

000

<210> 89

<400> 89

000

<210> 90

<400> 90

000

<210> 91

<400> 91

000

<210> 92

<400> 92

000

<210> 93

<400> 93

000

<210> 94

<400> 94

000

<210

> 95

<400> 95

000

<210> 96

<400> 96

000

<210> 97

<400> 97

000

<210> 98
 <400> 98
 000
 <210> 99
 <400> 99
 000
 <210> 100
 <400> 100
 000
 <210> 101
 <400> 101
 000
 <210> 102
 <400> 102
 000
 <210> 103
 <400> 103
 000
 <210> 104
 <400> 104
 000
 <210> 105
 <400> 105
 000
 <210> 106
 <400> 106
 000
 <210> 107
 <400> 107
 000
 <210> 108
 <400> 108
 000
 <210> 109
 <400> 109
 000

<210> 110
 <400> 110
 000
 <210> 111
 <400>
 > 111
 000
 <210> 112
 <400> 112
 000
 <210> 113
 <400> 113
 000
 <210> 114
 <400> 114
 000
 <210> 115
 <400> 115
 000
 <210> 116
 <400> 116
 000
 <210> 117
 <400> 117
 000
 <210> 118
 <400> 118
 000
 <210> 119
 <400> 119
 000
 <210> 120
 <400> 120
 000
 <210> 121

<400> 121
 000
 <210> 122
 <400> 122
 000
 <210> 123
 <400> 123
 000
 <210> 124
 <400> 124
 000
 <210> 125
 <400> 125
 000
 <210> 126
 <400> 126
 000
 <210> 127
 <400>
 127
 000
 <210> 128
 <400> 128
 000
 <210> 129
 <400> 129
 000
 <210> 130
 <400> 130
 000
 <210> 131
 <400> 131
 000
 <210> 132
 <400> 132

000

<210> 133

<400> 133

000

<210> 134

<400> 134

000

<210> 135

<400> 135

000

<210> 136

<400> 136

000

<210> 137

<400> 137

000

<210> 138

<400> 138

000

<210> 139

<400> 139

000

<210> 140

<400> 140

000

<210> 141

<400> 141

000

<210> 142

<400> 142

000

<210> 143

<400> 143

000

<210> 144
<400> 144
000
<210> 145
<400> 145
000
<210> 146
<400> 146
000
<210> 147
<400> 147
000
<210> 148
<400> 148
000
<210> 149
<400> 149
000
<210> 150
<400> 150
000
<210> 151
<400> 151
000
<210> 152
<400> 152
000
<210> 153
<400> 153
000
<210> 154
<400> 154
000
<210> 155
<400> 155
000

<210> 156
<400> 156
000
<210> 157
<400> 157
000
<210> 158
<400> 158
000
<210> 159
<400> 159
000

<210> 160
<400> 160
000
<210> 161
<400> 161
000
<210> 162
<400> 162
000
<210> 163
<400> 163
000
<210> 164
<400> 164
000
<210> 165
<400> 165
000
<210> 166
<400> 166
000
<210> 167

<400> 167
000
<210> 168
<400> 168
000
<210> 169
<400> 169
000
<210> 170
<400> 170
000
<210> 171
<400> 171
000
<210> 172
<400> 172
000
<210> 173
<400> 173
000
<210> 174
<400> 174
000
<210> 175
<400> 175
000
<
210> 176
<400> 176
000
<210> 177
<400> 177
000
<210> 178
<400> 178

000

<210> 179

<400> 179

000

<210> 180

<400> 180

000

<210> 181

<400> 181

000

<210> 182

<400> 182

000

<210> 183

<400> 183

000

<210> 184

<400> 184

000

<210> 185

<400> 185

000

<210> 186

<400> 186

000

<210> 187

<400> 187

000

<210> 188

<400> 188

000

<210> 189

<400> 189

000

<210> 190

<400> 190

000

<210> 191

<400> 191

000

<210>

> 192

<400> 192

000

<210> 193

<400> 193

000

<210> 194

<400> 194

000

<210> 195

<400> 195

000

<210> 196

<400> 196

000

<210> 197

<400> 197

000

<210> 198

<400> 198

000

<210> 199

<400> 199

000

<210> 200

<400> 200

000

<210> 201

<400> 201

000

<210> 202
 <400> 202
 000
 <210> 203
 <400> 203
 000
 <210> 204
 <400> 204
 000
 <210> 205
 <400> 205
 000
 <210> 206
 <400> 206
 000
 <210> 207
 <400> 207
 000
 <210>
 208
 <400> 208
 000
 <210> 209
 <400> 209
 000
 <210> 210
 <400> 210
 000
 <210> 211
 <400> 211
 000
 <210> 212
 <400> 212
 000
 <210> 213

<400> 213
000
<210> 214
<400> 214
000
<210> 215
<400> 215
000
<210> 216
<400> 216
000
<210> 217
<400> 217
000
<210> 218
<400> 218
000
<210> 219
<400> 219
000
<210> 220
<400> 220
000
<210> 221
<400> 221
000
<210> 222
<400> 222
000
<210> 223
<400> 223
000
<210> 224

<400> 224

000

<210> 225

<400> 225

000

<210> 226

<400> 226

000

<210> 227

<400> 227

000

<210> 228

<400> 228

000

<210> 229

<400> 229

000

<210> 230

<400> 230

000

<210> 231

<400> 231

000

<210> 232

<400> 232

000

<210> 233

<400> 233

000

<210> 234

<400> 234

000

<210> 235

<400> 235

000

<210> 236

<400> 236

000

<210> 237

<400> 237

000

<210> 238

<400> 238

000

<210> 239

<400> 239

000

<210> 240

<

400> 240

000

<210> 241

<400> 241

000

<210> 242

<400> 242

000

<210> 243

<400> 243

000

<210> 244

<400> 244

000

<210> 245

<400> 245

000

<210> 246

<400> 246

000

<210> 247

<400> 247

000

<210> 248
 <400> 248
 000
 <210> 249
 <400> 249
 000
 <210> 250
 <400> 250
 000
 <210> 251
 <400> 251
 000
 <210> 252
 <400> 252
 000
 <210> 253
 <400> 253
 000
 <210> 254
 <400> 254
 000
 <210> 255
 <400> 255
 000
 <210> 256
 <400>
 > 256
 000
 <210> 257
 <400> 257
 000
 <210> 258
 <400> 258
 000
 <210> 259

<400> 259
000
<210> 260
<400> 260
000
<210> 261
<400> 261
000
<210> 262
<400> 262
000
<210> 263
<400> 263
000
<210> 264
<400> 264
000
<210> 265
<400> 265
000
<210> 266
<400> 266
000
<210> 267
<400> 267
000
<210> 268
<400> 268
000
<210> 269
<400> 269
000
<210> 270
<400> 270
000
<210> 271

<400> 271
000
<210> 272
<400>
272
000
<210> 273
<400> 273
000
<210> 274
<400> 274
000
<210> 275
<400> 275
000
<210> 276
<400> 276
000
<210> 277
<400> 277
000
<210> 278
<400> 278
000
<210> 279
<400> 279
000
<210> 280
<400> 280
000
<210> 281
<400> 281
000
<210> 282
<400> 282

000

<210> 283

<400> 283

000

<210> 284

<400> 284

000

<210> 285

<400> 285

000

<210> 286

<400> 286

000

<210> 287

<400> 287

000

<210> 288

<400> 288

000

<210> 289

<400> 289

000

<210> 290

<400> 290

000

<210> 291

<400> 291

000

<210> 292

<400> 292

000

<210> 293

<400> 293

000

<210> 294

<400> 294

000

<210> 295

<400> 295

000

<210> 296

<400> 296

000

<210> 297

<400> 297

000

<210> 298

<400> 298

000

<210> 299

<400> 299

000

<210> 300

<400> 300

000

<210> 301

<400> 301

000

<210> 302

<400> 302

000

<210> 303

<400> 303

000

<210> 304

<400> 304

000

<210> 305

<400> 305
000
<210> 306
<400> 306
000
<210> 307
<400> 307
000
<210> 308
<400> 308
000
<210> 309
<400> 309
000
<210> 310
<400> 310
000
<210> 311
<400> 311
000
<210> 312
<400> 312
000
<210> 313
<400> 313
000
<210> 314
<400> 314
000
<210> 315
<400> 315
000
<210> 316
<400> 316
000
<210> 317

<400> 317
000
<210> 318
<400> 318
000
<210> 319
<400> 319
000
<210> 320
<400> 320
000
<
210> 321
<400> 321
000
<210> 322
<400> 322
000
<210> 323
<400> 323
000
<210> 324
<400> 324
000
<210> 325
<400> 325
000
<210> 326
<400> 326
000
<210> 327
<400> 327
000
<210> 328
<400> 328

000

<210> 329

<400> 329

000

<210> 330

<400> 330

000

<210> 331

<400> 331

000

<210> 332

<400> 332

000

<210> 333

<400> 333

000

<210> 334

<400> 334

000

<210> 335

<400> 335

000

<210> 336

<400> 336

000

<210

> 337

<400> 337

000

<210> 338

<400> 338

000

<210> 339

<400> 339

000

<210> 340
 <400> 340
 000
 <210> 341
 <400> 341
 000
 <210> 342
 <400> 342
 000
 <210> 343
 <400> 343
 000
 <210> 344
 <400> 344
 000
 <210> 345
 <400> 345
 000
 <210> 346
 <400> 346
 000
 <210> 347
 <400> 347
 000
 <210> 348
 <400> 348
 000
 <210> 349
 <400> 349
 000
 <210> 350
 <400> 350
 000
 <210> 351
 <400> 351
 000

<210> 352
<400> 352
000
<210>
353
<400> 353
000
<210> 354
<400> 354
000
<210> 355
<400> 355
000
<210> 356
<400> 356
000
<210> 357
<400> 357
000
<210> 358
<400> 358
000
<210> 359
<400> 359
000
<210> 360
<400> 360
000
<210> 361
<400> 361
000
<210> 362
<400> 362
000
<210> 363

<400> 363
000
<210> 364
<400> 364
000
<210> 365
<400> 365
000
<210> 366
<400> 366
000
<210> 367
<400> 367
000
<210> 368
<400> 368
000
<210> 369

<400> 369
000
<210> 370
<400> 370
000
<210> 371
<400> 371
000
<210> 372
<400> 372
000
<210> 373
<400> 373
000
<210> 374
<400> 374

000

<210> 375

<400> 375

000

<210> 376

<400> 376

000

<210> 377

<400> 377

000

<210> 378

<400> 378

000

<210> 379

<400> 379

000

<210> 380

<400> 380

000

<210> 381

<400> 381

000

<210> 382

<400> 382

000

<210> 383

<400> 383

000

<210> 384

<400> 384

000

<210> 385

<

400> 385

000

<210> 386
 <400> 386
 000
 <210> 387
 <400> 387
 000
 <210> 388
 <400> 388
 000
 <210> 389
 <400> 389
 000
 <210> 390
 <400> 390
 000
 <210> 391
 <400> 391
 000
 <210> 392
 <400> 392
 000
 <210> 393
 <400> 393
 000
 <210> 394
 <400> 394
 000
 <210> 395
 <400> 395
 000
 <210> 396
 <400> 396
 000
 <210> 397
 <400> 397
 000

<210> 398
 <400> 398
 000
 <210> 399
 <400> 399
 000
 <210> 400
 <400> 400
 000
 <210> 401
 <400>
 > 401
 000
 <210> 402
 <400> 402
 000
 <210> 403
 <400> 403
 000
 <210> 404
 <400> 404
 000
 <210> 405
 <400> 405
 000
 <210> 406
 <400> 406
 000
 <210> 407
 <400> 407
 000
 <210> 408
 <400> 408
 000
 <210> 409

<400> 409
 000
 <210> 410
 <400> 410
 000
 <210> 411
 <400> 411
 000
 <210> 412
 <400> 412
 000
 <210> 413
 <400> 413
 000
 <210> 414
 <400> 414
 000
 <210> 415
 <400> 415
 000
 <210> 416
 <400> 416
 000
 <210> 417
 <400>
 417
 000
 <210> 418
 <400> 418
 000
 <210> 419
 <400> 419
 000
 <210> 420
 <400> 420

000

<210> 421

<400> 421

000

<210> 422

<400> 422

000

<210> 423

<400> 423

000

<210> 424

<400> 424

000

<210> 425

<400> 425

000

<210> 426

<400> 426

000

<210> 427

<400> 427

000

<210> 428

<400> 428

000

<210> 429

<400> 429

000

<210> 430

<400> 430

000

<210> 431

<400> 431

000

<210> 432

<400> 432

000

<210> 433

<400> 433

000

<210> 434

<400> 434

000

<210> 435

<400> 435

000

<210> 436

<400> 436

000

<210> 437

<400> 437

000

<210> 438

<400> 438

000

<210> 439

<400> 439

000

<210> 440

<400> 440

000

<210> 441

<400> 441

000

<210> 442

<400> 442

000

<210> 443

<400> 443

000

<210> 444
<400> 444
000
<210> 445
<400> 445
000
<210> 446
<400> 446
000
<210> 447
<400> 447
000
<210> 448
<400> 448
000
<210> 449
<400> 449
000

<210> 450
<400> 450
000
<210> 451
<400> 451
000
<210> 452
<400> 452
000
<210> 453
<400> 453
000
<210> 454
<400> 454
000
<210> 455

<400> 455
000
<210> 456
<400> 456
000
<210> 457
<400> 457
000
<210> 458
<400> 458
000
<210> 459
<400> 459
000
<210> 460
<400> 460
000
<210> 461
<400> 461
000
<210> 462
<400> 462
000
<210> 463
<400> 463
000
<210> 464
<400> 464
000
<210> 465
<400> 465
000
<
210> 466
<400> 466

000

<210> 467

<400> 467

000

<210> 468

<400> 468

000

<210> 469

<400> 469

000

<210> 470

<400> 470

000

<210> 471

<400> 471

000

<210> 472

<400> 472

000

<210> 473

<400> 473

000

<210> 474

<400> 474

000

<210> 475

<400> 475

000

<210> 476

<400> 476

000

<210> 477

<400> 477

000

<210> 478

<400> 478

000

<210> 479

<400> 479

000

<210> 480

<400> 480

000

<210> 481

<400> 481

000

<210

> 482

<400> 482

000

<210> 483

<400> 483

000

<210> 484

<400> 484

000

<210> 485

<400> 485

000

<210> 486

<400> 486

000

<210> 487

<400> 487

000

<210> 488

<400> 488

000

<210> 489

<400> 489

000

<210> 490
 <400> 490
 000
 <210> 491
 <400> 491
 000
 <210> 492
 <400> 492
 000
 <210> 493
 <400> 493
 000
 <210> 494
 <400> 494
 000
 <210> 495
 <400> 495
 000
 <210> 496
 <400> 496
 000
 <210> 497
 <400> 497
 000
 <210>
 498
 <400> 498
 000
 <210> 499
 <400> 499
 000
 <210> 500
 <400> 500
 000
 <210> 501

<400> 501
000
<210> 502
<400> 502
000
<210> 503
<400> 503
000
<210> 504
<400> 504
000
<210> 505
<400> 505
000
<210> 506
<400> 506
000
<210> 507
<400> 507
000
<210> 508
<400> 508
000
<210> 509
<400> 509
000
<210> 510
<400> 510
000
<210> 511
<400> 511
000
<210> 512
<400> 512
000
<210> 513

<400> 513
000
<210> 514

<400> 514
000
<210> 515
<400> 515
000
<210> 516
<400> 516
000
<210> 517
<400> 517
000
<210> 518
<400> 518
000
<210> 519
<400> 519
000
<210> 520
<400> 520
000
<210> 521
<400> 521
000
<210> 522
<400> 522
000
<210> 523
<400> 523
000
<210> 524
<400> 524

000

<210> 525

<400> 525

000

<210> 526

<400> 526

000

<210> 527

<400> 527

000

<210> 528

<400> 528

000

<210> 529

<400> 529

000

<210> 530

<

400> 530

000

<210> 531

<400> 531

000

<210> 532

<400> 532

000

<210> 533

<400> 533

000

<210> 534

<400> 534

000

<210> 535

<400> 535

000

<210> 536
<400> 536
000
<210> 537
<400> 537
000
<210> 538
<400> 538
000
<210> 539
<400> 539
000
<210> 540
<400> 540
000
<210> 541
<400> 541
000
<210> 542
<400> 542
000
<210> 543
<400> 543
000
<210> 544
<400> 544
000
<210> 545
<400> 545
000
<210> 546
<400>
> 546
000
<210> 547

<400> 547
000
<210> 548
<400> 548
000
<210> 549
<400> 549
000
<210> 550
<400> 550
000
<210> 551
<400> 551
000
<210> 552
<400> 552
000
<210> 553
<400> 553
000
<210> 554
<400> 554
000
<210> 555
<400> 555
000
<210> 556
<400> 556
000
<210> 557
<400> 557
000
<210> 558
<400> 558
000
<210> 559

<400> 559
000
<210> 560
<400> 560
000
<210> 561
<400> 561
000
<210> 562
<400>
562
000
<210> 563
<400> 563
000
<210> 564
<400> 564
000
<210> 565
<400> 565
000
<210> 566
<400> 566
000
<210> 567
<400> 567
000
<210> 568
<400> 568
000
<210> 569
<400> 569
000
<210> 570
<400> 570

000

<210> 571

<400> 571

000

<210> 572

<400> 572

000

<210> 573

<400> 573

000

<210> 574

<400> 574

000

<210> 575

<400> 575

000

<210> 576

<400> 576

000

<210> 577

<400> 577

000

<210> 578

<400> 578

000

<210> 579

<400> 579

000

<210> 580

<400> 580

000

<210> 581

<400> 581

000

<210> 582
<400> 582
000
<210> 583
<400> 583
000
<210> 584
<400> 584
000
<210> 585
<400> 585
000
<210> 586
<400> 586
000
<210> 587
<400> 587
000
<210> 588
<400> 588
000
<210> 589
<400> 589
000
<210> 590
<400> 590
000
<210> 591
<400> 591
000
<210> 592
<400> 592
000
<210> 593
<400> 593
000

<210> 594

<400> 594

000

<210> 595

<400> 595

000

<210> 596

<400> 596

000

<210> 597

<400> 597

000

<210> 598

<400> 598

000

<210> 599

<400> 599

000

<210> 600

<400> 600

000

<210> 601

<400> 601

000

<210> 602

<400> 602

000

<210> 603

<400> 603

000

<210> 604

<400> 604

000

<210> 605

<400> 605
000
<210> 606
<400> 606
000
<210> 607
<400> 607
000
<210> 608
<400> 608
000
<210> 609
<400> 609
000
<210> 610
<400> 610
000
<
210> 611
<400> 611
000
<210> 612
<400> 612
000
<210> 613
<400> 613
000
<210> 614
<400> 614
000
<210> 615
<400> 615
000
<210> 616
<400> 616

000

<210> 617

<400> 617

000

<210> 618

<400> 618

000

<210> 619

<400> 619

000

<210> 620

<400> 620

000

<210> 621

<400> 621

000

<210> 622

<400> 622

000

<210> 623

<400> 623

000

<210> 624

<400> 624

000

<210> 625

<400> 625

000

<210> 626

<400> 626

000

<210

> 627

<400> 627

000

<210> 628
<400> 628
000
<210> 629
<400> 629
000
<210> 630
<400> 630
000
<210> 631
<400> 631
000
<210> 632
<400> 632
000
<210> 633
<400> 633
000
<210> 634
<400> 634
000
<210> 635
<400> 635
000
<210> 636
<400> 636
000
<210> 637
<400> 637
000
<210> 638
<400> 638
000
<210> 639
<400> 639
000

<210> 640
 <400> 640
 000
 <210> 641
 <400> 641
 000
 <210> 642
 <400> 642
 000
 <210>
 643
 <400> 643
 000
 <210> 644
 <400> 644
 000
 <210> 645
 <400> 645
 000
 <210> 646
 <400> 646
 000
 <210> 647
 <400> 647
 000
 <210> 648
 <400> 648
 000
 <210> 649
 <400> 649
 000
 <210> 650
 <400> 650
 000
 <210> 651

<400> 651
000
<210> 652
<400> 652
000
<210> 653
<400> 653
000
<210> 654
<400> 654
000
<210> 655
<400> 655
000
<210> 656
<400> 656
000
<210> 657
<400> 657
000
<210> 658
<400> 658
000
<210> 659

<400> 659
000
<210> 660
<400> 660
000
<210> 661
<400> 661
000
<210> 662
<400> 662

000

<210> 663

<400> 663

000

<210> 664

<400> 664

000

<210> 665

<400> 665

000

<210> 666

<400> 666

000

<210> 667

<400> 667

000

<210> 668

<400> 668

000

<210> 669

<400> 669

000

<210> 670

<400> 670

000

<210> 671

<400> 671

000

<210> 672

<400> 672

000

<210> 673

<400> 673

000

<210> 674

<400> 674

000

<210> 675

<

400> 675

000

<210> 676

<400> 676

000

<210> 677

<400> 677

000

<210> 678

<400> 678

000

<210> 679

<400> 679

000

<210> 680

<400> 680

000

<210> 681

<400> 681

000

<210> 682

<400> 682

000

<210> 683

<400> 683

000

<210> 684

<400> 684

000

<210> 685

<400> 685

000

<210> 686
 <400> 686
 000
 <210> 687
 <400> 687
 000
 <210> 688
 <400> 688
 000
 <210> 689
 <400> 689
 000
 <210> 690
 <400> 690
 000
 <210> 691
 <400>
 > 691
 000
 <210> 692
 <400> 692
 000
 <210> 693
 <400> 693
 000
 <210> 694
 <400> 694
 000
 <210> 695
 <400> 695
 000
 <210> 696
 <400> 696
 000
 <210> 697

<400> 697
 000
 <210> 698
 <400> 698
 000
 <210> 699
 <400> 699
 000
 <210> 700
 <400> 700
 000
 <210> 701
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: gRNA G000529
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-O-Me and PS bond
 <220><221> modified_base
 <
 222> (29)..(40)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (69)..(100)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (97)..(99)
 <223> PS bond
 <400> 701
 ggccacggag cgagacaucu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgugcuuuu 100
 <210> 702
 <211> 100
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: gRNA G013674

<220><221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> 2'-O-Me and PS bond

<220><221> modified_base

<222> (29)..(40)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (69)..(100)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (97)..(99)

<223> PS bond

<400> 702

uucuaggggc cccaacucca guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgugcuuuu 100

<210> 703

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: gRNA G012086

<220><221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> 2'-O-Me and PS bond

<220><221> modified_base

<222> (29)..(40)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (69)..(100)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (97)..(99)

<223> PS bond

<400> 703

agagucucuc agcugguaca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 704

<400> 704

000

<210> 705

<400> 705

000

<210> 706

<400> 706

000

<210> 707

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: gRNA G016239

<220><221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> 2'-O-Me and PS bond

<220><221> modified_base

<222> (29)..(40)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (69)..(100)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (97)..(99)

<223> PS bond

<400> 707

ggccucggcg cugacgaucu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 708
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: gRNA G013006
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-O-Me and PS bond
 <220><221> modified_base
 <222> (29)..(40)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (69)..(100)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (97)..(99)
 <223> PS bond
 <400> 708

cucucagcug guacacggca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100

<210> 709
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: gRNA G012738
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-O-Me and PS bond
 <220><221> modified_base
 <222> (29)..(40)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (69)..(100)
 <223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base
 <222> (97)..(99)
 <223> PS bond
 <400> 709
 ggccacggag cgagacau cu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 710
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: gRNA G000562
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-O-Me and PS bond
 <220><221> modified_base
 <222> (29)..(40)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (69)..(100)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (97)..(99)
 <223> PS bond
 <400> 710

ccaauaucag gagacuagga guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 711
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: gRNA G015995
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(3)

<223> 2'-O-Me and PS bond

<220><221> modified_base

<222> (29)..(40)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (69)..(100)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (97)..(99)

<223> PS bond

<400> 711

uuacccacu uaacuaucuu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 712

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: gRNA G016017

<220><221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> 2'-O-Me and PS bond

<220><221> modified_base

<222> (29)..(40)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (69)..(100)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (97)..(99)

<223> PS bond

<400> 712

ccacucugcc ccaugggcuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 713
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: gRNA G016206
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-O-Me and PS bond
 <220><221> modified_base
 <222> (29)..(40)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (69)..(100)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (97)..(99)
 <223> PS bond
 <400> 713

cgcgugaag uccaguucua guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100

<210> 714
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: gRNA G018117
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-O-Me and PS bond
 <220><221> modified_base
 <222> (29)..(40)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (69)..(100)
 <223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base
 <222> (97)..(99)
 <223> PS bond
 <400> 714
 gcguccacau ccugcaaggg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 715
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: gRNA G013676
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(3)
 <223> 2'-O-Me and PS bond
 <220><221> modified_base
 <222> (29)..(40)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (69)..(100)
 <223> 2'-O-Me
 <220><221> modified_base
 <222> (97)..(99)
 <223> PS bond
 <400> 715
 uggucagggc aagagcuauu guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
 cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 716
 <211> 100
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic: gRNA G018995
 <220><221> modified_base
 <222> (1)..(3)

<223> 2'-O-Me and PS bond

<220><221> modified_base

<222> (29)..(40)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (69)..(100)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (97)..(99)

<223> PS bond

<400> 716

acagcgacgc cgcgagccag guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 717

<211> 4607

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: pINT1405, HD1 TCR insertion including ITRs

<400> 717

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcaactgagg cgggcgacc aaaggtcgcc 60

cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg 120

gccaaactcca tcaactagggg ttccatagatc ttgccaacat accataaacc tcccattctg 180

ctaattgccc gctaagtgtg gggagaccac tccagattcc aagatgtaca gtttgctttg 240

ctgggccttt ttcccatgcc tgcctttact ctgccagagt tatattgctg gggttttgaa 300

gaagatccta ttaaataaaa gaataagcag tattattaag tagccctgca tticaggttt 360

ccttgagtgg caggccaggc ctggccgtga acgttctactg aaatcatggc ctcttgccca 420

agattgatag ctgtgacctg tccctgagtc ccagtcacac acgagcagct ggttttctaag 480

atgctatttc ccgtataaag catgagaccg tgacttgcca gccccacaga gccccgccct 540

tgtccatcac tggcatctgg actccagcct gggttggggc aaagagggaa atgagatcat 600

gtcctaaccg tgatcctctt gtcccacaga tatccagaac cctgaccctg cggctccggt 660

gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtcctccg agaagtggg gggaggggtc 720

ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg 780

tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc 840
 glgaacgttc tttttcgaa cgggtttgcc gccagaacac aggttaagtgc cgtgtgtggt 900
 tccccggggc ctggcctctt tacgggttat ggcccttgcg tgccttgaat tacttccacg 960
 cccctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg ggtgggagag 1020
 ttcgaggcct tgcgcttaag gagcccttc gcctcgtgct tgagttgagg cctggcttgg 1080
 gcgctggggc cgcgcgtgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg ctgctttcga 1140

taagtctcta gccatttaaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt tctggcaaga 1200
 tagtcttgta aatgcggggc aagatgtgca cactggtatt tcggtttttg gggccgcggg 1260
 cggcgacggg gcccgctgct cccagcgcac atgttcggcg aggcggggcc tgcgagcgcg 1320
 gccaccgaga atcggacggg ggtagtctca agctggccgg cctgctctgg tgcctggcct 1380
 cgcgcgccg tgtatcgccc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg caccagtgc 1440
 gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgcctgcagg agctcaaaat ggaggacgcg 1500
 gcgctcggga gagcgggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaagggcct ttccgtctc 1560

agccgtcgtc tcatgtgact ccacggagta ccgggcgccg tccaggcacc tcgattagtt 1620
 ctcgagcttt tggagtacgt cgtcttttagg ttggggggag gggttttatg cgatggagtt 1680
 tccccacact gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga tgtaattctc 1740
 ctgggaattt gccctttttg agtttggatc ttggttcatt ctcaagcctc agacagtgg 1800
 tcaaagtttt ttctttccat ttcaggtgtc gtgatgcggc cgccaccatg ggatcttgga 1860
 cactgtgttg cgtgtccctg tgcacctgg tggccaagca cacagatgcc ggcgtgatcc 1920
 agtctcctag acacgaagtg accgagatgg gccagaagt gacctgcgc tgcaagccta 1980

tcagcgcca cgattacctg ttctggtaca gacagacat gatgagagc ctggaactgc 2040
 tgatctactt caacaacaac gtgcccatcg acgacagcg catgcccgag gatagattca 2100
 gcgccaagat gcccaacgcc agcttcagca cctgaagat ccagcctagc gagccagag 2160
 atagcgccgt gtacttctgc gccagcagaa agacagcggt ctacagcaat cagccccagc 2220
 actttggaga tggcaccgg ctgagcatcc tggaagatct gaagaacgtg tccccacctg 2280
 aggtggccgt gttcgagcct tctgaggccg agatcagcca cacacagaaa gccacactcg 2340
 tgtgtctggc caccggcttc tatcccgatc acgtggaact gtcttggtgg gtcaacggca 2400

aagaggtgca cagcggcgtc agcaccgatc ctgagcctct gaaagagcag cccgctctga 2460
 acgacagcag atactgcctg agcagcagac tgagagtgtc cgccaccttc tggcagaacc 2520
 ccagaaacca cttcagatgc caggtgcagt tctacggcct gagcgagaa gatgagtgga 2580
 ccaggatag agccaagcct gtgacacaga tcgtgtctgc cgaagcctgg ggcagagccg 2640

attgtggctt taccagcgag agctaccagc agggcgctgct gtctgccaca atcctgtacg	2700
agatcctgct gggcaaagcc actctgtacg ccgtgctggt gtctgccctg gtgctgatgg	2760
ccatggtcaa gcggaaggat agcaggggcg gctccggtgc caaaaacttc tccctgctca	2820
agcaggccgg agatgtggaa gagaaccttg gcctatgga aacctgctg aaggtgctga	2880
gcggcacact gctgtggcag ctgacatggg tccgatctca gcagcctgtg cagtctcctc	2940
aggccgtgat tctgagagaa ggcgaggacg ccgtgatcaa ctgcagcagc tetaaggccc	3000
tgtacagcgt gcactggtag agacagaagc acggcgaggc ccctgtgttc ctgatgatcc	3060
tgctgaaagg cggcgagcag aaggggccacg agaagatcag cgccagcttc aacgagaaga	3120
agcagcagtc cagcctgtac ctgacagcca gccagctgag ctacagcggc acctactttt	3180
gtggcaccgc ctggatcaac gactacaagc tgtctttcgg agccggcacc acagtgacag	3240
tgccggccaa tattcagaac cccgatcctg ccgtgtacca gctgagagac agcaagagca	3300
gcgacaagag cgtgtgcctg ttcaccgact tcgacagcca gaccaacgtg tcccagagca	3360
aggacagcga cgtgtacatc accgataaga ctgtgctgga catgcggagc atggacttca	3420
agagcaacag cgcctggccc tgggtccaaca agagcgatit cgectgcgcc aacgccttca	3480
acaacagcat tatccccgag gacacattct tcccaagtcc tgagagcagc tgcgacgtga	3540
agctggtgga aaagagcttc gagacagaca ccaacctgaa cttccagaac ctgagcgtga	3600
tcggcttcag aatcctgctg ctcaagggtg ccggcttcaa cctgctgatg acctgagac	3660
tgtggtccag ctaacctga ctgtgccttc tagttgccag ccactgtttg tttgcccctc	3720
ccccgtgcct tecttgacce tggaagggtc cactccact gtcttttct aataaaatga	3780
ggaaattgca tcgcatgttc tgagtagggt tcattctatt ctgggggggtg ggggtggggca	3840
ggacagcaag ggggaggatt gggaagacaa tagcagcagc gctggggatg cgggtgggctc	3900
tatggcttct gagggcgaaa gaaccagctg gggctctagg ggggtatccc actagtcgtg	3960
taccagctga gagactctaa atccagtac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat	4020
tctcaaacaa atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg	4080
ctagacatga ggictatgga cttcaagagc aacagtgtg tggcctggag caacaaatct	4140
gactttgcat gtgcaaagc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc	4200
agcccaggta agggcagctt tgggtgccttc gcaggctgtt tecttgcttc aggaatggcc	4260
aggttctgcc cagagctctg gtcaatgatg tctaaaactc ctctgattgg tggctctggc	4320
cttatccatt gccacaaaa cctctttttt actaagaaac agtgagcctt gttctggcag	4380
tccagagaat gacacgggaa aaaagcagat gaagagaagg tggcaggaga gggcacgtgg	4440

cccagcctca gtctctagat ctaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg 4500

cgcgctcgct cgctcactga ggccgcccgg gcaaagcccg ggcgtcgggc gacctttggt 4560

cgccccggcct cagtgagcga gcgagcgcg agagagggag tggccaa 4607

<210> 718

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: gRNA G016200

<220><221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> 2'-O-Me and PS bond

<220><221> modified_base

<222> (29)..(40)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (69)..(100)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (97)..(99)

<223> PS bond

<400> 718

ccacacccaa aaggccacac guuuuagagc uagaaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 719

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: gRNA G016086

<220><221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> 2'-O-Me and PS bond

<220><221> modified_base

<222> (29)..(40)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (69)..(100)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (97)..(99)

<223> PS bond

<400> 719

cgcccagguc cucacgucug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 720

<211> 3294

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AAV6-1008 GFP insert for AAVS1

<400> 720

tgcacatca ccgtttttct ggacaacccc aaagtacccc gtctccctgg ctttagccac 60

ctctccatcc tcttgcttcc tttgcctgga caccctgttc tccgtggat tcgggtcacc 120

tctcactcct ttcatttggg cagctccctt accccctta cctctctagt ctgtgctagc 180

tcttccagcc cctgtcatg gcattttcca ggggtccgag agctcagcta gtctttctcc 240

tccaacccgg gccctatgt ccaattcagg acagcatgtt tgctgcctcc agggatcctg 300

tgccccgag ctgggaccac cttatattcc cagggccggt taatgtggct ctggttctgg 360

gtacttttat ctgtcccttc caccacacag tggggccact agggacagga ttggtgacag 420

aaaagcccca tcttaggcc tctctcttc gagtaattca taaaaagga ctgcgccctg 480

ccttggggaa tcccaggac cgtcgtttaa ctcccactaa cgtagaacct agagatcgct 540

gcgttccccg cccctaccc gcccgctctc gtcactctg aggtggagaa gagcatgcgt 600

gaggctccgg tgcccgctcag tgggcagagc gcacatcgcc cacagtcccc gagaagtgg 660

ggggaggggt cggcaattga accggtgcct agagaagggt gcgcggggta aactgggaaa 720

gtgatgtcgt gtactggctc cgcctttttc ccgagggtgg gggagaaccg tatataagtg 780

cagtagtcgc cgtgaacgtt ctttttcgca acgggtttgc cgccagaaca caggtaagtg 840

ccgtgtgtgg ttcccgctgg cctggcctct ttacgggtta tggcccttgc gtgccttgaa 900

ttacttccac gccctgggt gcagtacgtg attcttgatc ccgagcttcg ggttggaagt 960

gggtgggaga gticgaggcc ttgcgttaa ggagccctt cgcctcgtgc ttgagttgag 1020

gcctggcttg ggcgctgggg ccgccgctg cgaatctggt ggcaccttcg cgcctgtctc 1080

gtgcttttcg ataagtctct agccatttaa aatttttgat gacctgctgc gacgcttttt 1140

ttctggcaag atagtcttgt aaatgcgggc caacatctgc aacttggtat ttcggttttt 1200

ggggccgagg ggcgcgacgg ggcccgtgcg tcccagcgca catgttcggc gaggcggggc 1260

ctgcgagcgc ggccaccgag aatcggaagg ggtagtctc aagctggcgg gcctgctctg 1320

gtgcctggcc tcgcgccgcc gtgtatcgcc ccgccctggg cggcaaggct ggcccggtcg 1380

gcaccagttg cgtgagcgga aagatggcgg ctccccggcc ctgctgcagg gagtcaaaa 1440

tggaggacgc ggcgctcggg agagcgggcg ggtgagtcac ccacacaaag gaaaagggcc 1500

tttccgtcct cagccgtcgc ttcatgtgac tccacggagt accgggcgcc gtccaggcac 1560

ctcgattagt tctcgagctt ttggagtacg tcgtcttttag gttgggggga ggggttttat 1620

gcgatggagt ttccccacac tgagtgggtg gagactgaag ttaggccagc ttggcacttg 1680

atgtaattct ccttggaatt tgcccttttt gagtttggat cttggttcat tctcaagcct 1740

cagacagtgg ttcaaagttt ttttttcca ttccaggtgt cgtgacgcta gcgtaccgg 1800

actcaatctc gagtcaagc ttcgaattct gcagtcgacg gtaccgcggg cccgggatcc 1860

accggtcgcc accatggtga gcaagggcga ggagctgttc accggggttg tgcccatcct 1920

ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg agggcgaggg 1980

cgatgccacc tacggcaagc tgacctgaa gttcatctgc accaccgca agctgcccgt 2040

gccctggccc accctcgtga ccacctgac ctacggcgtg cagtgttca gccgtaccc 2100

cgaccacatg aagcagcacg actttttcaa gtccgccatg cccgaaggct acgtccagga 2160

gcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgagg tgaagtctga 2220

gggcgacacc ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcacg gacttcaagg aggacggcaa 2280

catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac aacgtctata tcatggccga 2340

caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg aggacggcag 2400

cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa caccctcgc ggcgacggcc ccgtgctgct 2460

gcccgacaac cactacctga gacccagtc cgccttgagc aaagaccca acgagaagcg 2520

cgatcacatg gtctgtctgg agttcgtgac cgcgcgggg atcactctcg gcatggacga 2580

gctgtacaag taatagcggc cgcgactcta gatcataatc agccatacca ctttttaga 2640

ggttttactt gctttaaaaa acctcccaca cttccccctg aacctgaaac ataaaatgaa 2700

tgcaattgtt gttgttaact tgtttattgc agcttataat ggttacaaat aaagcaatag 2760
catcacaaat ttcacaaata aagcattttt ttcactgcat tctagtgttg gtttgtccaa 2820
actcatcaat gtatcttaag gcgttagtct cctgatattg ggtctaacc cccactcctg 2880
ttaggcagat tccttatctg gtgacacacc cccatttcct ggagccatct ctctccttg 2940
cagaacctct aaggtttgct tacgatggag ccagagagga tcctgggagg gagagcttgg 3000
caggggggtg gaggggaagg ggggatgcgt gacctgccg gttctcagt gccaccctgc 3060
gtaccctct cccagaacct gagctgctct gacgcggccg tctggtgcgt ttcactgac 3120

ctggtgctgc agcttcccta cacttcccaa gaggagaagc agtttggaaa aacaaaatca 3180
gaataagtgt gtctgagtt ctaactttgg ctcttcacct ttctagtccc caatttatat 3240
tgttccctcg tgcgtcagtt ttacctgtga gataaggcca gtagccagcc ccgt 3294

<210> 721

<211> 4250

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AAV6-231 GFP insert for AAVS1

<400> 721

gaccactttg agctctactg gcttctgcgc cgcctctggc ccactgttcc ccttcccag 60
gcaggctctg ctttctctga cctgcattct ctcccctggg cctgtgccgc tttctgtctg 120

cagcttgtgg cctgggtcac ctctacggct ggcccagatc cttccctgcc gcctccttca 180
ggttccgtct tctccactc cctcttcccc ttgctctctg ctgtgttctg gcccagat 240
gctctttccg gagcacttcc ttctcggcgc tgcaccacgt gatgtcctct gagcggatcc 300
tccccgtgtc tgggtcctct cgggcatct ctctccctc acccaacccc atgccgtctt 360
cactcgttgg gtcccccttt ccttctcctt ctggggcctg tgccatctct cgtttcttag 420
gatggccttc tccgacggat gtctcccttg cgtccgcct ccccttcttg taggcctgca 480
tcatcacctg ttttctggac aaccccaaag taccctgtct ccttggttt agccacctct 540

ccatcctctt gctttcttg cctggacacc ccgttctct gtggattcgg gtcacctctc 600
actcttttca tttgggcagc tcccctaccc cctttacctc tctagtctgt gctagctctt 660
ccagccccc gtcatggcat cttccagggg tccgagagct cagctagtct tcttctcca 720
accggggccc ctatgtccac ttcaggacag catgtttgct gcctccaggg atcctgtgtc 780
cccagcttgg gaccacctta tattccagg gccggttaat gtggctctgg tcttggttac 840
ttttatctgt cccctccacc ccacagtggg gccactaggg acaggattgg tgacagaaaa 900

gccccatcct taggcctcct ccttagttat taatgagtaa ttcatacaaa aggactcgcc 960

cctgccttgg ggaatcccag ggaccgtcgt taaactccca ctaacgtaga acccagagat 1020

cgctgcgttc ccgccccctc acccgcccg ctcgtcctc actgaggtgg agaagagcat 1080

gcgtgaggct ccggtgcccc tcagtgggca gagcgacat cggccacagt ccccgagaag 1140

ttggggggag gggtcggcaa ttgaaccgtt gcctagagaa ggtggcgcg ggtaaactgg 1200

gaaagtgatg tcgtgtactg gctccgcctt tttcccagg gtgggggaga accgtatata 1260

agtgcagtag tcgccgtgaa cgttcttttt cgcaacgggt ttgccgccag aacacaggta 1320

agtgccgtgt gtggttcccg cgggcctggc ctctttacgg gttatggccc ttgcgtgcct 1380

tgaattactt ccacgccctt ggctgcagta cgtgattctt gatcccagc ttcgggttgg 1440

aagtgggtgg gagagttcga ggccttgcgc ttaaggagcc ccttcgcctc gtgcttgagt 1500

tgaggcctgg cttgggcgtt ggggcccgcg cgtgcgaatc tgggtggcacc ttcgcgcctg 1560

tctcgtgctt ttcgataagt ctctagccat ttaaaatctt tgatgacctg ctgcgacgtt 1620

ttttttctgg caagatagtc ttgtaaatgc gggccaacat ctgcacactg gtatttcggt 1680

ttttggggcc gggggcgccg acggggcccg tgcgtcccag cgcacatgtt cggcgaggcg 1740

gggcctcgca gcgcggccac cgagaatcgg acgggggtag tctcaagctg gccggcctgc 1800

tctggtgcct ggcctcgcgc cgccgtgtat cgcgccgcc tgggcggcaa ggctggcccc 1860

gtcggcacca gttagctgag cggaagaatg gccgcttccc ggccctgctg caggagagctc 1920

aaaatggagg acgcggcgct cgggagagcg ggcgggtgag tcaccacac aaaggaag 1980

ggcctttccg tctcagccg tcgttctatg tgactccacg gactaccggg cgccgtccag 2040

gcacctgat tagttctga gcttttggag tacgtcgtct ttaggttggg gggaggggtt 2100

ttatgcgatg gactttcccc acactgagtg ggtggagact gaagttaggc cagcttggca 2160

cttgatgtaa ttctccttgg aatttgccct tttttagttt ggatcttggg tcattctcaa 2220

gcctcagaca gtggttcaaa gttttttct tccatttcag gtgtcgtgac gctagcgcta 2280

ccgactcaa tctcagctc aagcttcgaa ttttcagtc gacgtaccg cgggcccggg 2340

atccaccgtt cgccaccatg gtgagcaagg gcgaggagct gttcaccggg gtggtgcccc 2400

tcctggtcga gctggacggc gacgtaaacg gccacaagtt cagcgtgtcc ggcgaggcg 2460

agggcgatgc cacctacggc aagctgaccc tgaagtctat ctgcaccacc ggcaagctgc 2520

ccgtgcctg gccaccctc gtgaccacc tgacctacgg cgtgcagtgc ttcagccgct 2580

accccgacca catgaagcag cagacttct tcaagtccg catgcccga ggctacgtcc 2640

aggagcgac catcttcttc aaggacgacg gcaactacaa gacccgcgcc gaggtgaagt 2700
 tcgagggcga caccctgggtg aaccgcatcg agctgaaggg catcgacttc aaggaggacg 2760
 gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc tatatcatgg 2820
 ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac atcgaggacg 2880
 gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc agaacacccc catcggcgac ggccccgtgc 2940
 tgctgcccga caaccactac ctgagcacc cgtccgcct gagcaaagac cccaacgaga 3000
 agcgcgatca catggtcctg ctggagtctg tgaccgccgc cgggatcact ctcggcattg 3060

acgagctgta caagtaatag cggccgcgac tctagatcat aatcagccat accacatttg 3120
 tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa 3180
 tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgctta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 3240
 atagcatcac aaatttcaca aataaagcat ttttttact gcattctagt tgtggtttgt 3300
 ccaaactcat caatgtatct taaggcgtgt ctaaccccca cctcctgtta ggcagattcc 3360
 ttatctggtg acacaccccc atttctgga gccatctctc tccttgccag aacctctaag 3420
 gtttgcttac gatggagcca gagaggatcc tgggagggag agcttggcag ggggtgggag 3480

ggaagggggg gatgcgtgac ctgcccgtt ctcagtggcc accctgcgt accctctccc 3540
 agaacctgag ctgctctgac gcggccgtct ggtgcgttc actgactctg gtgctgcagc 3600
 ttctttacac ttcccaagag gagaagcagt ttggaaaaac aaaatcagaa taagttggtc 3660
 ctgagttcta actttggctc ttcaccttc tagtcccaa tttatattgt tcctccgtgc 3720
 gtcagtttta cctgtgagat aaggccagta gccagccccg tcctggcagg gctgtggtga 3780
 ggaggggggt gtccgtgtgg aaaactccct ttgtgagaat ggtgcgtcct aggtgttcac 3840
 caggtcgtgg ccgcctctac tccctttctc tttctccatc cttctttcct taaagagtc 3900

ccagtgtat ctgggacata ttctccgcc cagagcaggg tcccgcttc ctaaggccct 3960
 gctctgggtc tctgggtttg agtctttggc aagcccagga gaggcgtca ggcttcctg 4020
 tcccccttc tctccacca tctcatgcc ctggtctctc tgcccccttc ctacaggggt 4080
 tcctggctct gctcttcaga ctgagccccg tccccctgca tccccgttc cctgcatccc 4140
 cttccccctg catccccag agggccccag ccacctactt ggcttgacc ccacgagagg 4200
 ccacccagc cctgtctacc aggtgcctt ttgggtggat tctctccaa 4250

<210> 722
 <211> 3105
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic: AAV6-1018 GFP insert for B2M

<400> 722

agatcttaat cttctgggtt tccgttttct cgaatgaaaa atgcaggtcc gagcagttaa	60
ctggctgggg caccattagc aagtcactta gcatctctgg ggccagtctg caaagcgagg	120
gggcagcctt aatgtgcctc cagcctgaag tcctagaatg agcgcccgggt gtcccaagct	180
ggggcgcgca ccccagatcg gagggcgccg atgtacagac agcaaaactca cccagtctag	240
tgcattgcctt cttaaaccatc acgagactct aagaaaagga aactgaaaac gggaaagtcc	300
ctctctctaa cctggcactg cgtcgtctggc ttggagacag gtgacgggtcc ctgcgggcct	360
tgctctgatt ggctgggcac gcgtttaata taagtggagg cgtcgcgctg gcgggcattc	420
ctgaagctga cagcattcgg gccgagaggc tccgggtgcc gtcagtgggc agagcgacaca	480
tcgccacag tccccagaa gttgggggga ggggtcggca attgaaccgg tgcctagaga	540
aggtggcgcg gggtaaacgt ggaaagtgat gtcgtgtact ggctccgcct ttttcccgag	600
ggtgggggag aaccgtatat aagtgcagta gtcgccgtga acgttctttt tcgcaacggg	660
tttgccgcca gaacacaggt aagtgccgtg tgtggttccc gcgggcctgg cctctttacg	720
ggttatggcc ctigcgtgcc ttgaattact tccacgcccc tggctgcagt acgtgattct	780
tgatccccag cttcgggttg gaagtgggtg ggagagttcg aggccttgcg ctttaaggagc	840
cccttcgcct cgtgcttagg ttgaggcctg gcttgggcgc tggggccgcc gcgtgcgaat	900
ctggtggcac cttcgcgcct gtctcgtgc tttcgataag tctctagcca tttaaaattt	960
ttgatgacct gctgcgacgc ttttttctg gcaagatagt cttgtaaatg cgggccaaga	1020
tgtgcacact ggtatttcgg tttttggggc cgcgggcggc gacggggccc gtgcgtccca	1080
gcgcacatgt tcggcgaggc ggggcctgcg agcgcgccca ccgagaatcg gacgggggta	1140
gtctcaagct ggccggcctg ctctgggtgcc tggcctcgcg ccgccgtgta tcgccccgcc	1200
ctgggcggca aggctggccc ggtcggcacc agttgcgtga gcggaagat ggccgcttcc	1260
cggccctgct gcaggagct caaaatggag gacgcggcgc tcgggagagc gggcgggtga	1320
gtcaccaca caaaggaaaa gggcctttcc gtcctcagcc gtcgcttcat gtgactccac	1380
ggagtaccgg gcgccgtcca ggcacctga ttagttctcg agcttttgga gtacgtcgtc	1440
tttaggttgg ggggaggggt tttatgcgat ggagtttccc cacttgagt ggggtggagac	1500
tgaagtagg ccagcttggc acttgatgia attctccttg gaatttgccc tttttgagtt	1560
tggatcttgg ttcatctca agcctcagac agtggttcaa agtttttttc ttccatttca	1620
ggtgtcgtga cgcccgcccc cgccaccatg gtgagcaagg gcgaggagct gttcacgggg	1680
gtggtgcccc tcctgggtcga gctggacggc gacgtaaagc gccacaagtt cagcgtgtcc	1740

ggcgaggcg agggcgatgc cacctacggc aagctgaccc tgaagtcat ctgcaccacc 1800
ggcaagctgc ccgtgccctg gcccacctc gtgaccaccc tgacctacgg cgtgcagtgc 1860
ttcagccgct accccgacca catgaagcag cagcacttct tcaagtcgc catgcccga 1920
ggctacgtcc aggagcgcac catcttcttc aaggacgacg gcaactacaa gacccgcgcc 1980
gaggtgaagt tcgaggcgca caccctggtg aaccgcatcg agctgaagg catcgacttc 2040

aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag ccacaacgtc 2100
tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat ccgccacaac 2160
atcgaggacg gcagcgtgca gctcgccgac cactaccagc agaacacccc catcggcgac 2220
ggccccgtgc tgctgccga caaccactac ctgagcacc agtccgccct gagcaaagac 2280
cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg ctggagttcg tgaccgccgc ggggatcact 2340
ctcgcatgg acgagctgta caagtaatct agacctcgac tgtgccttct agttgccagc 2400
catctgttgt ttgccccctc cccgtgccct ccttgaccct ggaaggtgcc actcccactg 2460

tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgattgtct gagtaggtgt cattctattc 2520
tggggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagacaat agcaggcatg 2580
ctggggatgc ggtgggctct atggcttctg aggcggaaag aaccagctgg ggctctaggg 2640
ggtatcccca ctagttgtct cgtccgtgg ccttagctgt gctcgcgcta ctctctcttt 2700
ctggcctgga ggctatccag cgtgagctc tcctaccctc ccgctctggt ccttctctc 2760
ccgctctgca cctctgtgg ccctcgtgt gctctctcgc tccgtgactt ccttctcca 2820
agttctcctt ggtggccgc cgtggggcta gtccagggt ggatctcggg gaagcggcgg 2880

ggtggcctgg gattggggaa ggggtgctc acccgggacg cgcgctactt gcccctttcg 2940
gcggggagca ggggagacct ttggcctacg gcgacgggag ggtcgggaca aagtttaggg 3000
cgtcgataag cgtcagacg ccgaggttgg gggagggttt ctcttcgct ctttcgcggg 3060
gcctctggct ccccgagcg agctggagtg ggggacgggt aggct 3105

<210> 723
<211> 100
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic: G014832
<220><221> modified_base
<222> (1)..(3)
<223> 2'-O-Me and PS bond
<220><221> modified_base

<

222> (29)..(40)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (69)..(100)

<223> 2'-O-Me

<220><221> modified_base

<222> (97)..(99)

<223> PS bond

<400> 723

ggcucucgga gaauacgag guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100