

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0153356
(43) 공개일자 2023년11월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0783 (2010.01) A61K 35/17 (2015.01)
A61P 37/06 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0636 (2023.05)
A61K 35/17 (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2023-7025734
- (22) 출원일자(국제) 2021년12월29일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2023년07월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2021/065524
- (87) 국제공개번호 WO 2022/147133
국제공개일자 2022년07월07일
- (30) 우선권주장
63/131,987 2020년12월30일 미국(US)

- (71) 출원인
인텔리아 테라퓨틱스, 인크.
미국 02139 매사추세츠주 캠프리지 스위트 130 이
리 스트리트 40
- (72) 발명자
루두리어, 크리스토퍼
미국 02139 매사추세츠 캠프리지 이리 스트리트
40
- (74) 대리인
양영준, 이상남

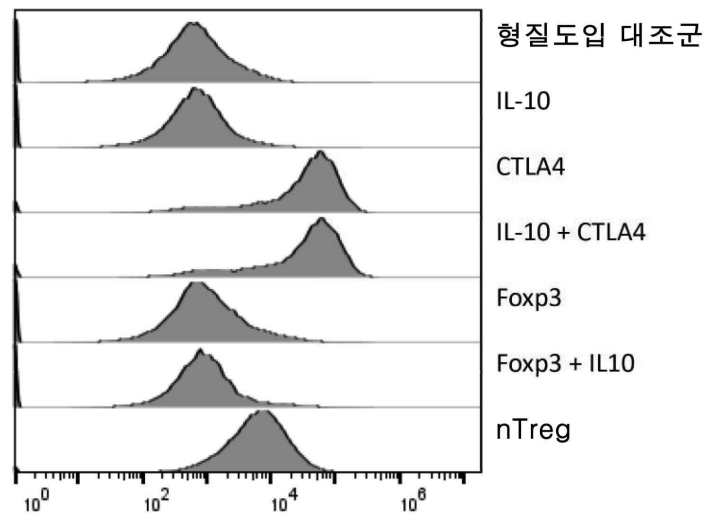
전체 청구항 수 : 총 57 항

(54) 발명의 명칭 조작된 T 세포

(57) 요약

본 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함하도록 조작된 T 세포 및 이의 조성물 및 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 37/06 (2018.01)

C12N 2501/2302 (2013.01)

C12N 2501/2307 (2013.01)

C12N 2501/2315 (2013.01)

C12N 2501/515 (2013.01)

C12N 2501/53 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

조작된 T 세포로서,

- i) 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산;
 - ii) 인터페론-감마(IFNG)를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형으로, 여기서 변형은 IFNG의 발현을 녹다운시키는, 변형; 및
 - iii) 종양 괴사 인자 알파(TNFA)를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형으로, 여기서 변형은 TNFA의 발현을 녹다운시키는, 변형
- 을 포함하는, 조작된 T 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 조절 T 세포 촉진 분자는 인터루킨-10(IL10), 세포독성 T-림프구 연관된 단백질 4(CTLA4), 형질전환 성장 인자 베타 1(TGFB1), 인돌아민 2,3-디옥시게나제 1(IDO1), 엑토뉴클레오타이드 트리포스페이트 디포스포하이드롤라아제 1(ENTPD1), 5'-뉴클레오타다아제 엑토(NT5E), 인터루킨-22(IL-22), 암피레굴린(AREG), 인터루킨-35(IL35), GARP, CD274 분자(CD274), 포크헤드 박스 P3(FOXP3), IKAROS 패밀리 징크 핑거 2(IKZF2), 호산구증가증 가족성(EOS), 인터페론 조절 인자 4(IRF4), 림프구 인핸서 결합 인자 1(LEF1) 및 BTB 도메인 및 CNC 동족체 2(BACH2)로부터 선택되는, 조작된 T 세포.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 조절 T 세포 촉진 분자는 IL10인, 조작된 T 세포.

청구항 4

제1항 내지 제2항에 있어서, 조절 T 세포 촉진 분자는 CTLA4인, 조작된 T 세포.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 T 세포 촉진 분자는 제1 조절 T 세포 촉진 분자이고, 프로모터 서열의 제어 하에 제2 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산을 추가로 포함하는, 조작된 T 세포.

청구항 6

제5항에 있어서, 제1 및 제2 조절 T 세포 촉진 분자는 IL10 및 CTLA4인, 조작된 T 세포.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 인터루킨 17A(IL17A), 인터루킨-2(IL2), 인터루킨 6(IL6), 퍼포린 1(PRF1), 그랜자임 A(GZMA) 또는 그랜자임 B(GZMB)를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형을 추가로 포함하며, 여기서 변형은 각각 IL17A, IL2, IL6, PRF1, GZMA 또는 GZMB의 발현을 녹다운시키는, 조작된 T 세포.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 T 세포 수용체(TCR)를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형을 추가로 포함하며, 여기서 변형은 내인성 TCR의 발현을 녹다운시키는, 조작된 T 세포.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터 서열의 제어 하에 표적화 수용체에 대한 이중 코딩 서열을 추가로 포함하는, 조작된 T 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 표적화 수용체는 점막 혈관 어드레신 세포 부착 분자 1(MADCAM1), 종양 괴사 인자 알파(TNFA), CEA 세포 부착 분자 6(CEACAM6), 혈관 세포 부착 분자 1(VCAM1), 시트룰린화된 비멘틴, 미엘린 염기성 단백질(MBP), MOG(미엘린 희소돌기아교세포 당단백질), 단백질질 단백질 1(PLP1), CD19 분자(CD19), CD20 분자(CD20), TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 17(TNFRSF17), 디캡티딜 펩티다제 유사 6 (DPP6), 용질 운반체 패밀리 2 구성원 2(SCL2A2), 글루타메이트 데카르복실라제(GAD2), 테스모글레인 3(DSG3) 및 MHC 클래스 I HLA-A(HLA-A*02)로부터 선택된 리간드에 표적화된, 조작된 T 세포.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, 표적화 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 포함하는, 조작된 T 세포.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 수용체를 인코딩하는 이중 핵산은 발현 작제물 안으로 혼입되는, 조작된 T 세포.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 수용체를 인코딩하는 이중 핵산은 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 핵산을 포함하지 않는 발현 작제물에 있는, 조작된 T 세포.

청구항 14

제5항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산은 발현 작제물 안으로 혼입되고 제2 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산은 발현 작제물에 혼입되는, 조작된 T 세포.

청구항 15

제5항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산 및 제2 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산은 별도의 발현 작제물 안으로 혼입되는, 조작된 T 세포.

청구항 16

제13항 또는 제14항에 있어서, 제1 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산 및 제2 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산은 단일 발현 작제물 안으로 혼입되는, 조작된 T 세포.

청구항 17

제12항 또는 제14항 내지 제16항에 있어서, 발현 작제물은 표적화 수용체를 인코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 조작된 T 세포.

청구항 18

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 이중 코딩 서열은 에피솜 발현 작제물에 있는, 조작된 T 세포.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 이중 코딩 서열은 게놈 안으로 삽입되는, 조작된 T 세포.

청구항 20

제19항에 있어서, 게놈 안으로의 삽입은 표적화되지 않은 삽입인, 조작된 T 세포.

청구항 21

제19항에 있어서, 삽입은 표적화된 삽입인, 조작된 T 세포.

청구항 22

제21항에 있어서, 표적화된 삽입은 TCR 유전자좌, TNF 유전자좌, IFNG 유전자좌, IL17A 유전자좌, IL6 유전자좌, IL2 유전자좌, 아데노-연관된 바이러스 통합 부위 1(AAVS1) 좌로부터 선택된 부위 안으로 되는, 조작된 T 세포.

청구항 23

제22항에 있어서, TCR 유전자좌는 T 세포 수용체 알파 불변(TRAC) 좌인, 조작된 T 세포.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자의 발현을 녹다운시키는 변형은 삽입, 결실 또는 치환 중 하나 이상을 포함하는, 조작된 T 세포.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 조작된 T 세포를 포함하는 세포군.

청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 군의 세포 중 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%는 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산 서열을 포함하고;

군의 세포 중 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 70%는 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형을 포함하고; 그리고

군의 세포 중 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 70%는 TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형을 포함하는, 조작된 T 세포군.

청구항 27

제26항에 있어서, 삽입 또는 변형을 포함하는 세포의 퍼센트는 차세대 시퀀싱(NGS)에 의한 판독의 퍼센트에 의해 결정되는, 조작된 T 세포군.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 조절 T 세포 촉진 분자는 인터루킨-10(IL10), 세포독성 T-림프구 연관된 단백질 4(CTLA4), 형질전환 성장 인자 베타 1(TGFB1), 인돌아민 2,3-디옥시게나제 1(IDO1), 엑토뉴클레오시드 트리포스페이트 디포스포하이드롤라아제 1(ENTPD1), 5'-뉴클레오티다아제 엑토(NT5E), 인터루킨-22(IL22), 암피레굴린(AREG), 포크헤드 박스 P3(FOXP3), IKAROS 패밀리 징크 핑거 2(IKZF2), 호산구증가증 가족성(EOS), 인터페론 조절 인자 4(IRF4), 림프구 인핸서 결합 인자 1(LEF1) 및 BTB 도메인 및 CNC 동족체 2(BACH2)로부터 선택되는, 조작된 T 세포군.

청구항 29

제26항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 T 세포 촉진 분자는 IL10인, 조작된 T 세포군.

청구항 30

제26항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 T 세포 촉진 분자는 CTLA4인, 조작된 T 세포군.

청구항 31

제26항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 T 세포 촉진 분자는 제1 조절 T 세포 촉진 분자이고, 프로모터 서열의 제어 하에 제2 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산을 추가로 포함하는, 조작된 T 세포군.

청구항 32

제31항에 있어서, 제1 및 제2 조절 T 세포 촉진 분자는 IL10 및 CTLA4인, 조작된 T 세포.

청구항 33

제26항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 인터루킨 17A(IL17A), 인터루킨 6(IL6), 인터루킨 2(IL2), 퍼포린 1(PRF1), 그랜자임 A(GZMA) 또는 그랜자임 B(GZMB)를 인코딩하는 적어도 하나의 내인성 핵산 서열의 변형을 추가로 포함하며, 여기서 세포군은 세포군 중 적어도 70%, 바람직하게는 세포군 중 적어도 80%에서, 각각 IL17A, IL6, IL2, PRF1, GZMA 또는 GZMB의 적어도 하나에 변형을 포함하며, 여기서 변형은 각각 IL17A, IL6, IL2, PRF1, GZMA 또는 GZMB 중 적어도 하나의 발현을 녹다운시키는, 조작된 T 세포군.

청구항 34

제26항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 70%는 TCR의 녹다운을 포함하는, 조작된 T 세포군.

청구항 35

제26항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 세포의 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%는 표적화 수용체의 핵산 코딩 서열의 삽입을 포함하는, 조작된 T 세포군.

청구항 36

제35항에 있어서, 표적화 수용체는 점막 혈관 어드레신 세포 부착 분자 1(MADCAM1), 종양 괴사 인자 알파 (TNFA), CEA 세포 부착 분자 6(CEACAM6), 혈관 세포 부착 분자 1(VCAM1), 시트룰린화된 비멘틴, 미엘린 염기성 단백질(MBP), MOG(미엘린 희소돌기아교세포 당단백질), 단백질질 단백질 1(PLP1), CD19 분자(CD19), CD20 분자(CD20), TNF 수용체 슈퍼패밀리 구성원 17(TNFRSF17), 디펩티딜 펩티다제 유사 6 (DPP6), 용질 운반체 패밀리 2 구성원 2(SCL2A2), 글루타메이트 데카르복실라제(GAD2), 데스모글레인 3(DSG3) 및 MHC 클래스 I HLA-A(HLA-A*02)로부터 선택되는 리간드에 특이적으로 결합하는, 조작된 T 세포군.

청구항 37

제35항 또는 제36항에 있어서, 표적화 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 포함하는, 조작된 T 세포군.

청구항 38

제35항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 수용체를 인코딩하는 이중 핵산은 발현 작제물 안으로 혼입되는, 조작된 T 세포군.

청구항 39

제38항에 있어서, 표적화 수용체를 인코딩하는 이중 핵산은 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 핵산을 포함하지 않는 발현 작제물에 있는, 조작된 T 세포군.

청구항 40

제26항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 제1 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산은 발현 작제물 안으로 혼입되고, 적어도 하나의 제2 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산은 발현 작제물에 혼입되는, 조작된 T 세포군.

청구항 41

제40항에 있어서, 제1 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산 및 제2 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산은 별도의 발현 작제물 안으로 혼입되는, 조작된 T 세포군.

청구항 42

제40항에 있어서, 제1 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산 및 제2 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산은 단일 발현 작제물 안으로 혼입되는, 조작된 T 세포군.

청구항 43

제38항 또는 제40항 내지 제42항에 있어서, 발현 작제물은 표적화 수용체를 인코딩하는 핵산을 추가로 포함하는, 조작된 T 세포군.

청구항 44

제26항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 이중 코딩 서열은 에피솜 발현 작제물에 있는, 조작된 T 세포군.

청구항 45

제26항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 이중 코딩 서열은 게놈 안으로 삽입되는, 조작된 T 세포군.

청구항 46

제45항에 있어서, 게놈 안으로의 삽입은 표적화되지 않은 삽입인, 조작된 T 세포군.

청구항 47

제45항에 있어서, 삽입은 표적화된 삽입인, 조작된 T 세포군.

청구항 48

제47항에 있어서, 표적화된 삽입은 TCR 유전자좌, TNF 유전자좌, IL2 유전자좌, IL6 유전자좌, IL17A 유전자좌, IFNG 유전자좌, 아데노-연관된 바이러스 통합 부위 1(AAVS1) 좌로부터 선택된 부위 안으로 되는, 조작된 T 세포군.

청구항 49

제48항에 있어서, TCR 유전자좌는 T 세포 수용체 알파 불변(TRAC) 좌인, 조작된 T 세포군.

청구항 50

제26항 내지 제49항에 있어서, 유전자의 발현을 녹다운시키는 변형은 삽입, 결실 또는 치환 중 하나 이상을 포함하는, 조작된 T 세포군.

청구항 51

제1항 내지 제24항의 조작된 T 세포 또는 제25항 내지 제50항의 조작된 T 세포군 중 어느 하나를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 52

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항의 세포 또는 제25항 내지 제50항 중 어느 한 항의 세포군 또는 제51항의 약학적 조성물을 대상체에게 투여하는 방법 또는 용도.

청구항 53

제52항에 있어서, 대상체는 면역억제를 필요로 하는, 방법 또는 용도.

청구항 54

제52항 또는 제53항에 있어서, 면역 장애의 치료를 위한, 방법 또는 용도.

청구항 55

제52항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 자가면역 질환의 치료를 위한, 방법 또는 용도.

청구항 56

제55항에 있어서, 자가면역 질환은 췌양성 대장염, 크론병, 류마티스 관절염, 건선, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스 및 제1형 당뇨병으로부터 선택되는, 방법 또는 용도.

청구항 57

제52항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 이식편대숙주 질환(GvHD)의 치료를 위한, 방법 또는 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 서열 목록

[0002] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되고 이로써 그 전체가 참조로 포함된 서열 목록을 함유한다. 2021년 12월 28일에 생성된 상기 ASCII 사본은 12793_0030-00304_SL.txt로 명명되고 크기는 120,061 바이트이다.

[0003] 관련 출원

[0004] 본 출원은 이로써 2020년 12월 30일에 출원된 미국 가출원 번호 63/131,987을 참조로 포함하며, 그 전체 내용은 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다.

배경 기술

[0005] 적응 면역은 신체가 외래 병원체를 제거할 수 있는 방어 메커니즘이다. T 세포는 이 면역 반응을 매개할 수 있는 면역 세포이다. T 세포 수용체(TCR)는 항원을 인식할 수 있는 T 세포의 표면 상의 단백질 복합체이다. T 세포 다양성은 TCR 알파 및 베타 유전자좌의 재배열에서 유도된다.

[0006] 적응 면역의 한 특징은 "자기" 항원과 "비-자기" 항원을 구별하는 능력이다. 자가면역 및 자가염증성 장애는 "자기" 항원에 대한 병원성 면역 반응에 의해 특징지어 진다. 일부 재배열 TCR 알파 및 베타 유전자좌는 자기-반응성 T 세포를 생성한다. Owen 등, Regulatory T Cell Development in the Thymus, J Immunol 203(8) (2019). 많은 자기-반응성 T 세포는 흉선에서 클론의 결실에 의해 제거되지만, 다른 것들은 클론의 결실을 회피하고 유해한 면역 반응을 유발할 수 있다. Id. 조절 T 세포(Treg)라고 하는 특화된 T 세포는 "자기" 내성에 중요하다. Id. Treg는, 예를 들어, 이식편대숙주 질환에서, 과도한 면역 반응, 자가면역 반응 및 바람직하지 않은 면역 반응을 억제할 수 있다. Id. 예를 들어, Treg의 수가 불충분하거나 Treg가 제대로 기능하지 않는 경우인, Treg의 조절장애는 자가면역 반응에 기여할 수 있다. Id.

[0007] 자가면역 장애를 치료하기 위한 현행 치료법은 적응 면역 과정 또는 면역 세포의 활성화를 억제하는 것을 목표로 한다. 이들 치료법은 해로운 면역 반응, 예를 들어 자가 면역 반응을 억제할 수 있는 반면, 그것은 또한 유익한 면역 반응도 억제할 수 있다. Treg 치료법은 공여자 세포가 조혈 줄기 세포 이식에 이어서 숙주 조직의 면역 공격을 매개하는 이식편대숙주 질환(GvHD)을 포함한 다양한 질환에서 항원-특이적 면역 반응을 억제하는데 사용되었다. Pierini 등, T Cells Expressing Chimeric Antigen Receptor Promote Immune Tolerance, JCI Insight 2(20) (2017). 그러나 여전히 "Treg-기반 치료법의 임상적 구현에 대한 주요 과제"가 있다. Id. 따라서, 염증 및 자가면역을 포함하는 면역 반응(들)을 억제하기 위한 Treg 치료법을 포함하는 효과적인 T 세포 치료법에 대한 필요성이 남아있다.

발명의 내용

[0008] 요약

[0009] 본 개시내용은 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 핵산; 인터페론-감마(IFNG)를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형으로, 여기서 변형은 IFNG의 발현을 녹다운시키는, 변형; 및 종양괴사 인자 알파(TNFA)를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형으로, 여기서 변형은 TNFA의 발현을 녹다운시키는, 변형을 포함하도록 조작된 T 세포 또는 T 세포군, 및, 예를 들어, 염증 및 자가면역을 포함하는 면역 반응(들)을 억제하기 위한 이의 조성물 및 용도를 제공한다. 일부 실시형태에서, 조절 T 세포 촉진 분자는 인터루킨-10(IL10), 세포독성 T-림프구 연관된 단백질 4(CTLA4), 형질전환 성장 인자 베타 1(TGFB1), 인돌아민 2,3-디옥시게나제 1(IDO1), 엑토뉴클레오시드 트리포스페이트 디포스포하이드롤라아제 1(ENTPD1), 5'-뉴클레오타다아제

엑토(NT5E), 인터루킨-22(IL-22), 암피레굴린(AREG), 인터루킨-35(IL35), GARP, CD274 분자(CD274), 포크헤드 박스 P3(FOXP3), IKAROS 패밀리의 징크 핑거 2(IKZF2), 호산구증가증 가족성(EOS), 인터페론 조절 인자 4(IRF4), 림프구 인핸서 결합 인자 1(LEF1) 및 BTB 도메인 및 CNC 동족체 2(BACH2)로부터 선택된다.

- [0010] 일부 실시형태에서, T 세포 또는 T 세포군은 프로모터 서열의 제어 하에 IL10을 인코딩하는 이중 핵산; IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형으로, 여기서 변형은 IFNG의 발현을 녹다운시키는, 변형; 및 TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형으로, 여기서 변형은 TNFA의 발현을 녹다운시키는, 변형을 포함하도록 조작된다.
- [0011] 일부 실시형태에서, T 세포 또는 T 세포군은 프로모터 서열의 제어 하에 CTLA4를 인코딩하는 이중 핵산; IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형으로, 여기서 변형은 IFNG의 발현을 녹다운시키는, 변형; 및 TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형으로, 여기서 변형은 TNFA의 발현을 녹다운시키는, 변형을 포함하도록 조작된다.
- [0012] 일부 실시형태에서, T 세포 또는 T 세포군은 프로모터 서열의 제어 하에 각각 IL10 및 CTLA4를 인코딩하는 이중 핵산; IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형으로, 여기서 변형은 IFNG의 발현을 녹다운시키는, 변형; 및 TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형으로, 여기서 변형은 TNFA의 발현을 녹다운시키는, 변형을 포함하도록 조작된다.
- [0013] 일부 실시형태에서, T 세포 또는 T 세포군은 인터루킨 17A(IL17A), 인터루킨-2(IL2), 인터루킨 6(IL6), 퍼포린 1(PRF1), 그랜자임 A(GZMA) 또는 그랜자임 B(GZMB)를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함하도록 추가로 조작된다.
- [0014] 일부 실시형태에서, T 세포 또는 T 세포군은 내인성 T 세포 수용체(TCR)를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함하도록 추가로 조작된다.
- [0015] 일부 실시형태에서, T 세포 또는 T 세포군은 프로모터 서열의 제어 하에 표적화 수용체에 대한 이중 코딩 서열을 포함하도록 추가로 조작된다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체는 점막 혈관 어드레신 세포 부착 분자 1(MADCAM1), 종양 괴사 인자 알파(TNFA), CEA 세포 부착 분자 6(CEACAM6), 혈관 세포 부착 분자 1(VCAM1), 시트룰린화된 비멘틴, 미엘린 염기성 단백질(MBP), MOG(미엘린 희소돌기아교세포 당단백질), 단백질질 단백질 1(PLP1), CD19 분자(CD19), CD20 분자(CD20), TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 17(TNFRSF17), 디펩티딜 펩티다제 유사 6(DPP6), 용질 운반체 패밀리의 2 구성원 2(SCL2A2), 글루타메이트 데카르복실라제(GAD2), 데스모글레인 3(DSG3) 및 MHC 클래스 I HLA-A(HLA-A*02)로부터 선택된 리간드에 표적화된다.
- [0016] 일부 실시형태에서, 적어도 30%, 35%, 바람직하게는 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 T 세포군은, 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이, 조절 T 세포 측진 분자를 인코딩하는 서열의 삽입을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 T 세포군은 변형, 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이, 예를 들어 IFNG 서열에서 녹다운을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 T 세포군은 변형, 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이, 예를 들어 TNFA 서열에서 녹다운을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 T 세포군은 변형, 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이, 예를 들어 TCR 서열에서 녹다운을 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 T 세포군은, 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 서열의 삽입을 포함한다.
- [0017] 유전자의 발현을 녹다운하기 위한 본 명세서에 기재된 변형은 삽입, 결실 또는 치환 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 이중 서열은 발현 작제물(들)에 통합될 수 있다. 다중 이중 서열은 단일 발현 구성으로 또는 별도의 발현 작제물 안으로 혼입될 수 있다. 본 명세서에 기재된 이중 서열은 에피솜 발현 작제물(들) 안으로 혼입될 수 있다. 본 명세서에 기재된 이중 서열은 예를 들어 비표적화된 삽입 또는 표적화된 삽입 같이 게놈 안으로 삽입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적화된 삽입은 TCR 유전자좌, TNF 유전자좌, IFNG 유전자좌, IL17A 유전자좌, IL6 유전자좌, IL2 유전자좌, 아데노-연관된 바이러스 통합 부위 1(AAVS1) 좌로부터 선택된 부위 안으로 된다.
- [0018] 조작된 T 세포의 약학적 조성물 및 용도가 또한 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 및 이의 약학적 조성물은 면역억제를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 및 이의 약학적 조성물은 면역 장애 또는 자가면역 질환, 예를 들어 궤양성 대장염, 크론병, 류마티스성

관절염, 건선, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스, 제1형 당뇨병, 및 이식편대숙주 질환(GvHD)의 치료에 유용할 수 있다.

[0019] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 서열(들) 또는 서열(들)의 변형, 예를 들어 녹다운의 삽입은 RNA-가이드된 DNA 결합제, 예를 들어 Cas 뉴클레아제와 조합된 가이드 RNA에 의해 매개될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 서열(들) 또는 서열(들)의 녹다운의 삽입은 또 다른 적합한 유전자 편집 시스템, 예를 들어 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 시스템 또는 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 시스템에 의해 매개될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1a-1e는 형질도입되지 않았거나 지시된 코딩 서열의 삽입으로 형질도입된 CD3+CD4+ 세포; 또는 CD3+CD4+CD25+ nTreg에서의 형광 염색의 강도를 나타내는 유세포분석 데이터의 히스토그램이다. 도 1a는 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에서의 CTLA 발현에 대한 형광 강도의 히스토그램이다. 도 1b는 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에서의 IL10 발현에 대한 형광 강도의 히스토그램이다. 도 1c는 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에서의 Foxp3 발현에 대한 형광 강도의 히스토그램이다. 도 1d는 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에서의 헬리오스 발현에 대한 형광 강도의 히스토그램이다. 도 1e는 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에서의 Eos 발현에 대한 형광 강도의 히스토그램이다.

도 2a 및 2b는 GvHD의 마우스 모델로부터의 결과를 나타내는 그래프이다. 도 2a는 지시된 코딩 서열 또는 지시된 대조군의 삽입으로 형질도입된 CD3+CD4+ 세포; CD4+CD25+ Treg, PBMC, 또는 세포가 주사되지 않은 것(조사 단독)의 주사 이후 생존의 일수를 나타내는 생존 곡선이다. 도 2b는 지시된 바와 같은 형질도입된 CD3+CD4+ 세포 또는 대조군으로의 주사에 이은 희생 시점에 마우스의 비장으로부터 단리된 인간 림프구의 정량화를 나타내는 그래프이다.

도 3a-3e는 지시된 코딩 서열 또는 지시된 대조군의 삽입으로 형질도입된 자극된 CD3+CD4+ 세포에서의 시험관내 사이토카인 프로파일 분석으로부터의 결과를 나타내는 그래프이다. 도 3a는 세포 자극 시 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에 의한 시험관내 IL6 생산을 보여준다. 도 3b는 세포 자극 시 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에 의한 시험관내 TNF-알파 생산을 보여준다. 도 3c는 세포 자극 시 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에 의한 시험관내 IL10 생산을 보여준다. 도 3d는 세포 자극 시 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에 의한 시험관내 IL13 생산을 보여준다. 도 3e는 세포 자극 시 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에 의한 시험관내 IL2 생산을 보여준다. 도 3f는 세포 자극 시 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에 의한 시험관내 IFN-감마 생산을 보여준다.

도 4는 CTV 표지된 T 세포 및 CD-3 고갈된 PBMC가 지시된 비율에서 지시된 코딩 서열 또는 지시된 대조군의 삽입으로 형질도입된 CD3+CD4+ 세포와 혼합되어진 혼합 림프구 반응 검정에서 CTV 희석에 의해 측정된 형질도입된 T 세포에 의한 세포 증식의 억제 퍼센트를 나타내는 그래프이다.

도 5a-5e는 형질도입되지 않았거나 IL10 및 CTLA4 단독(무 편집) 또는 IFNG 및 TNFA 중 하나 또는 둘 모두의 녹아웃(KO)과 조합한 코딩 서열의 삽입으로 형질도입된 CD3+CD4+ 세포; 또는 CD3+CD4+CD25+ nTreg에서의 형광 염색의 강도를 나타내는 유세포분석 데이터의 히스토그램이다. 도 5a는 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에서의 CTLA4 발현에 대한 형광 강도의 히스토그램이다. 도 5b는 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에서의 IL10 발현에 대한 형광 강도의 히스토그램이다. 도 5c는 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에서의 FOXP3 발현에 대한 형광 강도의 히스토그램이다. 도 5d는 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에서의 헬리오스 발현에 대한 형광 강도의 히스토그램이다. 도 5e는 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에서의 Eos 발현에 대한 형광 강도의 히스토그램이다.

도 6a 및 6b는 GvHD의 마우스 모델로부터의 결과를 나타내는 그래프이다. 도 6a는 PBMC, 형질도입되지 않았거나 IL10 및 CTLA4 단독(무 편집) 또는 IFNG 및 TNFA 중 하나 또는 둘 모두의 편집(KO)과 조합한 코딩 서열의 삽입으로 형질도입된 CD3+CD4+ 세포; CD3+CD4+CD25+ nTreg로 마우스의 주사; 또는 세포를 주사하지 않은 것(조사 단독) 이후 생존의 일수를 나타내는 생존 곡선이다. 도 6b는 지시된 바와 같이 형질도입된 CD3+CD4+ 세포 또는 대조군 세포로 주사 이후의 희생 시점에 마우스의 비장으로부터 단리된 인간 림프구의 정량화를 나타내는 그래프이다.

도 7a-7f는 형질도입되지 않았거나 IL10 및 CTLA4 어느 하나의 단독(무 편집) 또는 IFNG 및 TNFA 중 하나 또는 둘 모두의 편집(KO)과 조합한 코딩 서열의 삽입으로 형질도입된 자극된 CD3+CD4+ 세포; 또는 CD4+CD25+ nTreg에

서 시험관내 사이토카인 프로파일 분석으로부터의 결과를 나타내는 그래프이다. 도 7a는 세포 자극 시 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에 의한 시험관 IL6 생산을 보여준다. 도 7b는 세포 자극시 형질도입된 T 세포 또는 지시된 대조군에 의한 시험관내 TNF-알파 생성을 보여준다. 도 7c는 세포 자극 시 형질도입된 T 세포에 의한 시험관내 IL10 생산을 보여준다. 도 7d는 세포 자극 시 형질도입된 T 세포에 의한 시험관내 IL13 생산을 보여준다. 도 7e는 세포 자극 시 형질도입된 T 세포에 의한 시험관내 IL2 생산을 보여준다. 도 7f는 세포 자극 시 조작된 세포에 의한 시험관내 IFN-감마 생산을 보여준다.

도 8은 CTV 표지된 T 세포 및 CD-3 고갈된 PBMC가 지시된 비율에서 지시된 코딩 서열 또는 지시된 대조군의 삽입으로 형질도입된 CD3+CD4+ 세포와 혼합되어진 혼합 림프구 반응 검정에서 CTV 희석에 의해 측정된 조작된 T 세포에 의한 세포 증식의 억제 퍼센트를 나타내는 그래프이다.

도 9a 및 9b는 GvHD의 마우스 모델로부터의 결과를 나타내는 그래프이다. 도 9a는 PBMC, 형질도입되지 않았거나 지시된 바와 같이 야생형(wt) 또는 고친화성(HA)인 IL10 및 CTLA4, IFNG 및 TNFA 둘 모두의 편집(KO)과 조합한 코딩 서열의 삽입으로 형질도입된 CD3+CD4+ 세포; CD3+CD4+CD25+ nTreg로 마우스의 주사; 또는 세포를 주사하지 않은 마우스(비히클)에 이은 생존의 일수를 나타내는 생존 곡선이다. 도 9b는 지시된 바와 같이 형질도입된 CD3+CD4+ 세포 또는 대조군 세포로 주사 이후의 희생 시점에서 마우스의 비장으로부터 단리된 인간 림프구의 정량화를 나타내는 그래프이다.

도 10a 및 10b는 혼합 림프구 검정에서 CTV 희석에 의해 측정된 증식의 억제 퍼센트를 나타내는 그래프이다. 도 10a는 염증성 전처치가 있거나 없는 증식의 억제를 나타낸다. 도 10b는 지시된 염증성 사이토카인의 존재에서 추가로 염증성 전처치가 있거나 없는 증식의 억제를 나타낸다. 지시된 각각의 p 값은 *p<0.05, **p<0.01 및 ***p<0.001이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이제 발명의 특정 실시형태를 상세히 참조할 것이며, 그 예는 첨부된 도면에 예시되어 있다. 발명은 예시된 실시형태와 관련하여 기재되지만, 발명을 이들 실시형태로 제한하려는 의도가 아님을 이해할 것이다. 반대로, 발명은 첨부된 실시형태에 의해 정의된 바와 같이 발명 내에 포함될 수 있는 모든 대안, 변형 및 등가물을 포괄하도록 의도된다.
- [0022] 본 명세서에서 사용된 섹션 제목은 구성 목적만을 위한 것이고 어떤 식으로든 원하는 주제를 제한하는 것으로 해석되지 않는다. 참조로 포함된 임의의 자료가 본 명세서에 정의된 임의의 용어 또는 본 명세서의 임의의 다른 명시적 내용과 모순되는 경우, 본 명세서가 우선한다.
- [0023] **I. 정의**
- [0024] 본 교시내용을 상세히 설명하기 전에, 개시내용은 특정 조성 또는 공정 단계에 제한되지 않으며, 그 자체는 다양할 수 있음을 이해해야 한다. 본 명세서 및 첨부된 실시형태에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 ("a", "an") 및 상기 ("the")는 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 참조를 포함한다는 점에 유의해야 한다. 따라서, 예를 들어 "접합체"에 대한 언급은 복수의 접합체를 포함하고 "세포"에 대한 언급은 복수의 세포 또는 세포 군 등을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "포함한다" 및 이의 문법적 변형은 비-제한적인 것으로서 의도되어, 목록에서의 항목의 인용이 나열된 항목에 대체되거나 추가될 수 있는 다른 유사한 항목을 배제하는 것이 아니다.
- [0025] 수치 범위는 범위를 정의하는 수를 포함한다. 측정 및 측정가능한 값은 유효 숫자 및 측정과 연관된 오류를 고려하여 대략적인 것으로 이해된다. 또한, "포함하다", "포함한다", "포함하는", "함유하다", "함유한다", "함유하는", "포괄하다", "포괄한다", "포괄하는"의 사용은 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 전술한 일반적인 설명 및 상세한 설명은 모두 단지 예시적이고 설명을 위한 것이고 교시내용을 제한하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0026] 명세서에서 구체적으로 언급되지 않는 한, 다양한 구성요소를 "포함하는"을 언급하는 명세서에서의 실시형태는 인용된 구성요소를 "구성하는" 또는 "필수적으로 구성하는" 것으로 간주된다; 다양한 구성요소로 "구성되는"을 언급하는 명세서에서의 실시형태는 또한 인용된 구성요소를 "포함하는" 또는 "필수적으로 구성되는" 것으로 간주된다; 그리고 다양한 구성요소로 "본질적으로 구성되는"을 언급하는 명세서에서의 실시형태는 또한 인용된 구성요소로 "구성되는" 또는 "포함하는" 것으로 간주된다(이 호환성은 청구범위에서 이들 용어의 사용에 적용되지 않는다).

- [0027] 용어 "또는"은 문맥상 명백히 달리 나타내지 않는 한 포괄적인 의미, 즉 "및/또는"과 동등한 의미로 사용된다.
- [0028] 용어 "약"은 목록 또는 범위 앞에 사용될 때 목록의 각 구성원 또는 범위의 각 평가변수를 변형한다. 용어 "약" 또는 "대략적으로"은 값이 측정되거나 결정되는 방법에 부분적으로 의존하는 당업자에 의해 결정되는 특정 값에 대한 허용가능한 오차를 의미한다. 용어 "약"은 당업계에서 전형적인 허용 범위 내를 의미하는 것으로 본 명세서에서 사용된다. 예를 들어, "약"은 평균에서 약 2 표준 편차로 이해될 수 있다. 특정 실시형태에서, 약은 +10%를 의미한다. 특정 실시형태에서, 약은 +5%를 의미한다.
- [0029] 수 또는 일련의 수 앞의 용어 "적어도"는 용어 "적어도"에 인접한 수 및 논리적으로 포함될 수 있는 모든 후속 수 또는 정수를 포함하는 것으로 이해되며, 이는 문맥에서 명백하다. 예를 들어, 핵산 분자에서 뉴클레오타이드의 수는 정수여야 한다. 예를 들어, "20개 뉴클레오타이드 핵산 분자의 적어도 17개 뉴클레오타이드"는 17, 18, 19 또는 20개의 뉴클레오타이드가 지시된 특성을 갖는다는 것을 의미한다. 적어도가 일련의 수 또는 범위 앞에 있는 경우 "적어도"는 일련 또는 범위인 각 수를 변형할 수 있음을 이해한다.
- [0030] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "이하" 또는 "미만"은 어구에 인접한 값으로 이해되고 문맥상 논리적으로 0까지 논리적으로 더 낮은 값 또는 정수로 이해된다. 예를 들어, "2개 이하의 뉴클레오타이드 염기쌍"의 듀플렉스 영역은 2개, 1개 또는 0개의 뉴클레오타이드 염기쌍을 갖는다. 일련의 수 또는 범위 앞에 "이하" 또는 "미만"이 있는 경우, 일련의 또는 범위에서의 각각의 수가 변형된 것으로 이해된다.
- [0031] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 범위는 상한 및 하한 둘 모두를 포함한다.
- [0032] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 값의 최대량이 100%(예를 들어, 100% 억제 또는 100% 캡슐화)로 표현될 때 그 값은 검출의 방법에 의해 제한되는 것으로 이해된다. 예를 들어, 100% 억제는 검정의 검출 수준 아래의 억제로 이해되고, 100% 캡슐화는 캡슐화를 위한 물질이 소낭 외부에서 검출될 수 없는 것으로 이해된다.
- [0033] 달리 언급하지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 다음 용어 및 문구는 다음 의미를 갖는 것으로 의도된다.
- [0034] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "녹다운"은 예를 들어 세포, 세포군, 조직, 또는 기관에서, 유전자 편집에 의한, 특정 유전자 생성물(예를 들어, 전장 또는 야생형 mRNA, 단백질 또는 둘 모두)의 발현에서 감소를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 유전자 편집은 서열, 예를 들어 차세대 시퀀싱(NGS)에 의해 평가될 수 있다. 발현은 예를 들어, 적절한 대조군과 비교하여 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%까지 또는 검정의 검출 수준 아래로 감소될 수 있으며, 여기서 유전자 서열은 변형되지 않았다. 단백질의 녹다운은 조직, 세포군 또는 관심있는 유체에서 단백질의 양을 검출함에 의해 측정될 수 있다. mRNA의 녹다운을 측정하는 방법은 공지되어 있고 관심있는 조직 또는 세포군으로부터 분리된 mRNA의 시퀀싱을 포함한다. 유세포분석 분석법은 단백질 발현의 녹다운을 측정하기 위한 공지된 방법이다. 분비된 단백질의 경우, 녹다운은 조직 배양 배지 또는 혈액, 또는 그로부터 유래된 혈청 또는 혈장과 같은 유체에서 평가될 수 있다. 일부 실시형태에서, "녹다운"은 특정 유전자 생성물의 발현의 일부 손실, 예를 들어 전장 단백질로 전사되거나 번역되는 전장 야생형 mRNA의 양에서 감소, 또는 세포군에 의해 발현되는 단백질의 양에서 감소를 지칭할 수 있다. mRNA 서열에서 어떤 변화가 야생형 또는 전장 단백질의 감소된 발현을 초래한다는 것은 잘 알려져 있다. 일부 실시형태에서, "녹다운"은 특정 유전자 생성물, 예를 들어 체액 또는 조직 배양 배지에서 IFNG 또는 TNFA 유전자 생성물의 발현의 일부 손실을 지칭할 수 있다. 예를 들어 IFNG 또는 TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형은 녹다운을 초래할 수 있다.
- [0035] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "T 세포 수용체" 또는 "TCR"은 T 세포 내의 수용체를 지칭한다. 일반적으로 TCR은 2개의 TCR 폴리펩티드 사슬인 α 및 β 를 함유하는 이종이량체 수용체 분자이다. α 및 β 사슬 TCR 폴리펩티드는 다양한 CD3 분자와 복합체를 형성할 수 있고 항원 결합 후 염증 및 자가면역을 포함한 면역 반응(들)을 유도할 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같이, TCR의 녹다운은 일부 또는 전체에서 임의의 TCR 유전자의 녹다운, 예를 들어, 단독 또는 일부 또는 전체에서 다른 TCR 유전자(들)의 녹다운과 조합한, TRBC1 유전자의 일부의 결실을 지칭한다.
- [0036] "TRAC"는 T 세포 수용체 α 사슬을 지칭하기 위해 사용된다. 인간 야생형 TRAC 서열은 NCBI Gene ID: 28755; Ensembl: ENSG00000277734에서 이용가능하다. T 세포 수용체 Alpha Constant, TCRA, IMD7, TRCA 및 TRA는 TRAC에 대한 유전자 동의어이다.
- [0037] "TRBC"는 T-세포 수용체 β -사슬, 예를 들어 TRBC1 및 TRBC2를 지칭하는데 사용된다. "TRBC1" 및 "TRBC2"는 TRBC1 또는 TRBC2 유전자의 유전자 생성물인 T-세포 수용체 β -사슬을 인코딩하는 2개의 상동성 유전자를 지칭한다.

- [0038] 인간 야생형 TRBC1 서열은 NCBI Gene ID: 28639; Ensembl: ENSG00000211751에서 이용가능하다. T-세포 수용체 Beta Constant, V_segment Translation Product, BV05S1J2.2, TCRBC1 및 TCRB는 TRBC1에 대한 유전자 동의어이다.
- [0039] 인간 야생형 TRBC2 서열은 NCBI NCBI Gene ID: 28638; Ensembl: ENSG00000211772에서 이용가능하다. T 세포 수용체 Beta Constant, V_segment Translation Product 및 TCRBC2는 TRBC2에 대한 유전자 동의어이다.
- [0040] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "면역 반응"은 하나 이상의 면역계 반응(들), 예를 들어, 비자극된 대조군 면역계와 비교하여 면역계 세포, 예컨대, 비제한적으로 T 세포, B 세포, 자연 살해 세포, 단핵구, 호중구, 호산구, 호염기구, 비만 세포, 적혈구, 수지상 세포, 항원 제시 세포, 대식세포 또는 식세포의 증가된 생산 또는 활성을 지칭한다. 항원, 예를 들어 비제한적으로 병원체(미생물, 바이러스, 프리온, 진균 등), 알레르겐(먼지, 꽃가루, 집먼지진드기 등), 독소(화학물질, 약물 등) 또는 생리적 변화(고콜레스테롤혈증, 비만, 장기 이식 등)과 같은 외래 또는 자기-항원에 대한 면역계의 노출은 면역 반응을 야기할 수 있다. 면역 반응은 또한 GvHD에서 조절 줄기 세포 이식에 이은 숙주 조직의 면역 공격을 공여자 세포가 매개하는 반응을 포함할 수 있다. 면역 반응으로 인해 염증이 발생할 수 있다. 면역 반응은 항원, 예를 들어 외래 또는 자기 항원을 표적화하거나, 공격하거나, 제거하거나, 중화할 수 있다. 면역 반응은 바람직할 수도 있고 바람직하지 않을 수도 있다. 면역 반응은 급성 또는 만성일 수 있다. 면역 반응은 면역 반응이 일어나는 세포, 조직 또는 기관을 손상시킬 수 있다.
- [0041] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "자가면역 반응"은 예를 들어 대상체의 자신의 세포, 조직 또는 기관에 의해 생성된 자기-항원에 대한 하나 이상의 면역계 반응(들)을 지칭한다. 자가면역 반응은 적절한 대조군, 예를 들어 건강한 대조군과 비교하여 면역계 세포, 예컨대, 비제한적으로 T 세포, B 세포, 자연 살해 세포, 단핵구, 호중구, 호산구, 호염기구, 비만 세포, 적혈구, 수지상 세포, 항원 제시 세포, 대식세포 또는 식세포의 증가된 생산 또는 활성을 초래할 수 있다. 자가면역 반응은 염증, 예를 들어 지속된 염증을 초래하거나 자가면역 질환을 유발할 수 있다. 자가면역 반응은 자가면역 질환으로 이어질 수 있는 대상체의 자신의 세포, 조직 또는 기관에 의해 생성된 자기-항원을 표적화, 공격, 제거 또는 중화할 수 있다.
- [0042] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 면역 반응(들)을 "억제하는 것"은 적합한 대조군, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 조작된 T 세포로 처리되지 않거나 처리 이전의 대조군과 비교하여 하나 이상의 면역계 반응(들)의 수준, 예를 들어 면역계 세포의 생성 또는 활성을 감소시키거나 억제하는 것을 지칭한다. 면역 반응(들)을 "억제하는 것"은 적합한 대조군, 예를 들어 본 명세서에 기재된 조작된 T 세포로 처리되지 않거나 처리 이전의 대조군과 비교하여 면역계 세포의 감소된 생산 또는 활성을 지칭할 수 있다. 면역 반응을 "억제하는 것"은 면역 내성을 증가시키는 것을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 면역계 세포의 생산 또는 활성은 세포 계수, 예를 들어 림프구 계수 또는 비장 세포 계수; 세포 활성, 예를 들어 T 세포 검정; 또는 유전자 또는 단백질 발현, 예를 들어 바이오마커 발현에 의해 측정될 수 있으며; 여기서 생성 또는 활성은 적합한 대조군, 예를 들어 본 명세서에 기재된 조작된 T 세포로 처리되지 않거나 처리 이전의 대조군과 비교하여 검정의 검출의 수준이 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 이하로 감소된다.
- [0043] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "자가면역 질환" 또는 "자가면역 장애"는 대상체의 자신의 항원, 세포, 조직 또는 기관에 대한 병리학적 면역 반응을 특징으로 하는 병태를 지칭한다. 자가면역 질환 및 장애의 예는 췌양성 대장염, 크론병, 류마티스 관절염, 건선, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스 및 제1형 당뇨병을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 자가 또는 동종이게 용도를 갖는다.
- [0044] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "면역 장애"는 대상체에서 병리학적 또는 바람직하지 않은 면역 반응을 특징으로 하는 질환 또는 병태로 이해된다. 특정 실시형태에서, 면역 장애는 자가면역 질환이다. 특정 실시형태에서, 면역 장애는 GvHD이다. 특정 실시형태에서, 면역 장애를 가진 대상체는 면역 반응의 억제를 필요로 한다. 특정 실시형태에서, 면역 장애를 가진 대상체는 면역 내성에서 증가를 필요로 한다.
- [0045] "T 세포"는 항원에 대한 노출 이후 면역 반응에서 중심적인 역할을 한다. T 세포는 예를 들어, 줄기 세포로부터의 조작에 의해 또는 전환분화, 예를 들어 체세포를 재프로그래밍함에 의해 T 세포가 형성될 때 자연적으로 발생하거나 또는 비-자연적일 수 있다. T 세포는 세포 표면에 있는 T 세포 수용체의 존재에 의해 다른 림프구와 구별될 수 있다. 이 정의에는 헬퍼 CD4+ T 세포, 세포독성 CD8+ T 세포, 기억 T 세포 및 조절 CD4+ T 세포를 포함하는 통상의 적응 T 세포와 자연 살해 T 세포, 점막 연관된 불변 T 세포, 및 감마 델타 T 세포를 포함한 고유-유사 T 세포가 포함된다. 일부 실시형태에서, T 세포는 CD4+이다. 일부 실시형태에서, T 세포는 CD3+/CD4+이다.

- [0046] "조절 T 세포" 또는 "Treg"는 염증 및 자가면역을 포함하는 과도한 면역 반응(들)을 억제함에 의해 자가-내성에서 중심 역할을 하는 특화된 T 세포를 지칭한다. Treg는 예를 들어, Treg가 조작에 의해, 예를 들어, IFNG 및 TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운 및 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 적어도 하나의 서열(들)의 삽입에 의해 형성될 때 자연적으로 발생할 수 있거나 또는 비-자연적일 수 있다. 자연적으로 발생하는 Treg 또는 자연 Treg 또는 nTreg는 전형적으로 흉선에서 발생하고 과도한 면역 반응(들)을 억제하여 자가-내성을 촉진하는 기능을 하는 특화된 T 세포이다. 일부 실시형태에서, 통상의 T 세포 또는 통상의 T 세포군, 예를 들어, nTreg 세포의 존재에 대해 강화되지 않은 T 세포군과 같은 세포는 TNFA 및 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열을 변형함에 의해, 예를 들어, TNFA 및 IFNG를 인코딩하는 핵산 서열을 녹다운, 및 조절 T 세포의 표현형 특성 및 억제 기능을 나타내도록 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)의 세포 내로의 삽입에 의해 조작될 수 있고, 이들은 형질도입된 또는 "조작된" T 세포로 지칭될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형 및 TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 및 IL10 또는 CTLA4와 같은 이중 조절 T 세포 촉진 분자의 삽입을 포함한다. 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 내인성 유전자의 발현을 녹다운하는 변형은 게놈 서열에서 하나 이상의 삽입결실(indel) 또는 치환 돌연변이를 포함하거나 이로 구성될 수 있다.
- [0047] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "조절 T 세포 촉진 분자"는 면역억제 분자 및 Treg 전사 인자를 포함하는 통상의 T 세포의 조절 T 세포로의 전환을 촉진하는 분자를 지칭한다. 추가로, 조절 T 세포 촉진 분자는 또한 Treg-연관된 면역억제 분자 및 전사 인자를 포함하는, 통상의 T 세포에 조절 활성을 부여하는 분자를 지칭한다. 면역억제 분자의 예는 인터루킨-10(IL10), 세포독성 T-림프구 연관된 단백질 4(CTLA4), 형질전환 성장 인자 베타 1(TGFB1), 인돌아민 2,3-디옥시게나제 1(IDO1), 엑토뉴클레오시드 트리포스페이트 디포스포하이드롤라아제 1(ENTPD1), 5'-뉴클레오티다아제 엑토(NT5E), 인터루킨-22(IL22), 암피레굴린(AREG), 인터루킨-35(IL35), 류신 풍부 반복 함유 32(GARP), CD274 분자(CD274), 포크헤드 박스 P3(FOXP3), IKAROS 패밀리의 징크 핑거 2(IKZF2), 호산구증가증 가족성(EOS), 인터페론 조절 인자 4(IRF4), 림프구 인핸서 결합 인자 1(LEF1) 및 BTB 도메인 및 CNC 동족체 2(BACH2)를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 조절 T 세포 촉진 분자는 특정 조합, 예를 들어 IL10 및 CTLA4, ENTPD1 및 NT5E, 및 IL22 및 AREG로 사용될 수 있다. 특히, IL10 및 CTLA4 조합이 본 명세서에서 제공된다. 일부 실시형태에서, 면역억제 분자의 발현은 FoxP3, 헬리오스, Eos, IRF4, Lef1 또는 BACH2와 같은 전사 인자의 발현에 의해 촉진될 수 있다.
- [0048] 일부 실시형태에서, 통상의 T 세포는 게놈에서 서열을 변형, 삽입 또는 결실하도록 조작될 수 있고, "조작된" T 세포는 자연 조절 T 세포의 하나 이상의 표현형 특성 및 억제 기능을 나타낸다. 예를 들어, "조작된" T 세포는 하기 실시예 2 및 3에 제공된 바와 같이 혼합 림프구 반응 검정에서 억제 활성을 나타내거나, 바람직하게는 하기 실시예 2 및 3에 제시된 마우스 모델에서 바람직하게는 통계적으로 유의미한 방식으로 이식편대숙주 질환을 억제할 수 있다(또한, 예를 들어, Parmar 등, Ex vivo fucosylation of third-party human regulatory T cells enhances anti-graft-versus-host disease potency in vivo, Blood 125(9) (2015) 참조). 일부 실시형태에서, "조작된" T 세포는 조절 T 세포 촉진 분자에 대한 코딩 서열의 삽입 및 변형, 예를 들어 전-염증성 사이토카인, 예를 들어 IFNG 및 TNFA 둘 모두의 발현의 녹다운으로 변형된 통상의 T 세포이다. 일부 실시형태에서, 조작을 위한 출발 T 세포군은 자연 Treg의 존재에 대해 풍부하지 않으며, 예를 들어 출발 T 세포군은 20% 미만의 자연 Treg를 갖는다.
- [0049] 본 명세서에 사용된 바와 같이 "항-염증성" 분자, 예를 들어 사이토카인은 본 명세서에 기재된 바와 같은 면역 반응을 증가시키고, 예를 들어 용량 반응 방식으로 실시예 2 및 3에 제시된 이식편대숙주 질환의 마우스 모델에서 Treg의 효능을 감소시킨다. 항-염증성 분자의 예는 IFNG, TNFA, IL17A, IL6, IL2, 퍼포린 1(PRF1), 그랜자임 A(GZMA), 그랜자임 B(GZMB)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "표적화 수용체"는 표적 부위, 예를 들어 유기체 내의 특정 세포 또는 조직에 대한 세포의 결합을 허용하기 위해 세포, 예를 들어 T 세포의 표면 상에 존재하는 수용체를 지칭한다. 표적화 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), T-세포 수용체(TCR) 및 단백질의 세포의 수용체 부분의 결합 시 T 세포를 활성화할 수 있는 내부 시그널링 도메인에서 적어도 막관통 도메인을 통해 작동가능하게 연결된 세포 표면 분자에 대한 수용체, 예를 들어 점막 어드레신 세포 부착 분자-1(MadCAM-1), TNFA, CEA 세포 부착 분자 6(CEACAM6), 혈관 세포 부착 분자 1(VCAM1), 시트룰린화된 비멘틴, 미엘린 염기성 단백질(MBP), MOG(미엘린 희소돌기아교세포 당단백질), 단백질질 단백질 1(PLP1), CD19 분자(CD19), CD20 분자(CD20), TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 17(TNFRSF17), 용질 운반체 패밀리의 2 구성원 2(SCL2A2), 글루타메이트 데카르복실라제(GAD2), 데모

글레인 3(DSG3) 및 MHC 클래스 I HLA-A(HLA-A*02)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0051]

본 명세서에서 사용된 바와 같이 "키메라 항원 수용체"는 세포의 항원 인식 도메인, 예를 들어 scFv, VHH, 나노바디를 지칭하고; 항원이 결합될 때 T 세포를 활성화시키는 세포내 시그널링 도메인에 작동가능하게 연결된다. CAR은 항원 인식 도메인, 세포외 힌지 영역, 막관통 도메인 및 세포내 T-세포 시그널링 도메인의 4개 영역으로 구성된다. 이러한 수용체는 당업계에서 잘 알려져 있다(예를 들어, WO2020092057, WO2019191114, WO2019147805, WO2018208837을 참조하며, 이들 각각의 내용의 상응하는 부분은 본 명세서에 참조로 포함됨). 어댑터 분자를 통해 표적 세포에 대한 면역 세포의 결합을 촉진하는 역전된 범용 CAR(예를 들어, WO2019238722를 참조하며, 이의 내용은 전문이 본 명세서에 포함됨)이 또한 고려된다. CAR은 항체가 개발될 수 있는 임의의 항원에 표적화될 수 있고 전형적으로 표적화되어지는 세포 또는 조직의 표면 상에 표시된 분자로 지향된다. 일부 실시형태에서, CAR은 조작된 T 세포를 위장관으로 표적화할 수 있으며, 예를 들어 CAR은 MAdCAM-1을 표적화한다. 일부 실시형태에서, CAR은 조작된 T 세포를 내피 세포를 포함하는 조직으로 표적화할 수 있으며, 예를 들어 CAR은, 예를 들어 크론병 및 다발성 경화증과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 VCAM-1을 표적화한다. 일부 실시형태에서, CAR은 조작된 T 세포를 내피 세포에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 CAR은, 예를 들어 크론병과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 CEACAM6을 표적화한다. 일부 실시형태에서, CAR은 조작된 T 세포를 pre-B 세포에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 CAR은, 예를 들어 다발성 경화증 및 전신성 홍반성 루푸스 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 CD19를 표적화한다. 일부 실시형태에서, CAR은 조작된 T 세포를 B 림프구에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 CAR은, 예를 들어 다발성 경화증 및 전신성 홍반성 루푸스와 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 CD20을 표적화한다. 일부 실시형태에서, CAR은 조작된 T 세포를 염증 조직에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 CAR은, 예를 들어 류마티스관절염, 염증성 장 질환, 궤양성 대장염 또는 크론병과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 TNFA를 표적화한다. 일부 실시형태에서, CAR은 조작된 T 세포를 염증 조직에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 CAR은, 예를 들어 염증성 장 질환, 궤양성 대장염 또는 크론병과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 TGF- β 1을 표적화한다. 일부 실시형태에서, CAR은 조작된 T 세포를 신경 조직에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 CAR은, 예를 들어 다발성 경화증과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 MBP, MOG 또는 PLP1을 표적화한다. 일부 실시형태에서, CAR은 조작된 T 세포를 성숙한 B 림프구를 포함하는 조직에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 CAR은, 예를 들어 전신성 홍반성 루푸스와 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 TNFRSF17을 표적화한다. 일부 실시형태에서, CAR은 조작된 T 세포를 활막 조직에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 CAR은, 예를 들어 류마티스관절염과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 시트룰린화된 비멘틴을 표적화한다. 일부 실시형태에서, CAR은 디펩티딜 펩티다제 유사 6(DPP6), 용질 운반체 패밀리 2 구성원 2(SCL2A2), 글루타메이트 데카르복실라제(GAD2), 데모글레인 3(DSG3) 또는 MHC 클래스 I HLA-A(HLA-A*02)를 표적화한다. 추가의 CAR 표적, 예를 들어 염증성 항원은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, WO2020092057A1을 참조하고, 그 내용은 그 전체가 본 명세서에 포함된다.

[0052]

본 명세서에 사용된 바와 같이, "치료"는 대상체에서 질환 또는 장애에 대한 치료제의 임의의 투여 또는 적용을 지칭하고, 질환의 억제, 이의 발달 저지, 질환의 하나 이상의 증상 완화, 질환의 치유, 질환의 하나 이상의 증상의 예방 또는 질환의 하나 이상의 증상의 재발 방지를 포함한다. 자가면역 또는 염증 반응 또는 장애를 치료하는 것은 질환-특이적 증상의 경감을 초래하는 특정한 장애와 연관된 염증을 완화시키는 것을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 조작된 T 세포로의 치료는 추가적인 치료제, 예를 들어, 항-염증제, 면역억제제, 또는 자가면역 장애의 치료를 위한 생물학적 제제, 예를 들어 레미케이드, 휴미라 전, 후 또는 이와 조합하여 사용될 수 있다.

[0053]

"프로모터"는 조절 영역이 연결된 유전자의 발현을 조절하는 조절 영역을 지칭한다.

[0054]

"폴리뉴클레오타이드" 및 "핵산"은 통상의 RNA, DNA, 혼합 RNA-DNA, 및 이의 유사체인 중합체를 포함한, 백본을 따라 함께 연결된 질소 헤테로시클릭 염기 또는 염기 유사체를 갖는 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유사체를 포함하는 다량체 화합물을 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 핵산 "백본"은 하나 이상의 당-포스포디에스테르 연결, 펩티드-핵산 결합("펩티드 핵산" 또는 PNA; PCT 번호 WO 95/32305), 포스포로티오에이트 연결, 메틸 포스포네이트 연결, 또는 이의 조합을 포함하는 다양한 연결로 구성될 수 있다. 핵산의 당 모이어티는 리보스, 데옥시리보스, 또는 예를 들어 2' 메톡시 또는 2' 할라이드 치환 같은 치환을 갖는 유사한 화합물일 수 있다. 질소 염기는 통상적인 염기(A, G, C, T, U), 이의 유사체(예를 들어, 5-메톡시우리딘, 슈도우리딘 또는 N1-메틸 슈도우리딘 등과 같은 변형된 우리딘); 이노신; 퓨린 또는 피리미딘의 유도체(예를 들어, N⁴-메틸 데옥시구아노신, 테아자- 또는 아자-퓨린, 테아자- 또는 아자-피리미딘, 5 또는 6 위치에 치환기가 있는 피리미딘 염기(예를

들어, 5-메틸시토신), 2, 6 또는 8 위치의 치환기가 있는 퓨린 염기, 2-아미노-6-메틸아미노퓨린, 0⁶-메틸구아닌, 4-티오-피리미딘, 4-아미노-피리미딘, 4-디메틸하이드라진-피리미딘 및 0⁴-알킬-피리미딘일 수 있다; 미국 특허 번호 5,378,825 및 PCT 번호 WO 93/13121). 일반적인 논의는 *The Biochemistry of the Nucleic Acids* 5-36, Adams 등, ed., 11th ed., 1992를 참조한다). 핵산은 백본이 중합체의 위치(들)에 대해 질소성 염기를 포함하지 않는 하나 이상의 "비염기성" 잔기를 포함할 수 있다(미국 특허 번호 5,585,481). 핵산은 통상적인 RNA 또는 DNA 당, 염기 및 연결만을 포함할 수 있거나, 통상적인 구성요소 및 치환(예를 들어, 2' 메톡시 연결을 갖는 통상적인 염기 또는 통상적인 염기 및 하나 이상의 염기 유사체 둘 모두를 함유하는 중합체) 둘 모두를 포함할 수 있다. 핵산은 상보성 RNA 및 DNA 서열에 대한 혼성화 친화성을 증강시키는 RNA 모방 당 형태에 잠긴 바이시클릭 푸라노스 단위를 가진 하나 이상의 LNA 뉴클레오타이드 단량체를 함유하는 유사체인 "잠금 핵산"(LNA)을 포함한다(Vester and Wengel, 2004, *Biochemistry* 43(42):13233-41). RNA와 DNA는 서로 다른 당 모이머를 가질 수 있으며, RNA에 우라실 또는 이의 유사체 및 DNA에 티민 또는 이의 유사체의 존재에 의해서 다를 수 있다.

[0055] "가이드 RNA", "gRNA" 및 간단히 "가이드"는 가이드 서열, 예를 들어 crRNA(CRISPR RNA로도 알려짐)를 포함하는 가이드 또는 crRNA와 trRNA(tracrRNA로도 알려짐)의 조합을 지칭하기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. crRNA 및 trRNA는 단일 RNA 분자(단일 가이드 RNA, sgRNA) 또는, 예를 들어, 2개의 개별 RNA 분자(이중 가이드 RNA, dgRNA)로 회합될 수 있다. "가이드 RNA" 또는 "gRNA"는 각각의 유형을 지칭한다. trRNA는 자연적으로-발생하는 서열이거나, 자연적으로-발생하는 서열과 비교하여 변형 또는 변이를 갖는 trRNA 서열일 수 있다. sgRNA 또는 dgRNA와 같은 가이드 RNA는 본 명세서에 기재된 변형된 RNA를 포함할 수 있다.

[0056] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "가이드 서열"은 표적 서열에 상보성이고 RNA-가이드된 DNA 결합체에 의한 결합 또는 변형(예를 들어, 절단)을 위해 가이드 RNA를 표적 서열로 지향하도록 기능하는 가이드 RNA 내의 서열을 지칭한다. "가이드 서열"은 또한 "표적화 서열" 또는 "스페이서 서열"로 지칭될 수 있다. 가이드 서열은, 예를 들어 스트렙토코커스 피오게네스(즉, Spy Cas9) 및 관련된 Cas9 동족체/이중상동유전자의 경우 길이가 20 염기 쌍일 수 있다. 더 짧거나 더 긴 서열, 예를 들어 15-, 16-, 17-, 18-, 19-, 21-, 22-, 23-, 24- 또는 25-뉴클레오타이드 길이가 또한 가이드로서 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서 가이드 서열은 표적에 상보성인 서열의 적어도 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 연속 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 표적 서열은 예를 들어 유전자에 또는 염색체 상에 있고 가이드 서열에 대해 상보성이다. 일부 실시형태에서, 가이드 서열과 이의 상응하는 표적 서열 사이의 상보성 또는 동일성의 정도는 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 가이드 서열은 서열의 적어도 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 연속 뉴클레오타이드에 대해 약 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 가이드 서열 및 표적 영역은 100% 상보성이거나 동일할 수 있다. 다른 실시형태에서, 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 초과인 염기쌍이다. 일부 실시형태에서, 가이드 서열 및 표적 영역은 1-4개의 미스매치를 함유할 수 있거나, 가이드 서열이 적어도 17, 18, 19, 20 또는 그 초과인 뉴클레오타이드를 포함하는 경우 완전히 상보성일 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 서열 및 표적 영역은 가이드 서열이 20개의 뉴클레오타이드를 포함하는 경우 1, 2, 3 또는 4개의 미스매치를 함유할 수 있다.

[0057] RNA-가이드된 DNA 결합체에 대한 표적 서열은 RNA-가이드된 DNA 결합체에 대한 핵산 기질이 이중 가닥 핵산이므로, 게놈 DNA의 양성 및 음성 가닥 둘 모두(즉, 주어진 서열과 서열의 역보체)를 포함한다. 따라서, 가이드 서열이 "표적 서열에 상보성"이라고 하는 경우, 가이드 서열은 가이드 RNA가 표적 서열의 역보체에 결합하도록 지향할 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 가이드 서열이 표적 서열의 역보체에 결합하는 경우, 가이드 서열은 가이드 서열에서 U가 T로 치환된 것을 제외하고는 표적 서열(예를 들어, PAM을 포함하지 않는 표적 서열)의 특정 뉴클레오타이드와 동일하다.

[0058] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "RNA-가이드된 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 다르다. RNA-가이드된 DNA-결합체라는 용어는 또한 이러한 폴리펩티드를 인코딩하는 핵산을 포함한다. 예시적인 RNA-가이드된 DNA 결합체는 Cas 클레아바아제/닉카아제를 포함한다. 예시적인 RNA-가이드된 DNA-결합체는 예를 들어, FokI 클레아바아제 도메인과의 융합을 통해 DNA 절단을 허용하도록 변형된 경우, 이의 불활성화된 형태("dCas DNA-결합체")를 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "Cas 뉴클레아제"는 Cas 클레아바아제 및 Cas 닉카아제를 포함한다. Cas 클레아바아제 및 Cas 닉카아제는 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. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "클래스 2 Cas 뉴클레아제"는 RNA-가이드된 DNA 결합 활성을 갖는 단일 사슬 폴리펩티드다. 클래스 2 Cas 뉴클레아제는 추가로 RNA-가이드된 DNA 클레아바아제 또는 니카아제 활성을 갖는 클래스 2 Cas 클레아바아제/니카아제(예를 들어, H840A, D10A 또는 N863A 변이체), 및 클래스 2 dCas DNA-결합제를 포함하며, 여기서 클레아바아제/니카아제 활성은, 예를 들어 이들 작용제가 DNA 절단을 허용하도록 변형되거나 C에서 T로의 데아미나제 또는 A에서 G로의 데아미나제 활성으로 변형된 경우 불활성화된다). 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합제는 데아미나제 영역 및 RNA-가이드된 DNA 니카아제, 예컨대 Cas9 니카아제를 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 변형을 포함한다. Cpf1 단백질, Zetsche 등, *Cell*, 163:1-13 (2015)은 또한 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인을 함유한다. Zetsche의 Cpf1 서열은 그 전체가 참조로 포함된다. 예를 들어, Zetsche, 표 S1 및 S3 참조. 예를 들어, Makarova 등, *Nat Rev Microbiol*, 13(11): 722-36 (2015); Shmakov 등, *Molecular Cell*, 60:385-397 (2015) 참조. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, RNA-가이드된 DNA-결합제(예를 들어, Cas 뉴클레아제, Cas9 뉴클레아제 또는 *S. 피코게네스* Cas9 뉴클레아제)의 전달은 폴리펩티드 또는 mRNA의 전달을 포함한다.

[0059] Cas9 분자의 예시적인 뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열이 아래에 제공된다. 대안적인 자연적으로 발생하는 변이체를 포함하는 Cas9 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 대안적인 뉴클레오티드 서열을 동정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 본 명세서에 제공된 Cas9 핵산 서열, 아미노산 서열 또는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열 중 어느 것에 대해 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열이 또한 고려된다.

[0060] Cas9에 대한 예시적인 개방 판독 프레임

[illegible]

[0063] MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRIICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLRESFLVEEDKKHERHPIFGNI VDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLA LAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASAQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKITLDFLKSDFGANRNFQMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVDELVKVMGRHKPENIVIEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIIEGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDV DHI V PQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNPVSEEVVKMKMNYWRQLLNAKLI TQRKFDNLTKAERGGSELDAKAGFIK RQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVI TLKSKLVSDFRKDFQFYKVIENNYHHAHDAYLNAVVG TALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRK MIAKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNI VKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKVEKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLFELENGRKRM LASAGELQKGNELALPSKYVNFYLLASHYEKLGKSPEDNEQQLFVEQHKHYLDEIEQI SEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGDGGGSPKKRRKV (서열번호: 115)

[0065] AUGGACAAGAAGUACAGCAUCGGAUCGGAACGGAACAGCAUCGGAACGGAACAGCAUCACAGACGAAUAACAGGUCCGAGCAAGAAGUUAAGGUUCUGGGAAACACAGACAGACACAGCAUCAAGAAGAACCUGAUCGGAGCACUGCUGUUCGACAGCGGAGAAACAGCAGAAGCAACAAGACUGAAGAGAACAGCAAGAAGAAGAUACACAAGAAGAAAGACAGAAUCUGCUACCCUGCAGGAAAUCUUCAGCAACGAAUUGGCAAAGGUCCAGCAGCAGCUUCUCCACAGACUGGAAAGAAAGCUCCUGGUGCAAGAAGACAAGAAGCACGAAAGACACCCGAUCUUCGGAACACUUCGUCGACGAAAGUCGCAUACCACGAAAAGUACCCGACAAUCUACACCUGAGAAAAGAAGCUGGUCGACAGCACAGACAAGGCAGACUGAGACUGAUCUACCCUGGCACUGGCACACAUGAUAAGUUCAGAGGACACUCCUGAUCGAAGGAGACCUGAACCCGGACAACAGCGACGUCGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUCCAGACAUAACAACCAGCUGUUCGAAGAAAACCCGAUCAACGCAAGCGGAGUCGACGCAAAGGCAAUCCUGAGCGCAAGACUGAGCAAGAGCAGAAGACUGGAAAACCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAAAAGAAGAACGGACUGUUCGGAAACCUGAUCGCACUGAGCCUGGGACUGACACCGAACUUAAGAGCAACUUCGACCUGGCAGAAAGACGCAAAGCUGCAGCUGAGCAAGGACACAUAACGACGACACCUGGACAACCUGCUGGCACAGAUCCGAGACCAGUACGCGAGACCUGUUCUGGCAGCAAAGAACCUAGAGCAGACGCAAUCCUGCUGAGCGACAUCUGAGAGUCAACACAGAAUACAAAGGCACCGCUGAGCGCAAGCAUGAUAAGAGAUACGACGAACACCACCAGGACCUGACACUGCUGAAGGCACUGGUCAGACAGCAGCUGCCGAAAAGUACAAGGAAUUCUUCUUCGACCAGAGCAAGAACGGAUACGCGAGGAUACAUCGACGGAGGAGCAAGCCAGGAAGAAUUCUACAAGUUAUCAAGCCGAUCCUGGAAAAGAUGGACGGAACAGAAAGACUUCUGGUAAGCUGAACAGAGAAGACCUGCUGAGAAAAGCAGAGAACAUUCGACAACGGAGCAUCCCGCACCCAGAUCCACCUGGGAGAACUGCACGCAAUCCUGAGAAGACAGGAAGACUUCUACCCGUUCCUGAAGGACAACAGAGAAAAGAUCGAAAAGAUCCUGACAUCAGAAUCCCGUACUACGUCGGACCGCUGGCAAGAGGAAACAGCAGAUUCGCAUGGAUGACAAGAAAGAGCGAAGAAACAUCACACCGUGGAACUUCGAAGAAGUCGUCGACAAGGGAGCAAGCGCACAGAGCUUCAUCGAAAGAAUGACAAAACUUCGACAAGAACCUGCCGAACGAAAAGGUCCUGCCGAAGCACAGCCUGCUGUACGAUACUUCACAGUCUACAACGAACUGACAAAGGUCAAGUACGUCACAGAAGGAAUGAGAAAGCCGGCAUCCUGAGCGGAGAACAGAAGAAGGCAUUCGUCGACCUGCUGUUAAGACAAACAGAAAGGUCACAGUCAAGCAGCUGAAGGAAGACUACUUAAGAAGAUCCGAUUGCUUCGACAGCGUGAAAUCAGCGGAGUCGAAGACAGAUUCAACGCAAGCCUGGGAAACAUACCACGACCUGCUGAAGAUCAUCAAGGACAAGGACUCCUGGACAACGAAGAAAACGAAGACAUCCUGGAAGACAUCGUCCUGACACUGACACUGUUCGAAGACAGAGAAAUGAUCGAAGAAAAGACUGAAGACAUAACGCACACCUGUUCGACGACAAGGUCAUGAAGCAGCUGAAGAGAAGAAGAUACACAGGAUGGGGAAGACUGAGCAGAAAAGCUGAUCAACGGAUUCAGAGACAAGCAGAGCGGAAAAGACAACUCCUG

GACUCCUGAAGAGCGACGGAUUCGCAAACAGAAACUUCAGCAGCUGAUCCACGACGACAGCCUGACAUUCAAGGAAGACAUCCAGAAGGCACAGGUCAGC
GGACAGGGAGACAGCCUGCAGCAACACAUCCGAAACCCUGGAGAGCCCGGCAUCAAAGGGAAUCCUGCAGACAGUCAAGGUCGUCGACGAACUGGUC
AAGGUCAUGGGAAGACACAAGCCGAAAAACUUCGUAUCGAAUUGGCAAGAGAAAACAGACAACACAGAAGGGACAGAAGAACAGCAGAGAAAGAAUAGAG
AGAAUCGAAGAAGGAUCAAAGAACUGGGAAGCCAGAUCCUGAAGGAACACCCGUGCGAAAAACACAGCUGCAGAACGAAAAGCUGUACCUUACUACCUG
CAGAACGGAAGAGACAUUGACUGCAGCAGGAACUGGACAUCAACAGACUGAGCGACUACGACGUCGACCACAUUCGUCCCGCAGAGCUCCUGAAGGACGAC
AGCAUCGACAACAAGGUCCUGACAAGAAGCGACAAGAACAGAGGAAAGAGCGACAACGUCCCGAGCGAAGAAGUCGUAAGAAGUAAGAACUACUGGAGA
CAGCUGCUGAACGCAAAGCUGAUACACAGAGAAAGUUCGACAACCCUGACAAGGCAGAGAGAGGAGGACUGAGCGAACUGGACAAGGCAGGAUUAUCAAG
AGACAGCUGGUGCAAACAAGACAGAUACAAAGCAGCUGCGACAGAUCCUGGACAGCAGAAUGAACACAAAGUACGACGAAAACGACAAGCUGAUACAGAGAA
GUCAAGGUAUCACACUGAAGAGCAAGCUGGUCAGCGACUUCAGAAAGGACUUCAGUUCUACAAGGUCAGAGAAUACAACUACCCACGACACGAC
GCAUACCUAAGCAGCUGCUGGAACAGCACUGAUCAAGAAGUACCCGAGCUGGAAAGCGAAUUCGUCUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUCAGAAAG
AUGAUCGCAAAGAGCGAACAGGAAUUCGAAAGGCAACAGCAAAGUACUUCUUCUACAGCAACAUCAUGAACUUCUACAAGACAGAAUACACUGGCAAAAC
GGAGAAUACAGAAAGAGACCGCUGAUUGAAACAAACGGAGAAACAGGAGAAUUCGUUGGGACAAGGGAAGAGACUUCGCAACAGUCAGAAAGGUCCUGAGC
AUGCCGAGGUAACAUCGUAAGAAGACAGAAGUCCAGACAGGAGGAUUCAGCAAGGAAAGCAUCCUGCGAAGAGAAACAGCGACAAGCUGAUCCGAAAGA
AAGAAGGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGACAGCCCGACAGUCGCAUACAGCGUCCUGGUCGUCGCAAGGUCGAAAAGGGAAGAGCAAGAAG
CUGAAGAGCGUAAGGAACUGCUGGGAUACAAUACUGGAAAGAGCAGCUUCGAAAGAACCCGAGCAGUUCUCCUGGAAGCAAAGGGAUACAAGGAAGUC
AAGAAGGACCGUAUCAUACAGCUGCCGAAGUACAGCCUUCUGAACUGGAAAACGGAAAGAGAAUGCUGGCAAGCGCAGGAGAACUGCAGAAGGGAAC
GAACUGGCACUGCCGAGCAAGUACGUAACUUCUGUACCGGCAAGCCACUACGAAAGCUGAAGGGAAGCCCGGAAGACAACAGAACAGAGCAGCUGUUC
GUCGAACAGCACAGCACUACCGGACGAAUACUGAACAGAUACAGCGAAUUCAGCAAGAGAGUACUCCUGGACAGCGAAACCGGACAAAGGUCCUGAGC
GCAUACAACAAGCACAGAGACAAGCCGUAUCAGAGAACAGGCAGAAAACAUAUCCACCGUUCACACUGACAAACCGGGAGCACCAGCAGCAUUAAGUAC
UUCGACACAACAUCGACAGAAAGAGAUACACAAGCACAAGGAAGUCCUGGACGCAACACUGAUCCACCAGAGCAUCACAGGACUGUACGAAACAAGAAUC
GACCUGAGCCAGCUGGGAGGAGACGGAGGAGGAAGCCGGAAGAAGAGAAAGGUCUAG (서열번호: 116)

[0066] Hibit 태그를 갖는 Cas9에 대한 예시적인 개방 판독 프레임

[0067] AUGGACAAGAAGUACUCCAUCCGCCUGGACAUCCGCCACCAACUCCUGGGGUGGGCCGUGAUACCCGACGAGUACAAGGUGCCCUCCAAGAAGUUAAGGUG
CUGGGCAACACCGACCGGACUCCAUCAAGAAGAACCUGAUCCGGCGCCUGCUGUUCGACUCCGGCGAGACCGCGAGGCCACCCGGCUGAAGCGGACCGCC
CGGCGGCGGUACACCCGGCGGAAGAACCUGAUCCUGCAGGAGAUUCUUCUCCACGAGAUUGGCCAAGGUGGACGACUCCUUCUCCACCGGCGUGGAG
GAGUCCUUCUGGUGGAGGAGGACAAGAAGCAGAGCGGCACCCAUUCUGGCAACAUCCUGGACGAGGUGGCCUACCACGAGAAGUACCCACCAUCUAC
CACCUGCGGAAGAAGCUGGUGGACUCCACCGACAAGGCCACCGUGCGGUGAUUCUACCGGCCUGGCCACAUGAUCAAGUUCGGGGCCACUCCUGAUUC
GAGGGCGACCUGAACCCCGACAACUCCGACGUGGACAAGCUGUUAUCCAGCUGGUGCAGACCUACAACCAGCUGUUCGAGGAGAACCCCAUACGCCUCC
GGCGUGGACGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGGUGUCCAAGUCCGGCGGUGGAGAACCUGAUCCGCCAGCUGCCCGGCGAGAAGAAGAACGGCCUGUUC
GGCAACCUGAUCCGCCUGUCCUGGGCCUGACCCCAACUUAAGUCCAACUUCGACCUGGCGGAGGACGCCAAGCUGCAGCUGUCCAAGGACACCUACGAC
GACGACCUGGACAACCUGUGGCCAGAUCCGCGACCCAGUACGCCGACCUGUUCUGGCCGCCAAGAACCUGUCCGACGCCAUCCUGUGUCCGACAUCCUG
CGGUGAACACCGAGAUCAACAGGCCCCCGUGUCCGCCUCCAUGAUCAAGCGGUACGACGAGCACCACAGGACCUGACCCUGUAAGGCCUGGUGCGG
CAGCAGCUGCCCGAGAAGUACAAGGAGAUUCUUCGACCAGUCCAAGAACGGCUACGCCGGCUACAUCGACGCGGCCGCCUCCAGGAGGAGUUCUACAAG
UUAUCAAGCCCAUCCUGGAGAAGAUGGACGCGACCCGAGGAGCUGCUGUGAAGCUGAACCGGGAGGACCUGCUGCGAAGCAGCGGACCUUCGACAACGGC
UCCAUCGCCACAGAUCCACCGGCGAGCUGACGCCAUCCUGCGCGGAGGAGGACUUCUACCCCUUCUGAAGGACAACCGGGAGAAGAUCCGAGAAG
AUCCUGACCUUCGGAUCCCUACUACGUGGGCCCCUGGCCCGGGGAACUCCGGUUCGCCUGGAUAGCCGGAAGUCCGAGGAGACCAUACCCCCUGG
AACUUCGAGGAGGUGGUGACAAGGGCGCCUCCGCCAGUCCUUAUCGAGCGGAUGACCAACUUCGACAAGAACCUGCCCAACGAGAAGGUGUGCCCAAG
CACUCCUGCUGUACGAGUACUACCGUGUACAACGAGCUGACCAAGGUGAAGUACGUGACCGAGGGCAUCCGGAAGCCCGCCUCCUGUCCGGCGAGCAG
AAGAAGGCCAUCCUGGACCUGUGUUAAGACCAACCGGAAGGUGACCGUGAAGGAGGACUACUUAAGAAGAUCCGAGUGCUUCGACUCCUGG
GAGAUUCGGCGUGGAGGACCGGUACAACGCCUCCUGGGACCUACCACGACCUCCUGAAGAUCAUACAAGGACAAGGACUCCUGGACAACGAGGAGAAC
GAGGACAUCCUGGAGGACAUUGUGUGACCCUGACCCUGUUCGAGGACCGGGAGAUGAUCGAGGAGCGGUGAAGACCUACGCCACCUUGUACGACGAAG
GUGAUGAAGCAGCUGAAGCGGCGGUGUACACCGGUGGGGCCGUGUCCCGGAAGCUGAUCAACGGCAUCCGGGACAAGCAGUCCGGCAAGACCAUCCUG
GACUCCUGAAGUCCGACGGCUUCGCCAACCGGAACUUAUCGAGCUGAUCCACGACGACUCCUGACCUUAAGGAGGACAUCCAGAAGGCCAGGUGUCC
GGCCAGGGGACUCCUGCAGGACAUCCGCCAACCGGCCGUGUCCCGGCCAUCAAGAAGGGCAUCCUGCAGACCGUGAAGGUGGUGGACGAGCUGGUG
AAGGUGAUGGGCCGACAAAGCCGAGAACUUCGUAUCGAGAUGGCCCGGGAGAACCAGACCCAGAGGGCCAGAAGAACUCCGGGAGCGGAUGAAG
CGGAUCGAGGAGGGCAUAAAGGAGCUGGGUCCAGAUCCUGAAGGAGACCCCGUGGAGAACCACCGAGCUGCAGAACGAGAAGCUGUACCUUACUACCUG
CAGAACGGCCGGGACAUUGACGUGGACAGGAGCUGGACAUCAACCGGUGUCCGACUACGACGUGGACCAUCUGUGCCCGAGUCCUCCUGAAGGACGAC
UCCAUCGACAACAAGGUGCUGACCCGUGCCGACAAGAACCAGGGCAAGUCCGACAACGUGCCUCCGAGGAGGUGGUGAAGAAGUAAGAACUACUGGCGG
CAGCUGCUGAACGCCAAGCUGAUACCCAGCGGAAGUUCGACAACCUAGCAAGGCCGAGCGGGCGGCCUUCGAGCUGGACAAGGCCGGCUUCAUAAAG
CGGACGUGGUGGAGACCCGGCAGAUACCAAGCAGCUGGCCAGAUCCUGGACUCCCGGAUGAACCAAGUACGACGAGAACGACAAGCUGAUCCGGGAG

GUGAAGGUGAUCACCCUGAAGUCCAAGCUGGUGUCCGACUUCGGAAGGACUCCAGUUCUACAAGGUGCGGGAGAUACAACUACCACCACGCCACGACGCCUACCUGAACGCCGUGGGGACCGCCUGAUCAGAAGUACCCCAAGCUGGAGUCCGAGUUCGUGUACGGGACUACAAGGUGUACGACGUGCGGAAGAUGAUCGCCAAGUCCGAGCAGGAGAUCCGCAAGGCCACCGCCAAGUACUUCUUCUACUCCAACAUCAGAACUUCUACAAGACCGAGAUACCCUGGCCAACGGCGAGAUCCGGAAGCGGCCUGAUCGAGACCAACGGCGAGACCGGCGAGAUCCUGUGGGACAAGGGCCGGGACUUCGCCACCGUGCGGAAGGUGCUGUCC AUGCCCCAGGUGAACAUCCUGAAGAAGACCGAGGUGCAGACCGGCGGCUUCUCCAAGGAGUCCAUCUGCCCAAGCGGAACUCCGACAAGCUGAUCGCCCGGAAGAAGGACUGGGACCCCAAGAAGUACGGCGGCUUCGACUCCCCACCGUGGCCUACUCCGUGCUGGUGGUGGCAAGGUGGAGAAGGGCAAGUCCAAGAAGCUGAAGUCCGUGAAGGAGCUGCUGGGCAUCACCAUACUGGAGCGGUCCUUCGAGAAGAACCCCAUCGACUCCUGGAGGCCAAGGGCUACAAGGAGGUGAAGAAGGACCUGAUCAUCAAGCUGCCCAAGUACUCCUGUUCGAGCUGGAGAACGGCGGAAGCGGAUGCUGGCCUCCGCGGCGAGCUGCAGAAGGGCAACGAGCUGGCCUGCCCUCAAGUACGUGAACUCCUGUACCGGCCUCCACUACGAGAAGCUGAAGGGCUCUCCCGAGGACAACGAGCAGAAGCAGCUGUUCGUGGAGCAGCACAAGCACUACCGGACGAGAUCAUCGAGCAGAUCCGAGUUCUCCAAGCGGGUGAUCCUGGCCGACGCCAACCGGACAAGGUGCUGUCCGCCUACAACAAGCACCGGACAAGCCAUCCGGGAGCAGGCCGAGAACAUAUCCACCGUUCACCCUGACCAACCGGGCGCCCCCGCCGCCUUAAGUACUUCGACACCACCAUCGACCGGAAGCGGUACACCUCCACCAAGGAGGUGCUGGACGCCACCCUGAUCCACCGAGUCCAUCACCGGCCUGUACGAGACCGGAUCGACCUGUCCAGCUGGGCGGCGACGGCGGCCUCCCCAAGAAGAAGCGGAAGGUGUCCGAGUCCGCCACCCCGAGUCCGUGUCCGGCUGGCGGUGUUAAGAAGAUCCUGA (서열번호: 117)

[0068]

Hibit 태그를 갖는 Cas9에 대한 예시적인 아미노산 서열

[0069]

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLRESFLVEEDKKHERHPIFGNIIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDSTDKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNGLFNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDYYDDLDNLLAQIGDQYADFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGLARGNSRFAMTRKSEETITPWNFEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHSLLEYEFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNKVTQKLEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREMIEERLKYAHLFDKVMKQLKRRRYTGWRLSRKLINGIRDKQSGKITLDFLKSDFGANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVEMARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYDVIDHIVPQSLKDDSIDNKVLTRSDKNRGSNDVPSEEVKKMKNYWRQLLNAKLIITQRKFDNLTKAERGGSELDKAGFIKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVIITLKSILVSDFRKDFQFYKVIENNYHHAHDAYLNAVVGITALIKKYPKLESEFYVDYKVDYVRKMIKSEQIEGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVAKEVGKSKKLKSVKELLGITIMERSSEFKNPIDFLEAKGYKEVKKDLIKLPKYSLEFENGRKMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLAASHYEKLGKSPEDNEQQLFVEQHKHYLDEIEIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHDKPIREQAENI IHLFTLTNLGAPAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGDGGSPKKKRKVSSEATPESVSGWRLFKKIS* (서열번호: 118)

[0070]

본 명세서에서 사용된 바와 같이, "리보핵단백질"(RNP) 또는 "RNP 복합체"는 RNA-가이드된 DNA 결합제, 예컨대 Cas 뉴클레아제, 예를 들어, Cas 클레아바제, Cas 니카아제 또는 dCas DNA 결합제(예를 들어, Cas9)와 함께 가이드 RNA를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는 Cas9와 같은 RNA-가이드된 DNA-결합제를 표적 서열로 안내하고, 가이드 RNA는 표적 서열과 혼성화하고 작용제는 표적 서열에 결합한다; 작용제가 클레아바제 또는 니카아제인 경우, 결합은 이중-가닥의 DNA 절단 또는 단일-가닥의 DNA 절단에 뒤따를 수 있다.

[0071]

본 명세서에서 사용된 바와 같이, 제1 서열은 제2 서열에 대한 제1 서열의 정렬이 그 전체적으로 제2 서열의 위치의 X% 이상이 제1 서열에 의해 매치되는 것을 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 대해 매치가 있다는 점에서 100% 동일성을 제공할 것이기 때문이다. RNA와 DNA 사이의 차이(일반적으로 우리딘을 티미딘으로 또는 그 반대로 교체) 및 변형된 우리딘과 같은 뉴클레오타이드 유사체의 존재는 관련 뉴클레오타이드(예컨대, 티미딘, 우리딘, 또는 변형된 우리딘)이 동일한 보체(예를 들어, 모든 티미딘, 우리딘 또는 변형된 우리딘에 대한 아데노신; 또 다른 예는 보체로서 구아노신 또는 변형된 구아노신을 갖는 시토신 및 5-메틸시토신)를 갖는 한 폴리뉴클레오타이드 간의 동일성 또는 상보성에서 차이에 기여하지 않는다. 따라서, 예를 들어, X가 슈도우리딘, N1-메틸 슈도우리딘 또는 5-메톡시우리딘과 같은 임의의 변형된 우리딘인 서열 5'-AXG는 둘 모두 동일한 서열(5'-CAU)에 대해 완벽하게 상보성이라는 점에서 AUG와 100% 동일한 것으로 간주된다. 예시적인 정렬 알고리즘은 당업계에 잘 알려진 Smith-Waterman 및 Needleman-Wunsch 알고리즘이다. 당업자는 정렬되어지는 주어진 서열의 쌍에 대해 알고리즘 및 매개변수 설정의 어떤 선택이 적절한지 이해할 것이다; 일반적으로 유사한 길이의 서열 및 아미노산에 대해 >50% 또는 뉴클레오타이드에 대해 >75%의 예상된 동일성의 경우, www.ebi.ac.uk 웹 서버에서 EBI가 제공하는 Needleman-Wunsch 알고리즘 인터

페이스의 기본 설정을 갖는 Needleman-Wunsch 알고리즘이 일반적으로 적합하다.

- [0072] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 제1 서열 염기의 염기 중 X%가 제2 서열과 쌍을 이루는 경우 제1 서열은 제2 서열에 "X% 상보성"인 것으로 간주된다. 예를 들어, 제1 서열 5'AAGA3'은 제2 서열 3'TTCT5'와 100% 상보성이고, 제2 서열은 제1 서열과 100% 상보성이다. 일부 실시형태에서, 제1 서열 5'AAGA3'은 제2 서열 3'TTCTGTGA5'에 100% 상보성인 반면, 제2 서열은 제1 서열에 50% 상보성이다.
- [0073] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "mRNA"는 본 명세서에서 전적으로 또는 우세하게 RNA 또는 변형된 RNA이고 폴리펩티드로 번역될 수 있는 개방 관독 프레임을 포함하는(즉, 리보솜 및 아미노-아실화된 tRNA에 의해 번역을 위한 기질로서 작용할 수 있는) 폴리뉴클레오티드를 지칭하는데 사용된다. mRNA는 리보솜 잔기 또는 이의 유사체, 예를 들어 2'-메톡시 리보솜 잔기를 포함하는 포스페이트-당 백본을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, mRNA 포스페이트-당 백본의 당은 본질적으로 리보솜 잔기, 2'-메톡시 리보솜 잔기, 또는 이의 조합으로 구성된다.
- [0074] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "삽입결실"은 표적 핵산에서 이중 가닥의 파손(DSB) 부위에서 삽입되거나 결실되는 다수의 뉴클레오티드로 구성된 삽입/결실 돌연변이를 지칭한다.
- [0075] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "표적 서열"은 gRNA의 가이드 서열에 대해 상보성을 갖는 표적 유전자 내의 핵산의 서열을 지칭한다. 표적 서열과 가이드 서열의 상호작용은 RNA-가이드된 DNA-결합체가 표적 서열 내에서(작용체의 활성화에 의존하여) 결합하고 잠재적으로 틈을 내거나 절단하도록 지시한다.
- [0076] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "폴리펩티드"는 야생형 또는 변이체 단백질(예를 들어, 돌연변이체, 단편, 융합체 또는 이의 조합)을 지칭한다. 변이체 폴리펩티드는 야생형 폴리펩티드의 적어도 또는 약 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 기능적 활성을 보유할 수 있다. 일부 실시형태에서, 변이체는 야생형 폴리펩티드의 서열에 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일하다. 일부 실시형태에서, 변이체 폴리펩티드는 과활성 변이체일 수 있다. 특정 예에서, 변이체는 야생형 폴리펩티드의 약 80% 내지 약 120%, 140%, 160%, 180%, 200%, 300%, 400%, 500% 또는 그 초과 기능적 활성을 보유한다.
- [0077] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "이종 유전자"는 세포 내에 외인성 공급원으로서 도입된(예를 들어, TCR 유전자좌를 포함하는 사이프 하버 좌와 같은 게놈 좌에 삽입된) 유전자를 지칭한다. 즉, 도입된 유전자는 삽입 부위에 관해 이종이다. 이러한 이종 유전자로부터 발현되는 폴리펩티드는 "이종 폴리펩티드"로 지칭된다. 이종 유전자는 자연적으로-발생하거나 조작될 수 있고, 야생형 또는 변이체일 수 있다. 이종 유전자는 이종 폴리펩티드를 인코딩하는 서열 이외의 뉴클레오티드 서열(예를 들어, 내부 리보솜 진입 부위)을 포함할 수 있다. 이종 유전자는 야생형 또는 변이체(예를 들어, 돌연변이체)로서 게놈에서 자연적으로 발생하는 유전자일 수 있다. 예를 들어, 세포가 관심있는 유전자(야생형 또는 변이체로서)를 함유하지만, 동일한 유전자 또는 이의 변이체가 예를 들어 고도로 발현되는 좌에서 발현을 위한 외인성 공급원으로서 도입될 수 있다. 이종 유전자는 또한 게놈에서 자연적으로 발생하지 않거나 게놈에서 자연적으로 발생하지 않는 이종 폴리펩티드를 발현하는 유전자일 수 있다. "이종 유전자", "외인성 유전자" 및 "이식유전자"는 상호교환적으로 사용된다. 일부 실시형태에서, 이종 유전자 또는 이식유전자는 외인성 핵산 서열을 포함하며, 예를 들어 핵산 서열은 수용체 세포에 대해 내인성이 아니다. 일부 실시형태에서, 이종 유전자 또는 이식유전자는 외인성 핵산 서열, 예를 들어 수용체 세포에서 자연적으로 발생하지 않는 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, 이종 유전자는 이종 유전자의 삽입 부위 및 그의 수용체 세포에 관해 이종일 수 있다.
- [0078] "사이프 하버" 좌는 유전자가 세포에 유의미한 해로운 영향 없이 삽입될 수 있는 게놈 내의 좌이다. 본 명세서에서 사용하기 위한 뉴클레아제(들)에 의해 표적화되는 사이프 하버 좌의 비-제한적인 예는 AAVS1(PPP1 R12C), TCR, B2M, 및 본 명세서에 기재된 녹다운을 위해 표적화된 임의의 좌, 예를 들어 TNFA, IFNG, IL17A 및 IL6 게놈 좌를 포함한다. 일부 실시형태에서, TRC 유전자, 예를 들어 TRAC 유전자와 같은 녹다운을 위해 표적화된 좌(locus) 또는 좌들(loci)에서의 삽입은 동종이게 세포에 유리하다. 다른 적합한 사이프 하버 좌는 당업계에 공지되어 있다.
- [0079] **II. 조성물**
- [0080] **A. 조작된 T 세포**
- [0081] IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운 및 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이종 서열(들)의 세포 안

으로의 삽입을 포함하도록 조작된 T 세포 및 T 세포군, 뿐만 아니라 이의 조성물 및 용도가 본 명세서에서 제공된다. 일부 실시형태에서, 조절 T 세포 촉진 분자는 IL10, CTLA4, TGFβ1, IDO1, ENTPD1, NT5E, IL22, AREG, IL35, GARP, CD274, FOXP3, IKZF2, EOS, IRF4, LEF1, 및 BACH2로부터 선택된다.

[0082] 일부 실시형태에서, T 세포 또는 T 세포군은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 각각 프로모터 서열의 제어 하에 2개 이상의 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열의 세포 안으로의 삽입을 포함하도록 조작된다. 예를 들어, 조작된 T 세포는 제1 프로모터의 제어 하에 있는 제1 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 제1 이중 서열 및 제2 프로모터의 제어 하에 있는 제2 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 제2 이중 서열을 포함한다. 제1 프로모터 및 제2 프로모터는 동일한 프로모터 또는 상이한 프로모터일 수 있다.

[0083] 일부 실시형태에서, T 세포 또는 T 세포군은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터의 제어 하에 있는 IL10을 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하도록 조작된다. 일부 실시형태에서, T 세포는 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어, 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어, 녹다운, 및 프로모터의 제어 하에 있는 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하도록 조작된다. 일부 실시형태에서, T 세포는 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 프로모터의 제어 하에 있는 IL10을 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입 및 프로모터의 제어 하에 있는 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하도록 조작된다.

[0084] 일부 실시형태에서, T 세포 또는 T 세포군은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터의 제어 하에 있고 자연적으로 발생하는 조절 T 세포(nTreg)의 적어도 하나의 억제 활성화, 예를 들어, 시험관내 또는 생체내 검정, 예를 들어 GvHD의 동물 모델에서 면역 반응 또는 바이오마커의 억제를 나타내는 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하도록 조작된다.

[0085] 일부 실시형태에서, 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)은 발현 작제물 안에 혼입된다. 일부 실시형태에서, 2개 이상의 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열은 2개 이상의 별개의 발현 작제물 안에 혼입될 수 있다. 예를 들어, 제1 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 제1 이중 서열은 제1 발현 작제물에 제공되고, 제2 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 제2 이중 서열은 제2 별도의 발현 작제물에 제공된다. 일부 실시형태에서, 발현 작제물은 에피솜 발현 작제물이다. 일부 실시형태에서, 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)은 게놈 내로 삽입되고, 예를 들어 표적화되거나 표적화되지 않은 삽입이다.

[0086] 일부 실시형태에서, 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)은 TCR 유전자좌, 예를 들어, TRAC 좌; TNF 유전자좌, IFNG 유전자좌, IL17A 좌, IL6 좌, IL2 좌, 또는 아데노-연관된 바이러스 통합 부위 1(AAVS1) 좌로부터 선택된 부위 안으로 삽입될 수 있다.

[0087] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포군은 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이 유전자 편집에 의해 TNFA 서열에서 변형, 예를 들어 녹다운을 포함하며, 여기서 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 내인성 TNFA 서열에 삽입, 결실 또는 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, TNFA의 발현(전장, 야생형 단백질 또는 mRNA)은 예를 들어 ELISA 또는 유세포분석에 의해 결정된 바와 같이, 예를 들어 TNFA 유전자가 변형되지 않은 적합한 대조군과 비교하여 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 검정의 검출 한계 미만까지 감소된다. 예를 들어, T 세포군에서의 TNFA 단백질 및 mRNA 발현에 대한 검정은 당업계에 공지되어 있고 본 명세서에서 제공된다(실시예 2 및 3 참조). 특정 실시형태에서, TNFA의 녹다운은 실시예 2 및 3에 제공된 방법에 의해 2500 pg/ml 이하의 TNFA 수준을 초래한다.

[0088] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포군은 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이 유전자 편집에 의해 IFNG 서열에서 변형, 예를 들어 녹다운을 포함하며, 여기서 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 내인성 IFNG 서열에 삽입, 결실 또는 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, IFNG의 발현(전장, 야생형 단백질 또는 mRNA)은 예를 들어 ELISA 또는 유세포분석에 의해 결정된 바와 같이, 예를 들어 IFNG 유전자가 변형되지 않은 적합한 대조군과 비교하여 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 검정의 검출 한계 미만까지 감소된다. 예를 들어, T 세포군에서의 IFNG 단백질 및 mRNA 발현에 대한 검정은 당업계에 공지되어 있고 본 명세서에서 제공된다

(실시예 2 및 3 참조). 특정 실시형태에서, IFNG의 녹다운은 실시예 2 및 3에 제공된 방법에 의해 300,000 pg/ml 이하의 IFNG 수준을 초래한다.

[0089] 일부 실시형태에서, 유전자, 예를 들어 TNFA 또는 IFNG의 발현을 녹다운시키는 변형은 삽입, 결실 또는 치환 중 하나 이상이다.

[0090] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가되는 바와 같이, 예를 들어 유전자 편집에 의한 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함하며, 여기서 세포의 적어도 30%, 35%, 바람직하게는 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열의 삽입을 포함한다. 일부 실시형태에서, 삽입된 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어 IL10은 예를 들어 ELISA 또는 유세포분석에 의해 결정된 바와 같이 예를 들어 조절 T 세포 촉진 분자 유전자가 삽입되지 않은 적합한 대조군과 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 단백질 또는 mRNA의 발현을 초래한다. 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가되는 바와 같이 유전자 편집에 의해 IL10을 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함하며, 여기서 세포의 적어도 30%, 35%, 바람직하게는 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%는 IL10을 인코딩하는 서열 또는 삽입을 포함한다. 일부 실시형태에서, IL10을 인코딩하는 삽입된 서열(들)은 적합한 대조군, 예를 들어 여기서 조절 T 세포 촉진 분자와 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 단백질 또는 mRNA의 발현을 초래한다. 예를 들어, T 세포군에서의 IL10 단백질 및 mRNA 발현에 대한 검정은 본 명세서에 기재되어 있고, 예를 들어, ELISA 및 유세포분석 같이 당업계에 공지되어 있다. 특정 실시형태에서, IL10의 수준은 실시예 2 및 3의 방법에 의해 측정시 적어도 300pg/ml이다.

[0091] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이, 예를 들어 유전자 편집에 의해 CTLA4를 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함하며, 여기서 세포의 적어도 30%, 35%, 바람직하게는 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 CTLA4를 인코딩하는 서열 또는 삽입을 포함한다. 일부 실시형태에서, CTLA4를 인코딩하는 삽입된 서열(들)은 적합한 대조군, 예를 들어 여기서 조절 T 세포 촉진 분자와 비교하여 통계적으로 유의하게 증가된 단백질 또는 mRNA의 발현을 초래한다. 예를 들어, T 세포군에서 CTLA4 단백질 및 mRNA 발현에 대한 검정은 본 명세서에 기재되어 있고, 예를 들어, ELISA 및 유세포분석 같이 당업계에 공지되어 있다.

[0092] 일부 실시형태에서, T 세포군은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열의 삽입을 포함하도록 조작된 T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, T 세포군에서 T 세포 중 적어도 40%, 45%, 바람직하게는 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%(예를 들어, 사용된 검정의 검출 한계 내에서)는 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이 이중 조절 T 세포 촉진 분자를 포함하도록 조작된다. 일부 실시형태에서, T 세포군에서 T 세포 중 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%는 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이 TNFA를 인코딩하는 서열(들)의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함하도록 조작된다. 일부 실시형태에서, T 세포군에서 T 세포 중 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%는 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이 IFNG를 인코딩하는 서열(들)의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함하도록 조작된다. 일부 실시형태에서, T 세포군에서 T 세포 중 적어도 40%, 45%, 바람직하게는 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%는 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이 이중 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열의 삽입을 포함하도록 조작된다. 일부 실시형태에서, T 세포군에서 T 세포 중 적어도 30%, 35%, 바람직하게는 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%는 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이 IL10을 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함하도록 조작된다. 일부 실시형태에서, T 세포군에서 T 세포 중 적어도 30%, 35%, 바람직하게는 적어도 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%는 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이 CTLA4를 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함하도록 조작된다.

[0093] 일부 실시형태에서, IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 인터루킨 17A(IL17A), 인터루킨 6(IL6), 인터루킨 2(IL2), 퍼포린 1(PRF1), 그랜자임 A(GZMA) 또는 그랜자임 B(GZMB)를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형을 추

가로 포함하고, 여기서 변형은 각각 IL17A, IL6, IL2, PRF1, GZMA 또는 GZMB의 발현을 녹다운시킨다.

- [0094] 일부 실시형태에서, T 세포 또는 T 세포군은 유전자 편집 시스템을 사용하여, 예를 들어 RNA-가이드된 DNA 결합제를 사용하여 조작된다. 일부 실시형태에서, T 세포는 CRISPR/Cas 유전자 편집 시스템을 사용하여 조작된다. 일부 실시형태에서, T 세포는 CRISPR/Cas 유형 II 유전자 편집 시스템을 사용하여, 예를 들어 Cpf1을 사용하여 조작된다. 일부 실시형태에서, T 세포는 CRISPR/Cas9 유전자 편집 시스템을 사용하여, 예를 들어 SpyCas9를 사용하여 조작된다. 예시적인 Cas9 서열이 본 명세서에 제공된다.
- [0095] 일부 실시형태에서, T 세포 또는 T 세포군은 IFNG 및 TNFA 유전자의 녹다운을 제공하도록 IFNG 및 TNFA 유전자 내의 부위를 특이적으로 표적화하는 가이드 RNA를 사용하여 조작된다. 예시적인 서열은 각각 열거된 가이드 서열의 표적의 게놈 좌표로서 표 1 및 2에 제공된다.
- [0096] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 RNA-가이드된 DNA 결합제와 함께 본 명세서에 개시된 가이드 RNA를 사용하여 녹다운된 IFNG 및 TNFA 유전자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 예를 들어 RNA-가이드된 DNA-결합제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)와 함께 본 명세서에 개시된 가이드 RNA를 사용하여 T 세포의 IFNG 및 TNFA 유전자 내에 파손(예를 들어, 이중 가닥 파손(DSB) 또는 단일 가닥 파손(닉))을 유도함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시된다. 방법은 예를 들어 염증 및 자가면역을 포함하는 면역 반응(들)을 억제하기 위한 세포 생성물의 제작에서 시험관내 또는 생체외에서 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 IFNG 유전자 내의 본 명세서에 개시된 부위에서 RNA-가이드된 DNA-결합제(예를 들어, Cas 뉴클레아제)에 의한 표적-특이적 절단을 매개한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 TNFA 유전자 내의 본 명세서에 개시된 부위에서 RNA-가이드된 DNA-결합제(예를 들어, Cas 뉴클레아제)에 의한 표적-특이적 절단을 매개한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는 상기 영역에 결합하거나 결합할 수 있는 가이드 서열을 포함한다는 것이 이해될 것이다.
- [0097] 표 1에 열거된 것으로부터 선택된 게놈 좌표에서 유전적 변형을 포함하는 조작된 T 세포 또는 T 세포군이 제공되며, 예를 들어 IFNG 내에서 임의의 열거된 게놈 범위 내에서 삽입결실 또는 치환 돌연변이를 포함하는 세포가 제공된다. 표 2에 열거된 것으로부터 선택된 게놈 좌표에서 유전적 변형을 포함하는 조작된 T 세포가 제공되며, 예를 들어 TNFA 내에서 임의의 열거된 게놈 범위 내에서 삽입결실 또는 치환 돌연변이를 포함하는 세포가 제공된다. 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 표 1에서 선택된 게놈 좌표 영역 내의 변형 및 표 2에서 선택된 게놈 좌표 영역에서 변형을 포함할 것이다.
- [0098] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표 1 또는 표 2의 서열 군으로부터 선택된 서열과 95%, 90%, 85%, 80% 또는 75% 동일한 가이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표 1 또는 표 2의 서열 군으로부터 선택된 서열과 95%, 90%, 85%, 80% 또는 75% 동일한 가이드 서열을 포함한다.
- [0099] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표 1의 서열 군으로부터 선택된 서열과 95%, 90%, 85%, 80% 또는 75% 동일한 서열로 구성된 군으로부터 선택된 서열의 적어도 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 연속 뉴클레오티드를 갖는 가이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표 1에서의 서열 군으로부터 선택된 서열의 적어도 17, 18, 19, 또는 20개의 연속 뉴클레오티드인 가이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표 1에서의 서열 군으로부터 선택된 서열과 95%, 90%, 85%, 80% 또는 75% 동일한 가이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표 1에서의 서열 군으로부터 선택된 서열의 17, 18, 19, 또는 20개의 연속 뉴클레오티드인 가이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표 1에서의 서열 군으로부터 선택되는 가이드 서열을 포함한다.
- [0100] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표 2에서의 서열 군으로부터 선택된 서열과 95%, 90%, 85%, 80%, 또는 75% 동일한 서열로 구성된 군으로부터 선택된 서열의 적어도 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 연속 뉴클레오티드를 갖는 가이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표 2에서의 서열 군으로부터 선택된 서열의 적어도 17, 18, 19, 또는 20개의 연속 뉴클레오티드인 가이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표 2에서의 서열 군으로부터 선택된 서열과 95%, 90%, 85%, 80% 또는 75% 동일한 가이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표 2에서의 서열 군으로부터 선택되는 가이드 서열을 포함한다.

[0101] 전체적으로 게놈 좌표는 달리 언급되지 않는 한 인간 참조 게놈 hg38에 따른다.

[0102] 특정 실시형태에서 IFNG를 표적화하는 가이드 서열을 포함하는 가이드 RNA 및 TNFA를 표적화하는 가이드 서열을 포함하는 가이드 RNA가 포함된다.

[0103] 표 1: IFNG의 녹다운을 위한 인간 가이드 서열 및 염색체 좌표

예시적인 게놈 좌표 (hg38)	엑손	가닥	가이드 서열 (5'에서 3')	서열번호
chr12:68155336-68155356	4	+	GCAGGCAGGACAACCAUUAC	1
chr12:68155337-68155357	4	+	CAGGCAGGACAACCAUUACU	2
chr12:68155374-68155394	4	-	AGGAGUCAGAUGCUGUUUCG	3
chr12:68155394-68155414	4	-	CUAAAACAGGGAAGCGAAAA	4
chr12:68155398-68155418	4	+	CGCUUCCCUGUUUAGCUGC	5
chr12:68155406-68155426	4	-	UGUCGCCAGCAGCUAAAAACA	6
chr12:68155407-68155427	4	-	CUGUCGCCAGCAGCUAAAAAC	7
chr12:68155420-68155440	4	+	GCGACAGUUCAGCCAUCACU	8
chr12:68155435-68155455	4	-	ACAUGAACUCAUCCAAGUGA	9
chr12:68155447-68155467	4	+	GUUCAUGUAUUGCUUUGCGU	10
chr12:68157972-68157992	3	+	GACAUUCAUGUCUCCUUGA	11
chr12:68157989-68158009	3	+	UGAUGGUCUCCACACUCUUU	12
chr12:68157989-68158009	3	-	AAAGAGUGUGGAGACCAUCA	13
chr12:68158001-68158021	3	-	CCAGAGCAUCCAAAAGAGUG	14
chr12:68158215-68158235	2	-	GAUAAUGGAACUCUUUUCUU	15
chr12:68158230-68158250	2	-	CAUUCAGAUGUAGCGGAUAA	16
chr12:68158237-68158257	2	-	UGCAGGUCAUUCAGAUGUAG	17
chr12:68159524-68159544	1	+	CUUCUUUUACAUAUGGGUCC	18

[0104]

예시적인 게놈 좌표 (hg38)	엑손	가닥	가이드 서열 (5'에서 3')	서열번호
chr12:68159559-68159579	1	-	UGCAUCGUUUUGGGUUCUCU	19
chr12:68159568-68159588	1	-	UUUCAGCUCUGCAUCGUUUU	20
chr12:68159569-68159589	1	-	UUUUCAGCUCUGCAUCGUUU	21

[0105]

[0106] 표 2: TNFA의 녹다운을 위한 인간 가이드 서열 및 염색체 좌표

예시적인 게놈 좌표 (hg38)	엑손	가닥	가이드 서열 (5'에서 3')	서열번호
chr6:31575742-31575762	1	+	UGAGCACUGAAAGCAUGAUC	22
chr6:31575749-31575769	1	+	UGAAAGCAUGAUCCGGGACG	23
chr6:31575755-31575775	1	+	CAUGAUCCGGGACGUGGAGC	24
chr6:31575781-31575801	1	-	CUUCUUGGGGAGCGCCUCCU	25
chr6:31575783-31575803	1	+	GAGGCGCUCCCCAAGAAGAC	26
chr6:31575784-31575804	1	+	AGGCGCUCCCCAAGAAGACA	27
chr6:31575785-31575805	1	+	GGCGCUCCCCAAGAAGACAG	28
chr6:31575786-31575806	1	+	GCGCUCCCCAAGAAGACAGG	29
chr6:31575794-31575814	1	+	CAAGAAGACAGGGGGGCCCC	30
chr6:31575794-31575814	1	-	GGGGCCCCCUGUCUUCUUG	31
chr6:31575796-31575816	1	-	CUGGGGCCCCCUGUCUUCU	32
chr6:31575813-31575833	1	-	AAGCACCGCCUGGAGCCUG	33
chr6:31575814-31575834	1	-	CAAGCACCGCCUGGAGCCCU	34
chr6:31575823-31575843	1	-	GCUGAGGAACAAGCACCGCC	35
chr6:31575842-31575862	1	+	CCUCUUCUCCUCCUGAUCG	36
chr6:31575846-31575866	1	+	UUCUCCUCCUGAUCGUGGC	37
chr6:31575853-31575873	1	-	GGCGCCUGCCACGAUCAGGA	38
chr6:31575857-31575877	1	-	UGGUGGCGCCUGCCACGAUC	39
chr6:31575888-31575908	1	+	CUGCUGCACUUUGGAGUGAU	40
chr6:31575890-31575910	1	-	CGAUCACUCCAAAGUGCAGC	41

[0107]

예시적인 게놈 좌표 (hg38)	엑손	가닥	가이드 서열 (5'에서 3')	서열번호
chr6:31575898-31575918	1	+	UUGGAGUGAUCGGCCCCCAG	42
chr6:31575899-31575919	1	+	UGGAGUGAUCGGCCCCCAGA	43
chr6:31575917-31575937	1	-	AGGCACUCACCUUCCCCUC	44
chr6:31576538-31576558	2	-	UGAUUAGAGAGAGGUCCUG	45
chr6:31576539-31576559	2	-	CUGAUUAGAGAGAGGUCCU	46
chr6:31576540-31576560	2	-	GCUGAUUAGAGAGAGGUCCC	47
chr6:31576544-31576564	2	+	CCUCUCUCUAAUCAGCCCUC	48
chr6:31576547-31576567	2	-	CCAGAGGGCUGAUUAGAGAG	49
chr6:31576550-31576570	2	+	UCUAAUCAGCCCUCUGGCCC	50
chr6:31576562-31576582	2	-	UACUGACUGCCUGGGCCAGA	51
chr6:31576563-31576583	2	-	UUACUGACUGCCUGGGCCAG	52
chr6:31576570-31576590	2	-	GAGACACUACUGACUGCCU	53
chr6:31576571-31576591	2	-	GGAGACACUACUGACUGCC	54
chr6:31576785-31576805	3	-	GGGCUACAGGCUUGUCACUC	55
chr6:31576786-31576806	3	-	UGGGCUACAGGCUUGUCACU	56
chr6:31576798-31576818	3	-	UUACCUACAACAUGGGCUAC	57
chr6:31576805-31576825	3	-	AGAGCUCUUACCUACAACAU	58
chr6:31576806-31576826	3	-	CAGAGCUCUUACCUACAACA	59
chr6:31577110-31577130	4	+	UCCAGCAAACCCUCAAGCUG	60
chr6:31577112-31577132	4	+	CAGCAAACCCUCAAGCUGAG	61

[0108]

예시적인 게놈 좌표 (hg38)	엑손	가닥	가이드 서열 (5'에서 3')	서열번호
chr6:31577122-31577142	4	-	GGAGCUGCCCCUCAGCUUGA	62
chr6:31577123-31577143	4	-	UGGAGCUGCCCCUCAGCUUG	63
chr6:31577136-31577156	4	+	AGCUCCAGUGGCUGAACCGC	64
chr6:31577137-31577157	4	+	GCUCCAGUGGCUGAACCGCC	65
chr6:31577143-31577163	4	-	UGGCCCGGCGGUUCAGCCAC	66
chr6:31577152-31577172	4	+	CCGCCGGGCCAAUGCCCUCC	67
chr6:31577155-31577175	4	-	CCAGGAGGGCAUUGGCCCGG	68
chr6:31577159-31577179	4	+	GCCAAUGCCCUCCUGGCCAA	69
chr6:31577163-31577183	4	-	GCCAUUGGCCAGGAGGGCAU	70
chr6:31577164-31577184	4	+	UGCCCUCCUGGCCAAUGGCG	71
chr6:31577170-31577190	4	-	GCUCCACGCCAUUGGCCAGG	72
chr6:31577173-31577193	4	-	UCAGCUCCACGCCAUUGGCC	73
chr6:31577178-31577198	4	-	AUCUCUCAGCUCCACGCCAU	74
chr6:31577185-31577205	4	+	GGAGCUGAGAGAUAAACCAGC	75
chr6:31577188-31577208	4	+	GCUGAGAGAUAAACCAGCUGG	76
chr6:31577200-31577220	4	+	CCAGCUGGUGGUGCCAUCAG	77
chr6:31577201-31577221	4	+	CAGCUGGUGGUGCCAUCAGA	78
chr6:31577216-31577236	4	-	AUGAGGUACAGGCCUCUGA	79
chr6:31577227-31577247	4	-	CCUGGGAGUAGAUGAGGUAC	80
chr6:31577237-31577257	4	+	UACUCCCAGGUCCUCUCAA	81

[0109]

예시적인 게놈 좌표 (hg38)	엑손	가닥	가이드 서열 (5'에서 3')	서열번호
chr6:31577245-31577265	4	-	CUUGGCCCUUGAAGAGGACC	82
chr6:31577295-31577315	4	-	GGCGAUGCGGCUGAUGGUGU	83
chr6:31577296-31577316	4	-	CGGCGAUGCGGCUGAUGGUG	84
chr6:31577301-31577321	4	-	GGAGACGGCGAUGCGGCUGA	85
chr6:31577308-31577328	4	-	UCUGGUAGGAGACGGCGAUG	86
chr6:31577311-31577331	4	+	CGCCGUCUCCUACCAGACCA	87
chr6:31577322-31577342	4	-	GAGGUUGACCUUGGUCUGGU	88
chr6:31577331-31577351	4	-	GGCAGAGAGGAGGUUGACCU	89
chr6:31577349-31577369	4	+	CCAUCAAGAGCCCCUGCCAG	90
chr6:31577350-31577370	4	+	CAUCAAGAGCCCCUGCCAGA	91
chr6:31577362-31577382	4	-	CUGGGGUCUCCUCUGGCAG	92
chr6:31577363-31577383	4	-	UCUGGGGUCUCCUCUGGCA	93
chr6:31577397-31577417	4	-	GAUGGGCUCUAUACCAGGCU	94
chr6:31577401-31577421	4	+	CUGGUAUGAGCCCAUCUAUC	95
chr6:31577402-31577422	4	-	AGAUAGAUGGGCUCUAACCA	96
chr6:31577402-31577422	4	+	UGGUAUGAGCCCAUCUAUCU	97
chr6:31577403-31577423	4	-	CAGAUAGAUGGGCUCUAACC	98
chr6:31577406-31577426	4	+	AUGAGCCCAUCUAUCUGGGA	99
chr6:31577407-31577427	4	+	UGAGCCCAUCUAUCUGGGAG	100
chr6:31577414-31577434	4	-	AAGACCCCUCCAGAUAGAU	101

[0110]

예시적인 게놈 좌표 (hg38)	엑손	가닥	가이드 서열 (5'에서 3')	서열번호
chr6:31577437-31577457	4	-	GUCGGUACCCUUCUCCAGC	102
chr6:31577454-31577474	4	+	GACUCAGCGCUGAGAUCAAU	103
chr6:31577455-31577475	4	-	GAUUGAUCUCAGCGCUGAGU	104
chr6:31577480-31577500	4	-	UCGGCAAAGUCGAGAUAGUC	105
chr6:31577481-31577501	4	-	CUCGGCAAAGUCGAGAUAGU	106
chr6:31577483-31577503	4	+	UAUCUCGACUUUGCCGAGUC	107
chr6:31577484-31577504	4	+	AUCUCGACUUUGCCGAGUCU	108
chr6:31577488-31577508	4	+	CGACUUUGCCGAGUCUGGGC	109
chr6:31577498-31577518	4	+	GAGUCUGGGCAGGUCUACUU	110
chr6:31577499-31577519	4	+	AGUCUGGGCAGGUCUACUU	111
chr6:31577499-31577519	4	-	AAAGUAGACCUGCCAGACU	112
chr6:31577532-31577552	4	-	GGAUGUUCGUCCUCCACACA	113

[0111]

[0112] TNFA의 녹다운을 위한 비-제한적인 변형된 가이드 서열이 아래에 도시되어 있다(hg38 좌표 chr12:68158001-68158021):

- [0113] mC^{*}mC^{*}mA^{*}GAGCAUCCAAAAGAGUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUm^{*}mU^{*}mU^{*}mU (서열번호: 119), 여기서 m은 2'-OMe 변형된 뉴클레오타이드/뉴클레오타이드 잔기이고, ^{*}는 잔기들 사이의 포스포로티오에이트 연결을 나타내고, 대문자는 바람직하게는 리보스 당을 포함하는 잔류물을 나타낸다.
- [0114] IFNG의 녹다운을 위한 비-제한적인 변형된 가이드 서열이 아래에 도시되어 있다(hg38 좌표 chr6:31576805-31576825):
- [0115] mA^{*}mG^{*}mA^{*}GCUCUUAACCAACAUGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUm^{*}mU^{*}mU^{*}mU (서열번호: 120).
- [0116] 예시적인 변형된 모의 가이드가 아래에 도시되어 있다(hg38 좌표 chr1:0-20):
- [0117] mG^{*}mA^{*}mU^{*}CACGUCGCCGUUGCGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUm^{*}mU^{*}mU^{*}mU (서열번호: 121).
- [0118] 일부 실시형태에서, 예를 들어 조작된 T 세포를 만들기 위해, 이중 IL10 핵산을 포함하는 작제물(예를 들어, 공여자 작제물 또는 주형), 및 RNA-가이드된 DNA 결합제와 함께 가이드 RNA를 사용하여 T 세포 또는 T 세포군의 게놈 좌 내에 이중 IL10 핵산을 도입하거나 삽입함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어 이중 IL10 핵산을 포함하는 작제물(예를 들어, 공여자) 및 RNA-가이드된 DNA-결합제와 함께 가이드 RNA를 사용하여 T 세포 또는 T 세포군의 게놈 좌로부터 이중 IL10을 발현함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, RNA-가이드된 DNA-결합제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)와 함께 가이드 RNA를 사용하여 IL10 유전자를 삽입하기 위한 T 세포 또는 T 세포군의 게놈 내에 파손(예를 들어, 이중-가닥의 파손(DSB) 또는 단일-가닥의 파손(닉))을 유도함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시된다. 방법에 의해 만들어진 세포 및 세포군도 제공된다.
- [0119] 일부 실시형태에서, 예를 들어 조작된 T 세포를 만들기 위해 이중 CTLA4 핵산을 포함하는 작제물(예를 들어, 공여자 작제물 또는 주형), 및 RNA-가이드된 DNA 결합제와 함께 가이드 RNA를 사용하여 T 세포 또는 T 세포군의 게놈 좌 내에 이중 CTLA4 핵산을 도입하거나 삽입함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어 이중 CTLA4 핵산을 포함하는 작제물(예를 들어, 공여자) 및 RNA-가이드된 DNA-결합제와 함께 가이드 RNA를 사용하여 T 세포 또는 T 세포군의 게놈 좌로부터 이중 CTLA4를 발현함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, RNA-가이드된 DNA-결합제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)와 함께 가이드 RNA를 사용하여 CTLA4 유전자를 삽입하기 위한 T 세포 또는 T 세포군의 게놈 내에 파손(예를 들어, 이중-가닥의 파손(DSB) 또는 단일-가닥의 파손(닉))을 유도함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시된다. 방법에 의해 만들어진 세포 및 세포군도 제공된다.
- [0120] 일부 실시형태에서, 예를 들어 조작된 T 세포를 만들기 위해 이중 CTLA4 핵산 및 이중 IL10 핵산을 포함하는 하나 이상의 작제물(예를 들어, 공여자 작제물 또는 주형), 및 RNA-가이드된 DNA 결합제와 함께 가이드 RNA를 사용하여 T 세포 또는 T 세포군의 게놈 좌 내에 이중 CTLA4 핵산 및 이중 IL10 핵산을 도입하거나 삽입함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어 이중 CTLA4 핵산 및 이중 IL10 핵산을 포함하는 하나 이상의 작제물(예를 들어, 공여자 작제물 또는 주형) 및 RNA-가이드된 DNA-결합제와 함께 가이드 RNA를 사용하여 T 세포 또는 T 세포군의 게놈 좌로부터 이중 CTLA4 및 이중 IL10을 발현함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, RNA-가이드된 DNA-결합제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)와 함께 가이드 RNA를 사용하여 CTLA4 유전자 및 IL10 유전자를 삽입하기 위한 T 세포 또는 T 세포군의 게놈 내에 파손(예를 들어, 이중-가닥의 파손(DSB) 또는 단일-가닥의 파손(닉))을 유도함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시된다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는 2개 이상의 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어, IL10 및 CTLA4를 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 위해 본 명세서에 기재된 부위에서 RNA-가이드 DNA-결합제(예를 들어, Cas 뉴클레아제)에 의한 표적-특이적 절단을 매개한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는 상기 영역에 결합하거나 결합할 수 있는 가이드 서열을 포함한다는 것이 이해될 것이다. 방법에 의해 만들어진 세포 및 세포군도 제공된다.
- [0121] 조절 T 세포 촉진 분자의 예시적인 뉴클레오타이드 및 폴리펩티드 서열이 아래에 제공된다. 대안적인 자연적으로 발생하는 변이체 및 비-인간 상동체를 포함하는, 폴리펩티드 서열을 인코딩하는 대안적인 뉴클레오타이드 서열을

동정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. IL10 및 CTLA4를 인코딩하는 예시적인 핵산 서열이 아래에 제공된다. 다른 적합한 IL10 및 CTLA4 서열은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Gorby 등, Engineered IL-10 variants elicit potent immuno-modulatory activities at therapeutic low ligand doses, BioRxiv (2020) 및 Xu 등, Affinity and cross-reactivity engineering of CTLA4-Ig to modulate T cell costimulation, J Immunol (2012)을 참조하며, 그 내용 및 서열은 본 명세서에 참조로 포함된다. 대안적인 IL10 및 CTLA4 서열을 동정하는 방법도 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, id 참조. 예를 들어, 돌연변이 또는 절삭에 기인하여, 본 명세서에 기재된 임의의 핵산 서열, 아미노산 서열, 또는 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열과 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열이 또한 고려된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열이 또한 제공된다.

[0122] IL10을 인코딩하는 비-제한적인 예시적인 핵산 서열이 제공된다:

[0123] 야생형 IL10:

[0124] ATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCCTGACTGGGGTGAGGGCCAGCCAGGCCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACTTCCCA
GGCAACCTGCCTAACATGCTTCGAGATCTCCGAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAGCTGGACAACCTGTTGTTAAAGGAG
TCCTTGCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGCCAAGCCTTGCTGAGATGATCCAGTTTTACCTGGAGGAGGTGATGCCCAAGCTGAGAACCAAGAC
CCAGACATCAAGGCGCATGTGAACCTCCCTGGGGGAGAACCTGAAGACCTCAGGCTGAGGCTACGGCGTGTCATCGATTTCTTCCCTGTGAAAACAAGAGC
AAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTACATAGAAGCC
TACATGACAATGAAGATACGAAAC (서열번호: 122)

[0125] 고친화성 IL10 (N36I, N110I, K117N, F129L):

[0126] ATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCCTGACTGGGGTGAGGGCCAGCCAGGCCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACTTCCCA
GGCATCTGCCTAACATGCTTCGAGATCTCCGAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAGCTGGACAACCTGTTGTTAAAGGAG
TCCTTGCTGGAGGACTTTAAGGGTTACCTGGGTTGCCAAGCCTTGCTGAGATGATCCAGTTTTACCTGGAGGAGGTGATGCCCAAGCTGAGAACCAAGAC
CCAGACATCAAGGCGCATGTGat cTCCCTGGGGGAGAACCTGAATACCTCAGGCTGAGGCTACGGCGTGTCATCGAct cTTCCCTGTGAAAACAAGAGC
AAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTACATAGAAGCC
TACATGACAATGAAGATACGAAAC (서열번호: 123)

[0127] IL10의 비-제한적인 예시적인 아미노산 서열이 제공된다:

[0128] 야생형 IL10:

[0129] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGLNPLNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLKESLLEDFKGYLGQALSEMIQFYLEEVMPPQENQD
PDIKAHVNSLGENLKLRLRLRRCHRLFPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN (서열번호: 124)

[0130] 고친화성 IL10 (N36I, N110I, K117N, F129L):

[0131] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGLNPLNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLKESLLEDFKGYLGQALSEMIQFYLEEVMPPQENQD
PDIKAHVISLGENLNLRLRLRRCHRLLPENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN (서열번호: 125)

[0132] CTLA4를 인코딩하는 비-제한적인 예시적인 핵산 서열이 제공된다:

[0133] 야생형 CTLA4:
ATGGCCTGCTTGGGCTTCCAAAGGCATAAAGCCAGCTTAATCTTGCTACTCGACGTGGCCCTGCACATTGCTCTTTTCTCCTGTTTCCCGTGT
TGCAAGGCGATGCATGTGGCACAACCTGCCGTCGTTCTGGCATCATCAAGAGGTATTGCTAGCTTCGTTTGTGAGTACGCCTCCCCTGGAAAAGCGACGGAG
GTGCGCGTCACTGTATTGCGGCAAGCCGACAGCCAAGTTACTGAAGTCTGCGCGGCAACGTATATGATGGGCAATGAGCTGACATTCTTGACGATTCAATC
TGCACGGGAACAAGTAGTGGTAACAGGTGAATCTCACTATTCAAGGTCTGAGAGCCATGGACACCGGCCTCTACATTGTAAAGGTGGAGCTGATGTATCCT
CCCCATATTATCTGGGGATCGGAAATGGGACACAGATATATGTTATTGATCCCGAGCCATGTCCCGATAGTGACTTCCTCTGTGGATACTTGCCGCTGTG
AGCAGTGTTTGTGTTTTTATTCTCTCTTACGGCAGTATCACTTTCAAAAATGCTCAAGAAGCGAAGTCCTTTGACAACCTGGCGTATATGTCAAAATG
CCACCAACAGAGCCGAATGTGAGAAACAGTTCCAGCCGTAATCTTATCTCTATAAAC (서열번호: 126)

[0134] 고친화성 CTLA4 (belatacept; 결합 도메인: A29Y, L104E):

[0135] ATGGCCTGCTTGGGCTTCCAAAGGCATAAAGCCAGCTTAATCTTGCTACTCGACGTGGCCCTGCACATTGCTCTTTTCTCCTGTTTCCCGTGT
TGCAAGGCGATGCATGTGGCACAACCTGCCGTCGTTCTGGCATCATCAAGAGGTATTGCTAGCTTCGTTTGTGAGTACGCCTCCCCTGGAAAATACACGGAG
GTGCGCGTCACTGTATTGCGGCAAGCCGACAGCCAAGTTACTGAAGTCTGCGCGGCAACGTATATGATGGGCAATGAGCTGACATTCTTGACGATTCAATC
TGCACGGGAACAAGTAGTGGTAACAGGTGAATCTCACTATTCAAGGTCTGAGAGCCATGGACACCGGCCTCTACATTGTAAAGGTGGAGCTGATGTATCCT

CCCCATATTATGAGGGGATCGGAAATGGGACACAGATATATGTTATTGATCCCGAGCCATGTCCCGATAGTGACTTCCTCTTGTGGATACTTGCCGCTGTG
AGCAGTGGTTTGTGTTTTTATTTCCTCTTACGGCAGTATCACTTTCAAAAATGCTCAAGAAGCGAAGTCCTTTGACAACTGGCGTATATGTCAAAATG
CCACCAACAGAGCCCGAATGTGAGAAACAGTTCCAGCCGTACTTTATTCCTATAAAC (서열번호: 127)

[0136] 고친화성 CTLA4 (결합 도메인: A29H):

[0137] ATGGCCTGCTTGGGCTTCCAAAGGCATAAAGCCAGCTTAATCTTGCTACTCGCACGTGGCCCTGCACATTGCTCTTTTCTCTCTGTTTCATTCCCGTGTGTT
TGCAAGGCGATGCATGTGGCACAACCTGCCGTCGTCTGGCATCATCAAGAGGTATTGCTAGCTTCGTTTGTGAGTACGCCTCCCCTGGAAAACATACGGAG
GTGCGCGTCACTGTATTGCGGCAAGCCGACAGCCAAGTTACTGAAGTCTGCGCGGCAACGTATATGATGGGCAATGAGCTGACATTCTTGACGATTCAATC
TGCACGGGAACAAGTAGTGGTAACAGGTGAATCTCACTATTCAAGGTCTGAGAGCCATGGACACCGGCCTCTACATTGTAAGGTGGAGCTGATGATCCT
CCCCATATTATCTGGGGATCGGAAATGGGACACAGATATATGTTATTGATCCCGAGCCATGTCCCGATAGTGACTTCCTCTTGTGGATACTTGCCGCTGTG
AGCAGTGGTTTGTGTTTTTATTTCCTCTTACGGCAGTATCACTTTCAAAAATGCTCAAGAAGCGAAGTCCTTTGACAACTGGCGTATATGTCAAAATG
CCACCAACAGAGCCCGAATGTGAGAAACAGTTCCAGCCGTACTTTATTCCTATAAAC (서열번호: 128)

[0138] 고친화성 CTLA4 (결합 도메인: K28H, A29H):

[0139] ATGGCCTGCTTGGGCTTCCAAAGGCATAAAGCCAGCTTAATCTTGCTACTCGCACGTGGCCCTGCACATTGCTCTTTTCTCTCTGTTTCATTCCCGTGTGTT
TGCAAGGCGATGCATGTGGCACAACCTGCCGTCGTCTGGCATCATCAAGAGGTATTGCTAGCTTCGTTTGTGAGTACGCCTCCCCTGGACATCACACGGAG
GTGCGCGTCACTGTATTGCGGCAAGCCGACAGCCAAGTTACTGAAGTCTGCGCGGCAACGTATATGATGGGCAATGAGCTGACATTCTTGACGATTCAATC
TGCACGGGAACAAGTAGTGGTAACAGGTGAATCTCACTATTCAAGGTCTGAGAGCCATGGACACCGGCCTCTACATTGTAAGGTGGAGCTGATGATCCT
CCCCATATTATCTGGGGATCGGAAATGGGACACAGATATATGTTATTGATCCCGAGCCATGTCCCGATAGTGACTTCCTCTTGTGGATACTTGCCGCTGTG
AGCAGTGGTTTGTGTTTTTATTTCCTCTTACGGCAGTATCACTTTCAAAAATGCTCAAGAAGCGAAGTCCTTTGACAACTGGCGTATATGTCAAAATG
CCACCAACAGAGCCCGAATGTGAGAAACAGTTCCAGCCGTACTTTATTCCTATAAAC (서열번호: 129)

[0140] CTLA4의 비-제한적인 예시적인 아미노산 서열이 제공된다:

[0141] 야생형 CTLA4:

[0142] MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI
CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIINGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKM
PPTPECEKQFQPYFIPIN (서열번호: 130)

[0143] 고친화성 CTLA4 (belatacept; 결합 도메인: A29Y, L104E):

[0144] MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKYTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI
CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYEGINGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKM
PPTPECEKQFQPYFIPIN (서열번호: 131)

[0145] 고친화성 CTLA4 (결합 도메인: A29H):

[0146] MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKHTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI
CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIINGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKM
PPTPECEKQFQPYFIPIN (서열번호: 132)

[0147] 고친화성 CTLA4 (결합 도메인: K28H, A29H):

[0148] MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGHTEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI
CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIINGTQIYVIDPEPCPDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKM
PPTPECEKQFQPYFIPIN (서열번호: 133)

[0149] 일부 실시형태에서, IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운 및 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 시험관내 또는 생체내 검정, 예를 들어 GvHD의 동물 모델에서 자연적으로 발생하는 조절 T 세포(nTreg)의 적어도 하나의 억제 활성화, 예를 들어 면역 반응(들) 또는 바이오마커의 억제를 나타낸다. 일부 실시형태에서, IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운 및 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 시험관내 또는 생체내 검정, 예를 들어 GvHD의 동물 모델에서 nTreg와 비교하여 개선된 억제 활성화, 예를 들어 면역 반응 또는 바이오마커의 증가된 억제를 나타낸다. 예를 들어, GvHD의 마우스 모델에서,

IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운 및 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포를 수용한 마우스는 대조군, 예를 들어 PBMC를 수용한 마우스와 비교하여 개선된 생존을 나타낸다.

[0150] B. 표적화 수용체

[0151] 일부 실시형태에서, IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운 및 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포는 표적화 수용체를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 추가로 포함한다. 표적화 수용체를 인코딩하는 서열(들)은 프로모터 서열, 예를 들어 내인성 프로모터 또는 이중 프로모터의 제어하에 있다.

[0152] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), T-세포 수용체(TCR), 또는 세포의 수용체 부분의 결합시 T 세포를 활성화할 수 있는 내부 시그널링 도메인에서 적어도 막관통 도메인을 통해 작동가능하게 연결된 세포 표면 분자에 대한 수용체이다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체는 표적 부위, 예를 들어 유기체에서의 특정 세포 또는 조직에 대한 세포의 결합을 허용하기 위해 세포, 예를 들어 T 세포의 표면 상에 존재하는 수용체일 수 있다. 표적화 수용체는 항원 수용체일 필요는 없으며, 예를 들어 표적화 수용체는 인테그린을 표적화할 수 있는 RGD 펩티드일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체는 MadCAM-1, TNFA, CEACAM6, VCAM-1, 시트룰린화된 비멘틴, 미엘린 염기성 단백질(MBP), MOG(미엘린 희소돌기아교세포 당단백질), 단백질질 단백질 1(PLP1), CD19 분자(CD19), CD20 분자(CD20), TNFRSF17, 디펩티딜 펩티다제 유사 6(DPP6), 용질 운반체 패밀리 2 구성원 2(SCL2A2), 글루타메이트 데카르복실라제(GAD2), 데모글레인 3(DSG3) 및 MHC 클래스 I HLA-A(HLA-A*02)로 구성된 군으로부터 선택된 분자를 표적화한다.

[0153] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, IL10, CTLA4, TGFBI, IDO1, ENTPD1, NT5E, IL22, AREG, IL35, GARP, CD274, FOXP3, IKZF2, EOS, IRF4, LEF1, 및 BACH2로부터 선택된 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)의 삽입, 및 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MadCAM-1을 표적화하는 CAR을 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함한다.

[0154] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, IL10을 인코딩하는 서열(들)의 삽입, 및 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MadCAM-1을 표적화하는 CAR을 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함한다.

[0155] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, CTLA4를 인코딩하는 서열(들)의 삽입, 및 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MadCAM-1을 표적화하는 CAR을 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함한다.

[0156] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, IL10을 인코딩하는 서열(들)의 삽입, CTLA4를 인코딩하는 서열(들)의 삽입, 및 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MadCAM-1을 표적화하는 CAR을 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함한다.

[0157] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체를 인코딩하는 서열(들)은 발현 작제물 안에 혼입된다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체를 인코딩하는 서열(들)을 포함하는 발현 작제물은 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)을 더 포함하고, 예를 들어, 표적화 수용체를 인코딩하는 서열(들) 및 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)은 동일한 발현 작제물 안에 혼입된다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체를 인코딩하는 서열(들)을 포함하는 발현 작제물은 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)을 더 포함하지 않고, 예를 들어 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)은 별도의 발현 작제물 안에 혼입된다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체를 인코딩하는 서열(들)을 포함하는 발현 작제물은 에피솅 발현 작제물이다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체를 인코딩하는 서열(들)은 게놈 내로 삽입되고, 예를 들어 표적화되거나 표적화되지 않은 삽입이다.

[0158] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체를 인코딩하는 서열(들)은 TCR 유전자좌, 예를 들어, TRAC 좌, TNF 유전자좌, IFNG 유전자좌, IL17A 좌, IL6 좌, IL2 좌, 또는 아데노-연관된 바이러스 통합 부위 1(AAVS1) 좌로부터 선택된 부위 안으로 삽입될 수 있다.

- [0159] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이 유전자 편집에 의해 표적화 수용체를 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함한다. 일부 실시형태에서, T 세포군은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열의 삽입, 및 표적화 수용체, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함하도록 조작된 T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, T 세포군에서 T 세포 중 적어도 40%, 45%, 바람직하게는 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%는 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이 표적화 수용체를 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함하도록 조작된다. T 세포군은 당업계에 공지된 선택 방법을 사용하여 표적화 수용체를 갖는 세포군에 대해 농후화될 수 있는 것으로 이해된다.
- [0160] 일부 실시형태에서, 예를 들어 조작된 T 세포를 만들기 위해, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 핵산을 포함하는 작제물(예를 들어, 공여자 작제물 또는 주형), 및 RNA-가이드된 DNA 결합제와 함께 가이드 RNA를 사용하여 T 세포 또는 T 세포군의 게놈 좌 내에, 예를 들어 T 세포 내에 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 핵산을 도입하거나 삽입함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 핵산을 포함하는 작제물(예를 들어, 공여자) 및 RNA-가이드된 DNA 결합제와 함께 가이드 RNA를 사용하여, T 세포 또는 T 세포군의 게놈 좌로부터 표적화 수용체, 예를 들어 CAR을 발현함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시되어 있다. 일부 실시형태에서, 예를 들어, RNA-가이드된 DNA-결합제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)와 함께 가이드 RNA를 사용하여, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR을 삽입하기 위한 T 세포 또는 T 세포군의 게놈 내에 파손(예를 들어, 이중-가닥의 파손(DSB) 또는 단일-가닥의 파손(닉))을 유도함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시되어 있다. 방법에 의해 만들어진 세포 및 세포군도 제공된다.
- [0161] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은, 예를 들어 특정 세포, 조직 또는 기관에 대해 표적화 수용체, 예를 들어 CAR을 포함하는 조작된 T 세포에 표적 특이성을 부여할 수 있다.
- [0162] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 위장관계에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 염증성 장 질환, 궤양성 대장염 또는 크론병과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 MadCAM-1을 표적화하는 CAR이다.
- [0163] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 염증 조직에 대해 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 염증성 장 질환, 궤양성 대장염 또는 크론병과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 TNFA를 표적화하는 CAR이다.
- [0164] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 내피 세포에 대해 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는 크론병과 같은 장애에서, 염증을 포함한 면역 반응(들)을 억제하기 위해 CEACAM6을 표적화하는 CAR이다.
- [0165] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 내피 세포를 포함하는 조직에 대해 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 크론병 및 다발성 경화증과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 VCAM-1을 표적화하는 CAR이다.
- [0166] 일부 실시형태에서, CAR은 조작된 T 세포를 활막 조직에 대해 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 류마티스 관절염과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 시트룰린화된 비멘틴을 표적화하는 CAR이다.
- [0167] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 신경 조직에 대해 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 다발성 경화증과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 MBP, MOG 또는 PLP1을 표적화하는 CAR이다.
- [0168] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 B 세포에 대해 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 다발성 경화증 및 전신성 홍반성 루푸스와 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 CD19를 표적화하는 CAR이다.
- [0169] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 B 세포에 대해 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 다발성 경화증 및 전신성 홍반성 루푸스와 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 CD20을 표적화하는 CAR이다.
- [0170] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 성숙한 B 림프구를 포함하는 조직에 대해

표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 전신성 홍반성 루푸스와 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 TNFRSF17을 표적화하는 CAR이다.

[0171] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 SCL2A2를 표적화한다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 DPP6을 표적화한다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 GAD2를 표적화한다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 DSG3을 표적화한다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 MHC 클래스 I HLA-A(HLA-A*02)를 표적화한다.

[0172] 추가의 CAR 표적, 예를 들어 염증성 항원은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, W02020092057A1을 참조하고, 그 내용은 그 전체로 본 명세서에 포함된다. 일부 실시형태에서, 삽입은 조작된 T 세포, 조작된 T 세포군, 조직, 관심있는 체액, 또는 조작된 T 세포를 포함하는 조직 배양 배지에서 단백질 또는 mRNA의 양을 검출함에 의해 평가될 수 있다. 일부 실시형태에서, 유전자 편집에 의한 삽입은 서열, 예를 들어 차세대 시퀀싱(NGS)에 의해 평가될 수 있다. 표적화 수용체, 예를 들어 CAR의 단백질 및 mRNA 발현에 대한 검정은 본 명세서에 기재되어 있고 당업계에 공지되어 있다.

[0173] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 이중 표적화 수용체를 포함하지 않는다.

[0174] C. T 세포 수용체(TCR)

[0175] 일부 실시형태에서, IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운 및 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 TCR 유전자 서열(들)을 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 추가로 포함한다.

[0176] 일부 실시형태에서, IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입, 표적화 수용체를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 TCR 유전자 서열(들)을 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 추가로 포함한다.

[0177] 일반적으로, TCR은 2개의 TCR 폴리펩티드 사슬인, α 및 β 를 함유하는 이중이량체 수용체 분자이다. 녹다운을 위한 표적에 적합한 α 및 β 게놈 서열 또는 좌는 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 TCR α -사슬 유전자 서열, 예를 들어 TRAC의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함한다. 예를 들어, NCBI Gene ID: 28755; Ensembl: ENSG00000277734(T-세포 수용체 Alpha Constant), US 2018/0362975 및 W02020081613 참조.

[0178] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, IL10, CTLA4, TGFB1, IDO1, ENTPD1, NT5E, IL22, AREG, IL35, GARP, CD274, FOXP3, IKZF2, EOS, IRF4, LEF1, 및 BACH2로부터 선택된 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)의 삽입 및 TCR 유전자 서열(들)을 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함한다.

[0179] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, IL10 또는 CTLA4를 인코딩하는 서열(들)의 삽입, 및 TCR 유전자 서열(들)을 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함한다.

[0180] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)의 삽입, 및 내인성 TCR 유전자 서열, 예를 들어 TRAC 유전자 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함한다.

[0181] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운,

[0182] IL10, CTLA4, TGFB1, IDO1, ENTPD1, NT5E, IL22, AREG, IL35, GARP, CD274, FOXP3, IKZF2, EOS, IRF4, LEF1 및 BACH2로부터 선택된 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)의 삽입, 및 내인성 TCR 유전자, 예를 들어, TRAC 유전자 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함한다.

[0183] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹

다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, IL10 또는 CTLA4를 인코딩하는 서열(들)의 삽입, 및 TCR 유전자, 예를 들어 TRAC 유전자 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함한다.

[0184] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)의 삽입, 및 내인성 TCR 유전자, 예를 들어 TRAC 유전자 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함한다.

[0185] 임의의 이들 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 본 명세서에 기재된 바와 같은 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1을 표적화하는 CAR을 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 추가로 포함할 수 있다.

[0186] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같은 유전자 편집에 의한 TRC 유전자 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함하며, 여기서 세포의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95%가 내인성 TRC 유전자 서열에서 삽입, 결실 또는 치환을 포함한다. 일부 실시형태에서, TRC는 예를 들어, TRC 유전자가 변형되지 않은 적합한 대조군과 비교하여 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 검정의 검출 한계 미만까지 감소된다. TRC 단백질 및 mRNA 발현에 대한 검정은 당업계에 공지되어 있다.

[0187] 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포 또는 T 세포군은 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이 유전자 편집에 의해 표적화 수용체를 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함한다.

[0188] 일부 실시형태에서, T 세포군은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열의 삽입, 및 적어도 하나의 TCR 유전자 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함하도록 조작된 T 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, T 세포군에서 T 세포 중 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 바람직하게는 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%는 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가된 바와 같이 적어도 하나의 TCR 유전자 서열의 변형, 예를 들어 녹다운을 포함하도록 조작된다.

[0189] 일부 실시형태에서, TCR 유전자, 예를 들어 TRAC 유전자 내의 부위를 특이적으로 표적화하는 가이드 RNA는 TCR 유전자의 변형, 예를 들어 녹다운을 제공하기 위해 사용된다.

[0190] 일부 실시형태에서, TCR 유전자는 RNA-가이드된 DNA 결합제와 함께 가이드 RNA를 사용하여 T 세포에서 변형, 예를 들어 녹다운된다. 일부 실시형태에서, 예를 들어 RNA-가이드된 DNA-결합제(예를 들어, CRISPR/Cas 시스템)와 함께 가이드 RNA를 사용하여, T 세포의 TCR 유전자 내에 파손(예를 들어, 이중-가닥의 파손(DSB) 또는 단일-가닥의 파손(닉))을 유도함에 의해 조작된 T 세포가 본 명세서에 개시되어 있다. 방법은 예를 들어 면역 반응을 억제하기 위한 세포 생성물의 제작에서 시험관내 또는 생체외에서 사용될 수 있다.

[0191] 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는 TCR 유전자 내의 본 명세서에 기재된 부위에서 RNA-가이드된 DNA-결합제(예를 들어, Cas 뉴클레아제)에 의한 표적-특이적 절단을 매개한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA는 상기 영역에 결합하거나 결합할 수 있는 가이드 서열을 포함한다는 것이 이해될 것이다.

[0192] D. 가이드 RNA

[0193] 본 명세서에서 임의의 실시형태에서, 가이드 RNA는 trRNA를 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 각각의 조성물 및 방법 실시형태에서, crRNA 및 trRNA는 단일 RNA(sgRNA)로서 회합될 수 있거나 별도의 RNA(dgRNA) 상에 있을 수 있다. sgRNA의 맥락에서, crRNA 및 trRNA 성분은 예를 들어 포스포디에스테르 연결 또는 다른 공유 결합을 통해 공유적으로 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 포스포디에스테르 연결이 아닌 뉴클레오티드 사이의 하나 이상의 연결을 포함한다.

[0194] 본 명세서에 기재된 각각의 조성물, 용도 및 방법 실시형태에서, 가이드 RNA는 "이중 가이드 RNA" 또는 "dgRNA"로서 2개의 RNA 분자를 포함할 수 있다. dgRNA는 예를 들어 본 명세서에 도시된 가이드 서열을 포함하는 crRNA를 포함하는 제1 RNA 분자 및 trRNA를 포함하는 제2 RNA 분자를 포함한다. 제1 및 제2 RNA 분자는 공유적으로 연결되지 않을 수 있지만, crRNA와 trRNA의 부분 사이의 염기 쌍화를 통해 RNA 듀플렉스를 형성할 수 있다.

[0195] 본 명세서에 기재된 각각의 조성물, 용도 및 방법 실시형태에서, 가이드 RNA는 "단일 가이드 RNA" 또는 "sgRNA"로서 단일 RNA 분자를 포함할 수 있다. sgRNA는 trRNA에 공유적으로 연결된 본 명세서에 도시된 가이드 서열을 포함하는 crRNA(또는 이의 일부)를 포함할 수 있다. sgRNA는 본 명세서에 도시된 가이드 서열의 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개의 연속 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, crRNA 및 trRNA는 링커를 통해

공유적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 crRNA와 trRNA의 부분 사이의 염기 쌍화를 통해 스템-루프 구조를 형성한다. 일부 실시형태에서, crRNA 및 trRNA는 포스포디에스테르 결합이 아닌 하나 이상의 결합을 통해 공유적으로 연결된다.

[0196] 일부 실시형태에서, trRNA는 자연적으로-발생하는 CRISPR/Cas 시스템으로부터 유래된 trRNA 서열의 전부 또는 일부를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, trRNA는 절삭되거나 변형된 야생형 trRNA를 포함한다. trRNA의 길이는 사용된 CRISPR/Cas 시스템에 따라 다르다. 일부 실시형태에서, trRNA는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 또는 100개 초과 뉴클레오티드를 포함하거나 이로 구성된다. 일부 실시형태에서, trRNA는 예를 들어 하나 이상의 헤어핀 또는 스템-루프 구조, 또는 하나 이상의 별지 구조와 같은 특정 2차 구조를 포함할 수 있다.

[0197] 일부 실시형태에서, 표적 서열 또는 영역은 가이드 RNA의 가이드 서열에 상보성일 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA의 가이드 서열과 이의 상응하는 표적 서열 사이의 상보성 또는 동일성의 정도는 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100%일 수 있다. 일부 실시형태에서, gRNA의 표적 서열 및 가이드 서열은 100% 상보성이거나 동일할 수 있다. 다른 실시형태에서, gRNA의 표적 서열 및 가이드 서열은 하나의 미스매치를 함유할 수 있다. 예를 들어, gRNA의 표적 서열 및 가이드 서열은 1, 2, 3, 4 또는 5개의 미스매치를 함유할 수 있으며, 여기서 가이드 서열의 총 길이는 약 20 또는 20이다. 일부 실시형태에서, gRNA의 표적 서열 및 가이드 서열은 1-4개의 미스매치를 함유할 수 있으며 여기서 가이드 서열은 약 20개 또는 20개의 뉴클레오티드이다.

[0198] 본 명세서에서 임의의 실시형태에서, 본 명세서에서 각각의 가이드 서열은 crRNA 또는 가이드 RNA를 형성하기 위한 추가 뉴클레오티드를 더 포함할 수 있으며, 예를 들어 이의 3' 말단에서 가이드 서열에 이어서 다음의 예시적인 뉴클레오티드 서열을 갖는다: 5'에서 3' 방향으로 GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG (서열번호: 134). sgRNA의 경우, 상기 가이드 서열은 sgRNA를 형성하기 위한 추가 뉴클레오티드를 더 포함할 수 있으며, 예를 들어 가이드 서열의 3' 말단에 이어서 다음의 예시적인 뉴클레오티드 서열을 갖는다:

[0199] GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGUGCUUUU (서열번호 135) 또는

[0200] GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGUGC (서열번호 136).

[0201] 임의의 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 프로포스페이서 인접 모티프(PAM)의 업스트림 영역에 결합한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, PAM 서열은 표적 서열을 함유하는 가닥의 반대쪽 가닥 상에 발생하고 CRISPR/Cas 시스템으로 변한다. 즉, PAM 서열은 표적 가닥(가이드 RNA가 결합하는 표적 서열을 함유하는 가닥)의 보체 가닥 상에 있다. 일부 실시형태에서, PAM은 NGG, NNGRRT, NNGRR(N), NNAGAAW, NNNNG(A/C)TT 및 NNNNRYAC으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0202] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 가이드 RNA 서열은 PAM 서열에 인접한 서열에 상보성이다.

[0203] 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 서열은 인간 참조 게놈 hg38에서의 좌표에 따라 본 명세서에서의 표로부터 선택된 게놈 영역 내의 서열에 상보성인 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 서열은 본 명세서에서의 표에서 선택된 게놈 영역 내로부터 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 서열에 상보성인 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 서열은 본 명세서에서의 표에서 선택된 게놈 영역에 걸쳐 있는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 서열에 상보성인 서열을 포함한다.

[0204] 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표적-특이적 절단을 매개하여 이중-가닥의 파손(DSB)을 초래한다. 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 표적-특이적 절단을 매개하여 단일-가닥의 파손(SSB 또는 Nick)을 초래한다.

[0205] E. 화학적으로 변형된 gRNA

[0206] 본 명세서에서 임의의 실시형태에서, gRNA는 화학적으로 변형될 수 있다. 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오티드를 포함하는 gRNA는 규범적 A, G, C 및 U 잔기의 대신에 또는 이에 부가하여 사용되는 하나 이상의 비-자연적으로 또는 자연적으로 발생하는 구성요소 또는 구성의 존재를 기재하기 위해, "변형된" gRNA 또는 "화학적으로 변형된" gRNA로 불린다. 일부 실시형태에서, 변형된 gRNA는 비-규범적 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드로 합성되며, 여기서는 "변형된"으로 불린다. 변형된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오티드는 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: (i) 포스포디에스테르 백본 연결에서 비-연결 인산염 산소 중 하나 또는 둘 모두 또는 연결 인산염 산소 중 하나 또는 둘 모두의 변경, 예를 들어, 대체(예시적인 백본 변형); (ii) 리보스 당, 예를 들어

어 리보스 당 상의 2' 하이드록실의 구성성분의 변경, 예를 들어 대체(예시적인 당 변형); (iii) "테포스포" 링커로 포스페이트 모이어티의 전체 대체(예시적인 백본 변형); (iv) 비-규범적 핵염기를 포함하는 자연적으로 발생하는 핵염기의 변형 또는 대체(예시적인 염기 변형); (v) 리보스-포스페이트 백본의 대체 또는 변형(예시적인 백본 변형); (vi) 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단 또는 5' 말단의 변형, 예를 들어, 말단 포스페이트 군의 제거, 변형 또는 대체 또는 모이어티, 캡 또는 링커의 접합(이러한 3' 또는 5' 캡 변형은 당 또는 백본 변형을 포함할 수 있음); 및 (vii) 당의 변형 또는 대체(예시적인 당 변형).

[0207] 상기에 열거된 것과 같은 화학적 변형을 조합하여 2개, 3개, 4개 또는 그 초과를 가질 수 있는 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드(집합적으로 "잔기")를 포함하는 변형된 gRNA를 제공할 수 있다. 예를 들어, 변형된 잔기는 변형된 당 및 변형된 핵염기를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, gRNA의 모든 염기는 변형되며, 예를 들어 모든 염기는 포스포로티오에이트기와 같은 변형된 포스페이트기를 갖는다. 특정 실시형태에서, gRNA 분자의 포스페이트기의 모두 또는 실질적으로 모두가 포스포로티오에이트기로 대체된다. 일부 실시형태에서, 변형된 gRNA는 RNA의 5' 말단 또는 그 근처에 적어도 하나의 변형된 잔기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 변형된 gRNA는 RNA의 3' 말단 또는 그 부근에 적어도 하나의 변형된 잔기를 포함한다. 특정 gRNA는 RNA의 5' 말단 및 3' 말단 또는 그 근처에 적어도 하나의 변형된 잔기를 포함한다.

[0208] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 WO2018/107028에 개시된 변형 패턴 중 하나를 포함하며 이의 내용은 관련 부분에서 참조로 본 명세서에 포함된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 본 명세서에 참조로 포함된 US20170114334에 개시된 구조/변형 패턴 중 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 가이드 RNA는 본 명세서에 참조로 포함된 WO2017/136794, WO2017004279, US2018187186, US2019048338에 개시된 구조/변형 패턴 중 하나를 포함한다.

[0209] F. RNA-가이드된 DNA-결합제를 인코딩하는 mRNA

[0210] 일부 실시형태에서, 세포 또는 방법은 본 명세서에 기재된 Cas 뉴클레아제와 같은 RNA-가이드된 DNA-결합제를 인코딩하는 개방 판독 프레임(ORF)을 포함하는 mRNA를 포함한다. Cas9 ORF는 본 명세서에서 제공되고 당업계에 공지되어 있다. 일 예로서, Cas9 ORF는 코딩 서열이 하나 이상의 아미노산에 대한 하나 이상의 대체 코돈을 포함하도록 코돈 최적화될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 "대체 코돈"은 주어진 아미노산에 대한 코돈 활용에서의 변이를 지칭하고, 주어진 발현 시스템에 대해 바람직하거나 최적화된 코돈(코돈 최적화)일 수도 있고 아닐 수도 있다. 바람직한 코돈 활용, 또는 주어진 발현 시스템에서 잘-용인되는 코돈은 당업계에 공지되어 있다. WO2013/176772, WO2014/065596, WO2016/106121 및 WO2019/067910의 Cas9 코딩 서열, Cas9 mRNA 및 Cas9 단백질 서열은 본 명세서에 참조로 포함된다. 특히, WO2019/067910의 단락 [0449]에서 표의 ORF 및 Cas9 아미노산 서열, 및 WO2019/067910의 단락 [0214] - [0234]의 Cas9 mRNA 및 ORF는 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0211] 일부 실시형태에서, 변형된 ORF는 적어도 하나, 복수 또는 모든 우리딘 위치에서 변형된 우리딘을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 예를 들어, 할로젠, 메틸 또는 에틸로 5 위치에서 변형된 우리딘이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 예를 들어, 할로젠, 메틸 또는 에틸로 1 위치에서 변형된 슈도우리딘이다. 변형된 우리딘은 예를 들어 슈도우리딘, N1-메틸-슈도우리딘, 5-메톡시우리딘, 5-요오도우리딘 또는 이의 조합일 수 있다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 5-메톡시우리딘이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 5-요오도우리딘이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 N1-메틸-슈도우리딘이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘과 N1-메틸-슈도우리딘의 조합이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘과 5-메톡시우리딘의 조합이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 N1-메틸 슈도우리딘과 5-메톡시우리딘의 조합이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 5-요오도우리딘과 N1-메틸-슈도우리딘의 조합이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 슈도우리딘과 5-요오도우리딘의 조합이다. 일부 실시형태에서, 변형된 우리딘은 5-요오도우리딘과 5-메톡시우리딘의 조합이다.

[0212] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 mRNA는 Cap0, Cap1, 또는 Cap2와 같은 5' 캡을 포함한다. 5' 캡은 일반적으로 7-메틸구아닌 리보뉴클레오타이드(이는 추가로 변형될 수 있음, 예를 들어 ARCA(항-역전 캡 유사체; Thermo Fisher Scientific Cat. No. AM8045)는 구아닌 리보뉴클레오타이드의 5' 위치에 연결된 7-메틸구아닌 3'-메톡시-5'-트리포스페이트를 포함하는 캡 유사체임)이며 이는 mRNA의 5'-대-3' 사슬의 제1 뉴클레오타이드, 즉 제1 캡-근위 뉴클레오타이드의 5' 위치에 5'-트리포스페이트를 통해 연결된다. Cap0에서 mRNA의 제1 및 제2 캡-근위 뉴클레오타이드의 리보스 둘 모두는 2'-하이드록실을 포함한다. Cap1에서 mRNA의 제1 및 제2 전사된 뉴클레오타이드의 리보스는 각각 2'-메톡시 및 2'-하이드록실을 포함한다. 예를 들어, CleanCap™ AG (m7G(5')ppp(5')(2'OMeA)pG; TriLink Biotechnologies Cat. No. N-7113) 또는 CleanCap™ GG

(m7G(5')ppp(5')(2'OMeG)pG; TriLink Biotechnologies Cat. No. N-7133) 참조. Cap2에서 mRNA의 제1 및 제2 캡-근위 뉴클레오타이드의 리보스 둘 모두는 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-E2115 참조.

[0213] 일부 실시형태에서, mRNA는 폴리-아데닐화된(폴리-A) 꼬리를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리-A 꼬리는 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 100개의 아데닌(서열번호: 147), 선택적으로 최대 300개의 아데닌(서열번호: 148)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리-A 꼬리는 95, 96, 97, 98, 99, 또는 100개의 아데닌 뉴클레오타이드(서열번호: 149)를 포함한다.

[0214] G. 조작을 위한 T 세포

[0215] 본 명세서에서 제공되는 조작된 세포는 CD4+ T 세포가 풍부한 세포군으로부터 제조된다. 이러한 세포는 예를 들어, StemCell Technologies를 포함하는 다양한 공급원으로부터 상업적으로 이용가능한 신선한 류코팩 샘플로부터 쉽게 얻을 수 있다. CD4+ T 세포는 예를 들어 인간 CD4+ T 세포 분리 키트를 사용한 음성 선택에 의해 일상적인 방법을 사용하여 상업적으로 이용가능한 키트를 사용하여 분리할 수 있다. 그러나, 다른 공급원으로부터 CD4+ T 세포의 제조의 방법도 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 조혈 줄기 세포(골수 또는 제대혈에서 분리된 것과 같은 HSC), 조혈 전구 세포(예를 들어, 림프계 전구 세포) 또는 중간엽 줄기 세포(MSC)와 같은 다능성 세포를 사용하여 CD4+ T 세포를 얻을 수 있다. 다능성 세포는 하나 초과인 세포 유형으로 발달할 수 있지만 분화의 폭에서 만능성 세포보다 더 제한적이다. 다능성 세포는 확립된 세포주로부터 유래되거나 인간 골수 또는 탭줄로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, HSC는 G-CSF-유도된 동원, 플렉사포르-유도된 동원, 또는 이의 조합에 이어서 환자 또는 건강한 공여자로부터 분리될 수 있다. 혈액 또는 골수로부터 HSC를 분리하기 위해, 혈액 또는 골수에서의 세포는 CD4 및 CD8(T 세포), CD45(B 세포), GR-I(과립구) 및 Iad(분화된 항원-제시 세포)에 대한 항체와 같이 원치 않는 세포에 결합하는 항체에 의해 패닝될 수 있다(예를 들어, Inaba, 등 (1992) *J Exp Med.* 176: 1693-1702 참조). CD4+ T 세포로의 분화를 촉진하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0216] III. 전달 방법

[0217] 본 명세서에 개시된 가이드 RNA, RNA-가이드된 DNA 결합제(예를 들어, Cas 뉴클레아제), 및 핵산 서열은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어, IL10, CTLA4를 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함하고; 그리고 선택적으로 표적화 수용체, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 추가로 포함하고, 그리고 선택적으로 당업계에서 이용가능한 다양한 공지되고 적합한 방법을 사용하여 TCR 서열(들)의 변형, 예를 들어 녹다운을 추가로 포함하는 조작된 T 세포의 생산을 위해 시험관내 또는 생체외에서 세포 또는 세포군에 전달될 수 있다. 가이드 RNA, RNA-가이드된 DNA 결합제 및 핵산 작제물은 적절하게 동일하거나 상이한 전달 방법을 사용하여 개별적으로 또는 임의의 조합으로 함께 전달될 수 있다.

[0218] 통상의 바이러스 및 비-바이러스 기반 유전자 전달 방법은 세포(예를 들어, 포유동물 세포) 및 표적 조직에서 가이드 RNA 뿐만 아니라 RNA-가이드된 DNA-결합제 및 공여자 작제물을 도입하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에서 추가로 제공되는 바와 같이, 비-바이러스 벡터 전달 시스템 핵산 예컨대 비-바이러스 벡터, 플라스미드 벡터, 및 예를 들어 네이키드 핵산, 및 리포솜, 지질 나노입자(LNP) 또는 폴록사머와 같은 전달 비히클과 복합체화된 핵산. 바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 및 RNA 바이러스를 포함한다.

[0219] 핵산의 비-바이러스 전달을 위한 방법 및 조성물은 전기천공법, 리포펙션, 마이크로인젝션, 바이오리스틱스, 바이로솜, 리포솜, 면역리포솜, LNP, 폴리양이온 또는 지질:핵산 접합체, 네이키드 핵산(예를 들어, 네이키드 DNA/RNA), 인공 비리 온 및 DNA의 작용제-강화된 섭취를 포함한다. 예를 들어 Sonitron 2000 시스템(Rich-Mar)을 사용하는 소노포레이션이 또한 핵산 전달에 사용될 수 있다.

[0220] 가이드 RNA, RNA-가이드된 DNA 결합제, 및 공여자 작제물을 단독으로 또는 조합하여 함유하는 다양한 전달 시스템(예를 들어, 벡터, 리포솜, LNP)은 또한 생체외에서 세포 또는 세포 배양물에 투여될 수 있다. 투여는 주사, 주입, 국소 적용 및 전기천공법을 포함하지만 이에 제한되지 않는 혈액, 체액 또는 세포와 궁극적인 접촉으로 분자를 도입하기 위해 일반적으로 사용되는 임의의 경로에 의해 된다. 그러한 핵산을 투여하는 적합한 방법이 이용가능하고 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0221] 특정 실시형태에서, 본 개시내용은 본 명세서에 개시된 임의의 조성물, 예를 들어, IFNG 및 TNFA를 변형(예를 들어, 녹다운)시키기 위해 본 명세서에 기재된 가이드 서열 중 임의의 하나 이상을 포함하는 가이드 RNA 또는 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어 IL10, 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR을 인코

당하는 서열(들)을 포함하는 공여자 작제물을 인코딩하는 DNA 또는 RNA 벡터를 제공한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 또한 RNA-가이드된 DNA 결합체를 인코딩하는 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 발명은 본 명세서에 기재된 임의의 하나 이상의 조성물을 인코딩하는 DNA 또는 RNA 벡터 또는 임의의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 예를 들어 프로모터, 인핸서 및 조절 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 하나 이상의 가이드 서열을 포함하는 가이드 RNA를 포함하는 벡터는 또한 본 명세서에 개시된 바와 같은 crRNA, trRNA 또는 crRNA 및 trRNA를 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열(들)을 포함한다.

[0222] 특정 실시형태에서, 본 개시내용은 조절 T 세포 촉진 분자 및 표적화 수용체를 인코딩하는 DNA 또는 RNA 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 조절 T 세포 촉진 분자에 대한 코딩 서열을 또한 함유하는 세포에 대한 수용체의 존재에 기반한 세포의 선택을 가능하게 한다. 세포 표면 분자의 존재에 기반한 양성 및 음성 선별 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0223] 일부 실시형태에서, 벡터는 본 명세서에 기재된 가이드 RNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 가이드 RNA의 하나의 카피를 포함한다. 다른 실시형태에서, 벡터는 가이드 RNA의 하나 초과 카피를 포함한다. 하나 초과 카피의 가이드 RNA가 있는 실시형태에서, 가이드 RNA는 상이한 표적 서열을 표적화하도록 비-동일할 수 있거나, 동일한 표적 서열을 표적화한다는 점에서 동일할 수 있다. 벡터가 하나 초과 카피의 가이드 RNA를 포함하는 일부 실시형태에서, 각각의 가이드 RNA는 Cas RNP 복합체와 같은 RNA-가이드된 DNA 뉴클레아제와의 복합체 내의 활성 또는 안정성과 같은 다른 상이한 특성을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 프로모터, 3' UTR 또는 5' UTR과 같은 적어도 하나의 전사 또는 번역 제어 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일 실시형태에서, 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: 2620-2628 참조. 일부 실시형태에서, 프로모터는 RNA 중합효소 III(Pol III)에 의해 인식될 수 있다. Pol III 프로모터의 비-제한적인 예는 U6 및 H1 프로모터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 마우스 또는 인간 U6 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 다른 실시형태에서, 가이드 RNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 마우스 또는 인간 H1 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 하나 초과 카피의 가이드 RNA가 있는 실시형태에서, 발현을 유도하기 위해 사용된 프로모터는 동일하거나 상이할 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA의 crRNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드 및 가이드 RNA의 trRNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드는 동일한 벡터 상에 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, crRNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드 및 trRNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드는 동일한 프로모터에 의해 구동될 수 있다. 일부 실시형태에서, crRNA 및 trRNA는 단일 전사체로 전사될 수 있다. 예를 들어, crRNA 및 trRNA는 단일 전사체로부터 처리되어 이중-분자 가이드 RNA를 형성할 수 있다. 대안적으로, crRNA 및 trRNA는 단일-분자 가이드 RNA(sgRNA)로 전사될 수 있다. 다른 실시형태에서, crRNA 및 trRNA는 동일한 벡터 상의 그 상응하는 프로모터에 의해 구동될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, crRNA 및 trRNA는 상이한 벡터에 의해 인코딩될 수 있다.

[0224] 일부 실시형태에서, 가이드 RNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 Cas 단백질과 같은 RNA-가이드된 DNA-결합체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 동일한 벡터 상에 위치될 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 및 RNA-가이드된 DNA-결합체 예컨대 Cas 단백질의 발현은 그 자신의 상응하는 프로모터에 의해 구동될 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA의 발현은 Cas 단백질과 같은 RNA-가이드된 DNA-결합체의 발현을 구동하는 동일한 프로모터에 의해 구동될 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 및 RNA-가이드된 DNA-결합체 예컨대 Cas 단백질 전사체는 단일 전사체 내에 함유될 수 있다. 예를 들어, 가이드 RNA는 Cas 단백질 전사체와 같은 RNA-가이드된 DNA-결합체의 비번역된 영역(UTR) 내에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서 가이드 RNA는 전사체의 5' UTR 내에 있을 수 있다. 다른 실시형태에서, 가이드 RNA는 전사체의 3' UTR 내에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 전사체의 세포내 반감기는 이의 3' UTR 내에 가이드 RNA를 함유함에 의해 그리고 이에 의해 이의 3' UTR의 길이를 단축시킴에 의해 감소될 수 있다. 추가 실시형태에서, 가이드 RNA는 전사체의 인트론 내에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 적합한 스플라이스 부위는 가이드 RNA가 전사체의 외부로 적절하게 스플라이싱되도록 가이드 RNA가 위치되는 인트론에 추가될 수 있다. 일부 실시형태에서, 가까운 일시적 근접에서 동일한 벡터로부터 RNA-가이드된 DNA-결합체 예컨대 Cas 단백질 및 가이드 RNA의 발현은 CRISPR RNP 복합체의 보다 효율적인 형성을 촉진할 수 있다.

[0225] 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 또는 RNA-가이드된 DNA-결합체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어, IL10, CTLA4; 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MadCAM-1 CAR을 인코딩하는 서열을 포함하는 작제물을 포함하는 동일한 벡터 상에 위치될 수 있다. 일부 실시형태에서, 동일한 벡터 상의 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어 IL10, CTLA4; 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MadCAM-1 CAR

를 인코딩하는 서열을 포함하는 작제물과 가이드 RNA(또는 RNA-가이드된 DNA 결합제)의 근접성은 가이드 RNA/RNA-가이드된 DNA 결합제에 의해 생성된 삽입의 부위 내로 작제물의 보다 효율적인 삽입을 용이하게 할 수 있다.

[0226] 특정 실시형태에서, DNA 및 RNA 벡터는 벡터에 또는 게놈 삽입 부위에 존재하는 단일 프로모터 하에서 발현을 위한 하나 초과와 개방 판독 프레임을 포함할 수 있다. 이러한 실시형태에서, 자기-절단 펩티드에 대한 코딩 서열은 개방 판독 프레임 사이에 포함될 수 있다. 자기-절단 펩티드는 예를 들어 2A 펩티드, 예를 들어 P2A 펩티드, E2A 펩티드, F2A 펩티드 또는 T2A 펩티드일 수 있다.

[0227] 일부 실시형태에서, 벡터는 sgRNA를 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열(들) 및 Cas 단백질 예컨대 Cas9 또는 Cpf1일 수 있는 RNA-가이드된 DNA 결합제를 인코딩하는 mRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 crRNA, trRNA, 및 Cas 단백질 예컨대 Cas9 또는 Cpf1일 수 있는 RNA-가이드된 DNA 결합제를 인코딩하는 mRNA를 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열(들)을 포함한다. 일 실시형태에서, Cas9는 스트렙토코커스 피오케네스(즉, Spy Cas9)으로부터 유래한다. 일부 실시형태에서, crRNA, trRNA, 또는 crRNA 및 trRNA(sgRNA일 수 있음)를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 자연적으로-발생하는 CRISPR/Cas 시스템으로부터의 반복 서열의 전부 또는 일부에 의해 축적된 가이드 서열을 포함하거나 이로 구성된다. crRNA, trRNA, 또는 crRNA 및 trRNA를 포함하거나 이로 구성된 핵산은 벡터 서열을 추가로 포함할 수 있으며 여기서 벡터 서열은 crRNA, trRNA 또는 crRNA 및 trRNA와 함께 자연적으로 발견되지 않는 핵산을 포함하거나 이로 구성된다.

[0228] 일부 실시형태에서, crRNA 및 trRNA는 하나의 벡터 내의 비-연속적 핵산에 의해 인코딩된다. 다른 실시형태에서, crRNA 및 trRNA는 인접한 핵산에 의해 인코딩될 수 있다. 일부 실시형태에서, crRNA 및 trRNA는 단일 핵산의 반대 가닥에 의해 인코딩된다. 다른 실시형태에서, crRNA 및 trRNA는 단일 핵산의 동일한 가닥에 의해 인코딩된다.

[0229] 일부 실시형태에서, 벡터는 본 명세서에 개시된 바와 같은 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어 IL10, 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MadCAM-1을 인코딩하는 서열을 포함하는 공여자 작제물을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 공여자 작제물에 부가하여, 벡터는 본 명세서에 기재된 가이드 RNA를 인코딩하는 핵산 또는 RNA-가이드된 DNA-결합제(예를 들어, Cas9와 같은 Cas 뉴클레아제)를 인코딩하는 핵산을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합제를 인코딩하는 핵산은 각각 또는 둘 모두가 본 명세서에 개시된 공여자 작제물을 포함하는 벡터와는 별도의 벡터 상에 있다. 임의의 실시형태에서, 벡터는 본 명세서에 기재된 바와 같은 프로모터, 인핸서, 조절 서열을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다른 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 공여자 작제물의 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어 IL10, 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MadCAM-1의 발현을 유도하지 않는다. 일부 실시형태에서, 벡터는 crRNA, trRNA, 또는 crRNA 및 trRNA를 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 sgRNA 및, Cas 뉴클레아제(예를 들어, Cas9)일 수 있는 RNA-가이드된 DNA 뉴클레아제를 인코딩하는 mRNA를 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 벡터는 crRNA, trRNA, 및 Cas9와 같은 Cas 뉴클레아제일 수 있는 RNA-가이드된 DNA 뉴클레아제를 인코딩하는 mRNA를 인코딩하는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열(들)을 포함한다. 일부 실시형태에서, Cas9는 스트렙토코커스 피오케네스(즉, Spy Cas9)에서 유래한다. 일부 실시형태에서, crRNA, trRNA, 또는 crRNA 및 trRNA(sgRNA일 수 있음)를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 자연적으로-발생하는 CRISPR/Cas 시스템으로부터의 반복 서열의 전부 또는 일부에 의해 축적된 가이드 서열을 포함하거나 이로 구성된다. crRNA, trRNA, 또는 crRNA 및 trRNA를 포함하거나 이로 구성된 핵산은 벡터 서열을 추가로 포함할 수 있으며 여기서 벡터 서열은 crRNA, trRNA 또는 crRNA 및 trRNA와 함께 자연적으로 발견되지 않는 핵산을 포함하거나 이로 구성된다.

[0230] 일부 실시형태에서, 벡터는 원형일 수 있다. 다른 실시형태에서, 벡터는 선형일 수 있다. 일부 실시형태에서, 벡터는 지질 나노입자, 리포솜, 비-지질 나노입자 또는 바이러스 캡시드에 둘러싸일 수 있다. 비-제한적인 예시적 벡터는 플라스미드, 파지미드, 코스미드, 인공 염색체, 미니염색체, 트랜스포존, 바이러스 벡터 및 발현 벡터를 포함한다.

[0231] 일부 실시형태에서, 벡터는 바이러스 벡터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 이의 야생형 대응물로부터 유전적으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터는 클로닝을 용이하게 하거나 벡터의 하나 이상의 특성이 변경되도록 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 결실 또는 치환을 포함할 수 있다. 이러한 특성은 패키징 용량, 형질도입 효율, 면역원성, 게놈 통합, 복제, 전사 및 번역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 게놈의 일부는 바이러스가 더 큰 크기를 갖는 외인성 서열을 패키징할 수 있도록 결실될 수 있다. 일부 실시

형태에서, 바이러스 벡터는 향상된 형질도입 효율을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, a에서 바이러스에 의해 유도된 면역 반응은 감소될 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 서열의 게놈 안으로의 통합을 촉진하는 바이러스 유전자(예컨대, 예를 들어 인테그라제)는 바이러스가 통합되지 않도록 돌연변이될 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 복제 결함일 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 벡터 상의 코딩 서열의 발현을 유도하기 위한 외인성 전사 또는 번역 제어 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스는 헬퍼-의존적일 수 있다. 예를 들어, 바이러스는 벡터를 증폭하고 바이러스 입자 안으로 패키징하는데 필요한 바이러스 성분(예컨대 예를 들어, 바이러스 단백질)을 공급하기 위해 하나 이상의 헬퍼 바이러스를 필요로 할 수 있다. 이러한 경우, 바이러스 성분을 인코딩하는 하나 이상의 벡터를 포함하는 하나 이상의 헬퍼 성분은 본 명세서에 기재된 벡터 시스템과 함께 세포 또는 세포군 안으로 도입될 수 있다. 다른 실시형태에서, 바이러스는 헬퍼-프리일 수 있다. 예를 들어, 바이러스는 헬퍼 바이러스 없이 벡터를 증폭하고 패키징할 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 벡터 시스템은 또한 바이러스 증폭 및 패키징에 필요한 바이러스 성분을 인코딩할 수 있다.

[0232] 비-제한적인 예시적인 바이러스 벡터는 아데노-연관된 바이러스(AAV) 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 헬퍼 의존성 아데노바이러스 벡터(HDA), 단순 헤르페스 바이러스(HSV-1) 벡터, 박테리오파지 T4, 배큘로 바이러스 벡터, 및 레트로바이러스 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 AAV 벡터일 수 있다. 다른 실시형태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터일 수 있다.

[0233] 일부 실시형태에서, "AAV"는 모든 혈청형, 서브타입 및 자연적으로 발생하는 AAV 뿐만 아니라 재조합 AAV를 지칭한다. "AAV"는 바이러스 자체 또는 그 유도체를 지칭하는데 사용될 수 있다. 용어 "AAV"는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10 및 이의 하이브리드, 조류 AAV, 소과 AAV, 개과 AAV, 말과 AAV, 영장류 AAV, 비영장류 AAV 및 양과 AAV를 포함한다. AAV의 다양한 혈청형의 게놈 서열 뿐만 아니라 고유 말단 반복(TR), Rep 단백질 및 캡시드 서브유닛의 서열은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 서열은 문헌 또는 GenBank와 같은 공개 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "AAV 벡터"는 AAV 기원이 아닌 이중 서열(즉, AAV에 이중인 핵산 서열)을 포함하는, 전형적으로 관심있는 이중 폴리펩티드를 인코딩하는 서열을 포함하는 AAV 벡터를 지칭한다. 작제물은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV3B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAVrh.64R1, AAVhu.37, AAVrh.8, AAVrh.32.33, AAV8, AAV9, AAV-DJ, AAV2/8, AAVrh10, AAVLK03, AV10, AAV11, AAV12, rh10, 및 이의 하이브리드, 조류 AAV, 소과 AAV, 개과 AAV, 말과 AAV, 영장류 AAV, 비영장류 AAV 및 양과 AAV 캡시드 서열을 포함할 수 있다. 일반적으로, 이중 핵산 서열(이식유전자)은 적어도 하나, 일반적으로 2개의 AAV 역위 말단 반복 서열(ITR)에 의해 측정된다. AAV 벡터는 단일-가닥(ssAAV) 또는 자기-상보성(scAAV)일 수 있다.

[0234] 일부 실시형태에서, 렌티바이러스는 통합될 수 있다. 일부 실시형태에서, 렌티바이러스는 통합되지 않을 수 있다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 아데노바이러스는 고-클로닝 능력 또는 "장없는" 아데노바이러스일 수 있으며, 여기서 5' 및 3' 역위 말단 반복(ITR) 및 패키징 신호('I')로부터 떨어진 모든 코딩 바이러스 영역은 그 패키징 용량을 증가시키기 위해 바이러스로부터 결실된다. 또 다른 실시형태에서, 바이러스 벡터는 HSV-1 벡터일 수 있다. 일부 실시형태에서, HSV-1-기반 벡터는 헬퍼 의존적이고, 다른 실시형태에서 그것은 헬퍼 독립적이다. 예를 들어, 패키징 서열만 유지하는 앰플리콘 벡터는 패키징을 위한 구조적 구성요소가 있는 헬퍼 바이러스가 필요한 반면, 비-필수 바이러스 기능을 제거하는 30kb-결실된 HSV-1 벡터는 헬퍼 바이러스를 필요로 하지 않는다. 추가 실시형태에서, 바이러스 벡터는 박테리오파지 T4일 수 있다. 일부 실시형태에서, 박테리오파지 T4는 바이러스의 헤드가 비어 있을 때 선형 또는 원형 DNA 또는 RNA 분자를 패키징할 수 있다. 추가 실시형태에서, 바이러스 벡터는 배큘로바이러스 벡터일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터일 수 있다. 더 작은 클로닝 용량을 갖는 AAV 또는 다른 벡터를 사용하는 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 바와 같은 벡터 시스템의 모든 구성요소를 전달하기 위해 하나 초과 벡터를 사용하는 것이 필요할 수 있다. 예를 들어, 하나의 AAV 벡터는 Cas 단백질(예를 들어, Cas9)과 같은 RNA-가이드된 DNA-결합제를 인코딩하는 서열을 함유할 수 있는 반면, 제2 AAV 벡터는 하나 이상의 가이드 서열을 함유할 수 있다.

[0235] 일부 실시형태에서, 벡터 시스템은 세포에서 하나 이상의 뉴클레아제 구성요소의 발현을 유도할 수 있다. 일부 실시형태에서, 벡터는 일단 세포에 통합되면 하나 이상의 코딩 서열의 발현을 구동하는 프로모터를 포함하지 않는다(예를 들어, 본 명세서에 예시된 바와 같이 세포의 특정한 게놈 좌에서 삽입될 때와 같이 세포의 내인성 프로모터를 사용함). 상이한 유형의 세포, 예를 들어 CD4+ T 세포에서 발현을 구동하기 위한 적합한 프로모터는

당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 야생형일 수 있다. 다른 실시형태에서, 프로모터는 보다 효율적이거나 효과적인 발현을 위해 변형될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 프로모터는 절삭되지만 그 기능을 유지할 수 있다. 예를 들어, 프로모터는 벡터를 바이러스 안에 적절히 패키징하기에 적합한 정상 크기 또는 감소된 크기를 가질 수 있다.

[0236] 일부 실시형태에서, 벡터는 본 명세서에 기재된 Cas 단백질(예를 들어, Cas9)과 같은 RNA-가이드된 DNA-결합제를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 벡터에 의해 인코딩된 뉴클레아제는 Cas 단백질일 수 있다. 일부 실시형태에서, 벡터 시스템은 뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 하나의 카피를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 벡터 시스템은 뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열의 하나 초과 카피를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 적어도 하나의 전사 또는 번역 제어 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 적어도 하나의 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0237] 일부 실시형태에서, 벡터는 본 명세서에 기재된 바와 같은 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어, IL10, CTLA4; 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR을 인코딩하는 서열을 포함하는 임의의 하나 이상의 작제물을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어, IL10, CTLA4; 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR의 서열은 적어도 하나의 전사 또는 번역 제어 서열에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어, IL10, CTLA4; 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR의 서열은 적어도 하나의 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어, IL10, CTLA4; 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR의 서열은 이중 유전자의 발현을 구동하는 프로모터에 연결되지 않는다.

[0238] 일부 실시형태에서, 프로모터는 구성적, 유도성 또는 조직-특이적일 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 구성적 프로모터일 수 있다. 비-제한적인 예시적인 구성적 프로모터는 사이토메갈로바이러스 즉시 초기 프로모터(CMV), 유인원 바이러스(SV40) 프로모터, 아데노바이러스 메이저 레이트(MLP) 프로모터, 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 포스포글리세르산 키나제(PGK) 프로모터, 신장 인자-알파(EF1a) 프로모터, 유비퀴틴 프로모터, 액틴 프로모터, 튜블린 프로모터, 면역글로불린 프로모터, 이의 기능적 단편, 또는 임의의 전기한 것의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 CMV 프로모터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 절삭된 CMV 프로모터일 수 있다. 다른 실시형태에서, 프로모터는 EF1a 프로모터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 유도성 프로모터일 수 있다. 비-제한적인 예시적인 유도성 프로모터는 열 충격, 빛, 화학물질, 펩티드, 금속, 스테로이드, 항생제 또는 알코올에 의해 유도가능한 것들을 포함한다. 일부 실시형태에서, 유도성 프로모터는 예를 들어 Tet-On[®] 프로모터(Clontech)와 같이 낮은 기저(비-유도된) 발현 수준을 갖는 것일 수 있다.

[0239] 일부 실시형태에서, 프로모터는 조직-특이적 프로모터, 예를 들어 T 세포에서의 발현에 특이적인 프로모터일 수 있다.

[0240] 일부 실시형태에서, 조성물은 벡터 시스템을 포함한다. 일부 실시형태에서, 벡터 시스템은 하나의 단일 벡터를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 벡터 시스템은 2개의 벡터를 포함할 수 있다. 추가 실시형태에서, 벡터 시스템은 3개의 벡터를 포함할 수 있다. 상이한 가이드 RNA가 다중화에 사용되거나 가이드 RNA의 다중 카피가 사용되는 경우, 벡터 시스템은 3개 초과 벡터를 포함할 수 있다.

[0241] 일부 실시형태에서, 벡터 시스템은 표적 세포로 전달된 후에만 발현을 시작하기 위한 유도성 프로모터를 포함할 수 있다. 비-제한적인 예시적인 유도성 프로모터는 열 충격, 빛, 화학물질, 펩티드, 금속, 스테로이드, 항생제 또는 알코올에 의해 유도가능한 것들을 포함한다. 일부 실시형태에서, 유도성 프로모터는 예를 들어 Tet-On[®] 프로모터(Clontech)와 같이 낮은 기저(비-유도된) 발현 수준을 갖는 것일 수 있다.

[0242] 추가 실시형태에서, 벡터 시스템은 조직-특이적 프로모터를 포함할 수 있다.

[0243] 비-제한적인 예시적인 바이러스 벡터 서열이 하기에 제공된다:

[0244] CTLA4 렌티바이러스 삽입물(뉴클레오타이드 서열)

[0245] ATGGCCTGCTTGGGCTTCCAAAGGCATAAAGCCAGCTTAATCTTGCTACTCGCACGTGGCCCTGCACATTGCTCTTTTCTCTGTTTCATTCCCGTGT
TGCAAGGCGATGCATGTGGCACACCTGCCGTCTTCTGGCATCATCAAGAGGTATTGCTAGCTTCGTTGTGAGTACGCCTCCCTGGAAAGCGACGGAG
GTGCGCGTCACTGTATTGCGGAAGCCGACAGCCAAGTTACTGAAGTCTGCGCGGAACGTATATGATGGCAATGAGCTGACATTCCTTGACGATTCAATC

TGCACGGGAACAAGTAGTGGTAACCAAGTGAATCTCACTATTCAAGGTCTGAGAGCCATGGACACCGCCTCTACATTGTAAAGTGGAGCTGATGTATCCT
CCCCATATTATCTGGGGATCGGAAATGGGACACAGATATATGTTATTGATCCCGAGCCATGTCCCGATAGTGACTTCCTCTGTGGATACTTGCCGCTGTG
AGCAGTGGTTTGTGTTTTTATTCATTCTCTTACGGCAGTATCACTTTCAAAAATGCTCAAGAAGCGAAGTCTTTGACAACTGGCGTATATGTCAAAATG
CCACCAACAGAGCCGAATGTGAGAAACAGTCCAGCCGTACTTTATTCCTATAAACTGA (서열번호: 137)

[0246] CTLA4 렌티바이러스 삽입물(아미노산 서열)

[0247] MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSI
CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLIGINGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVVVKM
PPTEPECEKQFPYFIPIN* (서열번호: 130)

[0248] IL10 렌티바이러스 삽입물(뉴클레오타이드 서열)

[0249] ATGCACAGCTCAGCACTGCTCTGTTGCCTGGTCCTCTGACTGGGGTGAGGGCCAGCCAGGCCAGGGCACCCAGTCTGAGAACAGCTGCACCCACTTCCCA
GGCAACCTGCCTAACATGCTTCGAGATCTCCGAGATGCCTTCAGCAGAGTGAAGACTTTCTTTCAAATGAAGGATCAGCTGGACAACCTGTTGTTAAAGGAG
TCCTTGCTGGAGGACTTTAAGGTTACCTGGGTTGCCAAGCCTTGCTGAGATGATCCAGTTTACCTGGAGGAGGTGATGCCCCAAGCTGAGAACCAAGAC
CCAGACATCAAGGCGCATGTGAACCTCCCTGGGGGAGAACCCTGAAGACCTCAGGCTGAGGCTACGGCGCTGTCTCGATTCTTCCTGTGAAAACAAGAGC
AAGGCCGTGGAGCAGGTGAAGAATGCCTTTAATAAGCTCCAAGAGAAAGGCATCTACAAAGCCATGAGTGAGTTTGACATCTTCATCAACTACATAGAAGCC
TACATGACAATGAAGATACGAACTGA (서열번호: 138)

[0250] IL10 렌티바이러스 삽입물(아미노산 서열)

[0251] MHSSALLCCLVLLTGVRASPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLKESLLEDFKGYLGQCQLSEMIQFYLEEVPQAENQD
PDIKAHVNSLGENLKLRLRLRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN* (서열번호: 124)

[0252] FOXP3 렌티바이러스 삽입물(뉴클레오타이드 서열)

[0253] ATGCCCAACCCAGGCCTGGCAAGCCCTCGGCCCTTCCTTGCCCTTGCCCATCCCCAGGAGCCTCGCCAGCTGGAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGAC
CTGCTGGGGGCCCGGGCCAGGGGAACCTTCCAGGGCCGAGATCTCGAGGCGGGGCCATGCTCTCTTCTTCTTGAACCCATGCCACCATCGCAG
CTGCAGCTGCCACACTGCCCCTAGTCATGGTGGCACCTCCGGGGACGGCTGGGGCCCTTGCCCCACTTACAGGCACTCTCCAGGACAGGCCACATTTT
ATGCACCACTCTCAACGGTGGATGCCACGCCCGACCCCTGTGCTGCAGGTGCACCCCTGGAGAGCCAGCCATGATCAGCCTCACACCACCCACCACC
GCCACTGGGGTCTTCTCCCTCAAGGCCCGCCTGGCCTCCACCTGGGATCAACGTGGCCAGCCTGGAATGGGTGTCCAGGAGCCGGCACTGCTCTGCACC
TTCCCAATCCCAGTGACCCAGGAAGGACAGCACCTTTCCGGTGTGCCCCAGAGTCTTACCCACTGCTGGCAAATGGTGTCTGCAAGTGGCCCGGATGT
GAGAAGGTCTTCGAAGAGCCAGAGGACTTCTCAAGCACTGCCAGGCGGACCATCTTCTGGATGAGAAGGCGAGGGCACAATGTCTCTCCAGAGAGAGATG
GTACAGTCTCTGGAGCAGCAGCTGGTGTGGAGAAGGAGAAGCTGAGTGCCATGCAGGCCACCTGGCTGGGAAAATGGCACTGACCAAGGCTTCATCTGTG
GCATCATCCGACAAGGGCTCCTGCTGCATCGTAGCTGTGGCAGCCAAGGCCCTGTGCTCCAGCCTGGTCTGGCCCCGGGAGGCCCTGACAGCCTGTTT
GCTGTCCGGAGGCACCTGTGGGTAGCCATGGAAACAGCACATTTCCAGAGTCTCTCCACAACATGGACTACTTCAAGTTCCACAACATGCGACCCCTTTC
ACCTACGCCACGCTATCCGTGGGCCATCTGGAGGCTCCAGAGAAGCAGCGGACACTCAATGAGATCTACCACTGGTTACACGCATGTTTGCTTCTTC
AGAAACCATCTGCCACCTGGAAGAAGCCATCCGCCACAACCTGAGTCTGCACAAGTGCTTTGTGCGGGTGGAGAGCGAGAAGGGGGCTGTGTGGACCGTG
GATGAGCTGGAGTTCGCAAGAAACGGAGCCAGAGGCCAGCAGGTGTTCACCCCTACCTGGCCCTGATAA (서열번호: 139)

[0254] FOXP3 렌티바이러스 삽입물(아미노산 서열)

[0255] MPNRPKGKPSAPSLALGSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGTQGRDLRGGAHSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHF
MHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTATGVFSLKARPLPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPPLLANGVCKWPGC
EKVFEEPEDFLKHQADHLLDEKGRAQLLQREMVQSLEQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAPWSPGPREAPDSLF
AVRRHLWGSNGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILAEPKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAWTV
DELEFRKKRSQRPSRCSNPTPGP** (서열번호: 140)

[0256] 빈 렌티백터

[0257] ACGCGTGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGATGCCGATT
GGTGGAAGTAAGGTGGTACGATCGTGCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACGAACCACTGAATTGCCGATTGCAGAGATATTGT
ATTTAAGTGCTAGTCGATACATAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGTAACTAGGGAACCACTGCTTAAGCCTCA
ATAAAGCTTGCTTGTAGTCTCAAGTAGTGTGTGCCCCGTGTGTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGTGGAATAATCTC
TAGCAGTGGCGCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAACAGAGAGCTCTCTGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGCAAGAGGGCGAG
GGGGCGGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCG

CGATGGGAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTTAATCCT
GGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAAGCTTAGATCATTATATAATACAGTA
GCAACCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAG
CAAGCGGCCACTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACCATAGGAGT
AGCACCCACCAAGGCAAGAGAAGAGTGGTGAGAGAAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTAT
GGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAACAAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCA
TCTGTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAGATACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTGGGGTTG
CTCTGGAAGAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGA
CAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATG
GGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGC
TGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCAGACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGA
AGAAGAAGGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGATGGCCGCCCTTCACCGAGGGCCTATTTCCCATG
ATTCCTTCATATTGTCATATACGATACAAGGCTGTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGA
AAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTGTCAGTTTAAAAATTATGTTTAAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTCGATTCTTGGCTTTA
TATATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGAGTCTCTTTTTTGAAGACACTTCGGACTGTAGAACTCTGAACCTCGAGCAATTTAAAGAAAAGGGGGATT
GGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAACAAATTAACAAAATTTCAAAATTTCTGCGTT
GTTGTGCGTGCTCGTTCTCTGCTCTTACGCTACTGAATTCATACCGGTTCTTCGAAGGCCCTCCGCGCGGGTTTGGCGCTCCCGCGGGCGCCCCCTC
CTCACGGCGAGCGTGCCACGTCAGACGAAGGGCGAGCGAGCGTCTGATCCTTCCGCCGACGCTCAGGACAGCGCCGCTGCTCATAAGACTCGGCC
TTAGAACCCAGTATCAGCAGAAGGACATTTTAGGACGGGACTTGGGTGACTCTAGGCACTGGTTTCTTTCCAGAGAGCGGAACAGGCGAGGAAAAGTAG
TCCCTTCTCGGCGATTCTGCGGAGGGATCTCCGTGGGGCGGTGAACGCCGATGATTATATAAGGACGCGCGGGTGTGACAGCTAGTCCGTCGACGCG
GGATTGGGTGCGCGTTCTGTTTGTGGATCGCTGTGATCGTCACTTGGTCTAGACGCCACCATGAGCGGGGCGAGGAGCTGTTCCGCGGCATCGTCCCCG
TGCTGATCGAGCTGGACGGCGACGTGCACGGCCACAAGTTCAGCGTGCGCGCGAGGGCGAGGGCGACGCCACTACGGCAAGCTGGAGATCAAGTTTCATCT
GCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCTTGGTGACCACCTCTGCTACGGCATCCAGTGCTTCGCCCCTACCCGAGCACATGAAGATGAACG
ACTTCTTCAAGAGCGCCATGCCCGAGGGCTACATCCAGGAGCGACCATCCAGTTCCAGGACGACGGCAAGTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTTCGAGG
GCGACACCTGTGTAACGCATCGAGCTGAAGGGCAAGGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGCCACAAGCTGGAGTACAGCTTCAACAGCCACAACG
TGTACATCCGCCCGACAAGGCCAACACGGCTGGAGGCTAACTTCAAGACCCGCCACAACATCGAGGGCGGGCGGTGCAGCTGGCCGACCACTACCAGA
CCAACGTGCCCTTGGGCGACGGCCCCGTGCTGATCCCCATCAACCACTACCTGAGCACTCAGACCAAGATCAGCAAGGACCGCAACGAGGCCCGGACACCA
TGGTGCTCCTGGAGTCTTCAGCGCCTGCTGCCACACCCACGGCATGGACGAGCTGTACAGGGATCCGAGGGCAGAGGAAGCCTTCTAACATGCGGTGACG
TGGAGGAGAATCCCGGCCCTTCCGGGATGACCGAGTACAAGCCACGGTGCGCTCGCCACCCGCGACGCTCCCAGGGCCGTACGCACCTCGCCGCG
CGTTCCGCGACTACCCCGCCACGCGCCACACCGTCGATCCGACCGCCACATCGAGCGGGTACCGGAGCTGCAAGAACTCTTCTCAGCGCGTGGGGCTCG
ACATCGCAAGGTGTGGTTCGCGGACGACGGCGCCGCGTGGCGGTCTGGACCACGCCGAGAGCGTCGAAGCGGGGCGGTGTTCCGCGAGATCGGCCGCG
GCATGGCCGAGTTGAGCGGTTCCCGGTGGCCGCGCAGCAACAGATGGAAGGCCCTTGGCGCCGACCGGCCAAGGAGCCCGGTGGTTCTTGCCACCG
TCGGCGTCTCGCCGACCAACAGGGCAAGGGTCTGGGACGCGCGTCTGTCTCCCGGAGTGGAGCGGCGGAGCGCGCGGGGTGCCGCTTCTTGAGA
CCTCCGCGCCCGCAACCTCCCTTCTACGAGCGGTCTGGCTTACCGTACCGCCGACGTCGAGGTGCCGAAGGACCGCGACCTGGTGCATGACCCGCA
AGCCCGGTGCTGAATCTAGGTGCACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCTTTACGCTATGTG
GATACGCTGCTTAATGCCTTTGTATCATGTATTGCTTCCGATATGGCTTTCAATTTCTCTCTTGATAAATCCTGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGT
TGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTGAGTCTCTTCCGGGA
CTTTCGCTTTCCCTCCCTATTGCCACGGCGAACTATCGCGCGCTGCTTGGCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGTGTTGGGCACTGACAATTCGTGG
TGTGTGCGGGAAATCATCGTCTTTCTTGGCTGCTCGCTGTGTGCCACCTGGATTCTGCGCGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATC
CAGCGGACCTTCTTCCCGCGGCTGCTGCCGCTCTGCGGCTCTTCCGCTCTCGGCTTCAGAGTTCGATCTCTTTTGGGCCGCTCCC
CGCTGTGATCTTAAAGACCAATGACTTACAAGGACGTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAGAAAAGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAACGA
AGATAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAA
TAAAGCTTGCTTGTAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCGCTGTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGTGAAAAATCTCT
AGCAGTAGTAGTTTATGTCATCTTATTATCAGTATTTATAACTTGCAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAAGTGTATTATGACGCTTATAATGGT
TACAAATAAAGCAATAGCATCACAATTTACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTGCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTC
TGGCTTAGTATCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCTTCTCCGCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATG
CAGAGGCCGAGGCCCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGCTTTTTTGGAGGCTAGACTTTTGACAGAGACCAAAATCGTAATCATGTCA
TAGCTGTTTCTGTGTGAAATGTTATCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAA
CTCACATTAATTGCTTGGCTCACTGCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGCGGTTG
CGTATTGGGCGCTTCTCCGCTTCTGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGTTCGCTGCGCGGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTA
TCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTGTCTGGCGTTTTTCCATAGG

CTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCC
CTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTAT
CTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATCGTCTTGAGTCC
AACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTCTTGAAGTGGTGG
CCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGATTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAA
ACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGTCTGAC
GCTCAGTGGAACGAAAACTACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATAAAAATGAAGTTTAAATCA
ATCTAAAGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTGCTTCATCCATAGTTGCC
TGAATCCCCGTGCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACGGCTCCAGATTTA
TCAGCAATAAACAGCCAGCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCTCCATCCAGTCTATTAATTTGTTCCGGGAAGCTAGAGTA
AGTAGTTCGCGAGTTAATAGTTTGGCGAACGTTGTTGCCATTGTACAGGCATCGTGGTGTACAGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCC
CAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGCGAGTTTA
TCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAA
TAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCATATTGAAAAACGTTCT
TCGGGGCAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTACTTTTACCAGC
GTTTCTGGGTGAGCAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTAT
TGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAAGTG
CCACCTGACGTCTAAGAAACATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTCGCTCTCGCGCTTTCGGTGATGACGGTGAA
AACCTCTGACACATGCAGCTCCCGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCGTCAGGGCGCGTACGCGGTGTTGGCGGG
TGTGCGGGCTGGCTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATCGTAAAGAGAAAAATACCGC
ATCAGCGCCATTTCGCCATTACGGCTGCGCAACTGTTGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGTGCA
AGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAACACGACGGCCAGTGCCAAGCTG (서열번호: 141)

[0258] 빈 렌티백터

[0259] GCGATCGCAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAA
CGACCCCGCCATTGACGTCATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGACTTTCCATTGACGTCATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGC
CCACTTGGCAGTACATCAAGTGATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTT
ATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGATAGCGGTTTGA
CTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCATGGGAGTTTGTGTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAATGTGCTAACAATCCGCCCC
ATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGG
GAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAGCTTGCCTTAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCGCTGTTGTGTGACTCTGGTAAAC
TAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGTGAAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCGAACAGGGACCTGAAAGCGAAAGGGAACAGAGCTCTCTCGACGCA
GGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGACGGCAAGAGGCGAGGGGCGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGATGGGT
GCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAATATAAATTAACATATAGTAT
GGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTTCGAGTAACTCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGA
CAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCTCTATTGTGTGCATCAAGGATAGAGATAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGA
TAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCGTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTA
TATAAATATAAAGTAGTAAAAATGAACCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATAGGAGCT
TTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAG
CAGAACAAATTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGA
TACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTGGGGTTGCTCTGAAAACTCATTTGCACCACTGTGTGCCTTGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTG
GAACAGATTGGAATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATCGAAAACAGCAA
GAAAAGAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAACATAACAAATGGCTGTGGTATATAAATTTATTCATAATG
ATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAGAATAGTTTTTGTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTACCATTTATCGTTTCAGACCCACCTC
CCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAGTGGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTAT
CGGTTAACTTTTAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAA
CAAATTACAAAAATTCAAAAATTTGGCTCCCGATCGTTGCGTTACACACACAATTACTGCTGATCGAGTGTAGCCTTCGAATGAAAGACCCACCTGTAGGT
TTGGCAAGATAGTGCAGTAACGCCATTTTGAAGGCATGAAAAATACCAACCAAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGGCGGGTACATGAAAATAGCTAA
CGTTGGCCAAACAGGATATCTCGGTGAGCAGTTTCGGCCCCGGCCGGGGCAAGAACAGATGGTCACCGCAGTTTCGGCCCCGGCCGAGGCCAAGAAC
AGATGGTCCCGAGATATGGCCAAACCTCAGCAGTTCTTAAGACCCATCAGATGTTTCCAGGCTCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGCGCCTTATTGGA
ATTAACCAATCAGCTGCTTCTCGCTTCTGTTCCGCGCTTCTGCTTCCCGAGCTCTATAAAGAGCTCAACAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCTCCGAT

TGACTGAGTCGCCCTGATCATTGTGTCATCTACCATCCACTCGACACACCCGCCAGGGCCCTGCCAAGCTTCCGAGCTCTCGATATCAAAGGAGGTACCCAA
CATGGTCAGCAAGGGCGAGGAAGTTCACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGG
CGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGTACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCTCTGTGACCACCTGACCTACGG
CGTGCAATGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAA
GGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAA
CATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCA
CAACATCGAGGACGGCAGCGTGAACCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCAC
CCAGTCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCGCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTA
CAAGTAGAAGTTGTCTCCTCCTGCACTGACTGACTGATACAATCGATTCTGGATCCGACGGCCTCTGTAGAAAGTTGTCTCCTCCTGCACTGACTGACTGA
TACAATCGATTCTGATCCGACGGCCTCTGCTAGCTTGACTGACTGAGTCGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAGATTGACTGGTATTCTT
AACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTGTATAAA
TCTTGGTTGTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCGTTGTGAGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATT
GCCACCACCTGTGAGTCTCTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCTGCTTGGCGCTGTGGACAGGGGCT
CGGCTGTTGGGCACTGACAATTCGCTGGTGTGTGCGGGAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTGCCACCTGGATTCTGCGCGGACGTCC
TTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCCGCGCCTGTGCGCGCTCTGCGGCTCTTCCGCTCTTCCGCTTCGCCCTCAGACG
AGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCGCCTGGAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAA
AAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCACCTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTGTCTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGG
AGCTCTCTGGCTAACTAGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCTTGTGCTTCAAGTAGTGTGCGCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACT
AGAGATCCCTCAGACCTTTTAGTCAGTGTGAAAAATCTCTAGCAGTCTGGCAACGTGAGCACCCTGTGACCTCCAAATATCGTTAAGCTGGAGCCTGG
GAGCCGGCTGGCCCTCCGCCCCCCCCACCCCGCAGCCACCCCTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGAGTGGCCGACAGTGCCCGTGGAGTTCTCGTGAC
CTGAGGTGACGGGCGCGCTAGGGACACGTCCGTGCACGTGCCGAGGCCCCCTGTGCGAGCTGAAGGGACAGGCTAGCCCTGCAGGCTAACTCCGCCCA
TCCCGCCCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCCGCTCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGCAGAGGCGGAGGCCGCTCGGCTCTGAGCTAT
TCCAGAAGTAGTGAGGACGCTTTTTTGGAGGCGGAGGCTTTTGCAAGATCGAACAAGAGACAGGACCTGCAGGTTAATTAATTTAAATCATGTGAGCAAA
AGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCGCGTGTGCGGCTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAGAAAAATCGACGCTCAAGTCA
GAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACAGGCGTTCCTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCT
GTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGTTCTGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCA
CGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGG
TAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGC
TCTGTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTGTATCCGGCAAACAACACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTGAAGCAGCAGAT
TACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGCTGTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCAGTTAAGGGATTTTGGTCATGAG
ATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATG
CTTAATCAGTGAGGACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTATCCATAGTTGCAATTTAAATGGCCGCTGGCGCGCGGTTTTAAACCTAGATATTGAT
AGTCTGATCGGTACAGTATAATCGAGTCTAGCTTTTGCAACATCTATCAAGAGACAGGATCAGCAGGAGGCTTTCGATGAGTATTCAACATTTCCGTG
TCGCCCTTATTCCTTTTTTGGCGCATTTTGCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCGCGAG
TGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGACGCTTTCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTG
GCGCGGTATTATCCCGTATTGACCGCGGCAAGAGCAACTCGGTGCGGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTATTACACAGTCACAGAAAAGC
ATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATTGGAGGACCGA
AGGAGTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGATCATGTAACTCGCCCTGATCGTTGGGAACCGAGCTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACA
CCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACCTTGCGTAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAGTTGATAGACTGGATGGAGGCGG
ATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGTGGTTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAG
CACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGTGAGATAGGTG
CCTCACTGATTAAGCATTGGTAACCGATTCTAGGTGCATTGGCGCAGAAAAAATGCCTGATGCGACGCTGCGCGTCTTATACTCCCATATGCCAGATTC
AGCAACGGATACGGCTTCCCAACTTGCCCACTTCCATACGTGTCTCTTACCAGAAATTTATCCTTAAGATCCCGAATCGTTTAAAC (서열번호:
142)

[0260]

가이드 RNA, RNA-결합 DNA 결합제, 또는 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어, IL10, CTLA4; 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR를 인코딩하는 서열을 포함하는 공여자 작제물을 포함하는 벡터는 개별적으로 또는 임의의 조합으로 리포솜, 나노입자, 엑소솜 또는 미세소포체에 의해 전달될 수 있다. 벡터는 또한 지질 나노입자(LNP)에 의해 전달될 수 있다. 하나 이상의 가이드 RNA, RNA-결합 DNA 결합제(예를 들어, mRNA), 또는 이중 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하는 공여자 작제물은 개별적으로 또는 임의의 조합으로 LNP, 리포솜, 나노입자, 엑소솜, 또는 미세소포체에 의해 전달될 수 있다. 하나 이상의 가이드 RNA, RNA-결합 DNA 결합제(예를 들어, mRNA), 또는 이

중 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하는 공여자 작제물은 개별적으로 또는 임의의 조합으로 LNP에 의해 전달될 수 있다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 가이드 RNA 및 RNA-가이드된 DNA-결합체(예를 들어, mRNA)는 LNP에 의해 전달된다. 공여자 작제물은 바이러스 벡터에 의해 전달될 수 있다.

- [0261] 지질 나노입자(LNP)는 뉴클레오타이드 및 단백질 화물의 전달을 위한 잘 알려진 수단이고, 본 명세서에 개시된 임의의 가이드 RNA, RNA-가이드된 DNA 결합체 또는 공여자 작제물의 전달을 위해 사용될 수 있다.
- [0262] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 지질 나노입자(LNP)는 분자간 힘에 의해 서로 물리적으로 회합된 복수(즉, 하나 초과)의 지질 분자를 포함하는 입자를 지칭한다. LNP는 예를 들어 마이크로스피어(단일층판 및 다중층판 소포 포함, 예를 들어 "리포솜" - 일부 실시형태에서 실질적으로 구형이고, 보다 특정한 실시형태에서, 예를 들어 RNA 분자의 상당 부분을 포함하는, 수성 코어를 포함할 수 있는 층판 상 지질 이중층), 에멀전에 분산된 상, 미셀 또는 현탁액에서의 내부 상일 수 있다(예를 들어, WO2017173054 참조, 그 내용은 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함됨). 대상체에게 뉴클레오타이드를 전달할 수 있는 것으로 당업자에게 공지된 임의의 LNP가 이용될 수 있다.
- [0263] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 가이드 RNA 또는 본 명세서에 개시된 공여자 작제물을 단독으로 또는 조합하여 세포 또는 세포군 또는 대상체에 전달하는 방법이 본 명세서에 제공되며, 여기서 임의의 하나 이상은 구성요소는 LNP와 회합된다. 일부 실시형태에서, 방법은 RNA-가이드된 DNA-결합체(예를 들어, Cas9 또는 Cas9를 인코딩하는 서열)를 추가로 포함한다.
- [0264] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 가이드 RNA 또는 본 명세서에 개시된 공여자 작제물을 단독으로 또는 조합하여, LNP와 함께 포함하는 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 RNA-가이드된 DNA-결합체(예를 들어, Cas9 또는 Cas9를 인코딩하는 서열)를 추가로 포함한다.
- [0265] 일부 실시형태에서, LNP는 양이온성 지질을 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP는 (9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-(((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트로, 또한 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-(((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트로 지칭되는 것 또는 다른 이온가능한 지질을 포함한다. 예를 들어, WO2019/067992, WO2017/173054, WO2015/095340, 및 WO2014/136086 뿐만 아니라 여기에 제공된 참고문헌의 지질을 참조한다. 일부 실시형태에서, LNP는 약 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 또는 6.5의 양이온성 지질 아민 대 RNA 포스페이트(N:P)의 몰비를 포함한다. 일부 실시형태에서, LNP 지질과 관련하여 용어 양이온성 및 이온화가능한 상호교환가능하며, 예를 들어 여기서 이온화가능한 지질은 pH에 따라 양이온성이다.
- [0266] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 개시된 작제물과 회합된 LNP는 면역 반응을 억제하기 위한 세포-기반 약제를 제조하는데 사용하기 위한 것이다. 세포-기반 치료제의 제조 방법 및 세포 기반 치료제에 사용하기 위한 시약은 당업계에 공지되어 있다.
- [0267] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 가이드 RNA, 본 명세서에 개시된 RNA-가이드된 DNA 결합체, 또는 공여자 작제물은 내이키드인 벡터의 일부로서이든, 단독으로 또는 조합하여, 지질 나노입자에 제형화되거나 이를 통해 투여된다; 예를 들어 WO2019/067992 또는 WO2017/173054를 참조하며 그 내용은 그 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다.
- [0268] 일부 실시형태에서, RNA 성분 및 지질 성분을 포함하는 LNP 조성물이 포함되며, 여기서 지질 성분은 생분해성, 이온화가능한 지질과 같은 아민 지질을 포함한다. 일부 경우에, 지질 성분은 생분해성, 이온화가능한 지질, 콜레스테롤, DSPC 및 PEG-DMG를 포함한다. 특정 실시형태에서, 지질 핵산 조립체는 이온화가능한 지질 A ((9Z,12Z)-3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-(((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트로, 또한 3-((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-(((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 (9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트로도 지칭되는 것, 콜레스테롤, DSPC 및 PEG2k-DMG를 함유했다. 특정 실시형태에서, 성분은 각각 50:38:9:3 몰비로 존재한다. 지질 핵산 조립체는 지질 아민 대 RNA 포스페이트(N:P) 몰비가 약 6이고, gRNA 대 mRNA의 중량비가 2:1, 1:1 또는 1:2로 제형화될 수 있다.
- [0269] 가이드 RNA, RNA-가이드된 DNA-결합체(예를 들어, Cas 뉴클레아제 또는 Cas 뉴클레아제를 인코딩하는 핵산), 및 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어, IL10 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR를 인코딩하는 서열을 포함하는 공여자 작제물은 동일하거나 상이한 시스템을 사용하여 전달될 수 있다는 것이 명백할 것이다. 예를 들어, 가이드 RNA, Cas 뉴클레아제 및 작제물은 동일한 벡터(예를 들어, AAV)에 의해 운반될 수 있다. 대안적으로, Cas 뉴클

레아제(단백질 또는 mRNA로서) 또는 gRNA는 플라스미드 또는 LNP에 의해 운반될 수 있는 반면, 공여자 작제물은 AAV와 같은 벡터에 의해 운반될 수 있다.

[0270] 상이한 전달 시스템은 동시적으로 또는 임의의 순차적인 순서로 전달될 수 있다. 일부 실시형태에서, 공여자 작제물, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제는 동시적으로, 예를 들어 하나의 벡터, 2개의 벡터, 개별 벡터, 하나의 LNP, 2개의 LNP, 개별 LNP 또는 이의 조합으로 전달될 수 있다. 일부 실시형태에서, 공여자 작제물은 가이드 RNA 또는 Cas 뉴클레아제를 벡터로서 또는 LNP와 단독으로 또는 함께 회합되어 또는 리보핵단백질(RNP)로서 전달하기 이전에(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 그 초과 일) 벡터로서 또는 LNP와 회합되어 전달될 수 있다. 추가 예로서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제는 벡터로서 또는 LNP와 단독으로 또는 함께 회합되어 또는 리보핵단백질(RNP)로서, 작제물을 벡터로서 또는 LNP와 회합하여 전달하기 이전에(예를 들어, 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 그 초과 일) 전달될 수 있다.

[0271] IV. T 세포를 조작하는 방법

[0272] 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하도록 T 세포를 조작하는 방법을 제공한다. 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 IL10을 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하도록 T 세포를 조작하는 방법을 제공한다. 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하도록 T 세포를 조작하는 방법을 제공한다. 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 각각 프로모터 서열의 제어 하에 IL10 및 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열의 세포 내로의 삽입을 포함하도록 T 세포를 조작하는 방법을 제공한다.

[0273] 일부 실시형태에서, 방법은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어 IL10 또는 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하고, 그리고 TCR 서열(들)의 변형, 예를 들어 녹다운을 추가로 포함하도록 T 세포를 조작하는 것을 포함한다.

[0274] 일부 실시형태에서, 방법은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어, IL10 또는 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하고, 그리고 표적화 수용체, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 추가로 포함하도록 T 세포를 조작하는 것을 포함한다.

[0275] 일부 실시형태에서, 방법은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어 IL10 또는 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입, TCR 서열(들)의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 표적화 수용체, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하도록 T 세포를 조작하는 단계를 포함한다.

[0276] 일부 실시형태에서, IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입, TCR 유전자의 선택적 녹다운 및 표적화 수용체, 예를 들어 CAR의 세포 내로의 선택적 삽입은 본 명세서에 개시된 CRISPR/Cas 시스템 및 가이드 RNA를 사용하여 조작된다.

[0277] 이들 실시형태에서, 삽입되어지는 조절 T 세포 촉진 분자는 공여자 작제물을 통해 제공될 수 있다. 공여자 작제물을 통해 제공되는 조절 T 세포 촉진 분자는 IL10, CTLA4, TGFB1, IDO1, ENTPD1, NT5E, IL22, AREG, IL35, GARP, CD274, FOXP3, IKZF2, EOS, IRF4, LEF1, 및 BACH2 및 TCR 유전자 서열(들)의 변형, 예를 들어 녹다운으로부터 선택될 수 있다.

[0278] 이들 실시형태에서, 삽입되어지는 표적화 수용체는 공여자 작제물을 통해 제공될 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR), T-세포 수용체(TCR), 또는 세포의 수용체 부분의 결합시 T 세포를 활성화할 수 있는 내부 시그널링 도메인에서 적어도 막관통 도메인을 통해 작동가능하게 연결된 세포 표면 분자에 대한 수용체일 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체는 표적 부위, 예를 들어 유기체에서의 특정 세포 또는 조직에 대한 세포의 결합을 허용하기 위해 세포, 예를 들어 T 세포의 표면 상에 존재하는 수용체일 수 있

다. 이들 실시형태에서, 표적화 수용체는 MAdCAM-1을 표적화할 수 있는 CAR이다.

- [0279] 삽입 및 변형, 예를 들어 녹다운을 포함하도록 T 세포를 조작하기 위한 적합한 유전자 편집 시스템이 본 명세서에 개시되고 당업계에 공지되어 있다. 일부 실시형태에서, 유전자 편집 시스템은 CRISPR/Cas 시스템; 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN) 시스템; 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN) 시스템을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일반적으로, 유전자 편집 시스템은 표적 DNA 서열에서 이중 가닥 파손(DSB) 또는 닉(예를 들어, 단일 가닥 파손 또는 SSB)을 유도하기 위해 조작된 절단 시스템의 사용을 포함한다. 절단 또는 닉킹은 조작된 ZFN, TALEN과 같은 특정 뉴클레아제를 사용하거나 CRISPR/Cas9 시스템과 같은 표적 DNA 서열의 특정 절단 또는 닉킹을 안내하기 위해 조작된 가이드 RNA와 함께 CRISPR/Cas 시스템을 사용하는 것을 통하여 발생할 수 있다. 더욱이, Argonaute 시스템(예를 들어, 'TtAgo'로 알려진 *T. 썬모필러스*로부터의 것, Swartz 등 (2014) *Nature* 507(7491): 258-261 참조)을 기반으로 표적화된 뉴클레아제가 개발되고 있으며, 이는 또한 게놈 편집 및 유전자 치료에서의 사용에 대한 잠재력을 가질 수 있다.
- [0280] 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)는 DNA의 특정 서열을 절단하도록 조작될 수 있는 제한 효소이다. 그것은 TAL 이펙터 DNA-결합 도메인을 DNA 절단 도메인(DNA 가닥을 절단하는 뉴클레아제)에 융합함에 의해 만들어진다. 전사 활성화제-유사 이펙터(TALE)는 특정 위치에서 DNA 절단을 촉진하기 위해 원하는 DNA 서열에 결합하도록 조작될 수 있다(예를 들어, Boch, TALEs of genome targeting *Nature Biotech.* 29:135-136 (2011) 참조). 제한 효소는 조작된 뉴클레아제로의 게놈 편집으로 알려진 기술인 현장 게놈 편집을 위해 또는 유전자 편집에 사용하기 위해 세포 내로 도입될 수 있다. 이에 사용하기 위한 이러한 방법 및 조성물은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, WO2019147805, WO2014040370, WO2018073393을 참조하고, 이의 내용은 그 전체가 본 명세서에 포함된다.
- [0281] 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)는 징크 핑거 DNA-결합 도메인을 DNA-절단 도메인에 융합시킴에 의해 생성된 인공 제한 효소이다. 징크 핑거 도메인은 징크-핑거 뉴클레아제가 복합체 게놈 내의 고유한 서열을 표적화할 수 있도록 특정한 원하는 DNA 서열을 표적화하도록 조작될 수 있다. 유형 II 제한 엔도뉴클레아제 FokI로부터 비-특이적 절단 도메인은 전형적으로 ZFN에서 절단 도메인으로 사용된다. 절단은 내인성 DNA 수선 기구에 의해 수선되어 ZFN이 고등 유기체의 게놈을 정확하게 변경할 수 있다. 이에 사용하기 위한 이러한 방법 및 조성물은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, WO2011091324를 참조하고, 이의 내용은 그 전체가 본 명세서에 포함된다.
- [0282] RNA 간섭(RNAi)은 표적화된 mRNA 분자를 중화함에 의해 RNA 분자가 유전자 발현 또는 번역을 억제하는 생물학적 과정이다. 작은 간섭 RNA(siRNA)는 RNA 간섭의 핵심이다. RNA는 유전자의 직접적인 생성물이고, 이들 작은 RNA (전형적으로 각 가닥은 19-21개 뉴클레오타이드의 듀플렉스를 형성하는 길이가 19-23개 뉴클레오타이드임)는 RNA 유도 침묵(RISC) 복합체를 매신저 RNA(mRNA) 분자를 분해하도록 지시할 수 있고 따라서 전사-후 유전자 침묵을 통해 번역을 방지함에 의해 그의 활성을 감소시킨다. 짧은 헤어핀 RNA(shRNA)는 듀플렉스 영역을 형성하는 가닥이 종종 발현 벡터로부터의 전사에 의해 생성되는 헤어핀 구조를 갖는 단일 RNA 가닥인 siRNA이다. RNAi는 또한 다 이서 기질 분자로 지칭되는 더 긴 RNA 듀플렉스 구조에 의해 달성될 수 있으며, 이는 표적 mRNA 절단을 촉진하기 위해 RISC 내에 장입되기 전에 효소 다이서에 의해 절단된다. 이러한 사용 방법 및 조성물은 당업계에 공지되어 있다. 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법에서, RNA 간섭을 촉진하기 위한 RNA 분자가 내구성을 위해 발현 벡터로서 제공되는 것이 바람직하며, 예를 들어, 이의 내용이 본 명세서에 그 전체로 포함된 WO2018208837를 참조한다. 일부 실시형태에서, RNAi는 발현 벡터와 함께 사용된다.
- [0283] 본 개시내용은 본 명세서에 개시된 가이드 RNA와 함께 또는 없이 수행되는 (예를 들어, ZFN 시스템을 사용하여 표적 DNA 서열에 파손을 일으켜, 작제물의 삽입을 위한 부위를 생성하는) 삽입 방법을 고려한다는 것이 인지될 것이다. 본 명세서에 개시된 가이드 RNA를 사용하는 방법의 경우, 방법은 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 TNFA, IFNG 또는 TCR을 인코딩하는 핵산 서열을 변형, 예를 들어 녹다운시키는 것을 포함한다. 또한 본 개시내용은 본 명세서에 개시된 가이드 RNA 없이 수행될 수 있는(예를 들어, ZFN 시스템을 사용하여 표적 DNA 서열에 파손을 일으켜, 작제물의 삽입을 위한 부위를 생성하는) TNFA, IFNG 또는 TCR을 변형, 예를 들어 녹다운시키는 방법을 고려한다는 것이 인지될 것이다.
- [0284] 일부 실시형태에서, 삽입을 위한 서열, 예를 들어, IL10 또는 CTLA4를 인코딩하는 서열을 포함하는 공여자 작제물은 변형, 예를 들어 녹다운에 대해 표적화된 서열, 예를 들어 TCR 유전자에 대한 게놈 좌에서 삽입된다.
- [0285] 일부 실시형태에서, CRISPR/Cas 시스템(예를 들어, 가이드 RNA 및 RNA-가이드된 DNA 결합체)은 게놈 내의 원하는 좌에서 삽입의 부위를 생성하기 위해 사용될 수 있으며, 이 부위에서 본 명세서에 개시된 IL10, CTLA4, 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR를 인코딩하는 서열을 포함하는 공여자 작제물이 IL10,

CTLA4 또는 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR을 발현하기 위해 삽입될 수 있다. 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR, IL10 또는 CTLA4는 이로부터 IL10, CTLA4 또는, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR이 본 명세서에 기재된 바와 같이 정상적으로 발현되지 않는, 이의 삽입 부위 또는 좌, 예를 들어 세이프 하버 좌 또는 TCR 좌에 관하여 이중일 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 가이드 RNA는 삽입 부위를 생성하기 위해 RNA-가이드된 DNA-결합체(예를 들어, Cas 뉴클레아제)와 함께 본 방법에 따라 사용될 수 있으며, 이 부위에서 IL10, CTLA4, 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR을 인코딩하는 서열을 포함하는 공여자 작제물이 IL10, CTLA4 또는 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR을 발현하기 위해 삽입될 수 있다. IL10, CTLA4, 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR을 특정 게놈 좌 안에 삽입하기 위한 가이드 RNA가 본 명세서에 예시되고 기재되어 있다.

[0286] 일부 실시형태에서, CD4+ T 세포는 gRNA(예를 들어, 녹다운을 위한 IFNG, TNFA 또는 TCR을 표적화하는 gRNA), RNA-가이드된 DNA-결합체(예를 들어, Cas 뉴클레아제), 공여자 작제물로 (예를 들어, 바이러스 또는 비-바이러스 전달을 사용하여) 형질도입에 의해 조작된다. 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 1) 항-염증성 사이토카인, 예를 들어, IFNG 또는 TNFA, RNA 가이드된 DNA 결합체(예를 들어, Cas 뉴클레아제)를 인코딩하는 핵산 서열을 표적화하는 gRNA로 형질도입되고, 2) 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어, IL10 또는 CTLA4, 및 표적화 수용체, 예를 들어, CAR, 예를 들어, MAdCAM-1 CAR을 인코딩하는 핵산 서열(들)을 포함하는 공여자 작제물로 형질도입된다. 특정 실시형태에서, 조작된 세포는 표적화 수용체의 발현을 위해 선택된다.

[0287] 일부 실시형태에서, CD4+ T 세포는 gRNA(예를 들어, 녹다운을 위한 IFNG, TNFA 또는 TCR을 표적화하는 gRNA), RNA-가이드된 DNA-결합체(예를 들어, Cas 뉴클레아제) 및 공여자 작제물로 형질도입에 의해 조작된다. 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 1) 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어 IL10 또는 CTLA4, 및 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR을 인코딩하는 핵산 서열(들)을 포함하는 공여자 작제물로 형질도입되고, 2) 항-염증성 사이토카인, 예를 들어, IFNG 또는 TNFA, RNA 유도된 DNA 결합체(예를 들어, Cas 뉴클레아제)를 인코딩하는 핵산 서열을 표적화하는 gRNA로 형질도입된다. 특정 실시형태에서, 조작된 세포는 표적화 수용체의 발현을 위해 선택된다.

[0288] 일부 실시형태에서, CD4+ T 세포는 gRNA(예를 들어, 녹다운을 위한 IFNG, TNFA 또는 TCR을 표적화하는 gRNA), RNA-가이드된 DNA-결합체(예를 들어, Cas 뉴클레아제), 공여자 작제물로 형질도입에 의해 조작된다. 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 1) 조절 T 세포 촉진 분자, 예를 들어 IL10 또는 CTLA4, 및 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어 MAdCAM-1 CAR을 인코딩하는 핵산 서열(들)을 포함하는 공여자 작제물로 형질도입되고, 2) 항-염증성 사이토카인, 예를 들어, IFNG 또는 TNFA, RNA 유도된 DNA 결합체(예를 들어, Cas 뉴클레아제)를 인코딩하는 핵산 서열을 표적화하는 gRNA로 형질도입된다.

[0289] 본 명세서에 기재된 바와 같이, IL10, CTLA4, 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 가이드 RNA(예를 들어, 녹다운을 위한 IFNG, TNFA 또는 TCR을 표적화하는 gRNA)를 인코딩하는 서열, 및 RNA-가이드된 DNA-결합체를 포함하는 공여자 작제물은 당업계에 공지된 임의의 적합한 전달 시스템 및 방법을 사용하여 전달될 수 있다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제는 IL10, CTLA4, 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 서열을 포함하는 공여자 작제물을 전달하기 이전에 LNP와 회합되고 세포 또는 세포군에 전달된다. 일부 실시형태에서, 가이드 RNA 및 Cas 뉴클레아제는 IL10, CTLA4 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 서열을 포함하는 공여자 작제물을 전달한 후에 LNP와 회합되고 세포 또는 세포군에 전달된다.

[0290] 일부 실시형태에서, 자연적으로 발생하는 T 세포에 대해 본 명세서에 기재된 gRNA, 공여자 작제물 및 RNA-가이드된 DNA 결합체의 투여는 자연적으로 발생하는 T 세포, 예를 들어 CD4+ T 세포를 조절 T 세포의 특성, 예를 들어 면역 반응 억제 특성을 나타내는 세포로 전환시킬 수 있다.

[0291] IFNG, TNFA 또는 TCR 유전자 발현을 변형, 예를 들어, 녹다운시키거나, 또는 IL10, CTLA4, 또는 표적화 수용체, 예를 들어 CAR, 예를 들어, MAdCAM-1 CAR을 인코딩하는 서열을 삽입하기 위한 gRNA, 공여자 작제물 및 RNA-가이드된 DNA 결합체는 통상적인 T 세포 또는 통상적인 T 세포군에 도입되어 본 명세서에 기재된 조작된 T 세포 또는 T 세포군을 생성할 수 있다.

[0292] 다양한 RNA-가이드된 DNA-결합체, 예를 들어 뉴클레아제, 예컨대 Cas 뉴클레아제, 예를 들어 Cas9를 사용하는 방법은 또한 당업계에 잘 알려져 있다. CRISPR/Cas 시스템의 사용이 본 명세서에서 예시되지만, 시스템에 대한 적절한 변형이 또한 사용될 수 있다는 것이 인지될 것이다. 문맥에 따라, RNA-가이드된 DNA-결합체는 핵산(예를 들어, DNA 또는 mRNA), 예컨대 상기 제공된 RNA-가이드된 DNA-결합체를 인코딩하는 mRNA로서, 또는 단백질로서 제공될 수 있다는 것이 인지될 것이다. 일부 실시형태에서, 본 방법은 RNA-가이드된 DNA-결합체를 이미 포함하

거나 발현하는 세포에서 실행될 수 있다.

[0293] 일부 실시형태에서, Cas9 뉴클레아제와 같은 RNA-가이드된 DNA-결합제는 이중-가닥의 엔도뉴클레아제 활성으로도 지칭될 수 있는 클레아아제 활성을 갖는다. 일부 실시형태에서, Cas9 뉴클레아제와 같은 RNA-가이드된 DNA-결합제는 단일-가닥의 엔도뉴클레아제 활성으로도 지칭될 수 있는 니카아제 활성을 갖는다. 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합제는 Cas 뉴클레아제를 포함한다. Cas 뉴클레아제의 예는 *S. 피오케네스*, *S. 아우레우스* 및 기타 원핵생물(예를 들어, 다음 단락의 목록 참조)의 유형 II CRISPR 시스템 및 이의 변이체 또는 돌연변이체(예를 들어, 조작된, 비-자연적으로 발생하는, 자연적으로 발생하는 또는 기타 변이체) 버전의 것들을 포함한다. 예를 들어, US2016/0312198 A1; US 2016/0312199 A1 참조.

[0294] Cas 뉴클레아제가 유래될 수 있는 비-제한적인 예시적인 종은 스트렙토코커스 피오케네스, 스트렙토코커스 썬모필루스, 스트렙토코커스 sp., 스타필로코커스 아우레우스, 리스테리아 이노쿠아, 락토바실러스 가세리, 프란시셀라 노비시다, 윌리넬라 숙시노제네스, 수테렐라 와즈워텐시스, 감마프로테오박테리움, 나이세리아 메닝기티디스, 캄필로박터 제주니, 파스퇴렐라 멀토시다, 피브로박터 석시노진, 로도스피릴룸 루브럼, 노카르디오시스 다손빌레이, 스트렙토마이세스 프리스티나에스피랄리스, 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스, 스트렙토마이세스 비리도크로모게네스, 스트렙토스포랑기움 로제움, 스트렙토스포랑기움 로제움, 알리시클로바실러스 아시도칼다리우스, 바실러스 슈도마이코이데스, 바실러스 셀레니티리듀센스, 엑시구오박테리움 시비리쿰, 락토바실러스 텔브루에키, 락토바실러스 살리바리우스, 락토바실러스 부크네리, 트레포네마 덴티콜라, 마이크로실라 마리나, 부르크홀데리알레스 박테리아, 폴라로모나스 나프탈레니보란, 폴라로모나스 sp., 크로코스파에라 왓소니, 시아노테세 sp., 마이크로시스티스 아에루기노사, 시네코코쿠스 sp., 아세토할로비움 아라바티쿰, 암모니팩스 테겐시이, 칼디셀룰로시럽터 벅스시이, 칸디다투스 데실포루디스, 클로스트리디움 보툴리눔, 클로스트리디움 디피실리, 파네클디아 마그나, 나트라나에로비우스 썬모필러스, 펠로토마쿨룸 썬모프로피온쿰, 애시디티오바실러스 칼두스, 애시디티오바실러스 페로옥시단스, 알로크로마티움 비노섬, 마리노박터 sp., 니트로소코커스 할로필러스, 니트로소코커스 왓소니, 슈도알테로모나스 할로플랑크티스, 케테도노박터 라세미퍼, 메타노할로비움 에베스티가툼, 아나바에나 바리아빌리스, 노듈라리아 스푸미게나, 노스톡 sp., 아르토스피라 맥시마, 아르토스피라 플라텐시스, 아르토스피라 sp., 링비아 sp., 마이크로콜레우스 크토노플라스테스, 오실라토리아 sp., 페트로토가 모빌리스, 썬모시포 아프리카누스, 스트렙토코커스 파스퇴리아누스, 나이세리아 시네레아, 캄필로박터 라리, 파르비바쿨룸 라바멘티보란스, 코리네박테리움 디프테리아, 아시다미노코쿠스 sp., 라크노스피라세 박테리움 ND2006 및 아카리오크로리스 마리나를 포함한다.

[0295] 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 스트렙토코커스 피오케네스로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 스트렙토코커스 썬모필루스로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 나이세리아 메닝기티디스로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 스타필로코커스 아우레우스로부터의 Cas9 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 프란시셀라 노비시다로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 에시드아미노커쿠스 sp.로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 라크노스피라세 박테리움 ND2006으로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다. 추가 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 프란시셀라 툴라렌시스, 라크노스피라세 박테리움, 부티리비브리오 프로테오클라스티쿠스, 페레그리넵테리아 박테리움, 파르쿠박테리아 박테리움, 스미텔라, 에시드아미노커쿠스, 칸디다투스 메타노플라스마, 유박테리움 엘리게네스, 모락셀라 보보쿨리, 랩토스피라 이나다이, 포르피로모나스 크레비오리카니스, 프레보텔라 디시엔스, 또는 포르피로모나스 마카카에로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다. 특정 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 에시드아미노커쿠스 또는 라크노스피라세로부터의 Cpf1 뉴클레아제이다.

[0296] 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합제와 함께 gRNA는 리보핵단백질 복합체(RNP)로 불린다. 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합제는 Cas 뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제와 함께 gRNA는 Cas RNP로 불린다. 일부 실시형태에서, RNP는 유형-I, 유형-II, 또는 유형-III 성분을 포함한다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 유형-II CRISPR/Cas 시스템으로부터의 Cas9 단백질이다. 일부 실시형태에서, Cas9와 함께 gRNA는 Cas9 RNP로 불린다.

[0297] 야생형 Cas9는 2개의 뉴클레아제 도메인: RuvC 및 HNH를 갖는다. RuvC 도메인은 비-표적 DNA 가닥을 절단하고 HNH 도메인은 DNA의 표적 가닥을 절단한다. 일부 실시형태에서, Cas9 단백질은 하나 초과 RuvC 도메인 또는 하나 초과 HNH 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, Cas9 단백질은 야생형 Cas9이다. 각각의 조성물, 용도 및 방법 실시형태에서, Cas는 표적 DNA에서 이중 가닥 절단을 유도한다.

[0298] 일부 실시형태에서, 키메라 Cas 뉴클레아제가 사용되며, 여기서 단백질의 한 도메인 또는 영역은 다른 단백질의

일부로 대체된다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제 도메인은 FokI과 같은 상이한 뉴클레아제로부터의 도메인으로 대체될 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 변형된 뉴클레아제일 수 있다.

[0299] 다른 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 유형-I CRISPR/Cas 시스템으로부터의 것일 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 유형-I CRISPR/Cas 시스템의 캐스케이드 복합체의 구성요소일 수 있다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 Cas3 단백질을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서 Cas 뉴클레아제는 유형-III CRISPR/Cas 시스템으로부터의 것일 수 있다. 일부 실시형태에서 Cas 뉴클레아제는 RNA 절단 활성을 가질 수 있다.

[0300] 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 단일-가닥 Nick아제 활성을 가지며, 즉, 하나의 DNA 가닥을 절단하여 "니"으로도 알려진 단일-가닥 파손을 생성할 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 Cas Nick아제를 포함한다. Nick아제는 dsDNA에 니를 생성하는 효소이며, 즉, DNA 이중 나선의 한 가닥은 절단하지만 다른 가닥은 절단하지 않는다. 일부 실시형태에서, Cas Nick아제는 예를 들어, 촉매 도메인에서 하나 이상의 변경(예를 들어, 점 돌연변이)에 의해 내핵융해 활성 부위가 불활성화된 Cas 뉴클레아제(예를 들어, 상기 논의된 Cas 뉴클레아제)의 버전이다. 예를 들어, Cas Nick아제 및 예시적인 촉매 도메인 변경의 논의에 대해 미국 특허 번호 8,889,356을 참조한다. 일부 실시형태에서, Cas9 Nick아제와 같은 Cas Nick아제는 불활성화된 RuvC 또는 HNH 도메인을 갖는다.

[0301] 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 단 하나의 기능성 뉴클레아제 도메인을 함유하도록 변형된다. 예를 들어, 작용제 단백질은 그 핵산 절단 활성을 감소시키기 위해 뉴클레아제 도메인 중 하나가 돌연변이되거나 완전히 또는 부분적으로 결실되도록 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 활성이 감소된 RuvC 도메인을 갖는 Nick아제가 사용된다. 일부 실시형태에서, 비활성 RuvC 도메인을 갖는 Nick아제가 사용된다. 일부 실시형태에서, 활성이 감소된 HNH 도메인을 갖는 Nick아제가 사용된다. 일부 실시형태에서, 비활성 HNH 도메인을 갖는 Nick아제가 사용된다.

[0302] 일부 실시형태에서, Cas 단백질 뉴클레아제 도메인 내의 보존된 아미노산은 뉴클레아제 활성을 감소시키거나 변경하기 위해 치환된다. 일부 실시형태에서, Cas 뉴클레아제는 RuvC 또는 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인에서 아미노산 치환을 포함할 수 있다. RuvC 또는 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인에서 예시적인 아미노산 치환은 D10A(*S. 피오케네스* Cas9 단백질에 기반함)를 포함한다. 예를 들어, Zetsche 등 (2015) *Cell* Oct 22:163(3): 759-771을 참조한다. 일부 실시형태에서, 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(*S. 피오케네스* Cas9 단백질에 기반함)를 포함한다. 예를 들어, Zetsche 등 (2015)을 참조한다. 추가의 예시적인 아미노산 치환은 D917A, E1006A 및 D1255A(*프란시셀라 노비시다* U112 Cpf1(FnCpf1) 서열(UniProtKB - A0Q7Q2(CPF1_FRATN)에 기반함))를 포함한다.

[0303] 일부 실시형태에서, Nick아제는 각각 표적 서열의 센스 및 안티센스 가닥에 상보적인 한 쌍의 가이드 RNA와 조합하여 제공된다. 이 실시형태에서, 가이드 RNA는 Nick아제를 표적 서열로 지향하게 하고 표적 서열의 반대 가닥 상에 니를 생성(즉, 이중 Nick)함에 의해 DSB를 도입한다. 일부 실시형태에서, Nick아제는 DNA의 반대쪽 가닥을 표적화하는 2개의 개별 가이드 RNA와 함께 사용되어 표적 DNA에서 이중 니를 생성한다. 일부 실시형태에서, Nick아제는 표적 DNA에서 이중 니를 생성하기 위해 가까이 근접하게 되도록 선택되는 2개의 별도의 가이드 RNA와 함께 사용된다.

[0304] 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 하나 이상의 이중 기능성 도메인을 포함한다(예를 들어, 융합 폴리펩티드이거나 이를 포함한다).

[0305] 일부 실시형태에서, 이중 기능성 도메인은 RNA-가이드된 DNA-결합체의 세포 핵 안으로의 이송을 용이하게 할 수 있다. 예를 들어, 이중 기능성 도메인은 핵 국지화 신호(NLS)일 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 1-10 NLS(들)과 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 1-5 NLS(들)과 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 하나의 NLS와 융합될 수 있다. 하나의 NLS가 사용되는 경우, NLS는 RNA-가이드된 DNA-결합체 서열의 N-말단 또는 C-말단에서 연결될 수 있다. 그것은 또한 RNA-가이드된 DNA-결합체 서열 내에 삽입될 수 있다. 다른 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 하나 초과 NLS와 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 2, 3, 4, 또는 5개의 NLS와 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 2개의 NLS와 융합될 수 있다. 특정 상황에서는 두 NLS는 동일할 수도 있고(예를 들어, 2개의 SV40 NLS) 상이할 수도 있다. 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 카르복시 말단에서 연결된 2개의 SV40 NLS 서열에 융합된다. 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 2개의 NLS와 융합될 수 있는데, 하나는 N-말단에 연결되고 하나는 C-말단에 연결된다. 일부 실시형태에서,

RNA-가이드된 DNA-결합체는 3개의 NLS와 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, RNA-가이드된 DNA-결합체는 NLS 없이 융합될 수 있다. 일부 실시형태에서, NLS는 예를 들어 SV40 NLS, PKKKRKV(서열번호: 143) 또는 PKKKRRV(서열번호: 144)와 같은 일입자성 서열일 수 있다. 일부 실시형태에서, NLS는 뉴클레오폴라스민의 NLS, KRPAATKKAGQAKKKK(서열번호: 145)와 같은 이입자성 서열일 수 있다. 특정 실시형태에서, 단일 PKKKRKV(서열번호: 143) NLS는 RNA-가이드된 DNA-결합체의 C-말단에서 연결될 수 있다. 하나 이상의 링커가 융합 부위에 선택적으로 포함된다.

[0306] V. 치료 방법

[0307] 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 억제하는 방법을 제공한다. 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 IL10을 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 억제하는 방법을 제공한다. 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 억제하는 방법을 제공한다. 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 IL10 및 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 면역 반응을 억제하는 방법을 제공한다.

[0308] 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 자가면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 IL10을 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입인 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 자가면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 자가면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 각각 IL10 및 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열의 세포 내로의 삽입인 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 자가면역 장애를 치료하는 방법을 제공한다.

[0309] 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 GvHD를 치료하는 방법을 제공한다. 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 IL10을 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 GvHD를 치료하는 방법을 제공한다. 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열(들)의 세포 내로의 삽입을 포함하는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 GvHD를 치료하는 방법을 제공한다. 개시내용은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 및 프로모터 서열의 제어 하에 각각 IL10 및 CTLA4를 인코딩하는 이중 서열의 세포 내로의 삽입인 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 GvHD를 치료하는 방법을 제공한다.

[0310] 일부 실시형태에서, 방법은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함하고, 그리고 TCR 서열(들)의 변형, 예를 들어, 녹다운을 추가로 포함하는 조작된 T 세포를 투여하는 것을

포함한다.

- [0311] 일부 실시형태에서, 방법은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함하고, 그리고 표적화 수용체, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 추가로 포함하는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함한다.
- [0312] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 위장관계에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 염증성 장 질환, 궤양성 대장염 또는 크론병과 같은 장애에서, 염증을 포함한 면역 반응을 억제하기 위해 MAdCAM-1을 표적화하는 CAR이다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 내피 세포를 포함하는 조직에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 크론병 및 다발성 경화증과 같은 장애에서, 염증을 포함한 면역 반응을 억제하기 위해 VCAM-1을 표적화하는 CAR이다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 내피 세포에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 크론병과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 CEACAM6을 표적화하는 CAR이다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 B 세포에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 다발성 경화증 및 전신성 홍반성 루푸스와 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 CD19를 표적화하는 CAR이다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 B 세포에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 다발성 경화증 및 전신성 홍반성 루푸스와 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 CD20을 표적화하는 CAR이다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 염증 조직에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 염증성 장 질환, 궤양성 대장염 또는 크론병과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 TNFA를 표적화하는 CAR이다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 신경 조직에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 다발성 경화증과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 MBP, MOG 또는 PLP를 표적화하는 CAR이다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 성숙한 B 림프구를 포함하는 조직에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 전신성 홍반성 루푸스와 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 TNFRSF17을 표적화하는 CAR이다. 일부 실시형태에서, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR은 조작된 T 세포를 활막 조직에 표적화할 수 있으며, 예를 들어 표적화 수용체는, 예를 들어 류마티스 관절염과 같은 장애에서 면역 반응을 억제하기 위해 시트룰린화된 비멘틴을 표적화하는 CAR이다.
- [0313] 일부 실시형태에서, 표적화 수용체는 DPP6, SCL2A2, 글루타메이트 데카르복실라제(GAD2), 데모글레인 3(DSG3) 및 MHC 클래스 I HLA-A(HLA-A*02)를 표적화하는 CAR이다.
- [0314] 일부 실시형태에서, 방법은 IFNG를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, TNFA를 인코딩하는 내인성 핵산 서열의 변형, 예를 들어 녹다운, 조절 T 세포 촉진 분자를 인코딩하는 서열(들)의 삽입, 표적화 수용체, 예를 들어 CAR을 인코딩하는 서열(들)의 삽입을 포함하고, 그리고 TCR 서열(들)의 변형, 예를 들어 녹다운을 추가로 포함하는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함한다.
- [0315] 일부 실시형태에서, 삽입되어지는 서열(들)은 변형되어지는, 예를 들어 녹다운되는 서열(들) 내로 삽입되고, 예를 들어 CAR 서열은 TNFA 게놈 서열 내로 삽입되어, 이에 의해 TNFA 서열을 변형, 예를 들어, 녹다운시킨다.
- [0316] 일부 실시형태에서, 방법은 상기 기재된 바와 같이 조작된 T 세포를 포함하는 T 세포군을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, T 세포군에서 T 세포 중 적어도 40%, 45%, 바람직하게는 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100%가 예를 들어 시퀀싱, 예를 들어 NGS에 의해 평가되는 바와 같이 조작된다.
- [0317] 일부 실시형태에서, 자가면역 장애는 궤양성 대장염, 크론병, 류마티스성 관절염, 건선, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 루푸스, 제1형 당뇨병 및 이식편대숙주 질환(GvHD)으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 조작된 T 세포는 자가 또는 동종이계 용도를 갖는다.
- [0318] 일부 실시형태에서, 상기 기재된 조작된 T 세포를 사용한 치료의 유효성은 조작된 T 세포의 투여에 이어서 동물의 체중 또는 생존율을 측정함에 의해 이식편대숙주 질환의 동물 모델, 예를 들어 마우스 모델에서 평가될 수 있다(여기서 동물은 체중의 상당 부분, 예를 들어 시작 체중의 20%의 손실 후에 희생된다). 일부 실시형태에서, 효과적인 치료는 적합한 대조군, 예를 들어 PBMC로 치료된 동물과 비교하여 생존율에서 통계적으로 유의한 증가를 초래한다.

- [0319] **실시예**
- [0320] 다음 실시예는 특정 개시된 실시형태를 예시하기 위해 제공되고 어떤 식으로든 본 개시내용의 범주를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0321] **실시예 1. 일반적인 방법**
- [0322] **1.1. 지질 나노입자의 제조**
- [0323] 일반적으로, 지질 성분을 다양한 몰비로 100% 에탄올에 용해하였다. RNA 카고(예를 들어, Cas9 mRNA 및 sgRNA)를 25mM 시트레이트 완충액, 100mM NaCl, pH 5.0에 용해하여 대략적으로 0.45mg/mL의 RNA 카고의 농도를 생성했다.
- [0324] 달리 명시되지 않는 한, 지질 핵산 어셈블리는 이온화가 가능한 지질 A((9Z,12Z)-3-(((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-(((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필 옥타데카-9,12-디에노에이트로, 또한 3-(((4,4-비스(옥틸옥시)부타노일)옥시)-2-(((3-(디에틸아미노)프로폭시)카르보닐)옥시)메틸)프로필(9Z,12Z)-옥타데카-9,12-디에노에이트), 콜레스테롤, DSPC 및 PEG2k-DMG를 각각 50:38.5:10:1.5 몰비로 함유했다. 달리 명시되지 않는 한, 지질 핵산 어셈블리는 약 6의 지질 아민 대 RNA 포스페이트(N:P) 몰비 및 1:1의 gRNA 대 mRNA 중량비로 제형화하였다.
- [0325] LNP는 2부피의 RNA 용액 및 1부피의 물로 에탄올 내 지질의 충돌 체트 혼합을 이용하는 교차-흐름 기술을 사용하여 제조하였다. 에탄올 내 지질은 2부피의 RNA 용액과 혼합 교차를 통해 혼합되었다. 네 번째 물 스트림은 인라인 티를 통해 크로스의 출구 스트림과 혼합되었다(WO2016010840 도 2 참조). LNP를 실온에서 1시간 동안 유지하고, 추가로 물로 희석하였다(대략적으로 1:1 v/v). LNP는 평평한 시트 카트리지(Sartorius, 100kD MWCO) 상에 접선 흐름 여과를 사용하여 농축하고 PD-10 탈염 컬럼(GE)을 사용하여 50mM Tris, 45mM NaCl, 5%(w/v) 수크로스, pH 7.5(TSS)로 완충액 교환하였다. 대안적으로, LNP는 선택적으로 100kDa Amicon 스핀 필터를 사용하여 농축하고 PD-10 탈염 컬럼(GE)을 사용하여 TSS로 완충액 교환하였다. 생성된 혼합물을 그 다음 0.2µm 멸균 필터를 사용하여 여과하였다. 최종 LNP는 추가 사용할 때까지 4℃ 또는 -80℃에서 보관했다.
- [0326] **1.2. mRNA의 시험관내 전사("IVT")**
- [0327] N1-메틸 슈도-U를 함유하는 캡핑되고 폴리아데닐화된 mRNA는 선형화된 플라스미드 DNA 주형 및 T7 RNA 중합효소를 사용하여 시험관내 전사에 의해 생성되었다. T7 프로모터, 전사를 위한 서열 및 폴리아데닐화 영역을 함유하는 플라스미드 DNA는 다음 조건: 200ng/µL 플라스미드, 2U/µL XbaI(NEB), 및 1x 반응 완충액으로 XbaI과 함께 37℃에서 2시간 동안 인큐베이션함에 의해 선형화되었다. XbaI는 반응물을 65℃에서 20분 동안 가열하여 불활성화시켰다. 선형화된 플라스미드를 효소 및 완충액 염으로부터 정제하였다. 변형된 mRNA를 생성하기 위한 IVT 반응은 다음 조건: 50ng/µL 선형화된 플라스미드; GTP, ATP, CTP 및 N1-메틸 슈도-UTP(Trilink) 각각 2-5mM; 10-25mM ARCA(Trilink); 5U/µL T7 RNA 중합효소(NEB); 1U/µL 뮤어라인 RNase 억제제(NEB); 0.004U/µL 무기 대장균 피로포스파타제(NEB); 및 1x 반응 완충액에서 37℃에서 1.5-4시간 동안 인큐베이션함에 의해 수행되었다. TURBO DNase(ThermoFisher)를 최종 농도 0.01U/µL로 첨가하고 반응물을 추가로 30분 동안 인큐베이션하여 DNA 주형을 제거했다. 제조사의 프로토콜에 따라 MegaClear Transcription Clean-up 키트(ThermoFisher) 또는 RNeasy Maxi 키트(Qiagen)를 사용하여 mRNA를 정제했다. 대안적으로, 일부 경우에는 HPLC-기반 정제가 이어지는, 침전 프로토콜을 통해 mRNA를 정제하였다. 간략하게, DNase 단리 후, LiCl 침전, 아세트산암모늄 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 참조). 풀링을 위해 선택된 분획을 조합하고 상기 기재된 바와 같이 아세트산나트륨/에탄올 침전에 의해 탈염하였다. 추가의 대안적인 방법에서, mRNA를 LiCl 침전 방법으로 정제하고 이어서 접선 흐름 여과에 의해 추가로 정제하였다. RNA 농도는 260nm(Nanodrop)에서 흡광도를 측정하여 결정하고 전사체는 Bioanalyzer(Agilent)에 의한 모세관 전기영동에 의해 분석했다.
- [0328] 스트랩토코커스 피오케네스("Spy") Cas9 mRNA는 본 명세서에 기재된 핵산 서열에 따라 개방 판독 프레임에 인코딩하는 플라스미드 DNA로부터 생성되었다. 하기 mRNA 핵산 서열의 경우, T는 U(이는 상기 기재된 바와 같이 N1-메틸 슈도우리딘임)로 대체되어야 하는 것으로 이해된다. 실시예에 사용된 메신저 RNA는 5' 캡 및 3' 폴리-A 꼬리, 예를 들어 최대 100nt(서열번호: 146)를 포함한다.
- [0329] **1.3. 온-표적 편집 효율성을 위한 차세대 시퀀싱("NGS") 및 분석**

- [0330] 제조사의 프로토콜에 따라 QuickExtract™ DNA 추출 용액(Lucigen, Cat. QE09050)을 사용하여 게놈 DNA를 추출하였다.
- [0331] 게놈 내 표적 위치에서 편집의 효율성을 정량적으로 결정하기 위해, 유전자 편집에 의해 도입된 삽입 및 결실의 존재를 동정하기 위해 딥 시퀀싱을 이용하였다. PCR 프라이머는 관심있는 유전자(예를 들어, TRAC) 내의 표적 부위 주위에 설계되었고 관심있는 게놈 영역이 증폭되었다. 프라이머 서열 설계는 현장에서 표준으로 수행되었다.
- [0332] 시퀀싱을 위한 화학물질을 추가하기 위해 제조업체의 프로토콜(Illumina)에 따라 추가 PCR을 수행했다. 앰플리콘은 Illumina MiSeq 기기에서 시퀀싱되었다. 낮은 품질 점수를 갖는 것들을 제거한 후 판독을 인간 참조 게놈(예를 들어, hg38)에 정렬했다. 판독을 함유하는 생성된 파일은 참조 게놈(BAM 파일)에 매핑하였으며, 여기서 관심있는 표적 영역과 중첩하는 판독을 선택하고 야생형 판독의 수 대 삽입결실을 함유하는 판독의 수를 계산했다. 편집 백분율(예를 들어, "편집 효율성" 또는 "퍼센트 편집" 또는 "퍼센트 삽입결실")은 야생형을 포함하여 전체 서열 판독의 수에 대한 삽입결실을 갖는 서열 판독의 총 수로 정의된다.
- [0333] **실시예 2. Treg 연관된 인자를 과발현하는 T 세포의 억제 능력**
- [0334] CD3+CD4+ T 세포를 Treg-연관된 전사 인자 Foxp3, IL10을 갖는 Foxp3, IL10, CTLA4, 및 CTLA4를 갖는 IL10을 과발현하도록 형질도입하였고, 염증성 면역 반응을 억제하는 그 능력에 대해 검정하였다.
- [0335] **2.1 T 세포 제조**
- [0336] 인간 CD3+CD4+ T 세포를 신선한 류코팩(StemCell Technologies, Donor # RG1953)으로부터 내부적으로 제조하였다. 내부 제조를 위해, CD3+CD4+ T 세포를 제조업체의 프로토콜에 따라 인간 CD4+ T 세포 분리 키트(Miltenyi; Cat no. 130-096-533)를 사용하여 음성 선택에 의해 분리하였다. 분리된 CD3+CD4+ T 세포는 추가 사용할 때까지 Cryostor CS10 동결 배지(Cat No. 07930)에서 동결하였다. 활성화 당일, 동결된 CD3+CD4+ T 세포를 37℃ 수조를 사용하여 해동시켰다. 해동된 CD3+CD4+ T 세포를 10%(v/v)의 태아 소 혈청(Gibco; Cat. No. A31605-01), 1x Glutamax(Gibco; Cat. 35050-061), 50 μM의 2-머캅토에탄올(Gibco; 31350-010), 1x 비필수 아미노산(Corning, Cat. 25-0250-CI), 1mM 피루브산나트륨(Corning; Cat No. 25-000-CI), 10mM HEPES 완충액(Gibco; Cat No. 15630-080), 첨가된 사이토카인을 갖는 1x의 페니실린-스트렙토마이신(Gibco; Cat. 15140-122) 100U/mL의 재조합 인간 인터루킨-2(StemCell Technologies; Cat No. 78036.1), 5ng/ml 재조합 인간 인터루킨 7(StemCell technologies, Cat No. 78053.1) 및 5ng/ml 재조합 인간 인터루킨 15(StemCell technologies, Cat No. 78031.1)를 함유하는 RPMI 1640(Corning; Cat No. 10-040-CV)으로 구성된 T 세포 RPMI 배지 총 5ml에 1×10^6 세포/mL의 밀도로 도말하였다. 세포를 25μL/mL ImmunoCult 인간 CD3/CD28/CD2 T 세포 활성화제(Stemcell Technologies, Cat. 10990)의 첨가에 의하여 활성화시키고, 렌티바이러스 형질도입 이전에 48시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다.
- [0337] **2.2 T 세포 형질도입 및 세포 분류**
- [0338] IL10, CTLA4 및 FOX3P를 과발현시키기 위해, 활성화된 CD3+CD4+ T 세포를 개별적으로 또는 함께 렌티바이러스 작제물로 형질도입하였다. 활성화 48시간 후, CD3+CD4+ T 세포를 수확하고, 세정하고, 1×10^6 세포/100μL T 세포 RPMI 배지의 밀도로 재현탁시켰다. 100μL의 농축된 바이러스 상등액을 CD3+CD4+ T 세포에 첨가하고 1000xg에서 60분 동안 37℃에서 원심분리했다. 형질도입에 이어서, CD3+CD4+ T 세포를 세포/바이러스 상등액 혼합물에 재현탁하고 500U/mL IL-2, 5ng/mL IL-7 및 5ng/mL IL-17이 보충된 20mL T 세포 RPMI 배지를 함유하는 6-웰 Grex(Wilson Wolf; Cat. 80240M)의 단일 웰로 옮겼다. 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포를 4 내지 6일 동안 배양하고 BD FACSAria™ 융합 세포 분류기(BD Biosciences)를 사용하여 분류하여 관심있는 표적을 발현하는 세포를 분리했다. 분류에 이어서, CD3+CD4+ T 세포를 2.1에 언급된 성분을 함유하고 추가로 500U/mL IL-2, 5ng/mL IL7 및 5ng/mL IL17이 보충된 20mL T 세포 RPMI 배지를 갖는 6-웰 Grex 플레이트에서 25일차까지 배양하였다.
- [0339] 자연 조절 T 세포(nTreg)를 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조하였다. 간략하게, 자가 PBMC를 해동하고 CD4+ T 세포 음성 선택 키트(Miltenyi, Cat. 130-096-533)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 CD4+ T 세포를 분리하도록 처리했다. CD3+CD4+ T 세포를 FACS 완충액에 1×10^7 세포/mL로 재현탁하고 BV421 항-CD4(Biolegend, Cat. 300532), APC 항-CD25(Biolegend, Cat. 302610) 및 PE-Cy7 항-CD127(Biolegend, Cat. 351320)로 4℃에서 30분 동안 염색했다. CD4+CD127- 군으로부터 CD25+ 세포를 가장 높이 발현하는 상위 3-5%를 FACS에 의해 50% 태아 소 혈청을 함유하는 T 세포 RPMI 배지 배양물 안으로 분류하였다. 분류된 CD3+CD4+CD25+CD127- nTreg를

500U/mL IL-2(Stemcell Technologies, Cat. 78036.1), 100nM 라파마이신(Millipore Sigma, Cat. 553211) 및 25 μ l/mL 항-CD3/28/2 Immunocult T 세포 활성화제(Stemcell Technologies, Cat. 10990)로 추가로 보충된 실시예 2.1에 언급된 성분으로 보충된 20mL T 세포 RPMI 배지를 함유하는 6-웰 Grex에 도말하였다. IL-2(Stemcell Technologies, Cat. 78036.1) 및 라파마이신(Millipore Sigma, Cat. 553211)을 7일 동안 격일로 첨가했으며, 이때 500U/ml IL-2만 격일로 첨가했다(Stemcell Technologies, Cat. 78036.1). 12일차에, nTreg를 수확하고, 세정하고, A.1에 언급된 성분, 500U/mL IL-2(Stemcell Technologies, Cat. 78036.1)로 보충된 T 세포 RPMI 배지에서 6-웰 Grex 플레이트에 주사일까지 도말하였다.

2.3 표적 발현 검증

표적 발현은 유세포분석법으로 확인하였다. 제조업체의 지침에 따라 FoxP3/전사 인자 염색 완충액 세트(eBioscience Cat. 00-5523-00)로 50만 개의 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포를 투과성화하였다. 투과성화에 이어서, 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포를 (1) PerCP/Cy 5.5 항-FoxP3(BD Biosciences, Cat. 561493), eFluor660 항-Eos(Invitrogen, Cat. 50- 5758-80), 패시픽 블루 항-헬리오스(Biolegend, Cat. 137220) 또는 (2) BV421 항-IL-10(Biolegend, Cat. 501422) 및 APC 항-CTLA4(Biolegend, Cat. 369612)로 구성된 항체의 패널로 인큐베이션하였다. 염색된 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포를 Cytoflex 유세포분석기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포는 항체 패널에서 표적의 정량화 이전에 크기, 형상에 기반하여 게이팅되었다. 표적의 과발현은 형질도입 대조군에 대해 특징지어졌다. 주어진 표적에 대한 원하는 발현 수준은 nTreg와 같거나 그 초과인 것이었다(표 4 및 도 1a-e). nTreg 샘플은 증강된 수준의 Foxp3, 헬리오스 및 Eos를 발현했으며, 이는 고도로 순수하고 억제성 표현형과 관련이 있다.

표 4 - 렌티바이러스 형질도입에 이은 CD3+CD4+ T 세포에서 단백질 발현에 대한 평균 형광 강도

샘플	CTLA4	IL10	Foxp3	헬리오스	Eos	n
형질도입 대조군	2203	1285	3948	1521	877	1
IL10	2291	2448	3945	1396	871	1
CTLA4	47928	1296	3936	1334	939	1
IL10 + CTLA4	49948	1802	4372	1304	803	1
FOXP3	3551	1347	10127	1670	1704	1
FOXP3 + IL10	3952	2050	7339	1525	2796	1
nTreg	9324	1282	10047	5018	2016	1

2.4 GvHD의 모델에서 면역억제의 생체내 평가

분류된 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포의 생체내 억제 기능을 이식편대숙주 질환 마우스 모델을 사용하여 평가하였다.

생체내 주사를 위해 분류된 CD3+CD4+ T 세포를 수확하고 제조업체의 지침에 따라 사멸 세포 제거 키트(Miltenyi, Cat. 130-090-101)로 처리했다. 자가 PBMC를 실시예에서 상기 기재된 바와 같이 해동시켰다. PBMC를 각 검정 군에 1:1 비율로 첨가하고 세포를 PBS에서 6×10^6 /150 μ L로 재현탁하였다. PBMC 단독 군은 3×10^6 /150 μ L에서 재현탁하였다.

암컷 NOG 마우스(NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Sug}/JicTac; Taconic, Cat No. NOG-F)는 주사 하루 전에 X-선(RS-2000 조사기; Rad Source Technologies)을 사용하여 치사량 이하의 조사(200rad)에 의해 세포 이식을 위해 컨디셔닝되었다. 조사된 NOG 마우스의 코호트에 각 테스트 세포군 150 μ L를 정맥내로 주사했다. 5마리의 조사된 마우스는 주사되지 않았고 조사만 받은 대조군으로 사용되었다. 체중을 매일 모니터링하였다. 체중이 20% 감소하면 마우스를 희생시키고 그 비장의 세포 조성을 평가했다. 생존은 각 테스트 군에서 마우스의 생존율을 이해하기 위해 플롯팅되었다. IL-10 및 CTLA4 둘 모두로 형질도입된 T 세포만이 표 5 및 도 2a에 도시된 바와 같이 nTreg와 유사한 수준으로 생존을 연장했다.

[0348] 표 5 - 렌티바이러스 형질도입된 CD3+CD4+ 세포 주사 후 퍼센트 생존 일수

일	FoxP3 (n=3)	FoxP3+ IL-10 (n=4)	IL10 (n=5)	IL10+ CTLA4 (n=5)	CTLA4 (n=5)	nTreg (n=3)	형질도입 대조군 (n=5)	PBMC 단독 (n=4)	조사 단독 (n=5)
1 2	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
1 3	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	75%	100%
1 4	100%	100%	100%	100%	100%	100%	60%	75%	100%
1 6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	20%	75%	100%
1 7	0%	75%	80%	100%	100%	100%	0%	50%	100%
1 8		75%	60%	100%	100%	100%		25%	100%
2 0		50%	40%	100%	40%	100%		25%	100%
2 1		25%	20%	100%	40%	100%		0%	100%
2 2		0%	0%	80%	40%	100%			100%
2 3				80%	20%	100%			100%
2 6				60%	0%	100%			100%
2 7				60%		67%			100%
3 0				0%		33%			100%
3 2						0%			100%

[0349]

[0350] 인간 백혈구의 생착을 확인하기 위해, 비장 조성을 평가하였다. 안락사의 시점에서, 각 동물의 비장을 PBS를 함유하는 gentleMACS C 튜브(Miltenyi, Cat. 130-096-334)에 수집하였다. 비장을 gentleMACS Octo 해리기 기계(Miltenyi, 130-095-937, 프로그램 mSpleen01_01)를 사용하여 해리하였다. 세포 현탁액을 70-미크론 세포 스트레이너(Corning, Cat. 08-771-2)를 통해 여과하고 세포를 Vi-CELL XR 세포 생존도 분석기(Beckman Coulter)를 사용하여 계수했다. 대략적으로 100만 개의 생존가능한 비장세포를 FACS 완충액에 재현탁하고 항-인간 CD3(Alexa Fluor 488(Biolegend, Cat. 317310 또는 PerCP/Cyanine 5.5(Biolegend, Cat. 300327))), BV650 항-인간 CD19(Biolegend, Cat. 302238), APC 항-인간 CD45(BD Pharmigen, Cat. 561864), APC-Fire 750 항-인간 CD4(Biolegend, Cat. 300560) 및 BV421 항-마우스 Ter119(Biolegend, Cat. 116234)로 구성된 항체의 패널로 4℃에서 30분 동안 염색했다. 비장세포를 FACS 완충액으로 세정하고 Cytotflex 유세포분석기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. CD4 T 세포는 Ter119-CD45+CD19-CD3+CD4+로 정의되었다. CD8 T 세포는 Ter119-CD45+CD19-CD3+CD4-로 정의되었다. B 세포는 Ter119-CD45+CD19+CD3-로 정의되었다. 개별 군의 세포의 수를 결정하기 위해 각 군의 백분율을 회수된 총 비장세포의 수에 적용했다. IL10 및 CTLA4 둘 모두, 및 nTreg 과발현을 유도하기 위해 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 T 세포로 처리된 마우스는 처리되지 않은 PBMC 마우스보다 B 세포 백분율 및 수가 더 낮았다. 데이터는 표 6 및 도 2b에 나타나 있다.

표 6 - 마우스의 비장에서 인간 림프구의 정량화

샘플	총 인간 림프구 (CD45+) $\times 10^5$			인간 CD4 T 세포 $\times 10^5$		인간 CD8 T 세포 $\times 10^5$		인간 B 세포 $\times 10^5$		n
	평균	SEM	n	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	
PBMC 단독	14.93	7.91	4	5.15	1.86	0.73	0.49	5.90	3.37	4
형질도입 대조군	57.27	19.09	5	16.00	5.00	3.35	1.94	22.25	8.65	5
nTreg	14.80	5.96	4	2.82	0.74	2.44	0.29	0.01	0.01	4
IL10	35.90	16.23	5	10.69	4.05	5.64	5.39	9.30	3.59	5
CTLA4	34.08	12.90	5	22.83	9.83	0.86	0.62	7.23	3.61	5
IL10+ CTLA4	34.86	18.52	5	6.47	3.98	9.66	5.45	0.02	0.01	5
Foxp3	41.90	7.77	3	13.00	2.59	4.01	0.68	22.50	3.74	4
Foxp3 + IL10	21.57	11.06	4	7.87	5.81	1.32	0.51	8.56	5.11	4

2.5 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포의 사이토카인 프로파일 분석

분류된 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포를 자극하여 그의 사이토카인 프로파일을 평가하였다. 분류된 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포는 25 μ L/mL ImmunoCult 인간 CD3/CD28/CD2 T 세포 활성화제(Stemcell Technologies, Cat. 10990)가 포함되어거나 포함되지 않은 총 200 μ L T 세포 RPMI 배지에서 U-바닥 배양 플레이트에 1×10^5 T 세포/웰에서 도말하고 37°C에서 48시간 동안 배양했다. 48시간의 배양에 이어서, 배양 플레이트를 원심분리하고, 상층액을 수집하고, 제조업체의 지침에 따라 맞춤형 U-PLEX Biomarker 키트(Meso Scale Diagnostics, Cat. K15067L-2)를 사용하여 차후 사이토카인 정량화를 위해 동결시켰다. 구체적으로, U-PLEX Biomarker 키트를 사용하여 다음 인간 사이토카인: IFNG, TNFA, IL6, IL2, IL13 및 IL10을 정량화했다. Meso Quickplex SQ120 기기(Meso Scale Discovery)를 사용하여 U-PLEX Biomarker 플레이트를 판독하고 Discovery Workbench 4.0 소프트웨어 패키지(Meso Scale Discovery)로 데이터를 분석했다. 결과는 표 7과 도 3a-3f에 나타나 있다. IL10을 인코딩하는 서열을 갖는 렌티바이러스 발현 벡터로 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포는 TCR 자극 시 다량의 IL10을 분비하였다. IL10의 과발현은 또한 IL6, IFNG 및 TNFA의 분비를 증가시켰다. 대조적으로, FoxP3를 인코딩하는 서열을 갖는 렌티바이러스 발현 벡터로 형질도입된 T 세포는 모든 정량화된 사이토카인의 감소된 발현을 나타냈다. 자연 Treg는 또한 정량화된 사이토카인의 감소된 분비를 나타냈으며, 이는 고도로 순수하고 억제성 nTreg의 특징이다.

표 7 - 세포 자극 시 형질도입된 세포의 시험관내 사이토카인 생산(pg/ml)

샘플	IFNG		IL10		IL13		IL2		IL6		TNFA		n
	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	
형질도입되지 않은 CD3+CD4+ T 세포	110,200	431	42	3	1,997	61	41,741	1,053	21	1	5,092	143	3
형질도입 대조군	49,896	2,310	29	2	2,279	64	27,081	1,060	6	1	3,383	139	3
Foxp3	57,997	5,483	5	0	463	27	4,978	550	7	2	1,306	123	3
IL10	152,243	1,803	66,549	698	1,564	26	35,979	747	24	1	7,279	123	3
CTLA4	61,526	3,636	34	0	2,008	53	24,469	629	5	1	3,679	179	3
IL10 + CTLA4	159,139	6,838	26,523	737	1,725	39	25,621	620	21	1	6,484	148	3
nTreg	5,805	229	24	3	1,198	33	384	7	3	1	297	5	3

2.6 억제 기능의 혼합 림프구 반응 검정

혼합 림프구 반응(MLR)을 사용하여 분류된 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포의 억제 기능을 검정하였다. MLR은 다른 공여자의 동종 백혈구를 외래물질로 인식하는 T 세포에 의해 야기되는 염증 반응이다. Treg는 이 염증 반응을

억제할 수 있다. 따라서, MLR은 조작된 Treg를 포함하여 Treg의 억제 능력을 평가하기 위한 표준 검정이다. Treg가 억제성인 경우, 반응하는 염증성 T 세포에 의한 염증성 사이토카인의 증식 및 생성이 적다.

[0359] MLR은 T 세포 RPMI 배지를 사용하여 96-웰 U-바닥 플레이트에서 수행되었다. 형질도입되지 않은 CD3+CD4+ T 세포를 제조업체의 지침에 따라 CellTrace Violet(CTV)(ThermoFisher Scientific; Cat No. C34557)로 표지하고 반응 세포로 사용하였다. 형질도입된 T 세포에 사용된 것보다 동종이계 공여자로부터의 CD3-고갈된 PBMC는 제조업체의 지침에 따라 사멸 세포 제거 키트(Miltenyi; Cat No. 130-090-101)를 사용하여 처리되었다. 배양물은 50,000개의 CTV-표지된 T 세포, 50,000개의 CD3-고갈된 PBMC 및 대략적으로 50,000개(1:1), 16,666개(4:1), 5,555개(16:1), 1,851(64:1) 또는 617개(256:1) 웰당 분류된 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포를 조합함에 의해 제조하였다. 37℃에서 5일간의 배양에 이어서, 배양 플레이트를 원심분리하고 사이토카인 정량화를 위해 배양 상등액을 수확하였다. 세포 펠렛을 APC/Fire 750 항-CD4를 함유하는 FACS 완충액에 재현탁하고 4℃에서 30분 동안 두었다. 이어서 세포를 세정하고 CytoFlex 유세포분석기(Beckman Coulter)에서 처리하고 FlowJo 소프트웨어 패키지를 사용하여 분석했다. 세포는 먼저 양성 CD4 발현에 의해, 이어서 CTV 발현과 마지막으로 희석되지 않은 CTV 군에 의해 게이팅되었다. CTV-희석의 억제는 다음 식을 사용하여 계산되었다:

$$(CTV\ T\ 세포의(log_2(y) - Treg\ 가\ 있는\ CTV\ T\ 세포의(log_2(y))) / CTV\ T\ 세포의(log_2(y))) * 100$$

[0360]

여기서 y = 전체 CTV-표지된 군의 평균 형광 강도/CTV-표지된 군의 희석되지 않은 부분의 평균 형광 강도. 데이터는 표 8 및 도 4에 나타나 있다.

[0361]

[0362] 표 8 - CTV 희석에 의해 측정된 형질도입된 T 세포에 의한 세포 증식의 퍼센트 억제

샘플	1 대 1		4 대 1		16 대 1		64 대 1		256 대 1	
	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM
형질도입 대조군	32.52	0.19	14.88	4.30	17.02	7.56	6.84	7.30	12.99	4.36
Foxp3	80.34	1.10	51.50	8.41	19.91	5.59	-1.95	10.75	5.24	3.50
IL10	32.73	0.97	27.57	11.08	-9.69	6.50	-19.10	9.28	-9.67	2.66
CTLA4	77.81	2.54	75.03	4.61	52.11	7.06	24.09	2.17	8.28	4.43
IL10/CTLA4	85.36	1.79	71.27	1.86	30.72	6.94	-1.98	2.68	-7.75	2.27
nTreg	74.68	0.76	74.89	1.84	53.10	1.84	2.01	6.18	-0.87	3.07

[0363]

실시예 3. 조작된 T 세포의 억제 능력

[0364]

[0365] IL-10 및 CTLA-4의 과발현을 촉진하기 위해 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포가 IFNG 및 TNFA의 생산에서 증가를 입증함에 따라, 이들 세포는 IFNG 및 TNFA를 인코딩하는 유전자를 파괴하도록 추가로 조작되었다. 이들 세포의 억제 능력을 시험관내 및 생체내에서 평가하였다.

[0366]

3.1 T 세포 조작

[0367]

인간 CD3+CD4+ T 세포를 류코팩으로부터 분리하고, 활성화하고, 실시예 2.2에 기재된 바와 같이 IL10 및 CTLA4의 과발현을 촉진하기 위해 렌티바이러스 작제물로 형질도입하였다. 형질도입 1일 후, 형질도입된 세포는 TNFA 및 IFNG 유전자를 파괴하기 위해 Cas9를 사용하여 조작되었다. IFNG(G019753; IFNG 가이드 서열 CCAGAGCAUCCAAAAGAGUG(서열번호: 14)) 또는 TNFA(G019757; TNFA 가이드 서열 AGAGCUCUUACUACAACAU(서열번호: 58))를 표적화하는 sgRNA와 Cas9 mRNA를 함유하는 LNP를 실시예 1에 기재된 바와 같이 제형화하였다.

[0368]

G019753:

mC* mC* mA* GAGCAUCCAAAAGAGUGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU* mU* mU* mU (서열번호: 119)

[0369]

G019757:

mA* mG* mA* GCUCUUACCUACAACAUGUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU* mU* mU* mU (서열번호: 120)

[0370]

[0371] 각각의 LNP 제제는 10ug/ml 재조합 인간 ApoE3(Peprotech, Cat. 350-02)으로 보충된 CTS OpTmizer T 세포 확장 SFM(Gibco, Cat. A3705001), 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1X Glutamax, 10mM HEPES, 2.5% 인간 AB 혈청 (Gemini, Cat. 100-512), 200U/mL 재조합 인간 인터루킨-2, 5ng/ml 재조합 인간 인터루킨 7, 및 5ng/ml 재조합 인간 인터루킨-15를 포함하는 OpTmizer 기본 배지에서 37°C에서 15분 동안 인큐베이션하였다. 활성화-후 48시간에, 형질도입된 T 세포를 세정하고 200U/mL 재조합 인간 인터루킨-2, 5ng/ml 재조합 인간 인터루킨 7 및 5ng/ml 재조합 인간 인터루킨-15가 2.5% 인간 AB 혈청(Gemini, Cat. 100-512)과 함께 포함된 OpTmizer 기본 배지에 현탁했다. 사전-인큐베이션된 LNP 혼합물을 각 15mL 튜브에 첨가하여 총 RNA 5ug/ml의 최종 농도를 산출했으며, 이중 녹아웃 최종 농도를 갖는 군에서는 10ug/ml의 총 RNA였다. ApoE3으로 보충된 배지는 비히클 대조군으로 사용되었다. 24시간 후, T 세포를 수집하고, 세정하고, 실시예 2에 기재된 바와 같이 사이토카인을 갖는 T 세포 RPMI 배지에서, 주사일(활성화-후 15일차)까지 확장을 위해 배양하였다.

[0372] 3.2 조작된 CD3+CD4+ T 세포에서 단백질 발현의 유세포분석법 분석

[0373] 표적 발현은 실시예 2에서와 같이 유세포분석법에 의해 확인되었다. 데이터는 표 9 및 도 5a-5e에 나타나 있다.

[0374] 표 9 - T 세포 조작에 이어서 CD3+CD4+ 세포의 평균 형광 강도

샘플	IL10		CTLA4		Foxp3		헬리오스		Eos		n
	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	
형질도입되지 않은 CD3+CD4+ T 세포	1613.5	2.5	8069.5	164.4	7650.0	94.0	1866.0	11.0	3559.5	13.5	2
모의 KO	2868.0	57.0	71630.0	553.0	6134.5	0.5	1475.0	15.0	2666.5	100.5	2
IFNG KO	3073.5	132.5	95616.0	3234.3	6468.5	39.5	1623.5	36.5	3145.0	118.0	2
TNF KO	2734.0	106.0	85600.5	1232.1	6363.5	393.5	1638.5	97.5	3344.0	409.0	2
IFNG KO, TNF KO	2190.5	75.5	48940.5	1751.9	5316.5	191.5	1321.5	61.5	2406.0	18.0	2
nTreg	1467.5	102.5	38990.0	1857.6	24685.0	866.0	8822.5	645.5	5494.5	48.5	2

[0375]

[0376] 3.3 GvHD 모델에서 염증 반응의 생체내 평가

[0377] IL10 및 CTLA4 단독(모의 KO)을 과발현하거나 IFNG, TNFA의 녹다운 발현 또는 IFNG 및 TNFA의 이중 녹다운에 대한 편집과 조합하여, 조작된 CD3+CD4+ T 세포의 생체내 억제 기능을 실시예 2에서와 같은 이식편대숙주 질환 마우스 모델을 사용하여 평가했다. 생존 데이터는 표 10 및 도 6a에 나타나 있다. 인간 백혈구 생착을 실시예 2에서와 같은 비장의 조성을 통해 평가하였다. 데이터는 표 11 및 도 6b에 나타나 있다.

[0378] 표 10 -- 조작된 CD3+CD4+ 세포의 주사 후 퍼센트 생존 일수

주사 후 일수	모의 KO (n=7)	IFNG KO (n=8)	TNF KO (n=6)	IFNG KO TNF KO (n=10)	nTreg (n=10)	PBMC 단독 (n=9)	조사 단독 (n=5)
P- 값 대 PBMC	0.5566	0.6053	0.7746	0.0312	0.0012		
6	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
8	100%	100%	100%	88%	100%	78%	100%
10	100%	75%	100%	88%	100%	78%	100%
12	58%	63%	67%	75%	100%	56%	100%
14	43%	63%	17%	50%	63%	34%	100%
16	29%	38%	0%	50%	63%	23%	100%
18	15%	25%		38%	50%	23%	100%
20	15%	25%		28%	50%	23%	100%
25	15%	0%		25%	50%	23%	100%
27	0%			25%	50%	0%	100%
33				13%	38%		100%
38				0%	25%		100%
41					13%		100%
50					0%		100%

[0379]

표 11 - 마우스의 비장에서 인간 림프구의 정량화

샘플	총 인간 림프구 (CD45+) x 10 ⁵			인간 CD4 T 세포 x 10 ⁵		인간 CD8 T 세포 x 10 ⁵		인간 B 세포 x 10 ⁵		
	평균	SEM	n	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	n
PBMC 단독	64.70	11.98	8	25.30	7.02	8.56	2.19	9.35	2.52	9
모의 KO	41.72	18.66	6	9.48	3.57	7.10	2.77	14.49	12.88	6
IFNG KO	29.40	19.62	6	12.48	8.37	8.41	6.52	4.41	3.53	6
TNF KO	50.82	11.97	6	12.32	4.39	7.49	2.57	11.86	5.80	5
IFNG KO, TNF KO	76.40	46.06	8	35.00	21.81	29.62	24.24	5.08	2.91	8
nTreg	37.40	11.33	7	15.66	7.91	6.16	2.41	1.25	0.96	7

3.4 CD3+CD4+ 조작된 세포의 사이토카인 프로파일

분류된 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포를 자극하여 실시예 2에서와 같이 이의 사이토카인 프로파일을 삼중으로 평가하였다. 결과는 표 12 및 도 7a-7f에 나타나 있다.

표 12 - 세포 자극 시 조작된 T 세포의 시험관내 사이토카인 생산(pg/ml)

샘플	형질도입되지 않은 T 세포		무 편집		IFNG KO		TNF KO		IFNG KO TNF KO		nTreg	
	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM
IFNG	519,150	13,984	709,650	24,157	2,091	172	540,921	28,764	5,413	213	10,292	294
IL10	77	3	30,500	2,557	27,767	1,484	20,622	1,467	32,167	967	12	1
IL13	9,714	254	3,608	263	3,429	113	1,735	101	2,428	41	576	29
IL2	23,535	1,088	13,211	291	6,080	131	7,180	467	41,787	138	36	3
IL6	137	3	30	3	24	1	20	3	46	3	5	1
TNFA	4,433	326	5,810	473	2,900	229	138	6	248	3	232	8

3.5 억제 기능의 혼합 림프구 반응 검정

혼합 림프구 반응을 사용하여 표 13에 기재된 조작된 T 세포에 대한 CTV-표지된 T 세포의 비율로 실시예 2에서와 같이 형질도입된 세포의 억제 기능을 검정하였다. 데이터는 표 13 및 도 8에 나타나 있다.

표 13 - CTV 희석에 의해 측정된 조작된 T 세포에 의한 세포 증식의 퍼센트 억제

샘플	1 대 1		1 대 3		1 대 9	
	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM
형질도입되지 않은 T 세포	7.17	-4.32	-6.91	4.97	3.13	4.78
모의 편집	49.60	-0.38	40.93	2.46	36.83	1.07
IFNG KO	43.27	-1.87	42.33	3.48	37.77	2.03
TNF KO	55.17	-9.52	43.53	1.96	31.87	1.30
IFNG KO, TNFA KO	38.07	-1.91	36.30	0.36	30.50	2.12
nTreg	50.57	-2.03	42.23	2.72	25.50	2.28

실시예 4. GvHD 모델에서 염증 반응의 생체내 평가

IFNG, TNFA의 녹다운 발현에 대한 편집과 함께, 야생형 또는 고-친화성 버전의 IL10 및 CTLA4를 과발현하는 조작된 CD3+CD4+ T 세포의 생체내 억제 기능을, 5x10⁶ PBMC 및 Treg가 주사된 것을 제외하고, 실시예 2에서와 같은 이식편대숙주 질환 마우스 모델을 사용하여 평가했다. 생존 데이터는 표 14 및 도 9a에 나타나 있다. 인간 백혈구 생착을 실시예 2에서와 같이 비장의 조성을 통해 평가하였다. 데이터는 표 15 및 도 9b에 나타나 있다.

[0392] 표 14 - 조작된 CD3+CD4+ 세포의 주사 후 퍼센트 생존 일수

주사 후 일수	IL10 (wt)/ CTLA4 (wt) (n=7)	IL10 (wt)/ CTLA4 (HA) (n=3)	IL10 (HA)/ CTLA4 (HA) (n=7)	nTreg (n=7)	PBMC (n=8)	비히클 (n=9)
P- 값 대 PBMC	0.088	0.25	0.32	0.0008		
8	100%	100%	86%	100%	100%	100%
15	100%	100%	86%	100%	88%	100%
16	100%	100%	86%	100%	75%	100%
18	100%	100%	86%	100%	50%	100%
20	100%	100%	86%	100%	38%	100%
21	100%	100%	71%	100%	38%	100%
28	85%	100%	57%	100%	25%	100%
29	85%	100%	42%	100%	25%	100%
30	85%	67%	42%	100%	25%	100%
32	71%	67%	42%	100%	25%	100%
33	42%	67%	42%	100%	25%	100%
34	42%	67%	29%	100%	25%	100%
36	29%	0%	29%	100%	25%	100%
37	29%		29%	100%	25%	100%
39	29%		14%	100%	13%	100%
40	0%		14%	100%	13%	100%

[0393]

[0394] 표 15 - 마우스의 비장에서 인간 림프구의 정량화

샘플	총 인간 림프구 (CD45+) x 10 ⁶			인간 CD4 T 세포 x 10 ⁶		인간 CD8 T 세포 x 10 ⁶		인간 B 세포 x 10 ⁵	
	평균	SEM	n	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM
IL10(wt)/CTLA4 (wt)	16.8	10.1	6	7.5	3.7	5.6	4.1	0.3	0.1
IL10(wt)/CTLA4(HA)	6.3	5	3	3.5	2.9	1.7	1.4	0.5	0.5
IL10(HA)/CTLA4(HA)	12.9	4.4	6	5.4	2.2	5.7	2.3	1.4	0.7
nTreg	9.2	1.3	8	5.6	0.8	2.4	0.5	3	2.1
PBMC	7	1.8	7	3.2	1.1	1.6	0.6	8	4.2

[0395]

[0396] 실시예 5. 염증성 사이토카인에 대한 노출에 이어서 조작된 T 세포의 억제 능력

[0397] 염증성 환경에서 Treg 억제 표현형의 안정성은 Treg 요법에 대한 주요 고려사항이다. 따라서 본 발명자들은 염증성 사이토카인 TNF-α, IL-6 및 IL-1β에 sTreg를 노출시키고 시험관내에서 그의 억제 기능을 평가했다.

[0398]

5.1 T 세포 조작

[0399] 인간 CD3+CD4+ T 세포를 류코팩으로부터 분리하고, 활성화하고, 실시예 2.2에 기재된 바와 같이 IL10 및 CTLA4의 과발현을 촉진하기 위해 렌티바이러스 작제물로 형질도입하였다. 형질도입 1일 후, 형질도입된 세포를 gRNA G019754(INFG) 및 G019760(TNFA)을 사용하여 실시예 3.1에 기재된 바와 같이 TNFA 및 IFNG 유전자를 파괴하기 위해 Cas9를 사용하여 조작하였다.

[0400]

분류된 조작된 CD3+ CD4+ T 세포의 일부를 염증성 사이토카인, TNF-α(Miltenyi; 130-094-014), IL-1β(Miltenyi; 130-093-898) 및 IL-6(Miltenyi; 130-095-365)의 각각 100ng/mL의 혼합물의 존재에서 배양하였다. TNF-α, IL-1β 및 IL-6은 8일 동안 2일마다 보충되었으며, 이 시점에서 MLR 억제 검정을 사용하여 그 기능을 평가했다.

[0401]

표적 발현은 실시예 2에서와 같이 유세포분석법에 의해 확인되었다. 데이터는 표 16에 나타나 있다.

표 16 - T 세포 조작에 이은 CD3+CD4+ 세포의 평균 형광 강도

샘플	CTLA4 (평균)
형질도입되지 않음	3866
무 편집	114290
IFNG KO	114271
TNFA KO	112277
IFNG/TNFA KO	116005
무 편집, 사전조정됨	78579
IFNG KO, 사전조정됨	93574
TNFA KO, 사전조정됨	82986
IFNG/TNFA KO, 사전조정됨	85807

분류된 형질도입된 CD3+CD4+ T 세포를 자극하여 실시예 2에서와 같이 그의 사이토카인 프로파일을 삼중으로 평가하였다. 데이터는 표 17 및 18에 나타나 있다.

표 17 - 세포 자극 시 조작된 T 세포의 시험관내 사이토카인 생산(pg/ml)

	형질도입되지 않음		무 편집		IFNG KO		TNF KO		IFNG KO TNF KO	
샘플	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM
IFNG	73975.5	3610.3	114184	859.7	621.2	58.1	113817.1	3318.9	711.7	120.8
TNFA	676.8	57.7	1427.1	174	880	133.5	164.7	8.7	131.6	14.7
IL10	575.1	59.8	45237.9	2672.3	28551.8	2639.2	38242.1	2746.2	34482.1	3807.2
IL13	2791.1	109.5	1960.8	80	1487.8	137.9	1698.8	69	1703.5	91.7
IL2	62.9	2.1	254.2	27.6	120.2	15	251	20.7	172.9	17.5
IL6	16.7	1.6	444.2	108.4	30.2	4.7	45.9	3	33.7	5.4

표 18 - 세포 자극 시 염증성 사이토카인에 노출된 조작된 T 세포의 시험관내 사이토카인 생산(pg/ml)

	무 편집		IFNG KO		TNF KO		IFNG KO TNF KO	
샘플	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM
IFNG	315882	7526.6	595	41.9	315422	1119.8	1033.2	29.5
TNFA	2284.5	115.9	1573.2	48.1	142.4	8.9	102.1	8.5
IL10	28998.4	1493.6	24158.7	1010.4	26235.9	523.5	21074	1190.8
IL13	3980.6	122.8	2731.7	97.6	2654.3	63.9	2523.7	87.3
IL2	1078.6	80.3	93.8	6.2	428	24.3	242.2	23.1
IL6	53.6	2.8	29.7	4.4	47.5	1.9	25.2	3.1

5.2 억제 기능의 혼합 림프구 반응 검정

혼합 림프구 반응을 사용하여 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6의 각각 100ng/mL를 첨가하거나 첨가하지 않고, CTV-표지된 T 세포 대 조작된 T 세포의 1:1 비율에서 실시예 2에서와 같이 형질도입된 세포의 억제 기능을 검정하였다. 데이터는 표 19 및 20 및 도 10a-b에 나타나 있다.

표 19 - 염증성 사이토카인이 없는 억제 검정에서 CTV 희석에 의해 측정된 조작된 T 세포에 의한 세포 증식의 퍼센트 억제

샘플	무 사전조정		염증성 사전조정	
	평균	SEM	평균	SEM
무 편집	69.4	3.1	75.6	1.6
IFNG KO	74.6	4.3	78.5	2.6
TNF KO	75.6	0.5	81.1	0.9
TNF IFNG KO	70.2	2.6	85.8	1.4

표 20 - 염증성 사이토카인이 있거나 없는 억제 검정에서 CTV 희석에 의해 측정된 조작된 T 세포에 의한 세포 증식의 퍼센트 억제

샘플	대조군		MLR에서 염증성 사이토카인		MLR에서 사전조정 및 염증성 사이토카인	
	평균	SEM	평균	SEM	평균	SEM
무 편집	69.4	3.1	51.8	3.8	53.4	1.8
IFNG KO	74.6	4.3	52.7	7	57.6	4.9
TNF KO	75.6	0.5	55.7	3.4	52.	3.1
TNF IFNG KO	70.2	2.6	57.4	4.2	56.4	3.5

[0414]

[0415] 실시예 6. 염증성 장 질환 모델에서 조작된 T 세포의 억제 능력

[0416] Treg는 전-임상 모델에서 대장염의 유도를 억제하는 것으로 알려져 있다. 더욱이, IL-10에서 돌연변이는 인간에서 대장염의 발생에 대한 위험-인자로 알려져 있다. 중요하기로는, 염증을 일으킨 결장은 림프구에 대한 부착 분자인 MAdCAM-1의 높은 수준을 발현하는 것으로 알려져 있다. IFNG 및 TNFA를 인코딩하는 유전자를 과과하도록 편집되고 항-MAdCAM CAR을 발현하도록 추가로 조작된, IL10 및 CTLA4를 과발현하는 T 세포가 염증성 장 질환 (IBD)의 인간화된 마우스 모델(예를 들어, Gottel 등, Low-Dose Interleukin-2 Ameliorates Colitis in a Preclinical Humanized Mouse Model. Cell Mol Gastroenterol Hepatol. 2019;8(2):193-195 참조)에서, 또는 IBD의 CD45RB^{hi} 전달 모델(예를 들어, Asseman 등, An Essential Role for Interleukin 10 in the Function of Regulatory T Cells That Inhibit Intestinal Inflammation. J Expt Med. 190(7):995-1003 참조)에서 치료를 위해 사용된다.

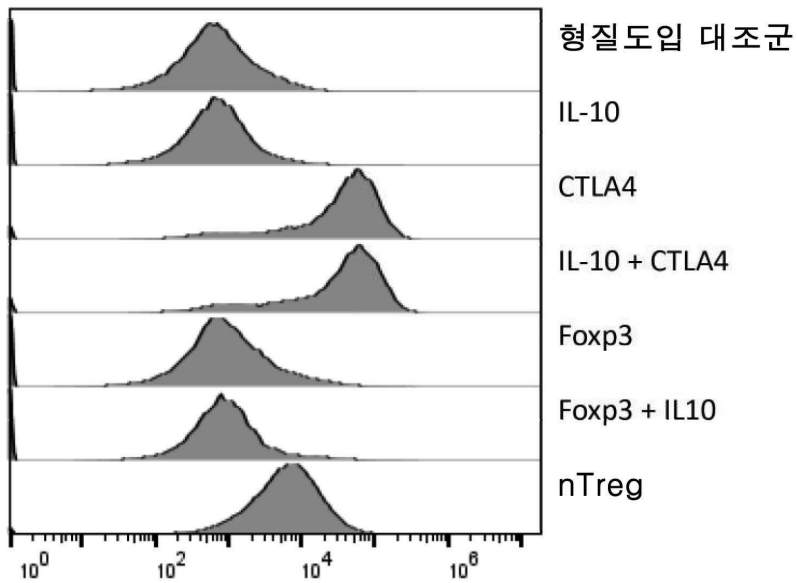
[0417] 간략히 설명하면, 인간화된 마우스 IBD 모델은 0일차에 NOG 마우스에 20x10⁶ PBMC를 주사하고 50% 에탄올 수성 용액(X w/v)에 현탁된 50 μL 2,4-디니트로벤젠 술폰산(DNBS)(Sigma-Aldrich, Cat. 556971)을 갖는 관장제를 투여함에 의해 유도된다. 예방적 환경에서 조작된 T 세포를 평가하기 위해, 본 명세서에서 제공되는 20x10⁶ 조작된 T 세포가 0일차에 동일한 공여자로부터의 PBMC와 공동-전달된다. 인간화된 모델의 치료 환경에서, PBMC는 DNBS 관장제의 당일에 주사되고 PBMC와 동일한 공여자로부터의 20x10⁶ 조작된 T 세포는 이어지는 여러 날에 전달된다. 체중이 20% 감소한 후 또는 체중이 20% 이상 감소하지 않은 것의 경우 미리정해진 시간에 마우스를 안락사시키고 그 결장을 수집한다. 알려진 방법을 사용하여 대장염의 정도에 대해 마우스를 분석한다. 예를 들어, 대장염의 정도는 대장의 총 길이 뿐만 아니라 대장 길이 대 중량 비율에 의해 결정된다. 대장은 포르말린에 고정되어 대장 상피의 비후에 대해 조직학에 의해 분석된다. IFNG 및 TNFA 둘 모두의 녹아웃과 조합하여 CTLA4 및 IL10을 삽입한 조작된 T 세포로 마우스의 예방적 및 치료적 처리는 상피의 비후화를 유의하게 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 예방적 및 치료적 처리는 CTLA4의 삽입 및 IFNG 및 TNFA 둘 모두의 녹아웃을 갖는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하고 상피의 비후화를 유의하게 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 예방적 및 치료적 처리는 IL10의 삽입 및 IFNG 및 TNFA 둘 모두의 녹아웃을 갖는 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하고 상피의 비후화를 유의하게 감소시킨다.

[0418] IBD의 T 헬퍼 세포 유형 1-매개/CD45RB^{hi} 전달 모델은 BALB/c(Taconic; BALB)로부터의 CD45RB^{hi} CD3+CD4+CD25- T 세포를 면역결핍 SCID 마우스(Taconic; CB17SC)로 전달함에 의해 유도된다. 대장염은, 분극화된 Th1 세포가 장 병변에 나타나기 때문에, Th1 반응의 발생으로부터 초래한다. 정상적으로 병원성 CD45RB^{high} 세포와 함께 상호 CD45RB^{low} CD4+ T 세포 하위집합의 공동-전달은 대장염의 발생을 예방하며, 이는 정상 마우스로부터의 CD45RB^{low} CD4+ 하위집합이 장에서 염증 반응을 제어할 수 있는 조절 T 세포군을 함유한다는 것을 나타낸다 (Powrid 등, Phenotypically distinct subsets of CD4+ T cells induce or protect from chronic intestinal inflammation in C.B-17 scid mice. Int. Immunol. 5:1461-1471). 세포군은 공지된 방법을 사용하여 단리하고 복강내 주사를 위해 제조한다. 조작된 Treg 및 nTreg를 실시예 2에서의 상기와 같이 제조한다. 체중에서 20% 감소 후 또는 적어도 20% 체중 감소가 없는 것의 경우 미리정해진 시간에 마우스를 안락사시키고 그의 대장을 수집한다. 마우스는 IBD의 인간화된 마우스 모델에서 제공되는 것과 같은 공지된 방법을 사용하여 대장염의 정도에 대해 분석된다. IFNG 및 TNFA 둘 모두의 녹아웃과 조합하여 CTLA4 및 IL10을 삽입한 조작된 T 세포로 마우스의 처리는 상피의 비후화를 50% 초과로 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 예방적 및 치료적 처리는 CTLA4의 삽입 및 IFNG 및 TNFA 둘 모두의 녹아웃으로 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하고 상피의 비후화를 50% 초과로 유의하게 감소시킨다. 일부 실시형태에서, 예방적 및 치료적 처리는 IL10의 삽입 및 IFNG 및 TNFA 둘 모두의 녹

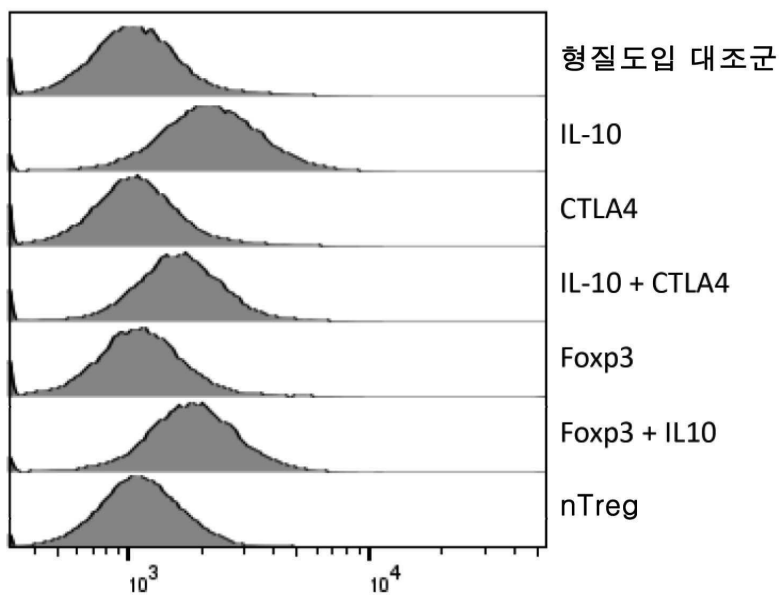
아웃으로 조작된 T 세포를 투여하는 것을 포함하고 상피의 비후화를 50% 초과로 유의하게 감소시킨다. 처리는 또한 체중 감소를 줄여 생존력을 연장한다.

도면

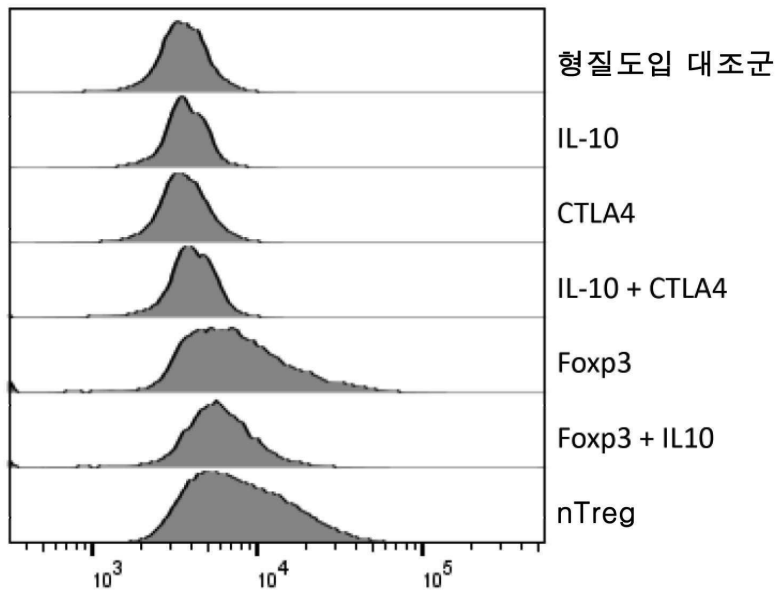
도면1a



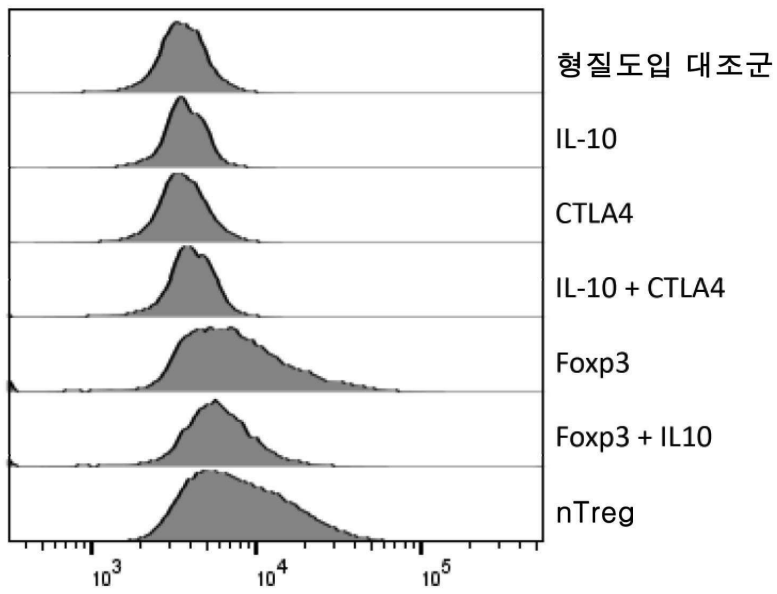
도면1b



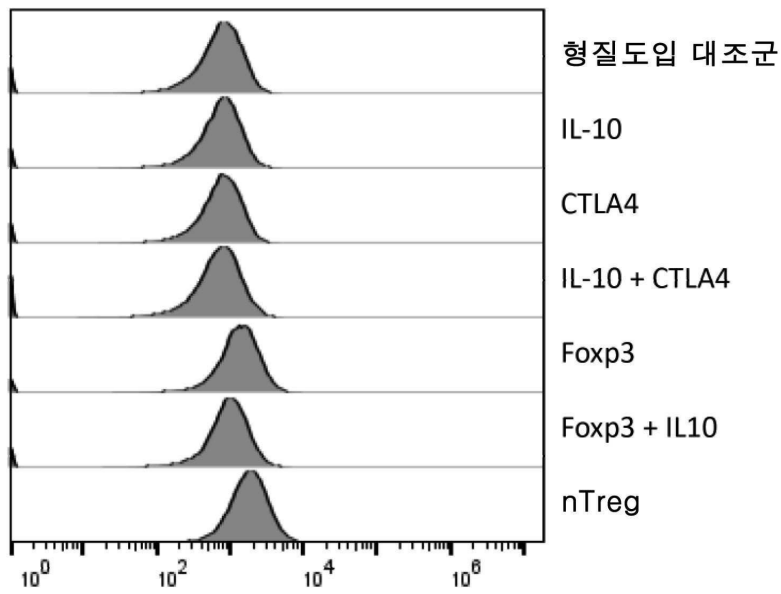
도면1c



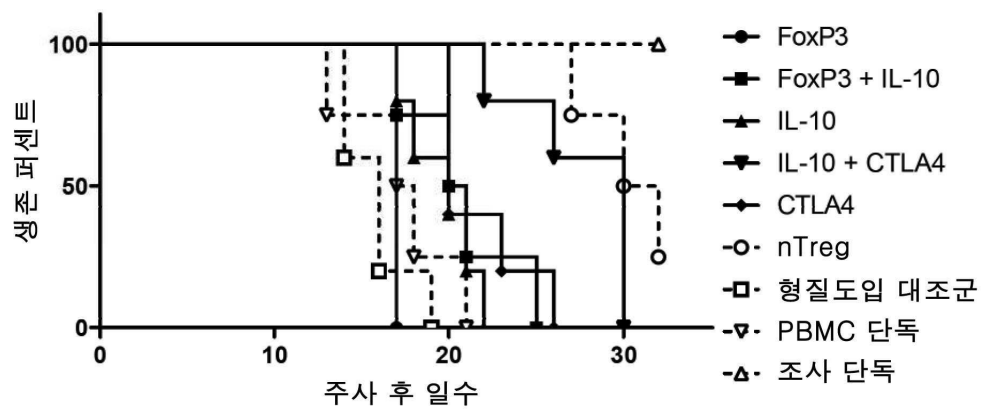
도면1d



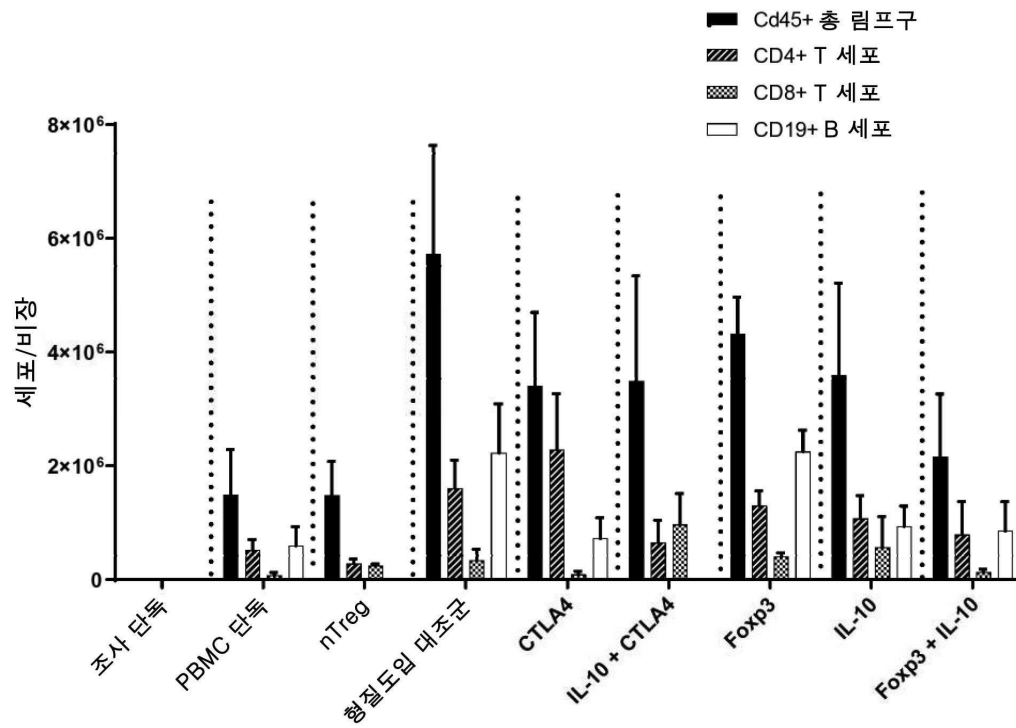
도면1e



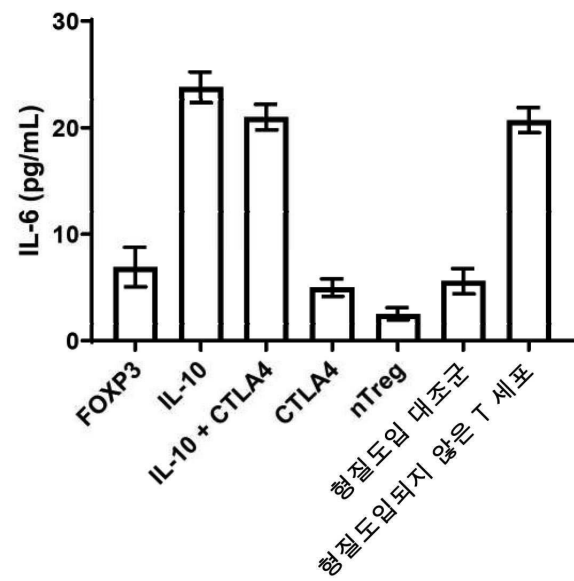
도면2a



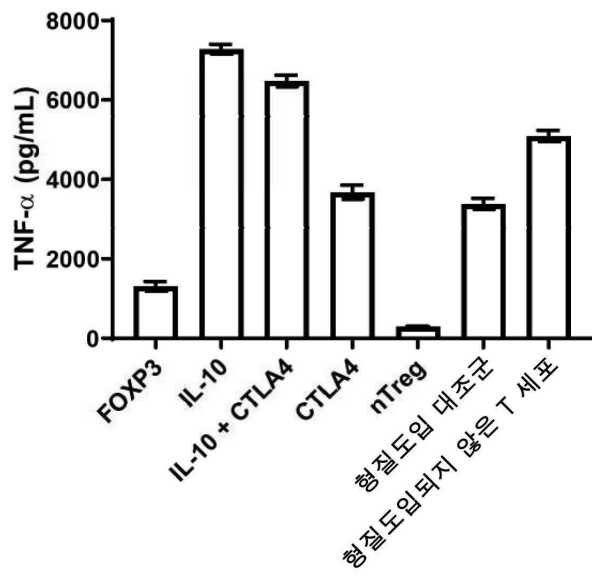
도면2b



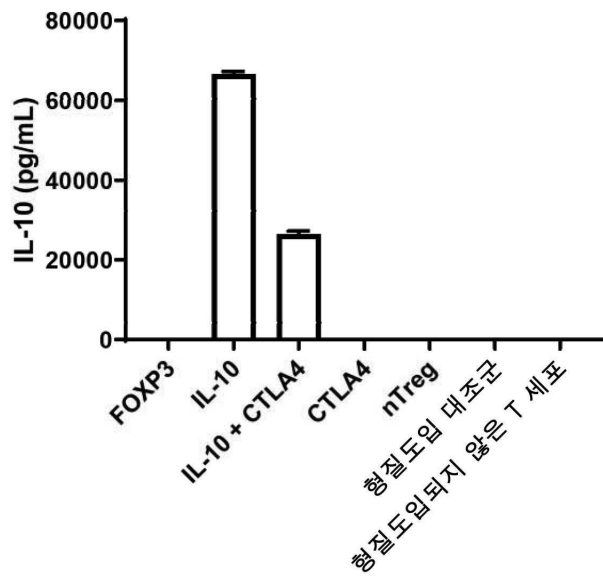
도면3a



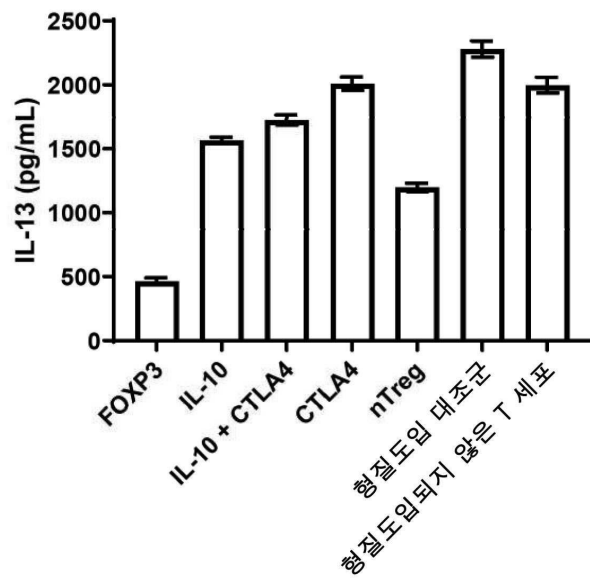
도면3b



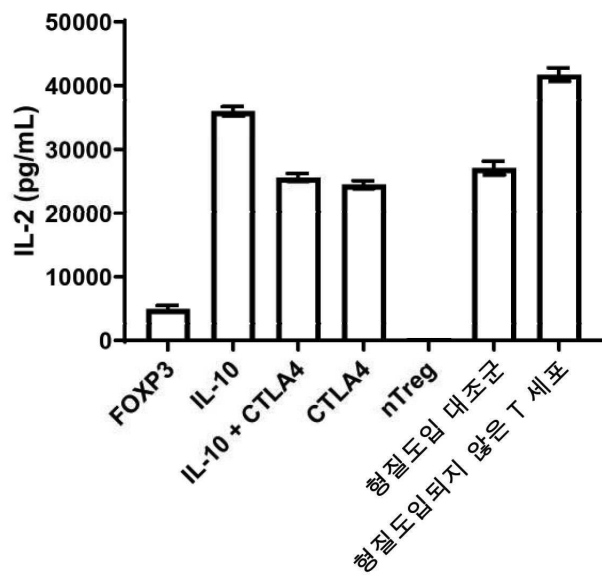
도면3c



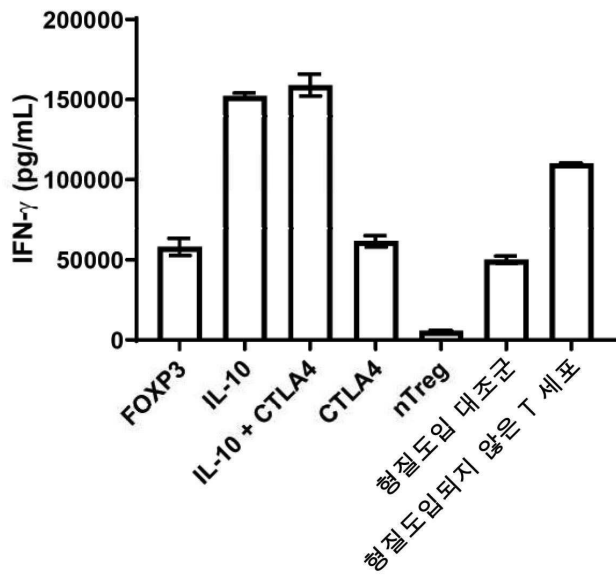
도면3d



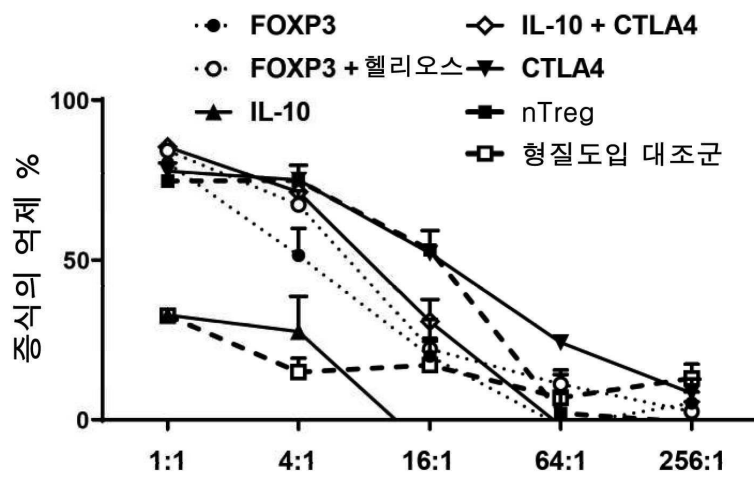
도면3e



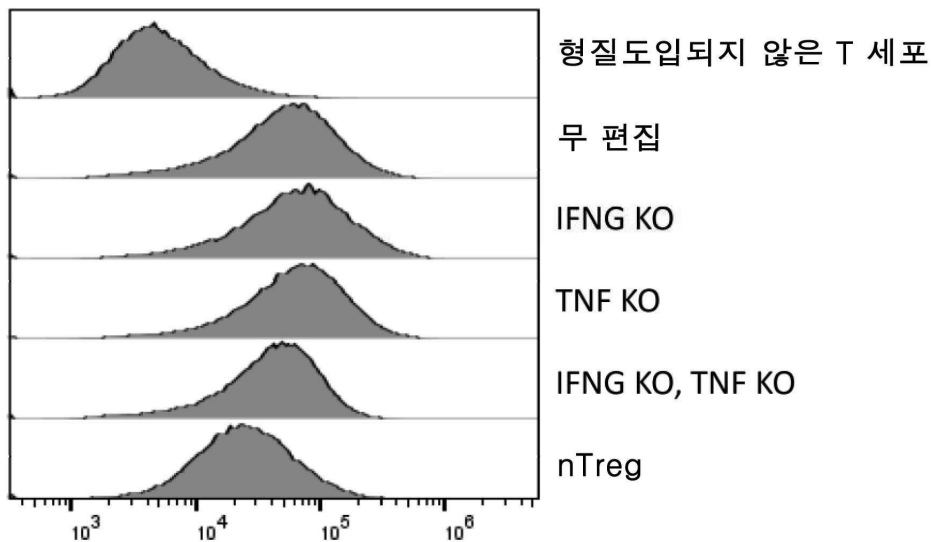
도면3f



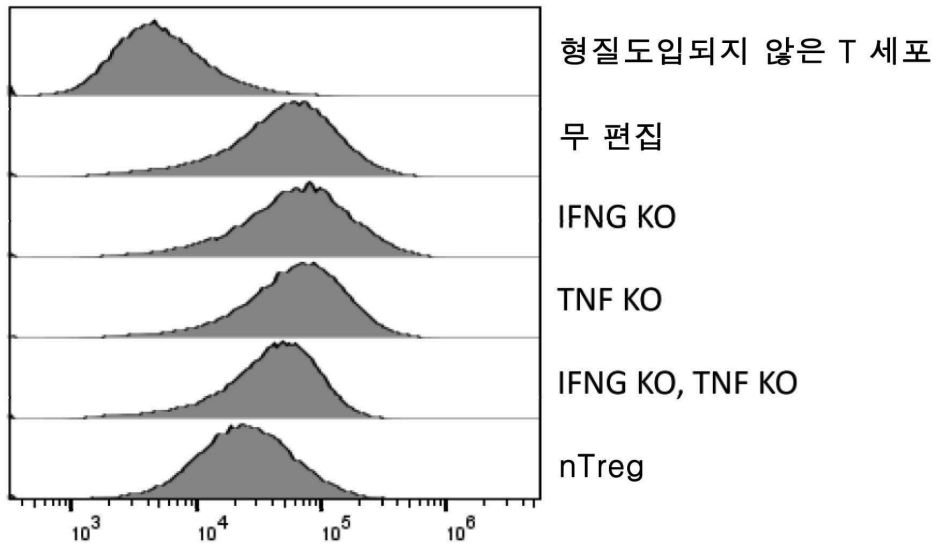
도면4



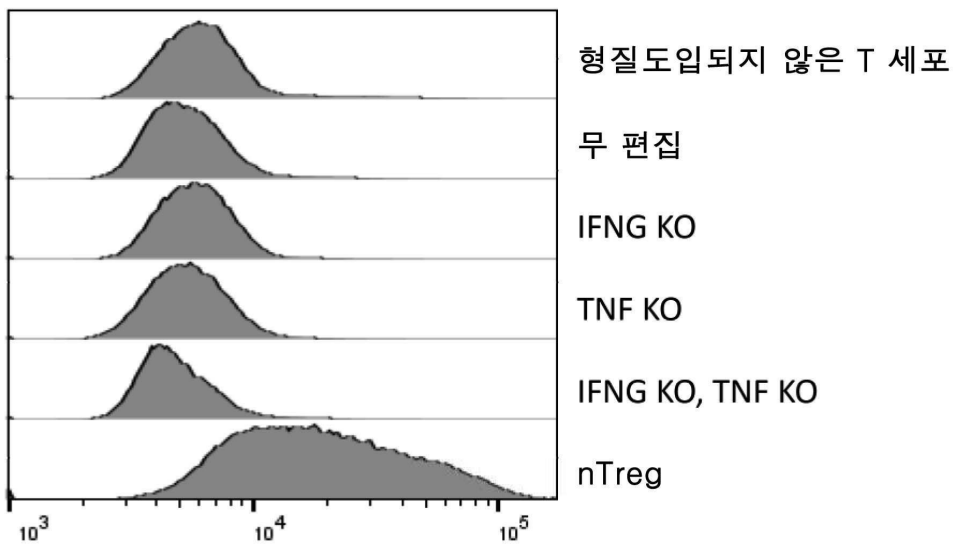
도면5a



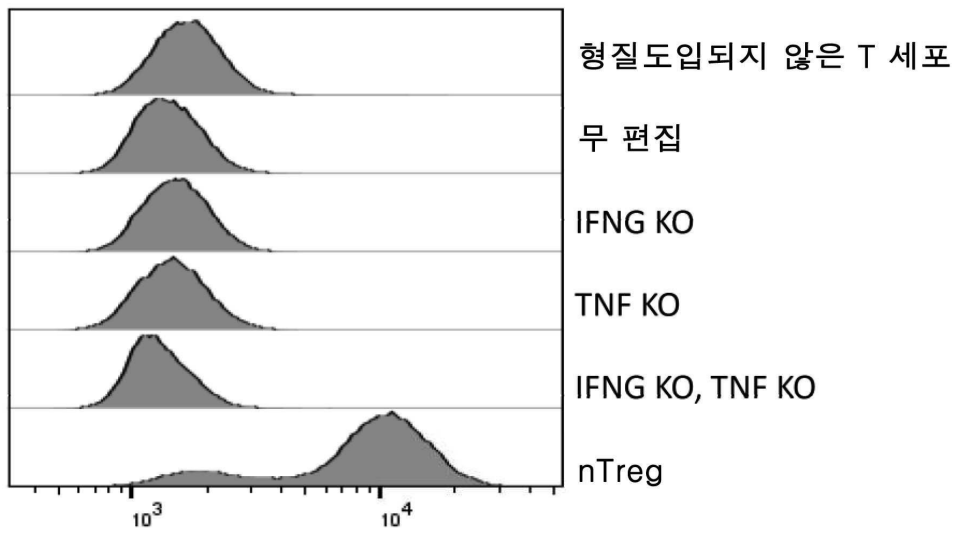
도면5b



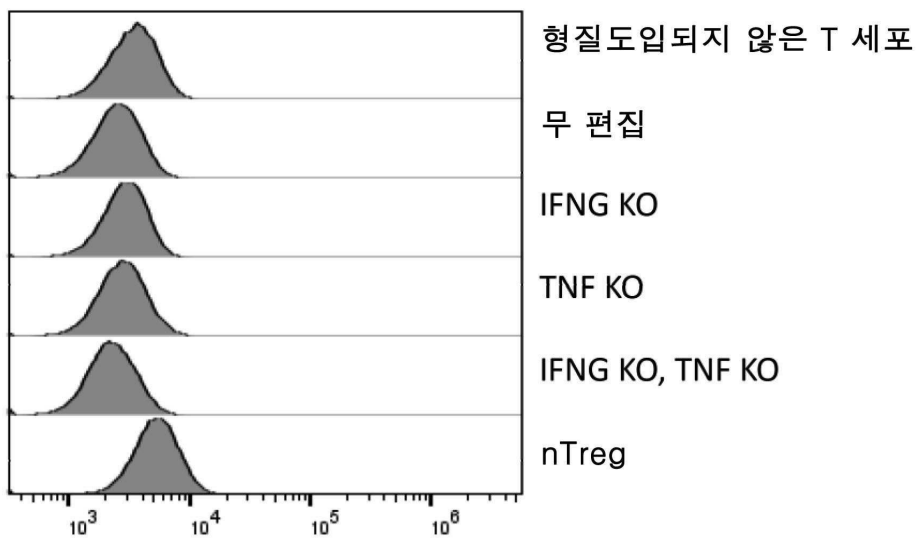
도면5c



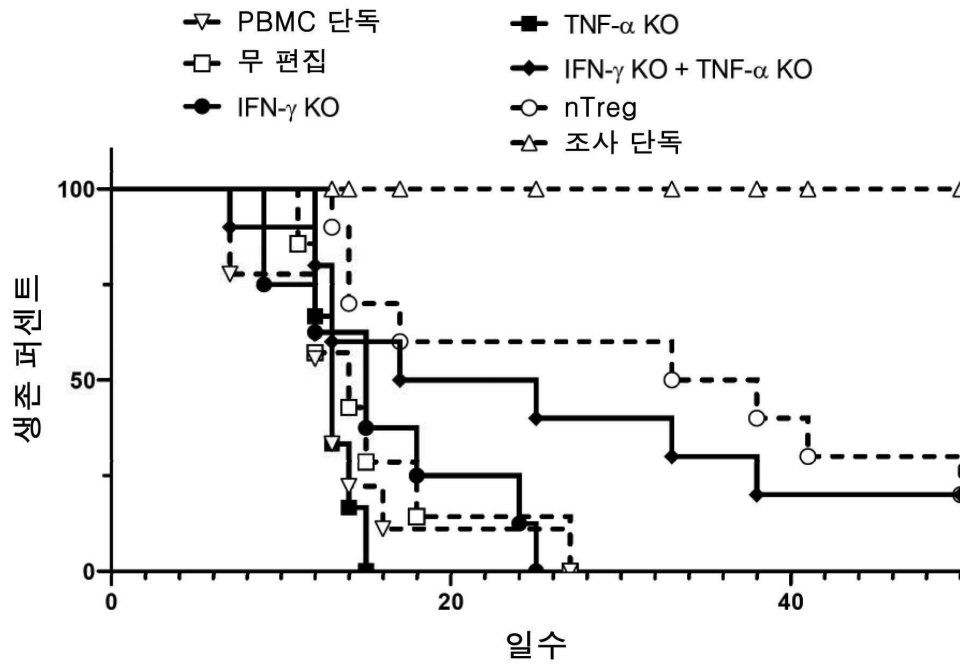
도면5d



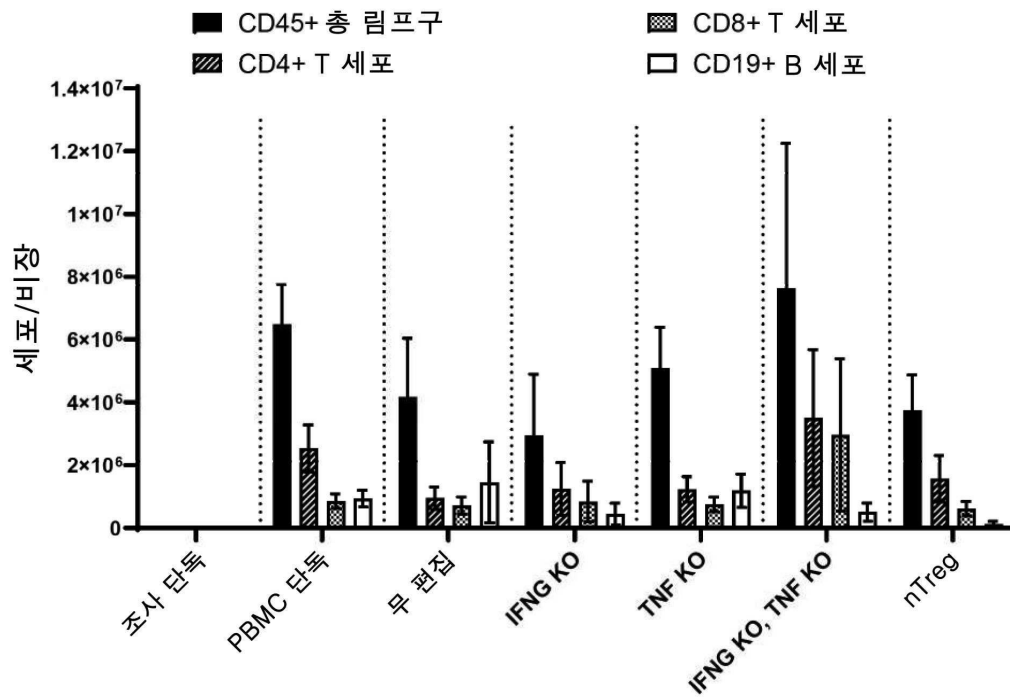
도면5e



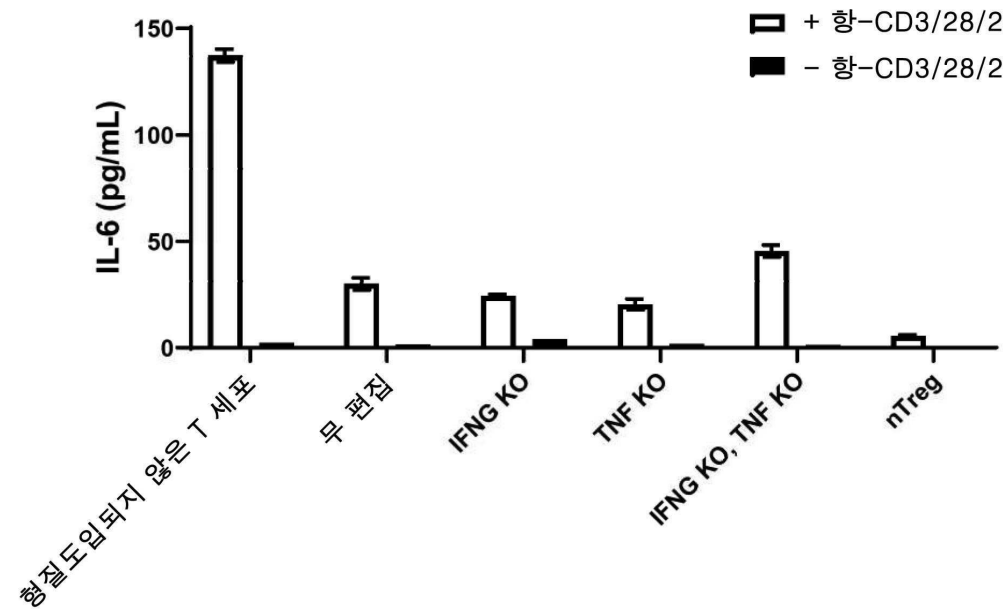
도면6a



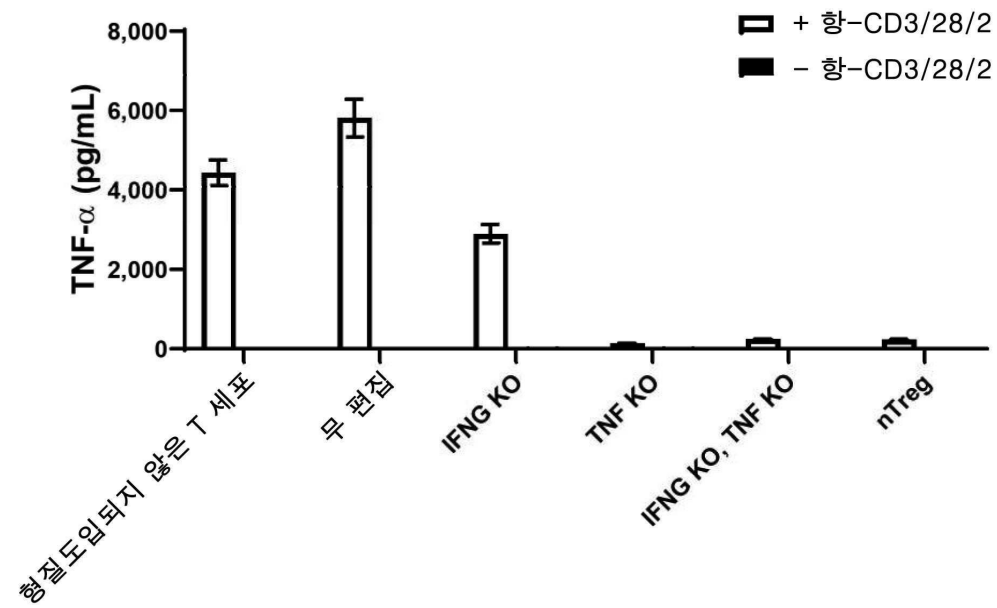
도면6b



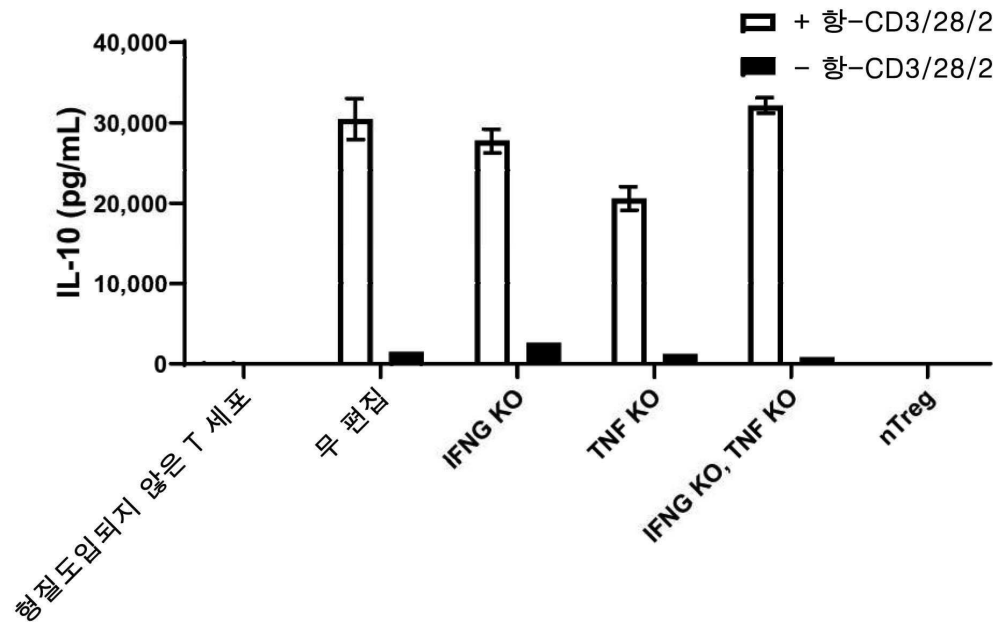
도면7a



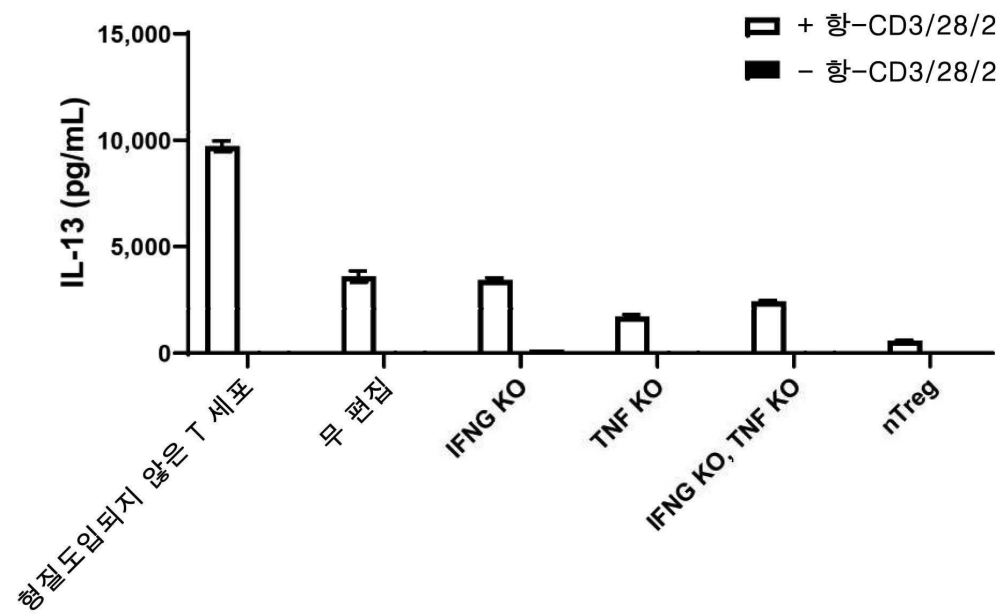
도면7b



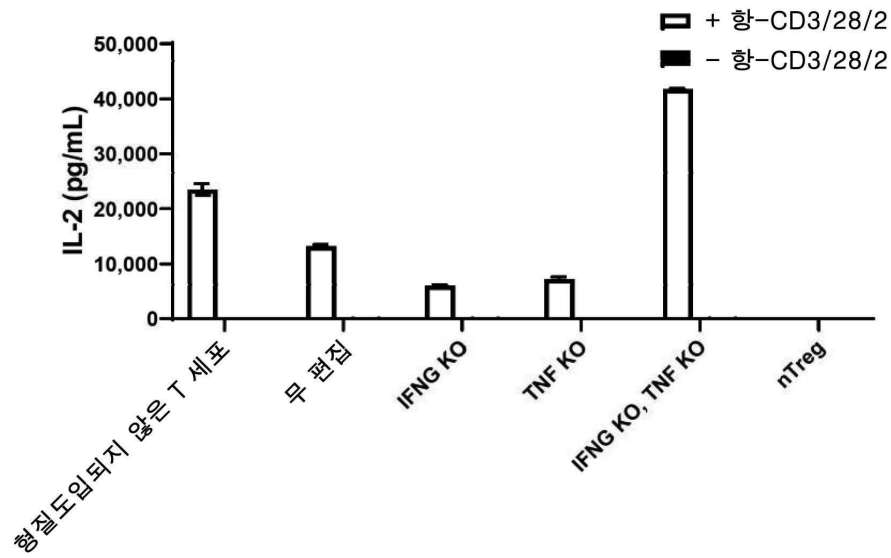
도면7c



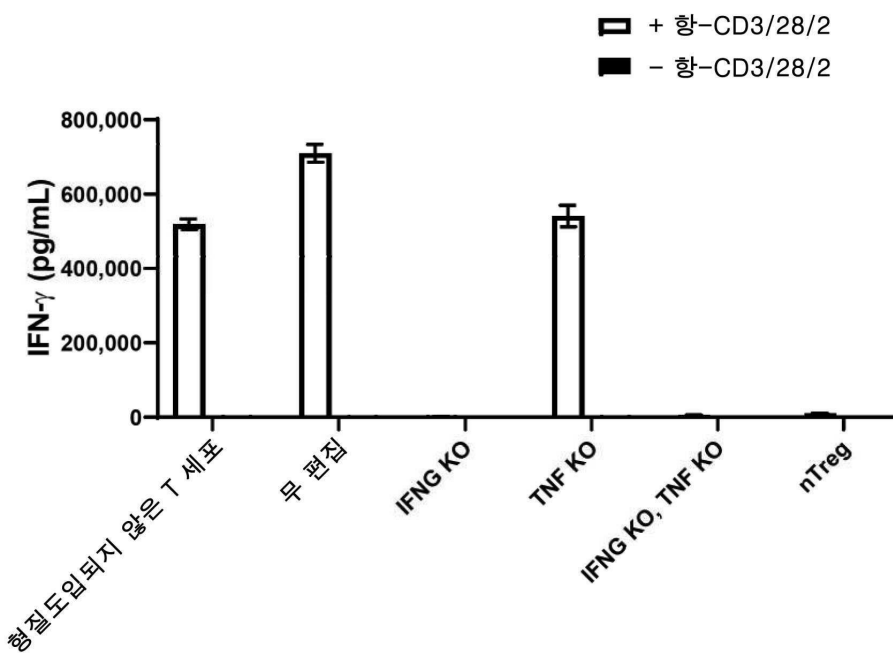
도면7d



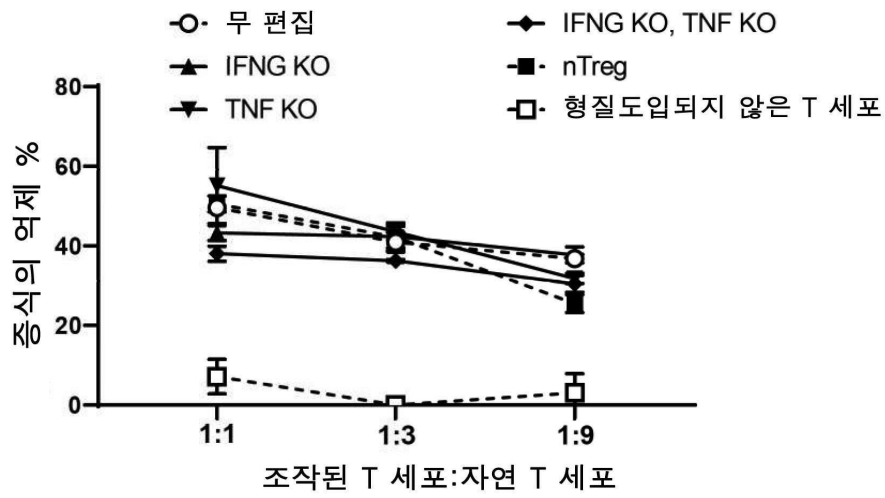
도면7e



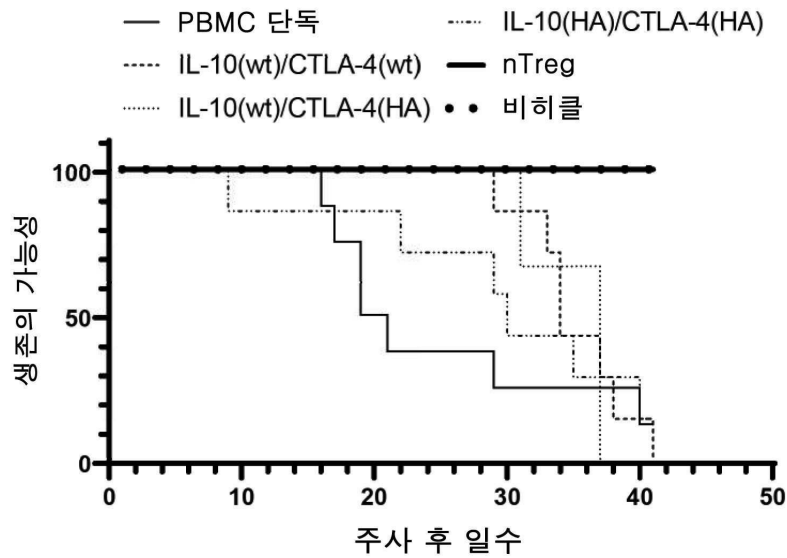
도면7f



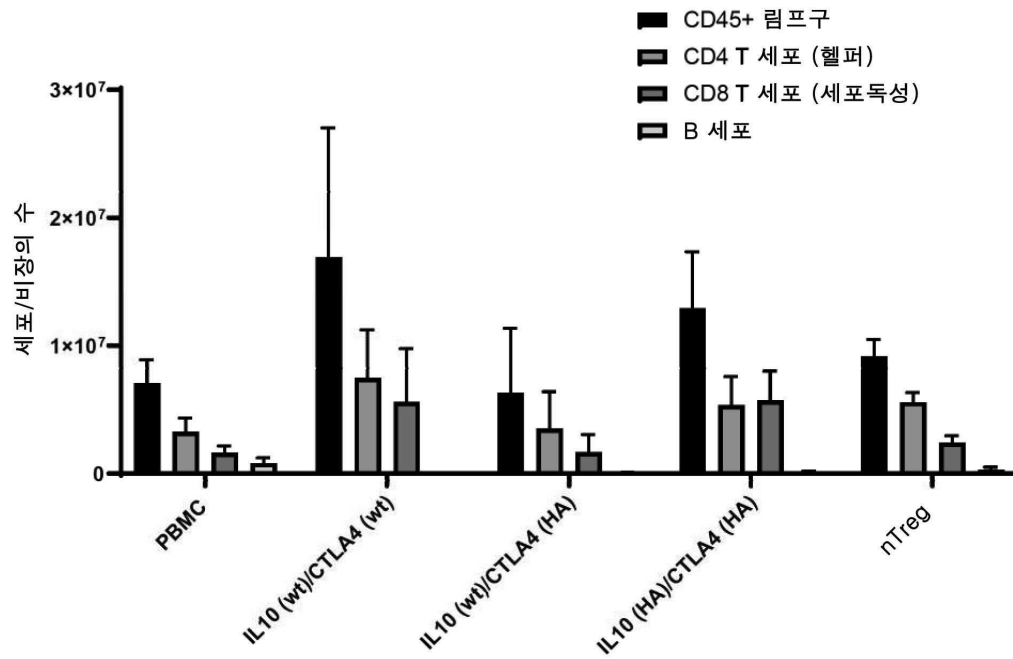
도면8



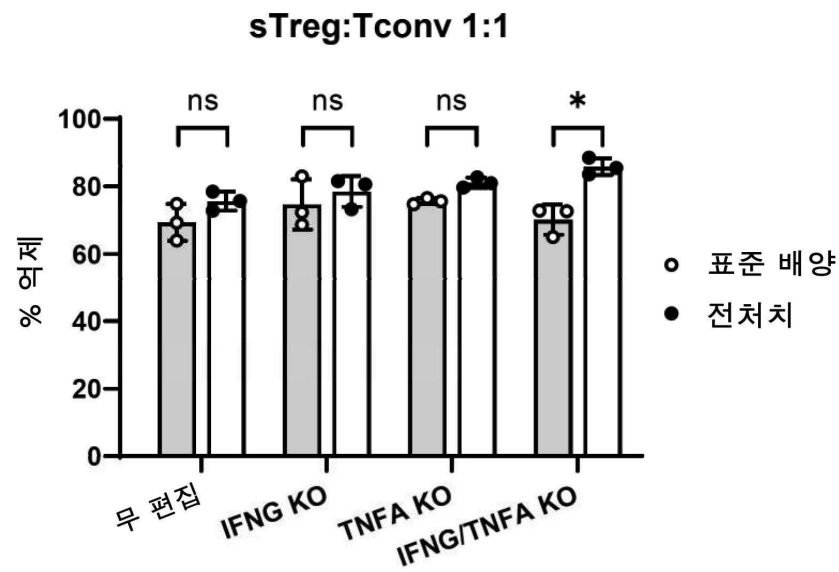
도면9a



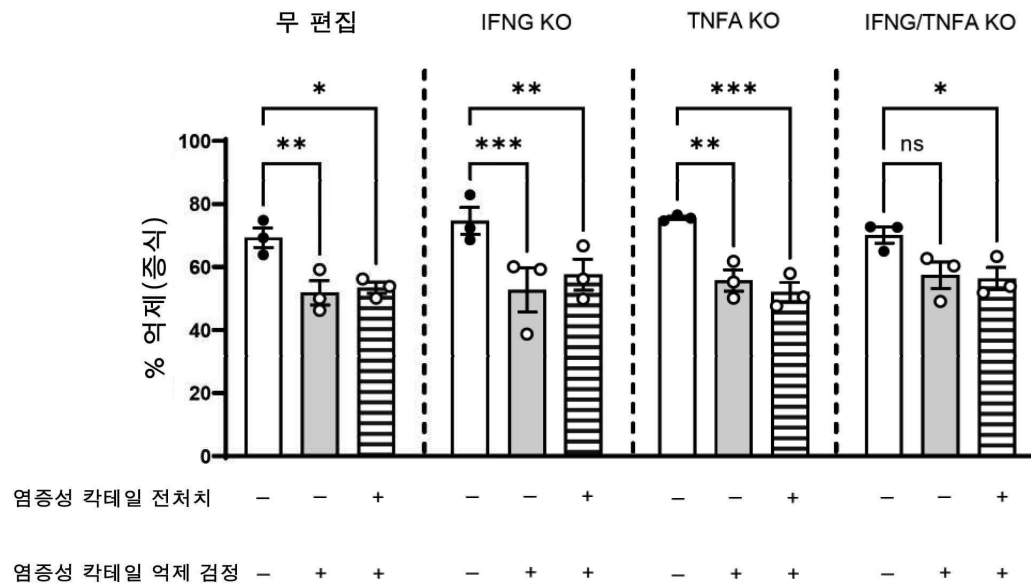
도면9b



도면10a



도면10b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> INTELLIA THERAPEUTICS, INC.

<120> ENGINEERED T CELLS

<130> 12793.0030-00304

<140><141><150> 63/131,987

<151> 2020-12-30

<160> 149

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 1

gcaggcagga caaccuuac

20

<210> 2

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 2

caggcaggac aaccuuacu

20

<210> 3

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 3

aggagucaga ugcuguuucg

20

<210> 4

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 4

cuaaaacagg gaagcgaaaa

20

<210> 5

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 5

cgcuuuccug uuuuagcugc

20

<210> 6
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221>
 source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 6
 ugucgccagc agcuaaaaca 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 7
 cugucgccag cagcuaaaac 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 8
 gcgacaguuc agccaucacu 20
 <210> 9
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 9

acaugaacuc auccaaguga 20

<210> 10

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 10

guucaugau ugcuuugcgu 20

<210> 11

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 11

gacaucaug ucuuccuuga 20

<210> 12

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223>

/note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 12

ugauggucuc cacacucuuu 20

<210> 13

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 13

aaagagugug gagaccauca 20

<210> 14

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 14

ccagagcauc caaaagagug 20

<210> 15

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 15

gauaauggaa cucuuuucuu 20

<210> 16

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 16

caucagaug uagcggauaa 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 17
 ugcaggucau ucagauguag 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <
 <400> 18
 cuucuuuuac auaugggucc 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 19
 ugcaucguuu ugguuucu 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400

> 20

uuucagcucu gcaucguuuu 20

<210> 21

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 21

uuuucagcuc ugcaucguuu 20

<210> 22

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400>

22

ugagcacuga aagcaugauc 20

<210> 23

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 23

ugaaagcaug auccgggacg 20

<210> 24

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 24

caugaucggg gacguggagc 20

<210> 25

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 25

cuucuugggg agcgccuccu 20

<210> 26

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 26

gaggcgucc ccaagaagac 20

<210> 27

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 27

aggcgucucc caagaagaca 20

<210> 28

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 28

ggcgcucccc aagaagacag 20

<

210> 29

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 29

gcgcucccca agaagacagg 20

<210> 30

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 30

caagaagaca ggggggcccc 20

<210

> 31

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 31
 gggggccccc ugucuuuug 20
 <210> 32
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 32
 cuggggccccc ccugucuucu 20
 <210>
 33
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 33
 aagcaccgcc uggagccug 20
 <210> 34
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 34
 caagcaccgc cuggagcccu 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 35

gcugaggaac aagcaccgcc 20

<210> 36

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 36

ccucuucucc uuccugaucg 20

<210> 37

<

211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 37

uucuccuucc ugaucguggc 20

<210> 38

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 38

ggcgccugcc acgaucagga 20

<210> 39

<211

> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 39

ugguggcgcc ugccacgauc 20

<210> 40

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 40

cugcugcacu uuggagugau 20

<210> 41

<211>

20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 41

cgaucacucc aaagucgagc 20

<210> 42

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 42

uuggagugau cggccccag 20

<210> 43

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 43

uggagugauc ggccccaga 20

<210> 44

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 44

aggcacucac cucuuccuc 20

<210> 45

<211> 20

<

212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 45

ugauuagaga gagguccug 20

<210> 46

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 46

cugauuagag agaggucceu 20

<210> 47

<211> 20

<212

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 47

gcugauuaga gagaggucce 20

<210> 48

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 48

ccucucucua aucagcccuc 20

<210> 49

<211> 20

<212>

RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 49

ccagagggu gauuagagag 20

<210> 50

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 50

ucuaaucagc ccucuggccc 20

<210> 51

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 51

uacugacugc cugggccaga 20

<210> 52

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 52

uuacugacug ccugggccag 20

<210> 53

<211> 20

<212> RNA

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 53

gagacacuua cugacugccu 20

<210> 54

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 54

ggagacacuu acugacugcc 20

<210> 55

<211> 20

<212> RNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 55

gggcuacagg cuugucacuc 20

<210> 56

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 56

ugggcuacag gcuugucacu 20

<210> 57

<211> 20

<212> RNA

<213>

Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 57

uuaccuacaa caugggcuac 20

<210> 58

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 58

agagcucuua ccuacaacau 20

<210> 59

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 59

cagagcucuu accuacaaca 20

<210> 60

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 60

uccagcaaac ccucaagcug 20

<210> 61

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<

220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 61

cagcaaacc ucaagcugag 20

<210> 62

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 62

ggagcugccc cucagcuuga 20

<210> 63

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 63

uggagcugcc ccucagcuug 20

<210> 64

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 64

agcuccagug gcugaaccgc 20

<210> 65
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 65
 gcuccagugg cugaaccgcc 20
 <210> 66
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 66
 uggcccgcg guucagccac 20
 <210> 67
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><
 221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 67
 ccgccgggcc aaugccucc 20
 <210> 68
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

```

        oligonucleotide"
<400> 68
ccaggagggc auuggcccg
20
<210> 69
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221>
> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 69
gccaaugccc uccuggccaa
20
<210> 70
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 70
gccauuggcc aggaggcga
20
<210> 71
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221>
source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
        oligonucleotide"
<400> 71
ugccuccug gccaauggcg
20
<210> 72
<211> 20
<212> RNA

```

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 72

gcuccacgcc auuggccagg 20

<210> 73

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 73

ucagcuccac gccauuggcc 20

<210> 74

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 74

aucucucagc uccagccau 20

<210> 75

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<

223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 75

ggagcugaga gauaaccagc 20

<210> 76
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 76
 gcugagagau aaccagcugg 20
 <210> 77
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223>
 > /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 77
 ccagcuggug gugccaucag 20
 <210> 78
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 78
 cagcuggugg ugccaucaga 20
 <210> 79
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223>
 /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 79

augagguaca gggccucuga 20

<210> 80

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 80

ccugggagua gaugagguac 20

<210> 81

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 81

uacucccagg uccucucaa 20

<210> 82

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 82

cuuggccuu gaagaggacc 20

<210> 83

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 83

ggcgaugcgg cugauggugu 20

<210> 84

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 84

cggcgaugcg gcugauggug 20

<210> 85

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<

400> 85

ggagacggcg augcggcuga 20

<210> 86

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 86

ucugguagga gacggcgaug 20

<210> 87

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400

> 87

cgccgucucc uaccagacca 20

<210> 88

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 88

gagguugacc uggucuggu 20

<210> 89

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400>

89

ggcagagagg agguugaccu 20

<210> 90

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 90
ccaaucaagag cccugccag 20
<210> 91
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 91

caucaagagc cccugccaga 20
<210> 92
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 92
cuggggguc ccucuggcag 20
<210> 93
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 93
ucuggggucu cccucuggca 20

<210> 94
<211> 20
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 94

gaugggcuca uaccagggcu 20

<210> 95

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 95

cugguaugag cccaucuauc 20

<

210> 96

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 96

agauagaugg gcucuaacca 20

<210> 97

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 97

ugguaugagc ccaucuaucu 20

<210

> 98

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 98

cagauagaug ggcucauacc 20

<210> 99

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 99

augagcccau cuaucuggga 20

<210>

100

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 100

ugagcccauc uaucugggag 20

<210> 101

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 101

aagaccccuc ccagauagau 20

<210

> 102

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 102

gucggucacc cuuccaccg 20

<210> 103

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 103

gacucagcgc ugagaucaau 20

<

210> 104

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 104

gauugaucuc agcgugagu 20

<210> 105

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 105

ucggcaaagu cgagauaguc 20

<210> 106

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 106

cucggcaaag ucgagauagu 20

<210> 107

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 107

uauucgacu uugccgaguc 20

<210> 108

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 108

aucucgacuu ugccgagucu 20

<210> 109

<211> 20

<212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 109
 cgacuuugcc gagucugggc 20

<210> 110
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 110
 gagucugggc aggucuacuu 20

<210> 111
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 111
 agucugggca ggucuacuuu 20

<210> 112
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 112

aaaguagacc ugcccagacu	20
<210> 113	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide"	
<400> 113	
ggauguucgu ccuccucaca	20
<210> 114	
<211> 4140	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	
<400> 114	
auggacaaga aguacuccau cgccucggac aucggcacca acuccguggg cugggccgug	60
aucaccgacg aguacaaggu gccuccaag aaguucaagg ugcugggcaa caccgaccgg	120
cacuccauca agaagaaccu gaucggcgcc cugcuguucg acuccggcga gaccgccgag	180
gccacccggc ugaagcggac cgcccgcgcg cgguacaccc ggcggaagaa ccggaucugc	240
uaccugcagg agaucuucuc caacgagaug gccaaggugg acgacuccuu cuuccaccgg	300
cuggaggagu ccuuccuggu ggaggaggac aagaagcacg agcggcaccc caucuucggc	360
aacaucgugg acgagguggc cuaccacgag aaguaccca ccaucuacca ccugcggaag	420
aagcuggugg acuccaccga caaggccgac cugcggcuga ucuaccuggc ccuggcccac	480
augaucaagu uccggggcca cuuccugauc gagggcgacc ugaaccccga caacuccgac	540
guggacaagc uguucaucca gcuggugcag accuacaacc agcuguucga ggagaacccc	600
aucaacgccu ccggcgugga cgccaaggcc auccuguccg cccggcuguc caaguccgg	660
cggcuggaga accugaucgc ccagcugccc ggcgagaaga agaacggccu guucggcaac	720
cugaucgccc ugucccuggg ccugaccccc aacuucaagu ccaacuucga ccuggccgag	780
gagccaagc ugcagcuguc caaggacacc uacgacgacg accuggacaa ccugcuggcc	840

cagaucggcg accaguacgc cgaccuguuc cuggccgcca agaaccuguc cgacgccauc	900
cugcuguccg acauccugcg ggugaacacc gagaucacca agggcccccucc guccgccucc	960
augaucaagc gguacgacga gcaccaccag gaccugaccc ugcugaaggc ccuggugcgg	1020
cagcagcugc ccgagaagua caaggagauu uucuuugacc aguccaagaa cggcuacgcc	1080
ggcuacaucg acggcgggcg cuccaggag gaguucuaca aguucacaa gcccauccug	1140
gagaagaugg acggcaccga ggagcugcug gugaagcuga accgggagga ccugcugcgg	1200
aagcagcgga ccuucgacaa cggcucauc cccaccaga uccaccuggg cgagcugcac	1260
gccauccugc ggccggcagga ggacuucua cccuuccuga aggacaaccg ggagaagau	1320
gagaagauc ugaacuuucg gaucuccuac uacgugggccc ccugggccc gggaacucc	1380
cgguucgccc ggauagcccg gaaguccgag gagaccauca ccccccuggaa cuucgaggag	1440
gugguggaca agggcgccuc gcgccagucc uucaucgagc ggauagacaa cuucgacaag	1500
aaccugccca acgagaaggu gcugcccaag cacuccugc uguacgagua cuucaccgug	1560
uacaacgagc ugaccaaggu gaaguacgug accgagggca ugcggaagcc cgccuuccug	1620
uccggcgagc agaagaaggc caucugggac cugcuguuca agaccaaccg gaaggugacc	1680
gugaagcagc ugaaggagga cuacuuaag aagaucgagu gcuucgacuc cguggagau	1740
uccggcgugg aggaccgguu caacgccucc cugggcaccu accacgaccu gcugaagau	1800
aucaaggaca aggacuucc ggacaacgag gagaacgagg acauccugga ggacaucgug	1860
cugaccuga cccuguucga ggaccgggag augaucgagg agcgcgugaa gaccuacgcc	1920
caccuguucg acgacaaggu gaugaagcag cugaagcggc ggcgguacac cggcuggggc	1980
cggcuguccc ggaagcugau caacggcauc cgggacaagc aguccggcaa gaccauccug	2040
gacuuccuga aguccgacgg cuucgccaac cggacuucua ugcagcugau ccacgacgac	2100
ucccugaccu ucaaggagga cauccagaag gccaggugu ccggccaggg cgacuccug	2160
cacgagcaca ucgccaaccu ggccggcucc cccgccauca agaagggcac ccugcagacc	2220
gugaaggugg uggacgagcu ggugaaggug augggccggc acaagcccga gaacaucgug	2280
aucgagaugg cccgggagaa ccagaccacc cagaagggcc agaagaacuc ccgggagcgg	2340
augaagcgga ucgaggagg caucaaggag cugggcuccc agauccugaa ggagcacc	2400
guggagaaca cccagcugca gaacgagaag cuguaccugu acuaccugca gaacggccgg	2460
gacauguacg uggaccagga gcuggacau aaccggcugu ccgacuacga cguggaccac	2520
aucgugcccc aguccuuccu gaagcagac uccaucgaca acaaggugcu gaccggucc	2580
gacaagaacc ggggcaaguc cgacaacgug ccuccgagg agguggugaa gaagaugaag	2640
aacuacuggc ggcagcugcu gaacgccaag cugaucacc agcggaaguu cgacaaccug	2700

accaaggccg agcggggcgg ccuguccgag cuggacaagg ccggcuucau caagcggcag 2760
 cugguggaga cccggcagau caccaagcac guggcccaga uccuggacuc ccggaugaac 2820

 accaaguacg acgagaacga caagcugauc cgggagguga aggugaucac ccugaaguucc 2880
 aagcuggugu ccgacuuccg gaaggacuuc caguucuaca aggugcggga gaucaacaac 2940
 uaccaccacg cccacgacgc cuaccugaac gccguggugg gcaccgcccu gaucaagaag 3000
 uacccaagc uggaguccga guucguguac ggcgacuaca agguguacga cgugcgggaag 3060
 augaucgcca aguccgagca ggagaucggc aaggccaccg ccaaguacuu cuucuacucc 3120
 aacaucauga acuuuucaaa gaccgagauc acccuggcca acggcgagau ccggaagcgg 3180
 cccugaucg agaccaacgg cgagaccggc gagaucgugu gggacaaggg ccgggacuuc 3240

 gccaccgugc ggaaggugcu guccaugccc caggugaaca ucgugaagaa gaccgaggug 3300
 cagaccggcg gcuuuccaa ggaguccauc cugcccaagc ggaacuccga caagcugauc 3360
 gcccgggaaga aggacuggga cccaagaag uacggcggcu ucgacucucc caccguggcc 3420
 uacuccgugc uggugguggc caagguggag aagggaagu ccaagaagcu gaaguccgug 3480
 aaggagcugc ugggcaucac caucauggag cgguccuccu ucgagaagaa cccaucgac 3540
 uuccuggagg ccaagggcua caaggaggug aagaaggacc ugaucauaa gcugcccaag 3600
 uacucccugu ucgagcugga gaacggccgg aagcggaugc uggccuccgc cggcgagcug 3660

 cagaagggca acgagcuggc ccugcccucc aaguacguga acuuuccgua ccuggccucc 3720
 cacuacgaga agcugaaggg cucccccag gacaacgagc agaagcagcu guucguggag 3780
 cagcacaagc acuaccugga cgagaucauc gagcagauc ccgaguucuc caagcgggug 3840
 auccggccg acgccaaccu ggacaaggug cuguccccu acaacaagca ccgggacaag 3900
 cccauccggg agcaggcca gaacaucauc caccuguuca ccugacca cccggcgcc 3960
 cccgcgccu ucaaguacuu cgacaccacc aucgaccgga agcgguacac cuccaccaag 4020
 gaggugcugg acgccaccu gauccaccag uccaucaccg gccuguacga gaccggaucc 4080

 gaccugucc agcugggcgg cgacggcggc ggcuccccca agaagaagcg gaagguguga 4140
 <210> 115
 <211> 1379
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 115

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
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
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
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> 116

<211> 4140

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"

<400> 116

auggacaaga aguacagcau cggacuggac aucggaacaa acagcgucgg augggcaguc

60

aucacagacg aaaucaaggu cccgagcaag aaguucaagg uccugggaaa cacagacaga	120
cacagcauca agaagaaccu gaucggagca cugcuguucg acagcggaga aacagcagaa	180
gcaacaagac ugaagagaac agcaagaaga agauacacaa gaagaaagaa cagaauucugc	240
uaccugcagg aaaucuucag caacgaaaug gcaaaggucg acgacagcuu cuuccacaga	300
cuggaagaaa gcuuccuggu cgaagaagac aagaagcacg aaagacaccc gaucuucgga	360
aacaucgucg acgaagucgc auaccacgaa aaguaccgga caaucuacca ccugagaaag	420
aagcuggucg acagcacaga caaggcagac cugagacuga ucuaccuggc acuggcacac	480
augaucaagu ucagaggaca cuuccugauc gaaggagacc ugaacccgga caacagcgac	540
gucgacaagc uguucaucca gcugguccag acauacaacc agcuguucga agaaaacccg	600
aucaacgcaa gcggagucga cgcaaaggca auccugagcg caagacugag caagagcaga	660
agacuggaaa accugaucgc acagcugccg ggagaaaaga agaacggacu guucggaaaac	720
cugaucgcac ugagccuggg acugacaccg aacuucaaga gcaacuucga ccuggcagaa	780
gacgcaaagc ugcagcugag caagacaca uacgacgacg accuggacaa ccugcuggca	840
cagaucggag accaguacgc agaccuguuc cuggcagcaa agaaccugag cgacgcaauc	900
cugcugagcg acauccugag aguacacaca gaaucacaa aggcaccgcu gagcgcaagc	960
augaucaaga gauacgacga acaccaccag gaccugacac ugcugaaggc acuggucaga	1020
cagcagcugc cgaaaaagua caaggaaauc uucuucgacc agagcaagaa cggauacgca	1080
ggauacaucg acggaggagc aagccaggaa gaauucuaca aguucauca gccgauccug	1140
gaaaagaugg acggaacaga agaacugcug gucaagcuga acagagaaga ccugcugaga	1200
aagcagagaa cauucgacaa cggaagcauc ccgcaccaga uccaccuggg agaacugcac	1260
gcaauccuga gaagacagga agacuucac ccguuccuga aggacaacag agaaaagauc	1320
gaaaagaucc ugacauucag aaucccgua uacgucggac cgcuggcaag aggaaacagc	1380
agauucgcau ggaugacaag aaagagcgaa gaaacaauc caccguggaa cuucgaagaa	1440
gucgucgaca agggagcaag cgcacagagc uucaucgaaa gaaugacaaa cuucgacaag	1500
aaccugccga acgaaaaggu ccugccgaag cacagccugc uguacgaaua cuucacaguc	1560
uacaacgaac ugacaaaggu caaguacguc acagaaggaa ugagaaagcc ggcauuccug	1620
agcggagaac agaagaaggc aaucgucgac cugcuguuca agacaaacag aaaggucaca	1680
gucaagcagc ugaaggaaga cuacuucag aagaucgaau gcuucgacag cgucgaaauc	1740
agcggagucg aagacagauu caacgcaagc cugggaacau accacgaccu gcugaagauc	1800

aucaaggaca aggacuuccu ggacaacgaa gaaaacgaag acauccugga agacaucguc	1860
cugacacuga cacuguucca agacagagaa augaucgaag aaagacugaa gacauacgca	1920
caccuguucg acgacaaggu caugaagcag cugaagagaa gaagauacac aggaugggga	1980
agacugagca gaaagcugau caacggaauc agagacaagc agagcggaaa gacaauccug	2040
gacuuccuga agagcgacgg auucgcaaac agaaacuua ugcagcugau ccacgacgac	2100
agccugacau ucaaggaaga cauccagaag gcacagguca gcggacaggg agacagccug	2160
cacgaacaca ucgcaaaccu ggcaggaagc ccggcaauca agaagggaau ccugcagaca	2220
gucaaggucg ucgacgaacu ggucaagguc augggaagac acaagccgga aaacaucguc	2280
aucgaaaugg caagagaaaa ccagacaaca cagaagggac agaagaacag cagagaaaga	2340
augaagagaa ucgaagaagg aaucaggaa cugggaagcc agauccugaa ggaacacccg	2400
gucgaaaaca cacagcugca gaacgaaaag cuguaccugu acuaccugca gaacggaaga	2460
gacauguacg ucgaccagga acuggacauc aacagacuga gcgacuacga cgucgaccac	2520
aucguccgc agagcuuccu gaaggacgac agcaucgaca acaagguccu gacaagaagc	2580
gacaagaaca gaggaaagag cgacaacguc ccgagcgaag aagucgucaa gaagaugaag	2640
aacuacugga gacagcugcu gaacgcaaag cugaucacac agagaaaguu cgacaaccug	2700
acaaaggcag agagaggagg acugagcgaa cuggacaagg caggauucau caagagacag	2760
cuggucgaaa caagacagau cacaagcac gucgcacaga uccuggacag cagaaugaac	2820
acaaaguacg acgaaaacga caagcugauc agagaaguca aggucaucac acugaagagc	2880
aagcugguca gcgacuucag aaaggacuuc caguucuaca agguacagaga aaucacaac	2940
uaccaccacg cacacgacgc auaccugaac gcagucgucg gaacagcacu gaucaagaag	3000
uacccgaagc uggaaagcga auucgucuac ggagacuaca agguacuaga cgucagaaag	3060
augaucgcaa agagcgaaca ggaaucgga aaggcaacag caaaguacuu cuucuacagc	3120
aacauauga acuucuuaa gacagaauc acacuggcaa acggagaaa cagaaagaga	3180
ccgcugaucg aaacaaacgg agaaacagga gaaucgucu gggacaaggg aagagacuuc	3240
gcaacaguca gaaagguccu gagcaugccg cagguaaca ucgucaagaa gacagaaguc	3300
cagacaggag gauucagcaa ggaaagcauc cugccgaaga gaaacagcga caagcugauc	3360
gcaagaaaga aggacuggga cccgaagaag uacggaggau ucgacagccc gacagucgca	3420
uacagcgucc uggucgucg aaaggucgaa aagggaaga gcaagaagcu gaagagcguc	3480
aaggaacugc uggaauacac aaucauggaa agaagcagcu ucgaaaagaa cccgaucgac	3540
uuccuggaag caaagggaau caaggaaguc aagaaggacc ugaucauaa gcugccgaag	3600
uacagccugu ucgaacugga aaacggaaga aagagaauagc uggcaagcgc aggagaacug	3660

cagaagggaa acgaacuggc acugccgagc aaguacguca acuuccugua ccuggcaagc 3720
cacuacgaaa agcugaaggg aagcccggaa gacaacgaac agaagcagcu guucgucgaa 3780
cagcacaagc acuaccugga cgaaaaucauc gaacagauca gcgaauucag caagagaguc 3840
auccuggcag acgcaaaccu ggacaagguc cugagcgcau acaacaagca cagagacaag 3900

ccgaucagag aacaggcaga aaacaucauc caccuguuca cacugacaaa ccugggagca 3960
ccggcagcau ucaaguacuu cgacacaaca aucgacagaa agagauacac aagcacaag 4020
gaaguccugg acgcaacacu gauccaccag agcaucacag gacuguacga aacaagaauc 4080
gaccugagcc agcugggagg agacggagga ggaagcccga agaagaagag aaaggucuag 4140

<210> 117
<211> 4197
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"
<400> 117

auggacaaga aguacuccau cggccuggac aucggcacca acuccguggg cugggcccug 60

aucaccgacg aguacaaggu gcccuccaag aaguucaagg ugcugggcaa caccgaccgg 120
cacuccauca agaagaaccu gaucggcgcc cugcuguuuc acuccggcga gaccgccgag 180
gccacccggc ugaagcggac cgcccggcgg cgguacaccc ggcggaagaa ccggaucugc 240
uaccugcagg agaucuucuc caacgagaug gccaaggugg acgacuccuu cuuccaccgg 300
cuggaggagu ccuuccuggu ggaggaggac aagaagcacg agcggcaccc caucuucggc 360
aacaucgugg acgagguggc cuaccacgag aaguaccca ccaucuacca ccugcggaag 420
aagcuggugg acuccaccga caaggccgac cugcggcuga ucuaccuggc ccuggcccac 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 agggccccc uuccgcccucc	960
augaucaagc gguacgacga gcaccaccag gaccugaccc ugcugaaggc ccuggugcgg	1020
cagcagcugc ccgagaagua caaggagau uucucgacc aguccaagaa cggcuacgcc	1080
ggcuacaucg acggcggcgc cucccaggag gaguucuaca aguucauca gcccuaucug	1140
gagaagaugg acggcaccga ggagcugcug gugaagcuga accgggagga ccugcugcgg	1200
aagcagcggg ccuucgacaa cggcucauc cccaccaga uccaccuggg cgagcugcac	1260
gccauccugc ggcggcagga ggacuucuac cccuuccuga aggacaaccg ggagaagauc	1320
gagaagauc uaccuuccg gaucuccuac uacgugggcc ccugggcccg gggcaacucc	1380
cgguucgccu ggaugacccg gaaguccgag gagaccauca ccccuggaa cuucgaggag	1440
gugguggaca agggcgccuc cgcccagucc uucaucgagc ggaugacaa cuucgacaag	1500
aaccugccca acgagaaggu gcugcccaag cacuccugc 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 ccuguuuga ggaccgggag augaucgagg agcggcugaa gaccuacgcc	1920
caccuguucg acgacaaggu gaugaagcag cugaagcggc ggcgguacac cggcuggggc	1980
cggcuguccc ggaagcugau caacggcauc cgggacaagc aguccggcaa gaccauccug	2040
gacuuccuga aguccgacgg cuucgccaac cggacuua ugcagcugau ccacgacgac	2100
ucccugaccu ucaaggagga cauccagaag gccagguu cgggccaggg cgacuccug	2160
cacgagcaca ucgccaaccu ggccggcucc cccgccauca agaagggc au ccugcagacc	2220
gugaaggugg uggacgagcu ggugaaggug augggccggc acaagcccga gaacaucgug	2280
aucgagaugg cccgggagaa ccagaccacc cagaagggcc agaagaacuc cgggagcgg	2340
augaagcggg ucgaggaggg caucaaggag cugggcuccc agauccugaa ggagcacc	2400
guggagaaca ccagcugca 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 cggcuucau caagcgcgag	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 gcaccgcccu gaucaagaag 3000

uacccaagc uggaguccga guucguguac ggcgacuaca agguguacga cgugcggaag 3060
 augaucgcca aguccgagca ggagaucggc aaggccaccg ccaaguacuu cuucuacucc 3120
 aacaucauga acuuuucaa gaccgagauc acccuggcca acggcgagau ccggaagcgg 3180
 cccugaucg agaccaacgg cgagaccggc gagaucgugu gggacaaggg ccgggacuuc 3240
 gccaccgugc ggaaggugcu guccaugccc caggugaaca ucgugaagaa gaccgaggug 3300
 cagaccggcg gcuucuccaa ggaguccauc cugcccaagc ggaacuccga caagcugauc 3360
 gcccgggaaga aggacuggga cccaagaag uacggcggcu ucgacucccc caccguggcc 3420

uacuccgugc uggugguggc caagguggag aagggaagu ccaagaagcu gaaguccgug 3480
 aaggagcugc ugggcaucac caucauggag cgguccuccu ucgagaagaa ccccaucgac 3540
 uuccuggagg ccaagggcua caaggaggug aagaaggacc ugaucaucaa gcugcccaag 3600
 uacucccugu ucgagcugga gaacggccgg aagcggaugc ugccuccgc cggcgagcug 3660
 cagaagggca acgagcuggc ccugcccucc aaguacguga acuuuccugua ccuggccucc 3720
 cacuacgaga agcugaaggg cucccccag gacaacgagc agaagcagcu guucguggag 3780
 cagcacaagc acuaccugga cgagaucauc gagcagauc ccgaguucuc caagcgggug 3840

auccuggccg acgccaaccu ggacaaggug cuguccccu acaacaagca ccgggacaag 3900
 cccauccggg agcaggccga gaacaucauc caccuguuca ccugaccaa ccugggcgcc 3960
 cccgccgccu ucaaguacuu cgacaccacc aucgaccgga agcgguacac cuccaccaag 4020
 gaggugcugg acgccaccu gauccaccag uccaucaccg gccuguacga gacccggauc 4080
 gaccuguccc agcugggcgg cgacggcggc ggucucccca agaagaagcg gaaggugucc 4140
 gaguccgcca ccccgaguc cguguccggc uggcggcugu ucaagaagau cuccuga 4197

<210> 118

<211> 1398

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 118

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> 119

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 119

ccagagcauc caaaagagug guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 120

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 120

agagcucuua ccuacaacau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 121

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 121

gaucacgucg gccguuggcg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 122

<211> 534

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 122

atgcacagct cagcactgct ctgttgctg gtcctcctga ctggggtgag ggccagccca 60

ggccagggca ccagctctga gaacagctgc acccacttcc caggcaacct gcctaacatg 120

cttcgagatc tccgagatgc cttcagcaga gtgaagactt tctttcaaat gaaggatcag 180

ctggacaact tgttggttaa ggagtccttg ctggaggact ttaagggtta cctgggttgc 240

caagccttgt ctgagatgat ccagttttac ctggaggagg tgatgccccca agctgagaac 300

caagaccag acatcaaggc gcatgtgaac tcctggggg agaacctgaa gaccctcagg 360
ctgaggctac ggcgctgtca tcgatttctt ccctgtgaaa acaagagcaa ggccgtggag 420
caggtgaaga atgcctttaa taagctccaa gagaaaggca tctacaaagc catgagttag 480
tttgacatct tcatcaacta catagaagcc tacatgacaa tgaagatacg aaac 534

<210> 123

<211> 534

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide"

<400> 123

atgcacagct cagcactgct ctgttgcttg gtcctcctga ctgggggtgag ggccagccca 60
ggccagggca cccagtctga gaacagctgc acccaattcc caggcatcct gcctaacatg 120
cttcgagatc tccgagatgc cttcagcaga gtgaagactt tctttcaaat gaaggatcag 180
ctggacaact tgttggttaa ggagtccttg ctggaggact ttaagggtta cctgggttgc 240
caagccttgt ctgagatgat ccagttttac ctggaggagg tgatgcccc aagctgagaac 300
caagaccag acatcaaggc gcatgtgatc tcctggggg agaacctgaa taccctcagg 360
ctgaggctac ggcgctgtca tcgactcctt ccctgtgaaa acaagagcaa ggccgtggag 420

caggtgaaga atgcctttaa taagctccaa gagaaaggca tctacaaagc catgagttag 480
tttgacatct tcatcaacta catagaagcc tacatgacaa tgaagatacg aaac 534

<210> 124

<211> 178

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 124

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val

1 5 10 15

Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His

20 25 30

Phe Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe

35

40

45

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu
50 55 60
Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
65 70 75 80
Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro
85 90 95
Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Asn Ser Leu
100 105 110
Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg
115 120 125
Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
130 135 140
Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
145 150 155 160
Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile

165 170 175
Arg Asn

<210> 125

<211> 178

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 125

Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val
1 5 10 15
Arg Ala Ser Pro Gly Gln Gly Thr Gln Ser Glu Asn Ser Cys Thr His
20 25 30

Phe Pro Gly Ile Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe
35 40 45

Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Met Lys Asp Gln Leu Asp Asn Leu
50 55 60
Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu Gly Cys
65 70 75 80
Gln Ala Leu Ser Glu Met Ile Gln Phe Tyr Leu Glu Glu Val Met Pro
85 90 95
Gln Ala Glu Asn Gln Asp Pro Asp Ile Lys Ala His Val Ile Ser Leu
100 105 110
Gly Glu Asn Leu Asn Thr Leu Arg Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg
115 120 125
Leu Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala Val Glu Gln Val Lys Asn
130 135 140
Ala Phe Asn Lys Leu Gln Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu
145 150 155 160
Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile
165 170 175
Arg Asn

<210> 126

<211> 669

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 126

atggcctgct tgggcttcca aaggcataaa gccagctta atcttgctac tcgcacgtgg	60
ccctgcacat tgctcttttt cctcctgttc attcccgtgt tttgcaagc gatgcatgtg	120
gcacaacctg ccgtcgttct ggcatcatca agaggtattg ctagcttcgt ttgtgagtac	180
gcctccctg gaaaagcgac ggaggtgcgc gtcactgtat tgcggcaagc cgacagccaa	240
gttactgaag tctgcgcggc aacgtatatg atgggcaatg agctgacatt ccttgacgat	300
tcaatctgca cggaacaag tagtggtaac caggtgaatc tcactattca aggtctgaga	360
gccatggaca cggcctcta catttgtaag gtggagctga tgtatcctcc cccatattat	420
ctggggatcg gaaatgggac acagatatat gttattgatc ccgagccatg tcccgatagt	480
gacttcctct tgttgatact tgccgctgtg agcagtggtt tgttttttta ttcattcctc	540

cttacggcag tatcactttc aaaaatgctc aagaagcgaa gtcctttgac aactggcgta 600
tatgtcaaaa tgccaccaac agagcccgaa tgtgagaaac agttccagcc gtactttatt 660

cctataaac 669

<210> 127

<211> 669

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 127

atggcctgct tgggcttcca aaggcataaa gccagctta atcttgctac tcgcacgtgg 60
ccctgcacat tgctcttttt cctcctgttc attcccggtg tttgcaaggc gatgcatgtg 120
gcacaacctg ccgtcgttct ggcatcatca agaggatttg ctagcttcgt ttgtgagtac 180
gcctcccctg gaaaatacac ggaggtgcgc gtcactgtat tgcggcaagc cgacagccaa 240

gttactgaag tctgcgcggc aacgtatatg atgggcaatg agctgacatt ccttgacgat 300
tcaatctgca cggaacaag tagtggtaac cagggtgaate tcaactattca aggtctgaga 360
gccatggaca ccggcctcta catttgtaag gtggagctga tgtatcctcc cccatattat 420
gaggggatcg gaaatgggac acagatatat gttattgatc ccgagccatg tcccgatagt 480
gacttctctt tgtggatact tgccgctgtg agcagtggtt tgttttttta ttcattcctc 540
cttacggcag tatcactttc aaaaatgctc aagaagcgaa gtcctttgac aactggcgta 600
tatgtcaaaa tgccaccaac agagcccgaa tgtgagaaac agttccagcc gtactttatt 660

cctataaac 669

<210> 128

<211> 669

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<400> 128

atggcctgct tgggcttcca aaggcataaa gccagctta atcttgctac tcgcacgtgg 60

ccctgcacat tgcctctttt cctcctgttc attcccgtgt ttgcaaggc gatgcatgtg 120
gcacaacctg ccgtcgttct ggcatcatca agaggtattg ctagcttcgt ttgtgagtac 180
gcctcccctg gaaaacatac ggaggtgctg gtcactgtat tgcggcaagc cgacagccaa 240

gttactgaag tctgcgcggc aacgtatatg atgggcaatg agctgacatt ccttgacgat 300
tcaatctgca cggaacaag tagtggtaac caggtgaatc tcactattca aggtctgaga 360
gccatggaca cggcctcta catttgtaag gtggagctga tgtatcctcc cccatattat 420
ctggggatcg gaaatgggac acagatata gttattgatc ccgagccatg tcccgatagt 480
gacttcctct tgtggatact tgccgctgtg agcagtgggt tgttttttta ttcattcctc 540
cttacggcag tatcactttc aaaaatgctc aagaagcgaa gtcctttgac aactggcgta 600
tatgtcaaaa tgccaccaac agagcccga tgtgagaaac agttccagcc gtactttatt 660

cctataaac 669

<210> 129

<211> 669

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 129

atggcctgct tgggcttcca aaggcataaa gccagctta atcttgctac tcgcacgtgg 60
ccctgcacat tgcctctttt cctcctgttc attcccgtgt ttgcaaggc gatgcatgtg 120
gcacaacctg ccgtcgttct ggcatcatca agaggtattg ctagcttcgt ttgtgagtac 180
gcctcccctg gacatcacac ggaggtgctg gtcactgtat tgcggcaagc cgacagccaa 240

gttactgaag tctgcgcggc aacgtatatg atgggcaatg agctgacatt ccttgacgat 300
tcaatctgca cggaacaag tagtggtaac caggtgaatc tcactattca aggtctgaga 360
gccatggaca cggcctcta catttgtaag gtggagctga tgtatcctcc cccatattat 420
ctggggatcg gaaatgggac acagatata gttattgatc ccgagccatg tcccgatagt 480
gacttcctct tgtggatact tgccgctgtg agcagtgggt tgttttttta ttcattcctc 540
cttacggcag tatcactttc aaaaatgctc aagaagcgaa gtcctttgac aactggcgta 600
tatgtcaaaa tgccaccaac agagcccga tgtgagaaac agttccagcc gtactttatt 660

cctataaac 669

<210> 130

<211> 223

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 130

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala

1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro

20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala

35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly

50 55 60

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln

65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr

85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val

100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile

115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly

130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser

145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe

165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys

180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu

195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn

210 215 220

<210> 131

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 131

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala

1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro

20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala

35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly

50 55 60

Lys Tyr Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln

65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr

85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val

100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile

115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly

130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser

145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe

165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys

180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu

195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn

210 215 220

<210> 132

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 132

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala

1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro

20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala

35 40 45

Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly

50 55 60

Lys His Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln

65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr

85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val

100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile

115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly

130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
 145 150 155 160
 Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
 165 170 175
 Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
 180 185 190
 Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
 195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
 210 215 220

<210> 133

<211> 223

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"

<400> 133

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1 5 10 15
 Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 35 40 45
 Ser Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
 50 55 60
 His His Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
 65 70 75 80
 Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
 85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
 100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
 115 120 125
 Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly
 130 135 140
 Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
 145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
 165 170 175
 Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
 180 185 190
 Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
 195 200 205
 Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
 210 215 220

<210> 134
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 134

guuuuagagc uaugcuguuu ug

22

<210> 135

<211> 80

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 135

guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu

60

ggcaccgagu cggugcuuuu 80

<210> 136

<211> 76

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 136

guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu 60

ggcaccgagu cggugc 76

<210> 137

<211> 672

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 137

atggcctgct tgggcttcca aaggcataaa gcccagctta atcttgctac tgcacgtgg 60

ccttgacat tgcctttttt cctcctgttc attcccgtgt ttgcaaggc gatgcatgtg 120

gcacaacctg ccgtcgttct ggcatcatca agaggtattg ctagcttcgt ttgtgagtac 180

gcctcccctg gaaaagcgac ggaggtgcgc gtcactgtat tgcggcaagc cgacagccaa 240

gttactgaag tctgcgcggc aacgtatatg atgggcaatg agctgacatt ccttgacgat 300

tcaatctgca cggaacaag tagtggtaac caggtgaatc tcactattca aggtctgaga 360

gccatggaca cggcctcta catttgtaag gtggagctga tgtatcctcc cccatattat 420

ctggggatcg gaaatgggac acagatatat gttattgatc ccgagccatg tcccgatagt 480

gacttcctct tgtggatact tgccgctgtg agcagtgggt tgttttttta ttcattcctc 540

cttacggcag tatcactttc aaaaatgctc aagaagcgaa gtcctttgac aactggcgta 600

tatgtcaaaa tgccaccaac agagcccgaa tgtgagaaac agttccagcc gtactttatt 660

cctataaact ga 672

<210> 138

<211> 537

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 138

atgcacagct cagcactgct ctgttgccctg gtcctcctga ctgggggtgag ggccagccca 60
ggccagggca ccagctctga gaacagctgc acccacttcc caggcaacct gcctaacatg 120

cttcgagatc tccgagatgc cttcagcaga gtgaagactt tctttcaaat gaaggatcag 180
ctggacaact tgttggttaa ggagtccttg ctggaggact ttaagggtta cctgggttgc 240
caagccttgt ctgagatgat ccagttttac ctggaggagg tgatgcccc aactgagaac 300
caagaccag acatcaaggc gcatgtgaac tccctggggg agaacctgaa gaccctcagg 360
ctgaggctac ggcgctgtca tcgatttctt cctgtgaaa acaagagcaa ggccgtggag 420
caggtgaaga atgcctttaa taagctccaa gaaaaaggca tctacaaagc catgagttag 480
tttgacatct tcatcaacta catagaagcc tacatgacaa tgaagatacg aaactga 537

<210> 139

<211> 1299

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 139

atgccaacc ccaggcctgg caagccctcg gccccttctt tggcccttgg cccatccca 60
ggagcctcgc ccagctggag ggctgcacc aaagcctcag acctgctggg ggcccggggc 120
ccagggggaa cttccaggg ccgagatctt cgaggcgggg cccatgcctc ctcttcttc 180
ttgaaccca tgccaccatc gcagctgcag ctgccacac tgcccctagt catggtggca 240
ccctccgggg caggtctggg ccccttgccc cacttacagg cactcctcca ggacaggcca 300
catttcatgc accagctctc aacggtggat gcccacgccc ggaccctgt gctgcaggtg 360

caccccttg agagcccagc catgatcagc ctacacacc ccaccaccgc cactggggtc 420
ttctccctca aggcccggcc tggcctccca cctgggatca acgtggccag cctggaatgg 480
gtgtccagg agccggcact gctctgcacc ttcccaaat ccagtgacc caggaaggac 540
agcacccttt cggtgtgcc ccagagctcc taccactgc tggcaaatgg tgtctgcaag 600
tggcccgat gtgagaaggt cttcgaagag ccagaggact tctcaagca ctgccaggcg 660
gaccatctt tggatgagaa gggcagggca caatgtctcc tccagagaga gatggtacag 720
tctctggagc agcagctggt gctggagaag gagaagctga gtgccatgca ggccacctg 780

gctgggaaaa tggcactgac caaggcttca tctgtggcat catccgacaa gggtcctgc 840
tgcatcgtag ctgctggcag ccaaggccct gtcgtcccag cctggtctgg cccccgggag 900
gcccctgaca gcctgtttgc tgtccggagg cacctgtggg gtagccatgg aaacagcaca 960
ttcccagagt tctccacaa catggactac ttcaagtcc acaacatgcg acccccttc 1020

acctacgcc a cgtcatccg ctgggccatc ctggaggctc cagagaagca gcggacactc 1080
aatgagatct accactgggtt cacacgcatg ttgcttctt tcagaaacca tctgccacc 1140
tggaagaacg ccatccgcc caacctgagt ctgcacaagt gctttgtgcg ggtggagagc 1200

gagaaggggg ctgtgtggac cgtggatgag ctggagttcc gcaagaaacg gagccagagg 1260
cccagcaggt gttccaacct tacacctggc cctgataa 1299

<210> 140

<211> 431

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 140

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu

1 5 10 15

Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala

20 25 30

Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln Gly Arg

35 40 45

Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met

50 55 60

Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala

65 70 75 80

Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu

85 90 95

Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala His

100 105 110

Ala Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro Ala Met

115 120 125

Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys

130 135 140

Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp

145 150 155 160

Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro Ser Ala

165	170	175	
Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro			
180	185	190	
Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe			
195	200	205	
Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu			
210	215	220	
Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln			
225	230	235	240
Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser Ala Met			
245	250	255	
Gln Ala His Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val			
260	265	270	
Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly Ser Gln			
275	280	285	
Gly Pro Val Val Pro Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser			
290	295	300	
Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn Ser Thr			
305	310	315	320
Phe Pro Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His Asn Met			
325	330	335	
Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu			
340	345	350	
Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr			
355	360	365	
Arg Met Phe Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala			
370	375	380	
Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser			
385	390	395	400
Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys			
405	410	415	

Arg Ser Gln Arg Pro Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro

420 425 430

<210> 141

<211> 8028

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<400> 141

acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca	60
acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcattgccga ttggtggaag taaggtagta	120
cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggtctgaca tggattggac gaaccactga	180
attgccgcgt tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacataa acgggtctct	240
ctggtagac cagatctgag cctgggagct ctctggctaa ctagggaacc cactgcttaa	300
gcctcaataa agcttgccctt gactgcttca agtagtgtgt gccgctctgt tgtgtgactc	360
tggtaaactag agatccctca gacctttta gtcagtgtgg aaaatctcta gcagtggcgc	420
ccgaacaggg acttgaaagc gaaagggaaa ccagaggagc tctctcgacg caggactcgg	480
cttgctgaag cgcgcacggc aagaggcgag gggcggcgac tggtagtac gccaaaaatt	540
ttgactagcg gaggctagaa ggagagagat gggtgcgaga gcgtcagtat taagcggggg	600
agaattagat cgcgatggga aaaaattcgg ttaaggccag ggggaaagaa aaaatataaa	660
ttaaaacata tagtatgggc aagcaggag ctagaacgat tgcagttaa tcttgccctg	720
ttagaacat cagaaggctg tagacaaata ctgggacagc tacaaccatc cttcagaca	780
ggatcagaag aacttagatc attatataat acagtagcaa ccctctattg tgtgcatcaa	840
aggatagaga taaaagacac caaggaagct ttagacaaga tagaggaaga gcaaaacaaa	900
agtaagacca ccgcacagca agcgccact gatcttcaga cctggaggag gagatatgag	960
ggacaattgg agaagtgaat tatataaata taaagtagta aaaattgaac cattaggagt	1020
agcaccacc aaggcaaga gaagagtggg gcagagagaa aaaagagcag tgggaatagg	1080
agctttgttc ctgggttct tgggagcagc aggaagcact atgggcgcag cgtcaatgac	1140
gtgacggta caggccagac aattattgtc tggtagtagt cagcagcaga acaatttgct	1200
gagggtatt gaggcgcaac agcatctgtt gcaactcaca gtctggggca tcaagcagct	1260

ccaggcaaga atcctggctg tggaaagata cctaaaggat caacagctcc tggggatttg 1320
gggttgctct ggaaactca ttgcaccac tgctgtgcct tggaatgcta gttggagtaa 1380
taaatctctg gaacagattt ggaatcacac gacctggatg gagtgggaca gagaaattaa 1440
caattacaca agcttaatac actccttaat tgaagaatcg caaaaccagc aagaaaagaa 1500

tgaacaagaa ttattggaat tagataaatg ggcaagtttg tggaattggt ttaacataac 1560
aaattggctg tggatataaa aattattcat aatgatagta ggaggcttgg taggtttaag 1620
aatagttttt gctgtacttt ctatagttaa tagagttagg cagggatatt caccattatc 1680
gtttcagacc cacctcccaa ccccgagggg acccgacagg cccgaaggaa tagaagaaga 1740
aggtggagag agagacagag acagatccat tcgattagtg aacggatctc gacggtatcg 1800
atggccgcc ccitcaccga gggcctatit cccatgattc cttcatatit gcataacga 1860
tacaaggctg ttagagagat aattggaatt aatttgactg taaacacaaa gatattagta 1920

caaaatcgt gacgtagaaa gtaataatit ctgggtagt ttgcagttit aaaattatgt 1980
tttaaatgg actatcatat gcttaccgta acttgaaagt atttcgattt ctgggcttta 2040
tatatcttgt ggaaaggacg aaacaccgga gtcttctttt ttgaagacac ttcggactgt 2100
agaactctga acctcgagca atttaaaaga aaagggggga ttggggggta cagtgcaggg 2160
gaaagaatag tagacataat agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaaacaaatt 2220
acaaaaatc aaaaattctg cgttgtgtc ggtgctcgtt ctctgctctt cacgctactg 2280
aattcatcac cggttcttcg aaggcctccg cgccgggttt tggcgctcc cgcgggcgcc 2340

ccccctctca cggcgagcgc tgccacgtca gacgaagggc gcagcgagcg tctgacct 2400
tccgcccga cgctcaggac agcgccccgc tgctcataag actcggcctt agaaccacag 2460
tatcagcaga aggacatttt aggacgggac ttgggtgact ctagggcact ggttttcttt 2520
ccagagagcg gaacaggcga ggaaaagtag tcccttctcg gcgattctgc ggagggatct 2580
ccgtggggcg gtgaacccg atgattatat aaggacgcgc cgggtgtggc acagctagtt 2640
ccgtcgcagc cgggatttgg gtgcgggtt ttgtttgtgg atcgtgtga tcgtcacttg 2700
gtctagacgc caccatgagc gggggcgagg agctgttcgc cggcatcgtg cccgtgctga 2760

tcgagctgga cggcgacgtg cacggccaca agttcagcgt gcgcggcgag ggcgaggcg 2820
acgccgacta cggcaagctg gagatcaagt tcactgcac caccggcaag ctgccctgc 2880
cctggccac ccigtgacc accctctgct acggcatcca gtgcttcgcc cgctaccccg 2940
agcacatgaa gatgaacgac ttcttcaaga gcgccatgcc cgagggtac atccaggagc 3000
gcacatcca gttccaggac gacggcaagt acaagaccg cggcgaggtg aagttcgagg 3060
gcgacacct ggtgaaccg atcgagctga agggcaagga cttcaaggag gacggcaaca 3120

tcctgggcca caagctggag tacagcttca acagccacaa cgtgtacatc cgccccgaca	3180
aggccaacaa cggcctggag gctaacttca agacccgcca caacatcgag ggcggcggcg	3240
tgcagctggc cgaccactac cagaccaacg tgccccctggg cgacggcccc gtgctgatec	3300
ccatcaacca ctacctgagc actcagacca agatcagcaa ggaccgcaac gaggcccgcg	3360
accacatggt gtccttggag tccctcagcg cctgctgcca caccacggc atggacgagc	3420
tgtacagggg atccgagggc agaggaagcc ttctaactg cggtgacgtg gaggagaatc	3480
ccggcccttc cgggatgacc gagtacaagc ccacggtgcg cctcgccacc cgcgacgacg	3540
tccccagggc cgtacgcacc ctgcgcgcg cgttcgccga ctaccccgcc acgcgccaca	3600
ccgtcgatcc ggaccgccac atcgagcggg tcaccgagct gcaagaactc ttcctcacgc	3660
gcgtcgggct cgacatcggc aagggtgtggg tcgcggacga cggcgcccg gtggcggctt	3720
ggaccacgcc ggagagcgtc gaagcggggg cgggtgttcgc cgagatcggc ccgcgcatgg	3780
ccgagttgag cggttcccg ctggccgcgc agcaacagat ggaaggcctc ctggcgccgc	3840
accggcccaa ggagcccgcg tggttcctgg ccaccgtcgg cgtctcgccc gaccaccagg	3900
gcaagggtct ggcagcgcc gtcgtgctcc ccggagtga ggccggccgag cgcgcggggg	3960
tggccgctt ccaggagacc tccgcgcccc gcaacctccc cttctacgag cggctcggct	4020
tcaccgtcac cgccgacgtc gaggtgcccg aaggaccgag caccgtgtgc atgaccgca	4080
agcccgggtc ctgaatctag gtcgacaatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat	4140
tgactggtat tcttaactat gttgtctctt ttacgtatg tggatacgt gctttaatgc	4200
ctttgtatca tgcatttgc tcccgatgg ctttcatctt ctcctcttg tataaatcct	4260
ggttgctgtc tctttatgag gattgtggc ccgttgtcag gcaacgtggc gtggtgtgca	4320
ctgtgtttgc tgacgcaacc cccactggtt ggggcattgc caccactgt cagctccttt	4380
ccgggacttt cgttttccc ctcctattg ccacggcgga actcatcgcc gcctgccttg	4440
cccgtgctg gacaggggct cggctgttgg gactgacaa ttccgtggtg ttgtcgggga	4500
aatcatgctc ctttcttgg ctgctgcct gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgt	4560
ctttctgcta cgtcccttcg gccctcaatc cagcggacct tccttcccgc ggcctgctgc	4620
cggctctgcg gcctcttccg cgtctccgc ttgcctca gacgagtcgg atctctcttt	4680
gggccgcctc ccgcctggt accttaaga ccaatgactt acaaggcagc ttagatctt	4740
agccactttt taaaagaaaa ggggggactg gaagggctaa ttactccca acgaagataa	4800
gatctgcttt ttgcttgtag tgggtctctc tggtagacc agatctgagc ctgggagctc	4860

tctggctaac tagggaaccc actgcttaag cctcaataaa gcttgccttg agtgcttcaa	4920
gtagtgtgtg cccgtctgtt gtgtgactct ggtaactaga gatccctcag acccttttag	4980
tcagtgtgga aaatctctag cagtagtagt tcatgtcatc ttattattca gtatttataa	5040
cttgcaaaga aatgaatatc agagagttag aggaacttgt ttattgcagc ttataatggt	5100
tacaaataaa gcaatagcat cacaaatttc acaataaag cattttttc actgcattct	5160
agtttgtggt tgtccaaact catcaatgta tcttatcatg tctggctcta gctatcccgc	5220
ccctaactcc gcccatcccg cccctaactc cgcccagttc cgccattct cgccecatg	5280
gctgactaat tttttttatt tatgcagagg ccgaggccgc ctggcctct gagctattcc	5340
agaagtagtg aggaggcttt ttggaggcc tagacttttg cagagaccaa attcgtaatc	5400
atgtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgtca caattccaca caacatacga	5460
gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaagtag tgagctaact cacattaatt	5520
gcgttgcgt cactgccgc tttccagtgc ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga	5580
atcgccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc gctcttcgc ttctcgtc	5640
actgactcgc tgcgtcgggt cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg	5700
glaatacgggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc	5760
cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggtccgc	5820
ccccctgacg agcatcaca aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga	5880
ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg tgcgtctcc gtttccgacc	5940
ctgccgtta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat	6000
agctcacgt gtaggtatct cagttcgggt taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg	6060
cacgaacccc ccgttcagc cgaccgtgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtc	6120
aaccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga	6180
gcgaggtatg taggcggtgc tacaggttc ttgaagtgtt ggcctaacta cggctacact	6240
agaagaacag tatttggtat ctgcgtctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt	6300
ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag	6360
cagcagatta cgcgagaaa aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg	6420
tctgacgtc agtggaaacg aaactcacgt taagggattt tggatcatg attatcaaaa	6480
aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata	6540
tatgagtaaa cttaggtctga cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg	6600
atctgtctat ttctgtcatc catagttgcc tgactccccg tcgttagat aactacgata	6660
cgggagggt taccatctgg cccagtgct gcaatgatac cgcgagacc acgtcacccg	6720

gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct 6780
 gcaactttat ccgcctccat ccagtcatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt 6840
 tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc 6900
 tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga 6960

 tccccatgt tgtgcaaaaa agcggtttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt 7020
 aagttggcgc cagtgttata actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc 7080
 atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa 7140
 tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgctcaa tacgggataa taccgcgcca 7200
 catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca 7260
 aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaacca ctctgtcacc caactgatct 7320
 tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc 7380

 gcaaaaaagg gaataagggc gacacgaaa tgttgaatac tcatactctt ctttttcaa 7440
 tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt 7500
 tagaaaaata acaaatagg ggttcgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc 7560
 taagaaacca ttattatcat gacattaacc tataaaaaata ggcgatcac gagggccctt 7620
 cgtctcgcgc gtttcggtga tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg 7680
 gtcacagctt gtctgtaagc ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg 7740
 ggtgttggcg ggtgtcgggg ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga 7800

 gtgcaccata tgcggtgtga aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg 7860
 cgccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcgggtgcg ggcctcttcg 7920
 ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca 7980
 gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg ccaagctg 8028

 <210> 142
 <211> 7127
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide"
 <400> 142
 gcgatcgcag taatcaatta cggggtcatt agttcatagc ccatatatgg agttccgcgt 60

tacataactt acggtaaatg gcccgcctgg ctgaccgccc aacgaccccc gccattgac	120
gtcaataatg acgtatgttc ccatagtaac gccaataggg actttccatt gacgtcaatg	180
ggtggagtat ttacggtaaa ctgcccactt ggagctacat caagtgtatc atatgccaag	240
tacgccccct attgacgtca atgacggtaa atggcccggc tggcattatg cccagtacat	300
gaccttatgg gactttccta cttggcagta catctacgta ttagtcacg ctattaccat	360
ggtgatgagg ttttggcagt acatcaatgg gcgtggatag cggtttgact cacggggatt	420
tccaagtctc caccctattg acgtcaatgg gagtttgttt tggcaccaaa atcaacggga	480
ctttccaaaa tgtcgttaaca actccgcccc attgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg	540
gtgggaggtc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgg ggtctctctg gttagaccag	600
atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaccac tgcttaagcc tcaataaagc	660
ttgccttagg tgcctcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg taactagaga	720
tccctcagac ccttttagtc agtgtgaaa atctctagca gtggcgcccg aacagggacc	780
tgaaagcgaa agggaaacca gagctctctc gacgcaggac tcggcttgct gaagcgcgca	840
cggcaagagg cgaggggagg cgactggtga gtacgcaaaa aattttgact agcggaggct	900
agaaggagag agatgggtgc gagagcgtca gtattaagcg ggggagaatt agatcgcgat	960
gggaaaaaat tcggttaagg ccagggggaa agaaaaata taaattaaaa catatagtat	1020
gggcaagcag ggagctagaa cgattcgcag ttaatcctgg cctgttagaa acatcagaag	1080
gctgtagaca aatctggga cagctacaac catccctca gacaggatca gaagaactta	1140
gatcattata taatacagta gcaacccctc attgtgtgca tcaaaggata gagataaaag	1200
acaccaagga agcttttagc aagatagagg aagagcaaaa caaaagtaag accaccgcac	1260
agcaagcggc cgctgatctt cagacctgga ggaggagata tgagggacaa ttggagaagt	1320
gaattatata aatataaagt agtaaaaatt gaaccattag gagtagcacc caccaaggca	1380
aagagaagag tgggtgcagag agaaaaaaga gcagtgggaa taggagcttt gttccttggg	1440
ttcttgggag cagcaggaag cactatgggc gcagcctcaa tgacgtgac ggtacaggcc	1500
agacaattat tgtctggtat agtgcagcag cagaacaatt tgctgagggc tattgaggcg	1560
caacagcatc tgttgcaact cacagtctgg ggcatcaagc agctccaggc aagaatcctg	1620
gctgtggaaa gatacctaaa ggatcaacag ctcttgggga tttggggttg ctctggaaaa	1680
ctcatttgca ccactgctgt gccttgggaat gctagtggga gtaataaatc tctggaacag	1740
atttggaaac acacgacctg gatggagtgg gacagagaaa ttaacaatta cacaagctta	1800
atacactcct taattgaaga atcgcaaac cagcaagaaa agaattgaaca agaattattg	1860
gaattagata aatgggcaag tttgtggaat tggtttaaca taacaattg gctgtggtat	1920

ataaaattat tcataatgat agtaggaggc ttggtagggt taagaatagt ttttgcgtga	1980
ctttctatag tgaatagagt taggcaggga tattcaccat tatcgtttca gaccacctc	2040
ccaaccccgga ggggaccgga caggcccgaa ggaatagaag aagaaggtgg agagagagac	2100
agagacagat ccattcgatt agtgaacgga tctcgacggt atcggttaac ttttaaaga	2160
aaagggggga ttggggggta cagtgcaggg gaaagaatag tagacataat agcaacagac	2220
atacaaaacta aagaattaca aaaacaaatt acaaaaattc aaaattttgg ctcccgatcg	2280
ttgcgttaca cacacaatta ctgctgatcg agtgtagcct tcgaatgaaa gacccacct	2340
gtaggtttgg caagatagct gcagtaacgc cattttgcaa ggcatggaaa aataccaaac	2400
caagaataga gaagttcaga tcaagggcgg gtacatgaaa atagctaacg ttgggccaaa	2460
caggatatct gcggtgagca gtttcggccc cggcccgagg ccaagaacag atggtcaccg	2520
cagtttcggc cccggcccga ggccaagaac agatggtccc cagatatggc ccaaccctca	2580
gcagtttctt aagaccctc agatgtttcc aggtcctccc aaggacctga aatgacctg	2640
cgctttattt gaattaacca atcagcctgc ttctcgcttc tgttcgcgcg ctctctcttc	2700
ccgagctcta taaaagagct cacaacccct cactcggcgc gccagtcctc cgattgactg	2760
agtcgcctg atcattgtcg atcctacat ccactcgaca caccgcag ggccctgcc	2820
agcttcagag ctctcgatat caaaggaggt acccaacatg gtcagcaagg gcgaggaact	2880
gttcaccggg gtggtgcccc tcctggtcga gctggacggc gacgtaaacg gccacaagtt	2940
cagcgtgtcc ggcgaggcg agggcgatgc cacctacggc aagctgacct tgaagttcat	3000
ctgtaccacc ggcaagetgc ccgtgccctg gcccaccctc gtgaccacce tgacctacgg	3060
cgtgcaatgc ttcagccgct accccgacca catgaagcag cagcacttct tcaagtcgc	3120
catgcccga ggtacgtcc aggagcgac catcttcttc aaggacgacg gcaactaaa	3180
gacccgcgc gaggtgaagt tcgagggcga caccctggtg aaccgcatcg agctgaagg	3240
catcgacttc aaggaggacg gcaacatcct ggggcacaag ctggagtaca actacaacag	3300
ccacaacgtc tatatcatgg ccgacaagca gaagaacggc atcaaggtga acttcaagat	3360
ccgccacaac atcgaggacg gcagcgtgca actcgccgac cactaccagc agaacacccc	3420
catcgcgac gggcccgctc tgctgcccga caaccactac ctgagcacc agtccgcct	3480
gagcaaacg cccaacgaga agcgcgatca catggtcctg ctggagttcg tgaccgcgc	3540
cgggatcact ctcgcatgg acgagctgta caagtagaag ttgtctctc ctgactgac	3600
tgactgatac aatcgatttc tggatccga ggctctgct agaagttgtc tcctcctgca	3660
ctgactgact gataaatcg atttctggat ccgcaggcct ctgctagctt gactgactga	3720
gtcgacaatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat tgactggtat tcttaactat	3780

gttgctcctt ttacgctatg tggatagct gctttaatgc ctttgatca tgctattgct 3840

tcccgtatgg ctttcatttt ctctccttg tataaatcct ggttgctgic tctttatgag 3900

gagttgtggc ccgttgtcag gcaacgtggc gtggtgtgca ctgtgtttgc tgacgcaacc 3960

cccactgggtt ggggcattgc caccacctgt cagctccttt ccgggacttt cgctttcccc 4020

ctccctattg ccacggcgga actcatcgcc gcctgccttg ccgctgctg gacaggggct 4080

cggctgttgg gcactgacaa ttccgtgggtg ttgtcgggga agctgacgtc ctttccatgg 4140

ctgctcgctt gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgt ccttctgcta cgtcccttcg 4200

gcctcaatc cagcggacct tcttccccgc ggctgctgc cggctctgcg gcctcttcg 4260

cgctttcgcc ttgcacctca gacgagtcgg atctcccttt gggccgcctc cccgcctgga 4320

attcgagctc ggtaccttta agaccaatga cttacaaggc agctgtagat cttagccact 4380

ttttaaaaga aaagggggga ctggaagggc taattcactc ccaacgaaga caagatctgc 4440

tttttgcttg tactgggtct ctctgggttag accagatctg agcctgggag ctctctggct 4500

aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc ttgagtgtt caagtagtgt 4560

gtgccgtctt gttgtgtgac tctgtaact agagatccct cagacccttt tagtcagtgt 4620

ggaaaatctc tagcagctct ggccaacgtg agcaccgtgc tgacctcaa atatcgttaa 4680

gctggagcct gggagccggc ctggccctcc gccccccca ccccgagc ccaccttg 4740

tctttgaata aagtctgagt gagtggccga cagtgccctg ggagtctctg tgacctgagg 4800

tgcagggcgc gccttaggga cagtcctgt cagtgccga gggccctgt gcagctgcaa 4860

gggacaggcc tagccctgca ggcctaactc cgccatccc gccctaact ccgcccagtt 4920

ccgcccattc tccgctcat ggctgactaa tttttttat ttaigcagag gccgaggccg 4980

cctcgccctc tgagctattc cagaagtagt gaggacgctt ttttgaggc cgaggctttt 5040

gcaaagatcg aacaagagac aggacctgca ggttaattaa atttaaatca tgtgagcaaa 5100

agggcagcaa aaggccagga accgtaaaaa ggccgcgttg ctggcgtttt tccataggct 5160

ccgccccct gacgagcatc aaaaaatcg acgtcaagt cagaggtggc gaaacccgac 5220

aggactataa agataccagg cgtttcccc tggaagctcc ctctgctgt ctctgttcc 5280

gacctgccc cttaccgat acctgtccgc ctttctcct tcgggaagcg tggcgcttc 5340

tcatagctca cgtgtaggt atctcagttc ggtgtaggtc gttcgtcca agctgggctg 5400

tgtgcacgaa cccccgttc agcccagccg ctgcgctta tccgtaact atcgtcttga 5460

gtccaaccg gtaagacacg acttatcgcc actggcagca gccactggta acaggattag 5520

cagagcgagg tatgtaggcg gtgctacaga gttcttgaag tggtagccta actacggcta 5580
 cactagaaga acagtatttg gtatctgcgc tctgctgaag ccagttacct tcggaaaaag 5640
 agttggtagc tcttgatccg gcaaaaaaac caccgctggt agcgggtggt tttttgtttg 5700
 caagcagcag attacgcgca gaaaaaaagg atctcaagaa gatcctttga tcttttctac 5760
 ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc acgttaaggg attttgtca tgagattatc 5820
 aaaaaggatc ttcacctaga tcctttttaa ttaaaaatga agttttaaat caatctaaag 5880
 tataatatgag taaacttggc ctgacagtta ccaatgctta atcagtgagg cacctatctc 5940

agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt tgcattttaa tggccggcct ggcgcgccgt 6000
 ttaaacctag atattgatag tctgatcggc caacgtataa tcgagtccta gcttttgcaa 6060
 acatctatca agagacagga tcagcaggag gctttcgcac gagtattcaa catttccgtg 6120
 tcgcccttat tccttttttt gcggcatttt gccttcctgt ttttgctcac ccagaaacgc 6180
 tggtagaaagt aaaagatgct gaagatcagt tgggtgcgcg agtgggttac atcgaaactgg 6240
 atctcaacag cggttaagatc cttgagagtt ttgcctccga agaacgcttt ccaatgatga 6300
 gcacttttaa agttctgcta tgtggcgcgg tattatcccg tattgacgcc gggcaagagc 6360

aactcggctc ccgcatacac tattctcaga atgacttggc tgaglattca ccagtcacag 6420
 aaaagcatct tacggatggc atgacagtaa gagaattatg cagtgtctgc ataaccatga 6480
 gtgataaac tcgcggccaac ttacttctga caacgattgg aggaccgaag gagctaaccg 6540
 cttttttgca caacatgggg gatcatgtaa ctgccttga tcgttgggaa ccggagctga 6600
 atgaagccat accaaacgac gagcgtgaca ccacgatgcc tgtagcaatg gcaacaacct 6660
 tgcgtaaact attaaactggc gaactactta ctctagcttc ccggcaacag ttgatagact 6720
 ggatggaggc ggataaagtt gcaggaccac ttctgcctc ggcccttccg gctggctggt 6780

ttattgctga taaatctgga gccggtgagc gtgggtctcg cggtatcatt gcagcactgg 6840
 ggccagatgg taagccctcc cgtatcgtag ttatctacac gacggggagt caggcaacta 6900
 tggatgaacg aaatagacag atcgtgaga taggtgcctc actgattaag cattggtaac 6960
 cgattctagg tgcattggcg cagaaaaaaa tgcctgatgc gacgtgcgc gtcttatact 7020
 cccacatatg ccagattcag caacggatac ggcttcccca acttgccac ttccatacgt 7080
 gtctctctta ccagaaattt atccttaaga tccgaatcg tttaaac 7127

<210> 143
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 143

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 144

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 144

Pro Lys Lys Lys Arg Arg Val

1 5

<210> 145

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 145

Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys

1 5 10 15

<210> 146

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"

<220>

<221> source

<223> /note="See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments"

<400> 146

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 100

<210> 147

<211> 100

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(100)

<223> /note="This sequence may encompass 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80,
90, or 100 nucleotides"

<400> 147

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 100

<210> 148

<211> 300

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide"

<220>

<221> source

<223> /note="See specification as filed for detailed description of
substitutions and preferred embodiments"

<400> 148

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300
<210> 149	
<211> 100	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><221> source	
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polynucleotide"	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(100)	
<223> /note="This sequence may encompass 95-100 nucleotides"	
<400> 149	
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	100