



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0052370
(43) 공개일자 2022년04월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0735 (2010.01) A61K 35/39 (2015.01)
C07K 14/705 (2006.01) C07K 14/74 (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) C12N 15/113 (2010.01)
C12N 15/90 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
C12N 5/074 (2010.01) C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0606 (2013.01)
A61K 35/39 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7010761
(22) 출원일자(국제) 2022년09월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년03월31일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2020/058281
(87) 국제공개번호 WO 2021/044379
국제공개일자 2021년03월11일
(30) 우선권주장
62/896,473 2019년09월05일 미국(US)
62/979,771 2020년02월21일 미국(US)

(71) 출원인
크리스퍼 테라퓨틱스 아게
스위스 6300 추크 바레어슈트라체 14
(72) 발명자
레자니아, 알리레자
미국 02139 매사추세츠주 캄브릿지 메인 스트리트
610 크리스퍼 테라퓨틱스 내
라모스-자야스, 레베카
미국 02139 매사추세츠주 캄브릿지 메인 스트리트
610 크리스퍼 테라퓨틱스 내
(74) 대리인
양영준, 이윤기

전체 청구항 수 : 총 85 항

(54) 발명의 명칭 **보편적 공여자 세포**

(57) 요약

본원에서는 다수의 개체와 양립 가능한 유전자 변형 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포 및 상기 유전자 변형 세포를 생성하는 방법이 제공된다. 보편적 공여자 세포는 생존 인자를 암호화하는 적어도 하나의 유전자 내부 또는 부근에서의 적어도 하나의 유전자 변형을 포함하며, 이때 유전자 변형은 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입을 포함한다. 보편적 공여자 세포는 하나 이상의 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에서의 적어도 하나의 유전자 변형을 추가로 포함할 수 있으며, 이때 상기 유전자 변형은 제2 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입을 포함한다.

(52) CPC특허분류

C07K 14/70532 (2013.01)

C07K 14/70539 (2013.01)

C12N 15/102 (2013.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 15/907 (2013.01)

C12N 5/0676 (2013.01)

C12N 5/0696 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

명세서

청구범위

청구항 1

보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 방법으로서,

- (a) 생존 인자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근의 부위를 표적화하는 제1 부위-지정 뉴클레아제; 및
- (b) 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 핵산으로서, 상기 제1 관용원성 인자는 (i) 상기 (a)의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열 및 (ii) (a)의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열이 측면에 있는 것인 제1 핵산을 세포에 전달하는 단계를 포함하며,

이때 상기 제1 부위-지정 뉴클레아제는 (a)의 표적 부위를 개열하고, (b)의 제1 핵산은 (a)의 부위와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된 부위에 삽입되어 보편적 공여자 세포를 생성하고, 상기 보편적 공여자 세포는 (b)의 핵산이 삽입되지 않은 세포와 비교하여 증가된 세포 생존을 갖는 것인 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 생존 인자는 TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK 또는 MANF인 것인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 제1 관용원성 인자는 PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 또는 CD47인 것인 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생존 인자는 TXNIP인 것인 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 제1 관용원성 인자는 HLA-E인 것인 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 부위-지정 뉴클레아제는 CRISPR 뉴클레아제 및 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 CRISPR 시스템인 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 II형 Cas9 뉴클레아제 또는 V형 Cfp1 뉴클레아제이고, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결되는 것인 방법.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 gRNA는 서열 번호 15 내지 서열 번호 24로 이루어진 표적 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (b)(i)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 25로 이루어지고, 상기 (b)(ii)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 32로 이루어지는 것인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

- (c) MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자 중 하나 이상을 암호화하는 유전자 내부 또는 부근의 부위를 표적화하는 제2 부위-지정 뉴클레아제; 및

(d) 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 핵산으로서, 상기 제2 관용원성 인자는 (iii) 상기 (c)의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열 및 (iv) (c)의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열이 측면에 있고, 상기 (d)의 제2 관용원성 인자는 (b)의 제1 관용원성 인자와 상이한 것인 제2 핵산을 세포에 전달하는 단계를 추가로 포함하며,

이때 상기 제2 부위-지정 뉴클레아제는 (c)의 표적 부위를 개열하고, 상기 (d)의 제2 핵산은 상기 (c)의 부위와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된 부위에 삽입되고, 상기 보편적 공여자 세포는 상기 (d)의 제2 핵산이 삽입되지 않은 세포와 비교하여 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 상기 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP 또는 RFXANK인 것인 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 상기 제2 관용원성 인자는 PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 또는 CD47인 것인 방법.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 상기 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자는 B2M인 것인 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 제2 관용원성 인자는 PD-L1인 것인 방법.

청구항 15

제10항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 부위-지정 뉴클레아제는 CRISPR 뉴클레아제 및 gRNA를 포함하는 CRISPR 시스템인 것인 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 II형 Cas9 뉴클레아제 또는 V형 Cfp1 뉴클레아제이고, 상기 CRISPR 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결되는 것인 방법.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서, 상기 gRNA는 서열 번호 1 내지 서열 번호 3 또는 서열 번호 35 내지 서열 번호 44로 이루어진 표적 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 d)(iii)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 7로 이루어지고, 상기 (d)(iv)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 13으로 이루어지는 것인 방법.

청구항 19

제6항 내지 제9항 또는 제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CRISPR 뉴클레아제 및 상기 gRNA는 1:3의 물비로 존재하는 것인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 상기 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 것인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 외생성 프로모터는 항시적, 유도성, 시간-, 조직- 또는 세포 유형-특이적 프로모터이고, 선택적으로 상기 외생성 프로모터는 CMV, EF1 α , PGK, CAG 또는 UBC 프로모터인 것인 방법.

청구항 22

보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 방법으로서,

(a) 생존 인자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근의 부위를 표적화하는 제1 부위-지정 뉴클레아제;

(b) 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 핵산으로서, 상기 제1 관용원성 인자는 (i) 상기 (a)의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열 및 (ii) 상기 (a)의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열이 측면에 있으며, 여기서 상기 제1 부위-지정 뉴클레아제는 상기 (a)의 표적 부위를 개열하고, 상동성 재조합 과정을 통해 상기 (b)의 제1 핵산은 상기 제1 관용원성 인자를 암호화하는 상기 뉴클레오타이드 서열을 상기 (a)의 부위와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된 부위 내에 삽입하여 상기 (a)의 유전자를 파괴하기 위한 주형으로서 이용되는 것인 제1 핵산;

(c) MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자 중 하나 이상을 암호화하는 유전자 내부 또는 부근의 부위를 표적화하는 제2 부위-지정 뉴클레아제; 및

(d) 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 핵산으로서, 상기 제2 관용원성 인자는 (iii) 상기 (c)의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열 및 (iv) 상기 (c)의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열이 측면에 있는 것인 제2 핵산을 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 이때 상기 (d)의 관용원성 인자는 관용원성 인자(b)와는 상이하고, 상기 제2 부위-지정 뉴클레아제는 상기 (c)의 표적을 개열하고, 상동성 재조합 과정을 통해 상기 (d)의 제2 핵산은 상기 제2 관용원성 인자를 암호화하는 상기 뉴클레오타이드 서열을 상기 (c)의 부위와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된 부위에 삽입하여 상기 (c)의 유전자를 파괴하기 위한 주형으로서 이용되어 보편적 공여자 세포를 생성하고, 상기 보편적 공여자 세포는 상기 (b)의 제1 핵산 및 상기 (d)의 제2 핵산이 삽입되지 않은 세포와 비교하여 증가된 세포 생존을 갖는 것인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 생존 인자는 TXNIP이고, 상기 제1 관용원성 인자는 HLA-E이고, 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자는 B2M이고, 상기 제2 관용원성 인자는 PD-L1인 것인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 포유동물 세포이고, 선택적으로 상기 세포는 인간 세포인 것인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 줄기 세포인 것인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포인 것인 방법.

청구항 27

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 분화된 세포 또는 체세포인 것인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 보편적 공여자 세포는 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화

된 체세포로 분화될 수 있는 것인 방법.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 계통-제한된 전구 세포는 췌장 내배엽 전구체, 췌장 내분비 전구체, 간엽성 전구 세포, 근육 전구 세포, 아세포, 조혈 전구 세포 또는 신경 전구 세포인 것인 방법.

청구항 30

제28항에 있어서, 상기 완전 분화된 체세포는 췌장 베타 세포, 상피 세포, 내배엽 세포, 대식세포, 간세포, 지방세포, 신장 세포, 혈액 세포, 심근세포 또는 면역계 세포인 것인 방법.

청구항 31

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 생성된 복수의 보편적 공여자 세포.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 세포가 분화를 겪기에 충분한 시간 및 조건 하에 유지되는 복수의 보편적 공여자 세포.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 치료를 필요로 하는 개체를 치료하는 데 사용하기 위한 복수의 세포.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 개체는 질병을 갖거나 갖는 것으로 의심되거나, 이에 대한 위험성이 있는 인간인 것인 복수의 세포.

청구항 35

제31항 또는 제32항의 복수의 보편적 공여자 세포를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 36

치료를 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 방법으로서,

(a) 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포로의 분화 이후에 제31항의 복수의 보편적 공여자 세포를 획득하거나 이미 획득한 단계; 및

(b) 상기 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포를 상기 개체에 투여하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 37

세포 투여를 필요로 하는 개체에 투여하기 위한 세포를 획득하는 방법으로서,

(a) 제31항의 보편적 공여자 세포를 획득하거나 이미 획득한 단계; 및

(b) 상기 세포가 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포로 분화하기에 충분한 시간 및 조건 하에 상기 보편적 공여자 세포를 유지시키는 단계를 포함하는 방법.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 상기 계통-제한된 전구 세포는 장 내배엽 전구체, 췌장 내분비 전구체, 간엽성 전구 세포, 근육 전구 세포, 아세포, 조혈 전구 세포 또는 신경 전구 세포인 것인 방법.

청구항 39

제36항 또는 제37항에 있어서, 상기 완전 분화된 체세포는 췌장 베타 세포, 상피 세포, 내배엽 세포, 대식세포, 간세포, 지방세포, 신장 세포, 혈액 세포, 심근세포 또는 면역계 세포인 것인 방법.

청구항 40

제35항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개체는 질병을 갖거나 갖는 것으로 의심되거나, 이에 대한

위험성이 있는 인간인 것인 방법.

청구항 41

제40항에 있어서, 상기 질병은 유전적으로 유전 가능한 질병인 것인 방법.

청구항 42

서열 번호 15 내지 서열 번호 24로 이루어진 표적 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함하는 가이드 RNA.

청구항 43

보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 과정으로서,

- (a) MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 삽입함으로써 줄기 세포를 변형시켜 제1 관용원성 인자 양성 세포를 생성하는 단계;
- (b) 제1 관용원성 인자 양성 세포를 부유화시키는 단계;
- (c) 생존 인자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 삽입함으로써 상기 (b)로부터 제1 관용원성 인자 양성 세포를 변형시켜 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포를 생성하는 단계;
- (d) 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포를 부유화시키는 단계;
- (e) 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포를 선택하기 위한 단일 세포 분류 단계;
- (f) 상기 (e)로부터의 세포를 보편적 공여자 세포로서 특성분석하는 단계; 및
- (g) 장기간 저장을 위해 상기 보편적 공여자 세포를 냉동시키는 단계를 포함하는 것인 과정.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 (b)에서의 제1 관용원성 인자 양성 세포의 부유화 단계는 자기 보조 세포 분류(MACS), 단일 세포 클로닝, 상기 제1 관용원성 인자 양성 세포의 확장 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 과정.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, 상기 (d)에서의 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포의 부유화 단계는 자기 보조 세포 분류, 단일 세포 클로닝, 상기 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포의 확장 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 과정.

청구항 46

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, (a)에서 상기 생성된 제1 관용원성 인자 양성 세포를 확장시키는 단계, (c)에서 상기 생성된 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포를 확장시키는 단계, (e)에서 상기 선택된 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포를 확장시키는 단계, 또는 이들의 조합을 추가로 포함하는 것인 과정.

청구항 47

제43항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (a)에서의 변형 단계는 (1) 제1 RNA-가이드 뉴클레아제 및 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내의 표적 부위를 표적화하는 제1 가이드 RNA(gRNA) 및 (2) 제1 핵산을 포함하는 제1 벡터로서, 상기 제1 핵산은 (i) 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내의 상기 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열, (ii) 상기 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 (iii) 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 제1 벡터를 상기 줄기 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 이때 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자

는 상기 표적 부위에서 개열되고, 상기 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 상기 제1 핵산은 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내에 삽입되어 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자의 성분 또는 전사 조절자를 파괴시키는 것인 과정.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 제1 RNA-가이드 뉴클레아제 및 상기 제1 gRNA는 제1 리보핵단백질(RNP) 복합체를 형성하는 것인 과정.

청구항 49

제43항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (a)에서의 변형 단계는 (1) 제1 RNA-가이드 뉴클레아제 및 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내의 표적 부위를 표적화하는 제1 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 제1 리보핵단백질(RNP) 복합체 및 (2) 제1 핵산을 포함하는 제1 벡터로서, 상기 제1 핵산은 (i) 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열, (ii) 상기 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 (iii) 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 제1 벡터를 상기 줄기 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 이때 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자는 상기 표적 부위에서 개열되고, 상기 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 상기 제1 핵산은 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내에 삽입되어 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자의 성분 또는 전사 조절자를 파괴하는 것인 과정.

청구항 50

제43항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자의 성분 또는 전사 조절자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP 또는 RFXANK인 것인 과정.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자의 성분 또는 전사 조절자는 B2M인 것인 과정.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 (a)(2)(i)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 7로 이루어지고, 상기 (a)(2)(iii)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 13으로 이루어지는 것인 과정.

청구항 53

제51항 또는 제52항에 있어서, 상기 제1 gRNA는 서열 번호 2로 이루어진 표적 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함하는 것인 과정.

청구항 54

제47항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제인 것인 과정.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 Cas9 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결되는 것인 과정.

청구항 56

제47항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 RNP는 제1 gRNA:제1 RNA-가이드 뉴클레아제를 3:1의 몰

비로 포함하는 것인 과정.

청구항 57

제43항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 관용원성 인자는 PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 또는 CD47인 것인 과정.

청구항 58

제43항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 것인 과정.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 외생성 프로모터는 CMV, EF1 α , PGK, CAG 또는 UBC 프로모터인 것인 과정.

청구항 60

제43항 내지 제59항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 관용원성 인자는 PD-L1인 것인 과정.

청구항 61

제60항에 있어서, 상기 PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 11로 이루어지는 것인 과정.

청구항 62

제61항에 있어서, 상기 PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 CAG 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 것인 과정.

청구항 63

제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 벡터는 서열 번호 33으로 이루어진 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 과정.

청구항 64

제43항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (c)에서의 변형 단계는 (1) 제2 RNA-가이드 뉴클레아제 및 생존 인자 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하는 제2 가이드 RNA(gRNA) 및 (2) 제2 핵산을 포함하는 제2 벡터로서, 상기 제2 핵산은 (i) 상기 생존 인자 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열, (ii) 상기 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 (iii) 상기 생존 인자 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 제2 벡터를 상기 줄기 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 이때 상기 생존 인자 유전자 유전자위는 상기 표적 부위에서 개열되고, 상기 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 상기 제2 핵산은 상기 생존 인자 유전자 유전자위 내에 삽입되어 상기 생존 인자 유전자를 파괴하는 것인 과정.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 제2 RNA-가이드 뉴클레아제 및 상기 제2 gRNA는 제2 리보핵단백질(RNP) 복합체를 형성하는 것인 과정.

청구항 66

제43항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (c)에서의 변형 단계는 (1) 제2 RNA-가이드 뉴클레아제 및 생존 인자 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하는 제2 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 제2 리보핵단백질(RNP) 복합체 및 (2) 제2 핵산을 포함하는 제2 벡터로서, 상기 제2 핵산은 (i) 상기 생존 인자 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열, (ii) 상기 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열 및 (iii) 상기 제2 생존 인자 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 제2 벡터를 상기 제1 관용원성 인자 양성 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 이때 상기 생존 인자 유전자 유전자위는 상기 표적 부위에서 개열되고, 상기 제2 관용원성 인

자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 상기 제2 핵산은 상기 생존 인자 유전자 유전자위에 삽입되어 상기 생존 인자 유전자를 파괴하는 것인 과정.

청구항 67

제43항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 생존 유전자는 TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK 또는 MANF인 것인 과정.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 생존 유전자는 TXNIP인 것인 과정.

청구항 69

제68항에 있어서, 상기 제2 gRNA는 서열 번호 20으로 이루어진 표적 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함하는 것인 과정.

청구항 70

제68항 또는 제69항에 있어서, 상기 (c)(2)(i)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 25로 이루어지고, 상기 (c)(2)(iii)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 32로 이루어지는 것인 과정.

청구항 71

제64항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제인 것인 과정.

청구항 72

제71항에 있어서, 상기 Cas9 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결되는 것인 과정.

청구항 73

제64항 내지 제72항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 RNP는 제2 gRNA:제2 RNA-가이드 뉴클레아제를 3:1의 몰 비로 포함하는 것인 과정.

청구항 74

제43항 내지 제73항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 관용원성 인자는 PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 또는 CD47인 것인 과정.

청구항 75

제43항 내지 제74항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 것인 과정.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 외생성 프로모터는 CMV, EF1 α , PGK, CAG 또는 UBC 프로모터인 것인 과정.

청구항 77

제43항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 관용원성 인자는 HLA-E인 것인 과정.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 자체의 신호 펩타이드가 없는 HLA-E에 융합된 B2M 막 단백질에 융합된 HLA-G 제시 펩타이드에 융합된 B2M 신호 펩타이드를 포함하는 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열을 포함하는 것인 과정.

청구항 79

제78항에 있어서, 상기 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열은 본질적으로 서열 번호 55로 이루어지는 것인 과정.

청구항 80

제78항 또는 제79항에 있어서, 상기 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 CAG 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 것인 과정.

청구항 81

제77항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 벡터는 서열 번호 34 또는 서열 번호 56으로 이루어진 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 과정.

청구항 82

제43항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (e)에서의 단일 세포 분류 단계는 형광 활성화 세포 분류(FACS), 단일 세포 클로닝, 상기 단일 세포-분류된 세포의 확장 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 과정.

청구항 83

제43항 내지 제82항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 (f)에서의 특성분석 단계는 접합성 및/또는 삽입-결실 프로파일에 대한 DNA 분석을 포함하는 것인 과정.

청구항 84

제43항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 f)에서의 특성분석 단계는 형태, 생존력, 핵형분석, 내독소 수준, 마이코플라스마 수준, 온/오프 표적 분석, 무작위 벡터 삽입, 잔류 Cas9, 잔류 벡터, 다능성 상태, 분화능 또는 이들의 조합에 대한 세포 분석을 포함하는 것인 과정.

청구항 85

제43항 내지 제84항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 과정은 (f)에서의 특성분석 이전에 냉동 단계를 추가로 포함하는 것인 과정.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2019년 9월 5일자로 출원된 미국 가출원 제62/896,473호 및 2020년 2월 21일자로 출원된 미국 가출원 제62/979,771호의 이익을 주장하고, 각각의 개시내용은 본원에 그 전체가 참고로 포함된다.

[0003]

서열 목록의 참조문헌으로서의 포함

[0004]

본 출원은 EFS-Web를 통해 ASCII 형식으로 제출된 서열 목록을 포함하며, 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 2020년 9월 2일자로 생성된 ASCII 사본은 CT124-PCT-100867-666508-Sequence-Listing_ST25.txt로 명명되며, 그 크기는 약 53,000 바이트이다.

[0005]

발명의 기술분야

[0006]

본 발명은 유전자 편집 분야에 관한 것이고, 일부 실시형태에서는 다수의 개체와 양립 가능한 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포를 생성할 목적을 위한 유전자 변형에 관한 것이다.

배경 기술

[0007]

이식 또는 생착된 세포의 동종이계 거부를 극복하기 위해 HLA-매칭, 항체를 이용한 T-세포 활성화를 촉발하는 차단 경로, 면역 억제 약물의 각테일의 사용 및 자가유래 세포 요법을 비롯한 다양한 접근법이 제안되었다. 이식편 거부를 약화시키기 위한 다른 전략은 이식 또는 생착된 세포와 수혜자 사이의 동종이계 차이의 최소화를 수반한다. 염색체 6 상의 인간 주요 조직 적합성 복합체에 위치한 유전자에 의해 암호화된 분자인 세포 표면-발현된 인간 백혈구 항원(HLA: human leukocyte antigen)은 면역 거부의 주요 매개자이다. 공여자와 개체 사이의 단일 HLA 유전자의 미스매치는 강력한 면역 반응을 야기할 수 있다(문헌[Fleischhauer K. *et al.* "Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44," N

Engl J Med., 1990, 323: 1818~1822]). HLA 유전자는 MHC 클래스 I(MHC-I) 및 MHC 클래스 II(MHC-II)로 분할된다. MHC-I 유전자(HLA-A, HLA-B 및 HLA-C)는 거의 모든 조직 세포 유형에서 발현되어, "비자가" 항원-가공된 펩타이드를 CD8+ T 세포에 제시하며, 그 결과 세포 용해성 CD8+ T 세포에 대한 이들의 활성화를 촉진한다. "비자가" MHC-I 분자를 발현하는 이식 또는 생착된 세포는 이들 세포에서 유도되는 강력한 세포 면역 반응을 야기하고, 궁극적으로 활성화된 세포 용해성 CD8+ T 세포에 의해 이들의 사멸을 초래할 것이다. MHC-I 단백질은 소포체에서 베타-2-미크로글로불린(B2M)과 친밀히 연관되어 있으며, 이는 세포 표면 상의 기능적 MHC-I 분자를 형성하는 데 필수적이다.

[0008] MHC-I 유전자의 광범위한 세포 발현과 반대로, MHC-II 유전자의 발현은 수지상 세포, 대식세포 및 B 세포와 같은 항원 제시 세포로 제한된다. HLA 항원 유전자는 인간 게놈에서 관찰되는 대부분의 다형성 유전자이다(문헌[Rubinstein P., "HLA matching for bone marrow transplantation--how much is enough?" N Engl J Med., 2001, 345: 1842~1844]). 임의의 HLA 유전자형과 양립 가능한 "보편적 공여자" 세포의 생성은 면역 거부 및 면역 회피에 대한 현재의 방법론의 연관된 경제적 비용을 해결할 수 있는 대안적인 전략을 제공한다.

[0009] 보편적 공여자 세포(들)의 이 같은 세포주를 생성하기 위해, 하나의 이전 접근법은 MHC-I 및 MHC-II 클래스 유전자의 발현을 기능적으로 파괴하는 것이었다. 이는, 예를 들어 MHC-I 경쇄인 B2M을 암호화하는 유전적 대립유전자 둘 모두의 유전적 파괴를 통해 달성될 수 있었다. 생성된 B2M 무함유(null) 세포주 및 이의 유도체는 크게 감소된 표면 MHC-I를 나타내며, 따라서 동종이계 CD8+ T 세포에 대한 감소된 면역원성을 나타내는 것으로 예상될 것이다. 전사 활성화-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN) 표적화 접근법은 B2M 유전자의 엑손 2에서 몇몇 뉴클레오타이드의 결실에 의한 B2M-결핍 hESC 세포주를 생성하기 위해 사용되었다(문헌[Lu, P. *et al.*, "Generating hypoinmunogenic human embryonic stem cells by the disruption of beta 2-microglobulin," Stem Cell Rev. 2013, 9: 806~813]). B2M-표적화된 hESC 세포주가 표면 HLA-I 결핍인 것으로 나타났지만, 이들은 B2M 및 MHC-I에 특이적인 mRNA를 여전히 함유하는 것으로 발견되었다. B2M 및 MHC-I mRNA는 표적화되지 않은 hESC(항시적인 것과 IFN- γ 유도된 것 둘 다)의 것과 유사한 수준으로 발현되었다. 따라서, 이들 TALEN B2M-표적화된 hESC 세포주가 B2M mRNA를 또한 발현하는 B2M2/2 마우스 세포에 의해 관찰된 바와 같이 면역 거부를 야기하기에 충분한 잔류 세포 표면 MHC-I를 발현할 것이라는 우려가 존재한다(문헌[Gross, R. and Rappuoli, R. "Pertussis toxin promoter sequences involved in modulation," Proc Natl Acad Sci, 1993, 90: 3913~3917]). TALEN B2M-표적화된 hESC 세포주가 오프-표적 개열 사건에 대해서는 실험되지 않았지만, TALEN을 사용하는 경우에 비특이적 개열의 발생은 이들의 임상적 사용에 대한 주요 안전성 우려를 제기할 수 있는 상당한 쟁점으로 남아 있다(문헌[Grau, J. *et al.*, "TALENoffer: genome-wide TALEN off-target prediction," Bioinformatics, 2013, 29: 2931~2932]; 문헌[Guilinger J.P. *et al.* "Broad specificity profiling of TALENs results in engineered nucleases with improved DNA-cleavage specificity," Nat Methods 2014, 11: 429~435]). 추가로, 다른 보고에서는 제1 B2M 대립유전자를 녹아웃시키고, 제2 B2M 대립유전자에서 HLA-E 유전자를 녹인시킴으로써 동종이계 인식을 회피하는 IPS 세포가 생성되었으며, 이는 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C의 표면 발현 없이 HLA-E 이량체 또는 삼량체의 표면 발현을 초래하였다(문헌[Gornalusse, G.G. *et al.*, "HLA-E-expressing pluripotent stem cells escape allogeneic responses and lysis by NK cells," Nature Biotechnology, 2017, 35, 765~773]).

[0010] 상술한 전략 중 일부의 잠재적인 제한은 HLA 분자가 자연 살해(NK) 세포에 대한 주요 리간드 억제체로서 작용하므로 MHC 클래스 I-음성 세포가 자연 살해(NK) 세포에 의한 용해에 민감하다는 것이다. 숙주 NK 세포는 이식 또는 생착된 B2M-/- 공여자 세포를 제거하는 것으로 나타났으며, 유사한 현상이 MHC 클래스-I-음성 인간 백혈병 세포주와 함께 시험관 내에서 발생한다(문헌[Bix, M. *et al.*, "Rejection of class I MHC-deficient haemopoietic cells by irradiated MHC-matched mice," Nature, 1991, 349, 329~331]; 문헌[Zarcone, D. *et al.*, "Human leukemia-derived cell lines and clones as models for mechanistic analysis of natural killer cell-mediated cytotoxicity," Cancer Res. 1987, 47, 2674~2682]). 따라서, 면역 반응을 회피할 수 있는 보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 이전 방법을 개선할 필요성 및 생착 후 생존할 수 있는 세포를 생성할 필요성이 존재한다. 본원에 기술되어 있는 바와 같이, 생착 후 세포 생존은 동종이계 거부와 독립적인 다수의 기타 경로, 예를 들어 저산소증, 반응성 산소 종, 영양소 고갈 및 산화 스트레스에 의해 매개될 수 있다. 또한 본원에 기술되어 있는 바와 같이, 생존 인자(유전자 및/또는 단백질)의 유전적 도입은 세포가 생착 후 생존하는 것을 도와줄 수 있다. 본원에 기술되어 있는 바와 같이, 보편적 공여자 세포주는 생착 후 동종이계 거부 및 생존 둘 다를 다루는 특성을 조합할 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 일부 양태에서, 본 개시내용은 보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 방법을 포함한다. 이 방법은 (a) 생존 인자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근의 부위를 표적화하는 부위-지정 뉴클레아제 및 (b) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산으로서, 관용원성 인자는 (i) (a)의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동인 뉴클레오타이드 서열 및 (ii) (a)의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동인 뉴클레오타이드 서열이 측면에 있는 것인 핵산을 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 이때 부위-지정 뉴클레아제는 (a)의 표적 부위를 개열하고, (b)의 핵산은 (a)의 부위와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된 부위에 삽입되어 보편적 공여자 세포를 생성하고, 여기서 보편적 공여자 세포는 (b)의 핵산이 삽입되지 않은 세포와 비교하여 증가된 세포 생존을 갖는다.

과제의 해결 수단

[0012] 일부 실시형태에서, 생존 인자는 TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK 또는 MANF이고, 관용원성 인자는 PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 또는 CD47이다. 구체적인 실시형태에서, 생존 인자는 TXNIP이고, 관용원성 인자는 HLA-E이다. 부위-지정 뉴클레아제가 CRISPR 뉴클레아제 및 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 CRISPR 시스템인 실시형태에서, CRISPR 뉴클레아제는 II형 Cas9 뉴클레아제 또는 V형 Cpf1 뉴클레아제이고, CRISPR 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결된다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열 번호 15 내지 서열 번호 24 또는 서열 번호 45 내지 서열 번호 54로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 표적화하고, (i) 본질적으로 서열 번호 25의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지고, (ii) 본질적으로 서열 번호 32의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다.

[0013] 일부 실시형태에서, 이 방법은 (c) MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자 중 하나 이상을 암호화하는 유전자 내부 또는 부근의 부위를 표적화하는 부위-지정 뉴클레아제, 및 (d) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산으로서, 관용원성 인자는 (iii) (c)의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동인 뉴클레오타이드 서열 및 (iv) (c)의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동인 뉴클레오타이드 서열이 측면에 있는 것인 핵산을 세포에 전달하는 단계를 추가로 포함하며, 이때 (d)의 관용원성 인자는 관용원성 인자(b)와 상이하고, 부위-지정 뉴클레아제는 (c)의 표적 부위를 개열하고, (d)의 핵산은 (c)의 부위와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된 부위에 삽입되고, 보편적 공여자 세포는 (d)의 핵산이 삽입되지 않은 세포와 비교하여 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는다.

[0014] 일부 실시형태에서, 하나 이상의 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자를 암호화하는 유전자는 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C로부터 선택되는 MHC-I 유전자, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ 또는 HLA-DR로부터 선택되는 MHC-II 유전자 또는 B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP 또는 RFXANK로부터 선택되는 유전자이고, 관용원성 인자는 PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 또는 CD47이다. 구체적인 실시형태에서, 하나 이상의 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자를 암호화하는 유전자는 B2M이고, 관용원성 인자는 PD-L1이다. 부위-지정 뉴클레아제가 CRISPR 뉴클레아제 및 gRNA를 포함하는 CRISPR 시스템인 실시형태에서, CRISPR 뉴클레아제는 II형 Cas9 뉴클레아제 또는 V형 Cpf1 뉴클레아제이고, CRISPR 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결된다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열 번호 1 내지 서열 번호 3 또는 서열 번호 35 내지 서열 번호 44로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 표적화하고, (iii) 본질적으로 서열 번호 7의 뉴클레오타이드 서열로 이루어지고, (iv) 본질적으로 서열 번호 13의 뉴클레오타이드 서열로 이루어진다.

[0015] 일부 실시형태에서, (b) 및 (d)의 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 외생성 프로모터는 항시적, 유도성, 시간-, 조직- 또는 세포 유형-특이적 프로모터로부터 선택될 수 있다. 일부 실시형태에서, 외생성 프로모터는 CMV, EF1a, PGK, CAG 또는 UBC 프로모터이다. 구체적인 실시형태에서, 외생성 프로모터는 CAG 프로모터이다.

[0016] 또한, 본 개시내용은 본원에 개시되어 있는 방법에 의해 생성된 보편적 공여자 세포를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 인간 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 다능성 줄기 세포(PSC), 배아 줄기 세포(ESC), 성체 줄기 세포(ASC), 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC) 또는 조혈 줄기 및 전구 세포(HSPC)(조혈 줄기 세포(HSC)로도 지칭됨)이다. 일부 실시형태에서, 세포는 분화된 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 체세포이다.

[0017] 일반적으로, 본원에 개시되어 있는 보편적 공여자 세포는 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포로 분

화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 계통-제한된 전구 세포는 췌장 내배엽 전구체, 췌장 내분비 전구체, 간엽성 전구 세포, 근육 전구 세포, 아세포, 조혈 전구 세포 또는 신경 전구 세포이고, 완전 분화된 체세포는 내분비성 분비 세포(예를 들어, 췌장 베타 세포), 상피 세포, 내배엽 세포, 대식세포, 간세포, 지방세포, 신장 세포, 혈액 세포 또는 면역계 세포이다. 일부 실시형태에서, 완전 분화된 체세포는 심근세포이다.

[0018] 본 개시내용의 추가의 양태는 치료를 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포로의 분화 이후에 본원에 개시되어 있는 보편적 공여자 세포를 수득하거나 이미 수득한 단계; 및 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포를 개체에 투여하는 단계를 포함한다. 세포 투여를 필요로 하는 개체에 투여하기 위한 세포를 수득하는 방법이 또한 제공되며, 이때 이 방법은 본원에 개시되어 있는 바와 같은 보편적 공여자 세포를 수득하거나 이미 수득한 단계; 및 보편적 공여자 세포가 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포로 분화하기에 충분한 시간 및 조건 하에 보편적 공여자 세포를 유지하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 개체는 질병을 갖거나 갖는 것으로 의심되거나, 이에 대한 위험성이 있는 인간이다. 일부 실시형태에서, 질병은 유전적으로 유전 가능한 질병이다.

[0019] 본 개시내용의 또 다른 양태는 서열 번호 15 내지 서열 번호 24 또는 서열 번호 45 내지 서열 번호 54로부터 선택되는 폴리뉴클레오타이드 서열을 표적화하는 gRNA를 포함한다.

[0020] 본 개시내용이 다양한 변형 및 대안적인 형태로 제시될 수 있지만, 이의 구체적인 실시형태는 도면에서 일례로 나타나 있고, 본원에서 상세하게 기술될 것이다. 그러나, 본원에 제시된 도면 및 상세한 설명이 본 개시내용을 개시된 특정 실시형태에 제한하기 위한 것은 아니지만, 반대로 본 발명은 첨부된 청구항에 의해 정의된 바와 같이 본 개시내용의 진의 및 범주 내에 있는 모든 변형, 균등물 및 대안을 다루기 위한 것으로 이해되어야 한다.

[0021] 본 개시내용의 기타 특징 및 이점은 첨부된 도면을 참조하여 이루어지는 본 발명의 실시형태에 대한 하기 상세한 설명을 통해 명확해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 CyT49 세포에서의 B2M gRNA 절단의 TIDE 분석을 보여준다. B2M-1, B2M-2 및 B2M-3 gRNA를 시험하였다.

도 2a 및 도 2b는 야생형 CyT49 세포(도 2a) 및 B2M KO CyT49 세포(도 2b)에서 IFN- γ 의 존재 및 부재 시의 B2M 발현의 유세포 분석 평가를 보여준다.

도 3은 HDR을 위한 B2M-CAGGS-PD-L1 공여자 벡터의 플라스미드 지도를 보여준다.

도 4는 B2M KO/PD-L1 KI CyT49 줄기 세포의 다능성에 대한 유세포 분석을 보여준다. 상기 유래의 클론은 OCT4 및 SOX2에 대해 99% 초과 의 이중 양성이며, 이때 2개의 전사 인자가 다능성에 필수적이다. IgG는 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 5a 및 도 5b는 야생형 CyT49(도 5a)- 및 B2M KO/PD-L1 KI(도 5b)-유래 줄기 세포 클론의 유세포 분석을 보여준다. 야생형 세포는 IFN γ 에 반응하여 B2M 발현을 상향 조절한다. B2M KO/PD-L1 KI 클론은 PD-L1을 완전히 발현하고, IFN γ 처리의 존재 또는 부재 하에 B2M을 발현하지 않는다. NT-1= 무처리. INTG-1 = 50 ng/ml IFN γ 로 48시간 처리된 세포.

도 6은 야생형 CyT49, PD-L1 KI/B2M KO 또는 B2M KO CyT49 세포로부터 분화된 단계 1(완성 내배엽) 세포에서의 FOXA2 및 SOX17에 대한 유세포 분석법을 보여준다.

도 7은 야생형, PD-L1 KI/B2M KO 또는 B2M KO 세포로부터 분화된 단계 1(완성 내배엽) 세포에서의 FOXA2 및 SOX17 발현의 정량적 비율(%)을 보여준다.

도 8은 야생형, PD-L1 KI/B2M KO 또는 B2M KO 세포로부터 분화된 단계 4(PEC) 세포에서의 CHGA, PDX1 및 NKX6.1 발현의 정량적 비율(%)을 보여준다.

도 9는 단계 4(PEC)에서 세포의 이중 개체군을 보여준다.

도 10은 야생형, PD-L1 KI/B2M KO 또는 B2M KO 세포로부터 분화된 세포에서 분화 시간 과정에 걸쳐 선택된 유전자 발현을 보여준다.

도 11a 내지 도 11f는 야생형, PD-L1 KI/B2M KO 또는 B2M KO 세포로부터 분화된 세포에서의 분화 시간 과정에 걸쳐 선택된 유전자 발현을 보여준다. 도 11a는 야생형 세포에서 B2M 발현을 보여준다. 도 11b는 B2M KO 세포에서 B2M 발현을 보여준다. 도 11c는 PD-L1 KI/B2M KO 세포에서 B2M 발현을 보여준다. 도 11d는 야생형 세포에서

PD-L1 발현을 보여준다. 도 11e는 B2M KO 세포에서 PD-L1 발현을 보여준다. 도 11f는 PD-L1 KI/B2M KO 세포에서 PD-L1 발현을 보여준다.

도 12a 내지 도 12f는 야생형, PD-L1 KI/B2M KO 또는 B2M KO 세포로부터 분화된 세포에서 PEC 단계에서 MHC 클래스 I 및 클래스 II 발현을 보여준다. 도 12a는 야생형 세포에서 MHC 클래스 I 발현을 보여준다. 도 12b는 B2M KO 세포에서 MHC 클래스 I 발현을 보여준다. 도 12c는 PD-L1 KI/B2M KO 세포에서 MHC 클래스 I 발현을 보여준다. 도 12d는 야생형 세포에서 MHC 클래스 II PD-L1 발현을 보여준다. 도 12e는 B2M KO 세포에서 MHC 클래스 II 발현을 보여준다. 도 12f는 PD-L1 KI/B2M KO 세포에서 MHC 클래스 II 발현을 보여준다.

도 13은 TC1133 hiPSC에서의 TXNIP gRNA 절단의 TIDE 분석을 보여준다. 가이드 T5는 엑손 1에서의 절단에 가장 적합한 것으로 보였다.

도 14는 HDR을 위한 TXNIP-CAGGS-HLA-E 공여자 벡터의 플라스미드 지도를 보여준다.

도 15는 B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI CyT49 줄기 세포의 다능성에 대한 유세포 분석을 보여준다. 상기 유래의 클론은 OCT4 및 SOX2에 대해 99% 초과 이종 양성이며, 이때 2개의 전사 인자가 다능성에 필수적이다. 클론은 또한 B2M을 발현하지 않는다. 클론은 MHC-I을 발현하지 않는다.

도 16은 B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI CyT49 줄기 세포의 다능성에 대한 유세포 분석을 보여준다. 상기 유래의 클론은 단계 6(미성숙 베타 세포)으로의 분화를 겪은 후에 PD-L1 및 HLA-E를 발현한다. IgG는 음성 대조군으로서 사용되었다.

도 17은 야생형, B2M KO, PD-L1 KI/B2M KO(V1A) 또는 TXNIP KO/HLA-E KI(V1B) hESC로부터 분화된 단계 4(PEC) 세포에서의 CHGA, PDX1 및 NKX6.1 발현의 정량적 비율(%)을 보여준다.

도 18a 및 도 18b는 TXNIP KO 세포(도 18a) 또는 TXNIP KO/HLA-E KI(V1B) 세포(도 18b)에서의 분화 시간 과정에 걸쳐 선택된 유전자 발현을 보여준다.

도 19a 및 도 19b는 CFSE 증식 검정을 이용한 T-세포 활성화에 대한 유세포 분석을 보여준다. 인간 1차 CD3+ T 세포는 야생형, B2M KO, B2M KO/PD-L1 KI 또는 B2M KO/PD-L1 KI + TXNIP KO/HLA-E KI CyT49 클론에서 유래하는 PEC와 함께 동시 배양하였다(도 19a). 도 19b에는 다양한 세포에서의 T-세포 활성화가 요약되어 있다. "CFSE-T 단독"이 대조군으로서 설정된 1-방향 ANOVA(Dunnett 다중 비교 시험에 의해 $\alpha = 0.05$). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$. n.s.=유의성 없음.

도 20은 TXNIP KO 세포로부터 분화된 세포의 분화 시간 과정에 걸쳐 선택된 유전자 발현을 보여준다.

도 21은 TXNIP KO 세포로부터 분화된 PEC 세포에서의 PDX1 및 NKX6.1 발현에 대한 유세포 분석 평가를 보여준다.

도 22는 단계 6으로의 분화 이후의 야생형("WT") 및 비절단 가이드 대조군("NCG#1") 세포와 비교하여 다양한 B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 클론("S6-V1B-H9," "S6-V1B-3B11," "S6-V1B-1G7" 및 "S6-V1B-3C2")의 형태를 보여준다.

도 23a 내지 도 23f는 단계 6으로의 분화 이후에 클론의 선택된 유전자 발현을 보여준다. 도 23a는 예시적인 B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 클론으로부터 분화된 세포의 분화 시간 과정에 걸쳐 선택된 유전자 발현을 보여준다. 도 23b 내지 도 23f는 대조군으로서의 미분화된 B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 클론("ES-V1B-H9") 및 야생형 췌도(islet)("췌도")과 함께 단계 6까지 분화된 야생형 세포("S6-Cyt49 WT"), 비절단 가이드 대조군("S6-NCG#1") 세포 및 다양한 B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 클론("S6-V1B-H9," "S6-V1B-3B11," "S6-V1B-1G7" 및 "S6-V1B-3C2")에서의 INS(도 23b), NKX6.1(도 23c), GCG(도 23d), SST(도 23e) 및 GCK(도 23f)의 유전자 발현을 보여준다.

도 24a 및 도 24b는 B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 클론으로부터 분화된 단계 6 세포에서의 INS 및 GCG 발현(도 24a) 및 INS 및 NKX6.1 발현(도 24b)에 대한 유세포 분석 평가를 보여준다.

도 25a 및 도 25b는 야생형 세포("S6-WT"), 비절단 가이드 대조군 세포("S6-NCG#1") 및 2개의 B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 클론("S6-V1B003" 및 "V1B-H9")으로부터 분화된 단계 6 세포에서의 INS 발현(도 25a) 및 NKX6.1 발현(도 25b)의 비율(%)을 보여준다.

도 26a는 상이한 집중 밀도를 갖는 클론 1(B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI) 세포로부터 분화된 단계 4

세포에서의 PDX1 및 NKX6.1 발현에 대한 유세포 분석 평가를 보여준다.

도 26b는 클론 1(B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI) 세포로부터 분화된 단계 4 세포에서의 PD-L1 및 HLA-E 발현에 대한 유세포 분석 평가를 보여준다.

도 27a 내지 도 27c는 PEC 단계까지 분화된 시드 클론의 특성분석을 보여준다. 도 27a는 형태를 보여주고, 도 27b는 분화 시간 과정에 걸쳐 선택된 유전자 발현을 보여주며, 도 27c는 분화된 개체군에서 CHGA-/NKX6.1+/PDX1+ 발현 세포의 비율(%)을 보여준다.

도 28은 TXNIP KO/HLA-E KI 클론으로부터 분화된 세포의 분화 시간 과정에 걸쳐 선택된 유전자 발현을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

I. 정의

결실: 본원에서 사용된 바와 같이, "유전적 결실" 또는 "녹아웃"이란 용어와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있는 "결실"이란 용어는 일반적으로 게놈 DNA의 부위 또는 영역이 임의의 분자 생물학 방법, 예를 들어 본원에 기술되어 있는 방법에 의해 제거되고, 예를 들어 엔도뉴클레아제 및 적어도 하나의 gRNA를 게놈 DNA의 부위에 전달함으로써 제거되는 유전자 변형을 지칭한다. 임의의 개수의 뉴클레오타이드가 결실될 수 있다. 일부 실시형태에서, 결실은 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 15개, 적어도 20개 또는 적어도 25개의 뉴클레오타이드의 제거를 수반한다. 일부 실시형태에서, 결실은 10개 내지 50개, 25개 내지 75개, 50개 내지 100개, 50개 내지 200개 또는 100개 초과 뉴클레오타이드의 제거를 수반한다. 일부 실시형태에서, 결실은 전체 표적 유전자, 예를 들어 B2M 유전자의 제거를 수반한다. 일부 실시형태에서, 결실은 표적 유전자의 일부, 예를 들어 B2M 유전자의 프로모터 및/또는 암호화 서열의 전부 또는 일부를 제거를 수반한다. 일부 실시형태에서, 결실은 표적 유전자의 전사 조절자, 예를 들어 프로모터 영역의 제거를 수반한다. 일부 실시형태에서, 결실은 암호화 영역에 의해 정상적으로 발현된 산물이 더 이상 발현되지 않거나, 절단된 형태로 발현되거나, 감소된 수준으로 발현되도록 암호화 영역의 전부 또는 일부를 제거를 수반한다. 일부 실시형태에서, 결실은 비변형 세포에 비해 유전자 발현의 감소를 초래한다.

엔도뉴클레아제: 본원에서 사용된 바와 같이, "엔도뉴클레아제"란 용어는 일반적으로 폴리뉴클레오타이드 내의 포스포디에스테르 결합을 개열하는 효소를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 DNA 폴리뉴클레오타이드 내의 포스포디에스테르 결합을 특이적으로 개열한다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화자 유사 효소기 뉴클레아제(TALEN), 호밍 엔도뉴클레아제(HE), 메가뉴클레아제, MegaTAL 또는 CRISPR-연관 엔도뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제이다. 특정 양태에서, RNA-가이드 엔도뉴클레아제는 CRISPR 뉴클레아제, 예를 들어 II형 CRISPR Cas9 엔도뉴클레아제 또는 V형 CRISPR Cpf1 엔도뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9(Csn1 및 Csx12로도 알려져 있음), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 또는 Cpf1 엔도뉴클레아제, 또는 이들의 상동체, 이들의 자연적으로 발생하는 분자의 재조합, 이들의 코돈 최적화된 버전, 또는 이들의 변형된 버전, 또는 이들의 조합이다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 하나 이상의 단일 가닥 절단부(SSB) 및/또는 하나 이상의 이중 가닥 절단부(DSB)를 도입할 수 있다.

유전자 변형: 본원에서 사용된 바와 같이, "유전자 변형"이란 용어는 일반적으로 임의의 분자 생물학적 방법, 예를 들어 본원에 기술되어 있는 방법을 사용하여 유전적으로 편집 또는 조작되거나, 예를 들어 게놈 DNA의 부위에 엔도뉴클레아제 및 적어도 하나의 gRNA를 전달함으로써 유전적으로 편집 또는 조작된 게놈 DNA의 부위를 지칭한다. 유전자 변형의 예로는 삽입, 결실, 중복, 역위 및 전좌, 및 이들의 조합을 들 수 있다. 일부 실시형태에서, 유전자 변형은 결실이다. 일부 실시형태에서, 유전자 변형은 삽입이다. 기타 실시형태에서, 유전자 변형은 표적 유전자의 리딩 프레임이 이동하여 유전자 산물의 변형을 초래하거나 어떠한 유전자 산물도 생성하지 않도록 하는 삽입-결실 돌연변이(또는 indel)이다.

가이드 RNA(gRNA): 본원에서 사용된 바와 같이, "가이드 RNA" 또는 "gRNA"란 용어는 일반적으로 엔도뉴클레아제와 상호 작용할 수 있고, 예를 들어 이에 결합할 수 있고, 표적 게놈 부위 또는 영역에 결합 또는 혼성화할 수 있는 짧은 리보핵산을 지칭한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 단일 분자 가이드 RNA(sgRNA)이다. 일부 실시형태에서, gRNA는 스페이서 연장 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, gRNA는 tracrRNA 연장 영역을 포함할

수 있다. 일부 실시형태에서, gRNA는 단일 가닥이다. 일부 실시형태에서, gRNA는 자연적으로 발생하는 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 화학적으로 변형된 gRNA이다. 일부 실시형태에서, 화학적으로 변형된 gRNA는 화학적 변형, 예를 들어 2'-O-메틸 당 변형을 갖는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함하는 gRNA이다. 일부 실시형태에서, 화학적으로 변형된 gRNA는 변형된 핵산 골격을 포함한다. 일부 실시형태에서, 화학적으로 변형된 gRNA는 2'-O-메틸-포스포로티오에이트 잔기를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 DNA 엔도뉴클레아제와 예비-복합체화될 수 있다.

[0028] **삽입:** 본원에서 사용된 바와 같이, "유전적 삽입" 또는 "녹인"이란 용어와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있는 "삽입"이란 용어는 일반적으로 폴리뉴클레오타이드가 임의의 분자 생물학적 방법, 예를 들어 본원에 기술되어 있는 방법에 의해 게놈 DNA의 부위 또는 영역에 도입 또는 부가되고, 예를 들어 게놈 DNA의 부위에 엔도뉴클레아제 및 적어도 하나의 gRNA를 전달함으로써 게놈 DNA의 부위 또는 영역에 도입 또는 부가되는 유전자 변형을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 삽입은 이전의 유전자 변형 부위, 예를 들어 결실 또는 삽입-결실 돌연변이 부위였던 게놈 DNA의 부위 내부 또는 부근에서 발생할 수 있다. 일부 실시형태에서, 삽입은 이전의 유전자 변형 부위, 예를 들어 결실 또는 삽입-결실 돌연변이 부위와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된 게놈 DNA의 부위에서 발생한다. 일부 실시형태에서, 삽입은 안전 하버 유전자위(safe harbor locus)에서 발생한다. 일부 실시형태에서, 삽입은 관심 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 도입을 수반한다. 일부 실시형태에서, 삽입은 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 도입을 수반한다. 일부 실시형태에서, 삽입은 생존 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 도입을 수반한다. 일부 실시형태에서, 삽입은 외생성 프로모터, 예를 들어 항시적 프로모터(예를 들어, CAG 프로모터)의 도입을 수반한다. 일부 실시형태에서, 삽입은 비암호화 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 도입을 수반한다. 일반적으로, 삽입될 폴리뉴클레오타이드는 삽입 부위에서 또는 그 부근에서 게놈 DNA와 실질적인 서열 상동성을 갖는 서열(예를 들어, 상동성 아암)이 측면에 있다.

[0029] **주요 조직 적합성 복합체 클래스 I(MHC-I):** 본원에서 사용된 바와 같이, "주요 조직 적합성 복합체 클래스 I" 또는 "MHC-I"이란 용어는 일반적으로 포유동물, 예를 들어 인간을 포함하는 척추동물에서 모든 핵 형성 세포의 세포 표면에서 발견되고; 면역 반응을 자극하기 위해 세포 내부(즉, 세포액)로부터 세포 독성 T 세포, 예를 들어 CD8+ T 세포로 비자가 또는 외래 항원, 예를 들어 단백질의 펩타이드를 보여주도록 기능하는 부류의 생체 분자를 지칭한다. 일부 실시형태에서, MHC-I 생체 분자는 MHC-I 유전자 또는 MHC-I 단백질이다. MHC-I 단백질과 베타-2 마이크로글로불린(B2M) 단백질과의 복합체화는 모든 MHC-I 단백질의 세포 표면 발현에 요구된다. 일부 실시형태에서, 비변형 세포에 비해 MHC-I 인간 백혈구 항원(HLA)의 발현의 감소는 MHC-I 유전자의 발현에서의 감소(또는 저감)를 수반한다. 일부 실시형태에서, 비변형 세포에 비해 MHC-I 인간 백혈구 항원(HLA)의 발현의 감소는 MHC-I 단백질의 세포 표면 발현에서의 감소(또는 저감)를 수반한다. 일부 실시형태에서, MHC-I 생체 분자는 HLA-A(NCBI 유전자 ID 번호: 3105), HLA-B(NCBI 유전자 ID 번호: 3106), HLA-C(NCBI 유전자 ID 번호: 3107) 또는 B2M(NCBI 유전자 ID 번호: 567)이다.

[0030] **주요 조직 적합성 복합체 클래스 II (MHC-II):** 본원에서 사용된 바와 같이, "주요 조직 적합성 복합체 클래스 II" 또는 "MHC-II"란 용어는 일반적으로 포유동물, 예를 들어 인간을 포함하는 척추동물에서 항원 제시 세포의 세포 표면에서 전형적으로 발견되고; 면역 반응을 자극하기 위해 세포 외부(세포 외)로부터 세포 독성 T 세포, 예를 들어 CD8+ T 세포에 비자가 또는 외래 항원, 예를 들어 단백질의 펩타이드를 보여주도록 기능하는 부류의 생체 분자를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 항원 제시 세포는 수지상 세포, 대식세포 또는 B 세포이다. 일부 실시형태에서, MHC-II 생체 분자는 MHC-II 유전자 또는 MHC-II 단백질이다. 일부 실시형태에서, 비변형 세포에 비해 MHC-II 인간 백혈구 항원(HLA)의 발현의 감소는 MHC-II 유전자의 발현에서의 감소(또는 저감)를 수반한다. 일부 실시형태에서, 비변형 세포에 비해 MHC-II 인간 백혈구 항원(HLA)의 발현의 감소는 MHC-II 단백질의 세포 표면 발현에서의 감소(또는 저감)를 수반한다. 일부 실시형태에서, MHC-II 생체 분자는 HLA-DPA(NCBI 유전자 ID 번호: 3113), HLA-DPB(NCBI 유전자 ID 번호: 3115), HLA-DMA(NCBI 유전자 ID 번호: 3108), HLA-DMB(NCBI 유전자 ID 번호: 3109), HLA-DOA(NCBI 유전자 ID 번호: 3111), HLA-DOB(NCBI 유전자 ID 번호: 3112), HLA-DQA(NCBI 유전자 ID 번호: 3117), HLA-DQB(NCBI 유전자 ID 번호: 3119), HLA-DRA(NCBI 유전자 ID 번호: 3122) 또는 HLA-DRB(NCBI 유전자 ID 번호: 3123)이다.

[0031] **폴리뉴클레오타이드:** 본원에서 사용된 바와 같이, "핵산"이란 용어와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있는 "폴리뉴클레오타이드"란 용어는 일반적으로 2개 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 생체 분자를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 적어도 2개, 적어도 5개, 적어도 10개, 적어도 20개, 적어도 30개, 적어도 40개, 적어도 50개, 적어도 100개, 적어도 200개, 적어도 250개, 적어도 500개 또는 임의의 개수의 뉴클레오타이드

드를 포함한다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는 적어도 500개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 600개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 700개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 800개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 900개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 1,000개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 2,000개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 3,000개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 4,000개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 4,500개의 뉴클레오타이드 또는 적어도 약 5,000개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 DNA 또는 RNA 분자 또는 혼성 DNA/RNA 분자일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 게놈 DNA의 부위 또는 영역이다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 비변형 세포 또는 보편적 공여자 세포의 게놈 내에 포함된 내생 유전자이다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 게놈 DNA 내에 통합되지 않은 외생 폴리뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 게놈 DNA 내에 통합된 외생 폴리뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 플라스미드 또는 아데노-연관 바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 원형 또는 선형 분자이다.

[0032] **안전 하버 유전자위:** 본원에서 사용된 바와 같이, "안전 하버 유전자위"란 용어는 일반적으로 세포에 대한 악영향 없이 게놈 DNA의 임의의 위치, 부위 또는 영역 내로의 유전적 삽입을 수용할 수 있는 게놈 DNA의 임의의 위치, 부위 또는 영역을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 안전 하버 유전자위는 유전자 내 또는 유전자 외 영역이다. 일부 실시형태에서, 안전 하버 유전자위는 전형적으로 전사적으로 비활성인 게놈 DNA의 영역이다. 일부 실시형태에서, 안전 하버 유전자위는 AAVS1(PPP1 R12C), ALB, Angptl3, ApoC3, ASGR2, CCR5, FIX(F9), G6PC, Gys2, HGD, Lp(a), Pcsk9, Serpina1, TF 또는 TTR 유전자위이다. 일부 실시형태에서, 안전 하버 유전자위는 문헌[Sadelain, M. *et al.*, "Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome," *Nature Reviews Cancer*, 2012, Vol 12, pages 51~58]에 기술되어 있다.

[0033] **안전 스위치:** 본원에서 사용된 바와 같이, "안전 스위치"란 용어는 일반적으로 세포가 세포 사멸(apoptosis)을 겪도록 하는 생체 분자를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 단백질 또는 유전자이다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 자살 유전자이다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치, 예를 들어 단순 포진 바이러스 티미딘 키나아제(HSV-tk)는 전구약물, 예를 들어 간시클로비르(ganciclovir)를 대사시킴으로써 세포가 세포 사멸을 겪도록 한다. 일부 실시형태에서, 단독으로 안전 스위치의 과발현된 존재로 인해 세포는 세포 사멸을 겪게 된다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 p53-기반 분자, HSV-tk 또는 유도성 카스파아제-9이다.

[0034] **개체:** 본원에서 사용된 바와 같이, "개체"란 용어는 포유동물을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 개체는 비인간 영장류 또는 설치류이다. 일부 실시형태에서, 개체는 인간이다. 일부 실시형태에서, 개체는 질병 또는 질환을 갖거나 갖는 것으로 의심되거나, 이의 위험성이 있다. 일부 실시형태에서, 개체는 질병 또는 질환의 하나 이상의 증상을 갖는다.

[0035] **생존 인자:** 본원에서 사용된 바와 같이, "생존 인자"란 용어는 일반적으로 세포에서 증가 또는 감소되는 경우에 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포가 비변형 세포에 비해 숙주 개체에 대한 이식 또는 생착 이후에 보다 높은 생존율로 생존할 수 있도록 하는 단백질(예를 들어, 본원에 기술되어 있는 바와 같은 폴리뉴클레오타이드에 의해 발현됨)을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 생존 인자는 인간 생존 인자이다. 일부 실시형태에서, 생존 인자는 세포 생존에 관련된 중요한 경로의 구성원이다. 일부 실시형태에서, 세포 생존에 관련된 중요한 경로는 저산소증, 반응성 산소 종, 영양소 고갈 및/또는 산화 스트레스에 영향을 미친다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 생존 인자의 유전자 변형, 예를 들어 결실 또는 삽입은 보편적 공여자 세포가 생착 후 비변형 세포보다 더 긴 기간 동안, 예를 들어 적어도 1.05배, 적어도 1.1배, 적어도 1.25배, 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배 또는 적어도 50배 더 긴 기간 동안 생존할 수 있도록 한다. 일부 실시형태에서, 생존 인자는 ZNF143(NCBI 유전자 ID 번호: 7702), TXNIP(NCBI 유전자 ID 번호: 10628), FOXO1(NCBI 유전자 ID 번호: 2308), JNK(NCBI 유전자 ID 번호: 5599) 또는 MANF(NCBI 유전자 ID 번호: 7873)이다. 일부 실시형태에서, 생존 인자는 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포 내에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 생존 인자는 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포로부터 결실된다. 일부 실시형태에서, MANF를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입은 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포가 비변형 세포에 비해 숙주 개체 내로의 이식 또는 생착 이후에 보다 높은 생존율로 생존할 수 있도록 한다. 일부 실시형태에서, ZNF143, TXNIP, FOXO1 또는 JNK 유전자 내부 또는 부근에서의 결실 또는 삽입-결실 돌연변이는 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포가 비변형 세포에 비해 숙주 개체 내로의 이식 또는 생착 이후에 보다 높은 생존율로 생존할 수 있도록 한다.

[0036] **관용원성 인자:** 본원에서 사용된 바와 같이, "관용원성 인자"란 용어는 일반적으로 세포에서 증가 또는 감소되는 경우에 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포가 비변형 세포에 비해 숙주 개체 내로의 이식 또는 생착 이후에 보다 높은 비율로 면역 거부를 억제 또는 회피할 수 있도록 하는 단백질(예를 들어, 본원에 기술되어 있는 바와

같은 폴리뉴클레오타이드에 의해 발현됨)을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 인간 관용원성 인자이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 관용원성 인자의 유전자 변형(예를 들어, 적어도 하나의 관용원성 인자의 삽입 또는 결실)은 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포가 생착 후 비변형 세포보다 적어도 1.05배, 적어도 1.1배, 적어도 1.25배, 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배 또는 적어도 50배 더 높은 비율로 면역 거부를 억제 또는 회피할 수 있도록 한다. 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 HLA-E(NCBI 유전자 ID 번호: 3133), HLA-G(NCBI 유전자 ID 번호: 3135), CTLA-4(NCBI 유전자 ID 번호: 1493), CD47(NCBI 유전자 ID 번호: 961) 또는 PD-L1(NCBI 유전자 ID 번호: 29126)이다. 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포 내로 삽입된다. 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포로부터 결실된다. 일부 실시형태에서, HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47 및/또는 PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입은 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포가 숙주 개체 내로의 이식 또는 생착 이후에 면역 거부를 억제 또는 회피할 수 있도록 한다.

[0037] **MHC-I 또는 MHC-II의 전사 조절자:** 본원에서 사용된 바와 같이, "MHC-I 또는 MHC-II의 전사 조절자"란 용어는 일반적으로 MHC-I 및/또는 MHC-II 인간 백혈구 항원의 발현을 조절하는, 예를 들어 증가 또는 감소시키는 생체 분자를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 생체 분자는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 유전자 또는 단백질이다. 일부 실시형태에서, MHC-I 또는 MHC-II의 전사 조절자는 적어도 하나의 MHC-I 또는 MHC-II 단백질의 세포 표면 발현을 증가 또는 감소시킬 것이다. 일부 실시형태에서, MHC-I 또는 MHC-II의 전사 조절자는 적어도 하나의 MHC-I 또는 MHC-II 유전자의 발현을 증가 또는 감소시킬 것이다. 일부 실시형태에서, 전사 조절자는 CIITA(NCBI 유전자 ID 번호: 4261) 또는 NLRC5(NCBI 유전자 ID 번호: 84166)이다. 일부 실시형태에서, CIITA 또는 NLRC5의 발현의 결실 또는 감소는 적어도 하나의 MHC-I 또는 MHC-II 유전자의 발현을 감소시킨다.

[0038] **보편적 공여자 세포:** 본원에서 사용된 바와 같이, "보편적 공여자 세포"란 용어는 일반적으로 비변형 세포에 비해 세포 이식 동안 동종이체 거부에 덜 민감하고/하거나 이식 후 증가된 생존을 나타내는 유전자 변형 세포를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술되어 있는 바와 같은 유전자 변형 세포는 보편적 공여자 세포이다. 일부 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 비변형 세포와 비교하여 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는다. 일부 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 비변형 세포와 비교하여 증가된 세포 생존을 갖는다. 일부 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 줄기 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 배아 줄기 세포(ESC), 성체 줄기 세포(ASC), 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC) 또는 조혈 줄기 또는 전구 세포(HSPC)(조혈 줄기 세포(HSC)로도 지칭됨)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 분화된 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 체세포(예를 들어, 면역계 세포)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 개체에 투여된다. 일부 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 질병을 갖거나 갖는 것으로 의심되거나, 이의 위험성이 있는 개체에 투여된다. 일부 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 계통-제한된 전구 세포 또는 완전히 분화된 체세포로 분화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 계통-제한된 전구 세포는 체장 내배엽 전구체, 체장 내분비 전구체, 간엽성 전구 세포, 근육 전구 세포, 아세포, 조혈 전구 세포 또는 신경 전구 세포이다. 일부 실시형태에서, 완전히 분화된 체세포는 내분비성 분비 세포(예를 들어, 체장 베타 세포), 상피 세포, 내배엽 세포, 대식세포, 간세포, 지방세포, 신장 세포, 혈액 세포 또는 면역계 세포이다. 일부 실시형태에서, 완전 분화된 체세포는 심근세포이다.

[0039] **비변형 세포:** 본원에서 사용된 바와 같이, "비변형 세포"란 용어는 MHC-I, MHC-I, MHC-I 또는 MHC-II의 전사 조절자, 생존 인자 및/또는 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 유전자를 수반하는 유전자 변형이 가해지지 않은 세포를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 비변형 세포는 줄기 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 비변형 세포는 배아 줄기 세포(ESC), 성체 줄기 세포(ASC), 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC) 또는 조혈 줄기 또는 전구 세포(HSPC)(조혈 줄기 세포(HSC)로도 지칭됨)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 비변형 세포는 분화된 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 비변형 세포는 체세포(예를 들어, 면역계 세포, 예를 들어 T 세포, 예를 들어 CD8+ T 세포)로부터 선택될 수 있다. 보편적 공여자 세포가 "비변형 세포에 대해" 비교되면, 보편적 공여자 세포 및 비변형 세포는 동일한 세포 유형이거나 공통의 부모 세포주를 공유하며, 예를 들어 보편적 공여자 iPSC는 비변형 iPSC에 대해 비교된다.

[0040] **유전자 내부 또는 부근:** 본원에서 사용된 바와 같이, "유전자 내부 또는 부근"이란 용어는 상기 유전자의 인트론성 또는 엑스트론성 성분이거나 상기 유전자 근위에 위치한 게놈 DNA의 부위 또는 영역을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 게놈 DNA의 부위가 상기 유전자의 인트론 또는 엑손의 적어도 일부를 포함하면 이는 유전자 내부에 있는 것이다. 일부 실시형태에서, 유전자 부근에 위치한 게놈 DNA의 부위는 상기 유전자의 5' 또는 3' 말단(예를 들어, 상기 유전자의 암호화 영역의 5' 또는 3' 말단)에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 유전자 부근에

위치한 게놈 DNA의 부위는 상기 유전자의 발현을 조절하는 프로모터 영역 또는 억제자 영역일 수 있다. 일부 실시형태에서, 유전자 부근에 위치한 게놈 DNA의 부위는 상기 유전자와 동일한 염색체 상에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 게놈 DNA의 부위 또는 영역이 상기 유전자의 5' 또는 3' 말단(예를 들어, 상기 유전자의 암호화 영역의 5' 또는 3' 말단)에 50 Kb, 40 Kb, 30 Kb, 20 Kb, 10 Kb, 5 Kb, 1 Kb 내에 있거나, 이에 더 가깝게 있으면 이는 유전자 근처에 있다는 것이다.

II. 게놈 편집 방법

게놈 편집은 일반적으로 게놈의 뉴클레오타이드 서열을 바람직하게는 정확한 방식 또는 소정의 방식으로 변형시키는 과정을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술되어 있는 바와 같은 게놈 편집 방법, 예를 들어 CRISPR-엔도뉴클레아제 시스템은, 예를 들어 본원에 기술되어 있는 바와 같은 세포를 유전자 변형시켜 보편적 공여자 세포를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 기술되어 있는 바와 같은 게놈 편집 방법, 예를 들어 CRISPR-엔도뉴클레아제 시스템은, 예를 들어 본원에 기술되어 있는 바와 같은 세포를 유전자 변형시켜 비변형 세포에 비해 하나 이상의 MHC-I 및/또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 기타 성분의 발현을 감소시키는 적어도 하나의 유전자 내부 또는 부근에 적어도 하나의 유전자 변형을 도입하기 위해; 비변형 세포에 비해 관용원성 인자를 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드의 발현을 증가시키는 적어도 하나의 유전자 변형을 도입하기 위해; 및/또는 비변형 세포에 비해 생존 인자를 암호화하는 적어도 하나의 유전자의 발현을 증가 또는 감소시키는 적어도 하나의 유전자 변형을 도입하기 위해 사용될 수 있다.

본원에 기술되어 있는 게놈 편집 방법의 예로는 게놈 내의 정확한 표적 위치에서 데옥시리보핵산(DNA)을 절단하여 게놈 내부의 특정 위치에서 단일 가닥 또는 이중 가닥 DNA 절단부를 생성하기 위해 부위-지정 뉴클레아제를 사용하는 방법을 들 수 있다. 이 같은 절단부는, 문헌[Cox *et al.*, "Therapeutic genome editing: prospects and challenges," *Nature Medicine*, 2015, 21(2), 121~31]에 기술되어 있는 바와 같이, 천연의 내생성 세포 과정, 예를 들어 상동성-유도 보수(HDR: homology-directed repair) 및 비상동성 말단 연결(NHEJ)에 의해 보수될 수 있고 정기적으로 보수된다. 이들 2개의 주요 DNA 보수 과정은 일군의 대안적인 경로로 이루어진다. NHEJ는 종종 유전자 발현을 파괴 또는 향상시킬 수 있는 뉴클레오타이드 서열의 소실 또는 부가에 의해 이중 가닥 절단 부로부터 생기는 DNA 말단을 직접 연결한다. HDR은 절단점에서 한정된 DNA 서열을 삽입하기 위한 주형으로서 상동성 서열 또는 공여자 서열을 이용한다. 상동성 서열은 내생성 게놈, 예를 들어 자매 염색분체 내에 있을 수 있다. 대안적으로, 공여자 서열은, 뉴클레아제-개열된 유전자위와 높은 상동성을 갖는 영역(예를 들어, 좌측 및 우측 상동성 아암)을 갖지만, 추가적인 서열, 또는 개열된 표적 유전자위 내에 혼입될 수 있는 결실을 포함하는 서열 변화를 또한 함유할 수 있는, 외생성 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 플라스미드, 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드, 이중 가닥 올리고뉴클레오타이드, 듀플렉스 올리고뉴클레오타이드 또는 바이러스일 수 있다. 제3 보수 기전은, 개열 부위에서 작은 결실 및 삽입이 발생할 수 있다는 점에서 유전적 결과가 NHEJ와 유사한 미세 상동성-매개 말단 연결(MMEJ: microhomology-mediated end joining; "대안적인 NHEJ"라고도 지칭됨)일 수 있다. MMEJ는 보다 선호되는 DNA 말단 연결 보수 결과를 유도하도록 DNA 절단 부위 측면에 있는 몇몇 염기쌍의 상동성 서열을 이용할 수 있고, 최근의 보고에서는 이러한 과정의 분자 기전이 추가로 설명되어 있다; 예를 들어 문헌[Cho and Greenberg, *Nature*, 2015, 518, 174~76]; 문헌[Kent *et al.*, *Nature Structural and Molecular Biology*, 2015, 22(3): 230~7]; 문헌[Mateos-Gomez *et al.*, *Nature*, 2015, 518, 254~57]; 문헌[Ceccaldi *et al.*, *Nature*, 2015, 528, 258~62]을 참조한다. 일부의 경우, DNA 절단부의 부위에서 잠재적인 미세 상동성의 분석에 기초한 가능한 보수 결과를 예측하는 것이 가능할 수 있다.

이들 게놈 편집 기전 각각은 목적하는 유전자 변형을 생성하기 위해 사용될 수 있다. 게놈 편집 과정에서의 단계는 의도된 돌연변이의 부위 부근과 같은 표적 유전자위 내에서의 1개 또는 2개의 DNA 절단부를 생성할 수 있으며, 후자의 2개의 DNA 절단부는 이중 가닥 절단부 또는 2개의 단일 가닥 절단부로서 생성된다. 이는 본원에 기술되고 예시되어 있는 바와 같이 엔도뉴클레아제의 사용을 통해 달성될 수 있다.

CRISPR 엔도뉴클레아제 시스템

CRISPR-엔도뉴클레아제 시스템은 유전자 편집에 사용된 RNA-가이드 DNA-표적화 플랫폼으로서 다른 용도에 맞게 고쳐진 원핵생물에서의 자연적으로 발생하는 방어 기전이다. CRISPR 시스템은 I형, II형, III형, IV형, V형 및 VI형 시스템을 포함한다. 일부 양태에서, CRISPR 시스템은 II형 CRISPR/Cas9 시스템이다. 기타 양태에서, CRISPR 시스템은 V형 CRISPR/Cpf1 시스템이다. CRISPR 시스템은 - DNA의 개열을 표적화하기 위해 - DNA 엔도뉴클레아제, 예를 들어 Cas9, 및 crisprRNA(crRNA) 및 트랜스-활성화 RNA(tracrRNA)의 2개의 비암호화 RNA에 의

존한다.

- [0047] crRNA는 전형적으로 표적 DNA 내의 대략 20개의 뉴클레오타이드(nt) 서열과 왓슨-클릭(Watson-Crick) 염기쌍 형성을 통해 CRISPR-엔도뉴클레아제 복합체의 서열 인식 및 특이성을 유도한다. crRNA 내의 5' 20 nt의 서열을 변경하면 특이적 유전자위에 대한 CRISPR-엔도뉴클레아제 복합체의 표적화가 가능하게 된다. 표적 서열 다음에 프로토스페이스 인접 모티프(PAM: protospacer adjacent motif)로 지칭되는 특이적 짧은 DNA 모티프(서열 NGG를 가짐)가 있으면 CRISPR-엔도뉴클레아제 복합체는 단일-가이드 RNA(sgRNA)의 최초 20개의 nt에 대한 서열 매치를 함유하는 DNA 서열에만 결합한다.
- [0048] tracrRNA는 촉매적으로 활성인 CRISPR-엔도뉴클레아제 복합체를 형성하기 위해 엔도뉴클레아제에 의해 결합된 RNA-듀플렉스 구조를 형성하기 위해 crRNA의 3' 말단과 혼성화하고, 이는 이어서 표적 DNA를 개열할 수 있다.
- [0049] CRISPR-엔도뉴클레아제 복합체가 표적 부위에서 DNA에 결합되면, 엔도뉴클레아제 내부의 2개의 독립적인 뉴클레아제 도메인은 각각 PAM 부위에서 3개의 염기 상류에 있는 DNA 가닥 중 하나를 개열하여, 이중 가닥 절단부(DSB)를 남기며, 여기서 DNA의 가닥 둘 다는 염기쌍으로 종료된다(무딘 말단).
- [0050] 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 Cas9(CRISPR-연관 단백질 9)이다. 일부 실시형태에서, Cas9 엔도뉴클레아제는 스트렙토코커스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)에서 유래한 것이지만, 기타 Cas9 상동체, 예를 들어 *S. 아우레우스*(*S. aureus*) Cas9, *N. 메닝기티디스*(*N. meningitidis*) Cas9, *S. 썬모필루스*(*S. thermophilus*) CRISPR 1 Cas9, *S. 썬모필루스* CRISPR 3 Cas9 또는 *T. 덴티콜라*(*T. denticola*) Cas9가 사용될 수 있다. 기타의 경우, CRISPR 엔도뉴클레아제는 Cpf1, 예를 들어 *L. 박테륨*(*L. bacterium*) ND2006 Cpf1 또는 액시다미노코커스 종(*Acidaminococcus* sp.) BV3L6 Cpf1이다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9(Csn1 및 Csx12로도 알려져 있음), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 또는 Cpf1 엔도뉴클레아제이다. 일부 실시형태에서, 야생형 변이체가 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 이전의 엔도뉴클레아제의 변형된 버전(예를 들어, 이의 상동체, 이의 자연적으로 발생하는 분자의 재조합, 이의 코돈 최적화된 버전 또는 이의 변형된 버전)을 사용할 수 있다.
- [0051] CRISPR 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호(NLS)에 연결될 수 있다. 적어도 하나의 NLS는 CRISPR 뉴클레아제의 아미노 말단의 50개의 아미노산에 또는 그 내부에 위치할 수 있고/있거나, 적어도 하나의 NLS는 CRISPR 뉴클레아제의 카복시 말단의 50개의 아미노산에 또는 그 내부에 위치할 수 있다.
- [0052] 예시적인 CRISPR/Cas 폴리펩타이드는 문헌[Fonfara *et al.*, "Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems," *Nucleic Acids Research*, 2014, 42: 2577~2590]에 공개된 바와 같은 Cas9 폴리펩타이드를 포함한다. CRISPR/Cas 유전자 명명 시스템은 Cas 유전자가 발견된 이후로 광범위하게 재표기되어 왔다. 또한, Fonfara 등은 다양한 종으로부터의 Cas9 폴리펩타이드에 대한 PAM 서열을 제공한다.
- [0053] 징크 핑거 뉴클레아제
- [0054] 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)는 II형 엔도뉴클레아제 FokI의 촉매 도메인에 연결된 조작된 징크 핑거 DNA 결합 도메인으로 구성된 모듈식 단백질이다. FokI가 이량체로서만 기능하기 때문에 한 쌍의 ZFN은 촉매적으로 활성인 FokI 이량체가 형성할 수 있도록 하는 이들 사이의 정확한 간격으로 반대의 DNA 가닥 상의 동족 표적 "절반-부위" 서열에 결합하도록 조작되어야 한다. 특히 그 자체가 서열 특이성을 갖지 않는 FokI 도메인의 이량체화 시, DNA 이중 가닥 절단부는 게놈 편집에서의 개시 단계로서 ZFN 절반-부위 사이에 생성된다.
- [0055] 제4 뉴클레오타이드와의 가닥간 상호 작용이 또한 중요할 수 있지만, 각각의 ZFN의 DNA 결합 도메인은 전형적으로 풍부한 Cys2-His2 구성의 3개 내지 6개의 징크 핑거로 구성되며, 여기서 각각의 핑거는 주로 표적 DNA 서열의 하나의 가닥 상의 뉴클레오타이드의 트리플렛(triplet)을 인식한다. DNA와 중요하게 접촉하는 위치에서의 핑거의 아미노산의 변경은 주어진 핑거의 서열 특이성을 변경한다. 따라서, 핑거가 4개인 징크 핑거 단백질은 12 bp의 표적 서열을 선택적으로 인식할 것이고, 여기서 표적 서열은 각각의 핑거가 기여하는 트리플렛 선호도를 갖는 복합체이지만, 트리플렛 선호도는 이웃하는 핑거에 의해 다양한 정도로 영향을 받을 수 있다. ZFN의 중요한 양태는, 이들이 단순히 개별 핑거를 변형시킴으로써 거의 모든 게놈 주소에 용이하게 재표적화될 수 있다는 것이다. 대부분의 ZFN 적용에서, 4개 내지 6개의 핑거를 갖는 단백질이 사용되어 12 bp 내지 18 bp를 각각 인식한다. 그러므로, 한 쌍의 ZFN은 전형적으로 절반-부위 사이에 전형적인 5 bp 내지 7 bp의 스페이서를 포함하지

않는 24 bp 내지 36 bp의 조합된 표적 서열을 인식할 것이다. 결합 부위는 15 bp 내지 17 bp를 포함하는 보다 큰 스페이스에 의해 추가로 분리될 수 있다. 반복 서열 또는 유전자 상동체가 설계 과정 동안 배제된다는 것을 고려하면 이러한 길이를 갖는 표적 서열은 인간 게놈에서 고유한 것일 가능성이 있다. 그럼에도 불구하고, ZFN 단백질-DNA 상호 작용이 특이성 측면에서 절대적인 것은 아니어서, 오프-표적 결합 및 개열 사건이 2개의 ZFN 사이의 이중이량체로서 또는 ZFN 중 하나 또는 다른 것의 동종이량체로서 발생한다. 후자의 가능성은 서로 이량체화하지만, 자체와는 이량체화하지 않을 수 있는 필수적인 이중이량체 변이체로도 알려져 있는 "플러스" 및 "마이너스" 변이체를 생성하도록 FokI 도메인의 이량체화 계면을 조작함으로써 효과적으로 제거된다. 필수적인 이중이량체의 강제(forcing)는 동종이량체의 형성을 방지한다. 이는 ZFN, 및 이들 FokI 변이체를 채택하는 임의의 기타 뉴클레아제의 크게 향상된 특이성을 갖는다.

[0056] 다양한 ZFN-기반 시스템은 당해 기술분야에 기술되어 있고, 이의 변형은 정기적으로 보고된 바 있고, 많은 참고 문헌에는 ZFN의 설계를 가이딩하기 위해 사용되는 규칙 및 매개변수가 기술되어 있으며; 예를 들어 문헌[Segal *et al.*, Proc Natl Acad Sci, 1999 96(6): 2758~63]; 문헌[Dreier B *et al.*, J Mol Biol., 2000, 303(4): 489~502]; 문헌[Liu Q *et al.*, J Biol Chem., 2002, 277(6):3850~6]; 문헌[Dreier *et al.*, J Biol Chem., 2005, 280(42): 35588~97]; 및 문헌[Dreier *et al.*, J Biol Chem. 2001, 276(31): 29466~78]을 참조한다.

[0057] 전사 활성화자-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN)

[0058] TALEN은 모듈식 뉴클레아제의 다른 형식을 나타내며, 이로 인해 ZFN에서와 같이 조작된 DNA 결합 도메인은 FokI 뉴클레아제 도메인에 연결되고, 한 쌍의 TALEN은 표적화된 DNA 개열을 달성하도록 탠덤으로 작동한다. ZFN과의 주요 차이는 DNA 결합 도메인의 성질 및 연관된 표적 DNA 서열 인식 특성이다. TALEN DNA 결합 도메인은 원래 식물 박테리아 병원균인 잔토모나스 종(*Xanthomonas* sp.)에서 기술되어 있는 TALE 단백질로부터 유래된다. TALE는 33개 내지 35개의 아미노산 반복부의 탠덤 어레이로 구성되며, 각각의 반복부는 전형적으로 길이가 최대 20 bp이어서 최대 40 bp의 총 표적 서열 길이를 제공하는 표적 DNA 서열 내의 단일 염기쌍을 인식한다. 각각의 반복부의 뉴클레오타이드 특이성은 12번 및 13번 위치에서 단 2개의 아미노산을 포함하는 반복 가변 이잔기(RVD: repeat variable diresidue)에 의해 결정된다. 염기인 구아닌, 아데닌, 사이토신 및 티민은 각각 Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp 및 Asn-Gly의 4개의 RVD에 의해 주로 인식된다. 이는 징크 핑거보다 훨씬 더 단순한 인식 코드를 구성하며, 따라서 뉴클레아제 설계의 경우 후자에 비해 이점을 나타낸다. 그럼에도 불구하고, ZFN에서와 같이, TALEN의 단백질-DNA 상호 작용은 이들 특이성에 있어 절대적인 것은 아니며, TALEN은 또한 오프-표적 활성을 감소시키기 위해 FokI 도메인의 필수적인 이중 이량체 변이체의 사용으로부터 또한 이익을 얻는다.

[0059] 촉매 기능에서 비활성화되는 FokI 도메인의 추가적인 변이체가 생성되었다. TALEN 또는 ZFN 쌍 중 하나의 절반이 불활성 FokI 도메인을 함유하면, 단일 가닥 DNA 개열(닉킹)만이 DSB가 아닌 표적 부위에서 발생할 것이다. 그 결과는 Cas9 개열 도메인 중 하나가 비활성화되어 있는 CRISPR/Cas9 또는 CRISPR/Cpf1 "닉카아제" 돌연변이체의 사용에 필적한다. DNA Nick HDR에 의한 게놈 편집을 유발하기 위해 사용되지만, DSB에 의한 것보다 더 낮은 효율로 유발하기 위해 사용될 수 있다. 주요 이점은, 오프-표적 Nick NHEJ 매개 보수 오류의 경향이 있는 DSB와 달리 빠르고 정확하게 보수된다는 것이다.

[0060] 다양한 TALEN-기반 시스템은 당해 기술분야에 기술되어 있고, 이의 변형은 정기적으로 보고된 바 있으며; 예를 들어 문헌[Boch, Science, 2009 326(5959): 1509~12]; 문헌[Mak *et al.*, Science, 2012, 335(6069): 716~9]; 및 문헌[Moscou *et al.*, Science, 2009, 326(5959): 1501] 참조한다. "Golden Gate" 플랫폼, 또는 클로닝 체계에 기초한 TALEN의 사용은 다수의 그룹에 의해 기술되어 있으며; 예를 들어 문헌[Cermak *et al.*, Nucleic Acids Res., 2011, 39(12):e82]; 문헌[Li *et al.*, Nucleic Acids Res., 2011, 39(14): 6315~25]; 문헌[Weber *et al.*, PLoS One., 2011, 6(2):e16765]; 문헌[Wang *et al.*, J Genet Genomics, 2014, 41(6):339~47]; 및 문헌[Cermak T *et al.*, Methods Mol Biol., 2015 1239: 133~59]을 참조한다.

[0061] 호밍 엔도뉴클레아제

[0062] 호밍 엔도뉴클레아제(HE)는 종종 게놈에서 고유한 부위에서 긴 인식 서열(14개 내지 44개의 염기쌍)을 갖고 높은 특이성으로 DNA를 개열하는 서열-특이적 엔도뉴클레아제이다. 진핵생물류, 원핵생물류, 박테리아, 고세균, 시아노박테리아 및 파지를 포함하는 넓은 범위의 숙주로부터 유래하는 GIY-YIG, His-Cis 박스, H-N-H, PD-(D/E)xK 및 Vsr-유사를 포함하는 이들의 구조에 의해 분류된 바와 같이 적어도 6개의 알려진 HE 패밀리가 있다. ZFN 및 TALEN과 같이, HE는 게놈 편집에서의 초기 단계로서 표적 유전자위에서 DSB를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 게다가, 일부 천연 및 조작된 HE는 DNA의 단일 가닥만을 절단하여, 부위-특이적 Nick아제로서 작용한다. HE의 큰 표적 서열 및 이들이 제공하는 특이성은 이들을 부위-특이적 DSB를 생성하기 위한 매력적인 후보물질로

만들었다.

[0063] 다양한 HE-기반 시스템은 당해 기술분야에 기술되어 있고, 이의 변형은 정기적으로 보고된 바 있으며; 예를 들어 문헌[Stentoft *et al.*, Glycobiology, 2014, 24(8): 663~80]; 문헌[Belfort and Bonocora, Methods Mol Biol., 2014, 1123: 1~26]; 및 문헌[Hafez and Hausner, Genome, 2012, 55(8): 553~69]의 검토를 참조한다.

[0064] *MegaTAL/Tev-mTALEN/MegaTev*

[0065] 혼성 뉴클레아제의 추가의 예로서, MegaTAL 플랫폼 및 Tev-mTALEN 플랫폼은 TALE DNA 결합 도메인과 촉매적으로 활성인 HE의 융합을 사용하여, TALE의 조율 가능한 DNA 결합 및 특이성 둘 다, 및 HE의 개별 서열 특이성을 이용하고; 예를 들어 문헌[Boissel *et al.*, Nucleic Acids Res., 2014, 42: 2591~2601]; 문헌[Kleinstiver *et al.*, G3, 2014, 4: 1155~65]; 및 문헌[Boissel and Scharenberg, Methods Mol. Biol., 2015, 1239: 171~96]을 참조한다.

[0066] 추가의 변형에서, MegaTev 구성은 GIY-YIG 호밍 엔도뉴클레아제 I-TevI(Tev)로부터 유래하는 뉴클레아제 도메인과 메가뉴클레아제(Mega)의 융합이다. 2개의 활성 부위는 DNA 기질 상에서 약 30 bp 떨어져 위치하고, 비상용성 접착성 말단을 갖는 2개의 DSB를 생성하고; 예를 들어, 문헌[Wolfs *et al.*, Nucleic Acids Res., 2014, 42, 8816~29]을 참조한다. 기존의 뉴클레아제-기반 접근법의 기타 조합이 진화할 것이고, 본원에 기술되어 있는 표적화된 게놈 변형을 달성하는 데 유용할 것으로 기대된다.

[0067] *dCas9-FokI 또는 dCpf1-FokI 및 기타 뉴클레아제*

[0068] 상술한 뉴클레아제 플랫폼의 구조적 특성과 기능적 특성의 조합은 선천적 결핍 중 일부를 잠재적으로 극복할 수 있는 게놈 편집에 대한 추가의 접근법을 제공한다. 일례로서, CRISPR 게놈 편집 시스템은 전형적으로 DSB를 생성하기 위해 단일 Cas9 엔도뉴클레아제를 사용한다. 표적화의 특이성은 표적 DNA(및 S. 피요게네스에서 유래한 Cas9의 경우에 인접한 NAG 또는 NGG PAM 서열 내의 추가적인 2개의 염기)와의 왓슨-클릭 염기쌍 형성을 겪은 가이드 RNA 내의 20개 또는 24개의 뉴클레오타이드 서열에 의해 유도된다. 이 같은 서열은 인간 게놈에서 고유할 수 있을 정도로 충분히 길지만, RNA/DNA 상호 작용의 특이성은 상당한 혼잡성이 용인된 상태에서 특히 표적 서열의 5' 절단에서는 절대적인 것이 아니어서, 특이성을 유도하는 염기의 개수를 효과적으로 감소시킨다. 이에 대한 하나의 해결책은, RNA-가이드 DNA 결합 기능만을 보유하고, 대신에 FokI 도메인을 비활성화된 Cas9에 융합하여 Cas9 또는 Cpf1 촉매 기능을 완전히 비활성화시키는 것이었으며; 예를 들어 문헌[Tsai *et al.*, Nature Biotech, 2014, 32: 569~76]; 및 문헌[Guilinger *et al.*, Nature Biotech., 2014, 32: 577~82]을 참조한다. FokI가 촉매적으로 활성이 되도록 이량체화해야 하기 때문에 이량체를 형성하고 DNA를 개열하도록 매우 근접하게 2개의 FokI 융합을 테터링(tethering)하기 위해서 2개의 가이드 RNA가 필요하다. 이는 조합된 표적 부위 내의 염기의 개수를 본질적으로 배가시켜 CRISPR-기반 시스템에 의한 표적화의 엄격성을 증가시킨다.

[0069] 추가의 예로서, 촉매적으로 활성인 HE, 예를 들어 I-TevI에 대한 TALE DNA 결합 도메인의 융합은 오프-표적 개열이 추가로 감소할 수 있다는 기대와 함께 TALE의 조율 가능한 DNA 결합 및 특이성 둘 다를 이용할 뿐만 아니라, I-TevI의 개별 서열 특이성을 이용한다.

[0070] *RNA-가이드 엔도뉴클레아제*

[0071] 본원에서 사용된 바와 같은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 시스템은 야생형의 예시적인 엔도뉴클레아제, 예를 들어 S. 피요게네스에서 유래한 Cas9(US2014/0068797 서열 ID 번호 8 또는 문헌[Sapranaukas *et al.*, Nucleic Acids Res, 39(21): 9275~9282 (2011)])와 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 엔도뉴클레아제는 10개의 인접한 아미노산에 걸쳐 야생형 엔도뉴클레아제(예를 들어, 상기 S. 피요게네스에서 유래한 Cas9)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함할 수 있다. 엔도뉴클레아제는 10개의 인접한 아미노산에 걸쳐 야생형 엔도뉴클레아제(예를 들어, 상기 S. 피요게네스에서 유래한 Cas9)와 최대 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함할 수 있다. 엔도뉴클레아제는 엔도뉴클레아제의 HNH 뉴클레아제 도메인 내의 10개의 인접한 아미노산에 걸쳐 야생형 엔도뉴클레아제(예를 들어, 상기 S. 피요게네스에서 유래한 Cas9)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함할 수 있다. 엔도뉴클레아제는 엔도뉴클레아제의 HNH 뉴클레아제 도메인 내의 10개의 인접한 아미노산에 걸쳐 야생형 엔도뉴클레아제(예를 들어, 상기 S. 피요게네스에서 유래한 Cas9)와 최대 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 100% 동일성을 포함할 수 있다. 엔도뉴클레아제는 엔도뉴클레아제의 RuvC 뉴클레아제 도메인 내의 10개의

인접한 아미노산에 걸쳐 야생형 엔도뉴클레아제(예를 들어, 상기 S. 피요게네스에서 유래한 Cas9)와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함할 수 있다. 엔도뉴클레아제는 엔도뉴클레아제의 RuvC 뉴클레아제 도메인 내의 10개의 인접한 아미노산에 걸쳐 야생형 엔도뉴클레아제(예를 들어, 상기 S. 피요게네스에서 유래한 Cas9)와 최대 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99% 또는 100%의 동일성을 포함할 수 있다.

[0072] 엔도뉴클레아제는 야생형의 예시적인 엔도뉴클레아제의 변형된 형태를 포함할 수 있다. 야생형의 예시적인 엔도뉴클레아제의 변형된 형태는 엔도뉴클레아제의 핵산 개열 활성을 감소시키는 돌연변이를 포함할 수 있다. 야생형의 예시적인 엔도뉴클레아제의 변형된 형태는 야생형의 예시적인 엔도뉴클레아제(예를 들어, 상기 S. 피요게네스에서 유래한 Cas9)의 핵산 개열 활성의 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만 또는 1% 미만을 가질 수 있다. 엔도뉴클레아제의 변형된 형태는 실질적인 핵산 개열 활성을 갖지 않을 수 있다. 엔도뉴클레아제가 실질적인 핵산 개열 활성을 갖지 않는 변형된 형태인 경우, 이는 본원에서 "효소적 불활성"으로 지칭된다.

[0073] 고려되는 돌연변이는 치환, 부가 및 결실, 또는 임의의 이들 조합을 포함할 수 있다. 돌연변이는 돌연변이된 아미노산을 알라닌으로 전환시킨다. 돌연변이는 돌연변이된 아미노산을 다른 아미노산(예를 들어, 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 프롤린, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 리신 또는 아르기닌)으로 전환시킨다. 돌연변이는 돌연변이된 아미노산을 비천연 아미노산(예를 들어, 셀레노메티오닌)으로 전환시킨다. 돌연변이는 돌연변이된 아미노산을 아미노산 모방체(예를 들어, 포스포모방체)로 전환시킨다. 돌연변이는 보존적 돌연변이일 수 있다. 예를 들어, 돌연변이는 돌연변이된 아미노산을 돌연변이된 아미노산(예를 들어, 시스테인/세린 돌연변이, 리신/아스파라긴 돌연변이, 히스티딘/페닐알라닌 돌연변이)의 크기, 형상, 전하, 극성, 형태 및/또는 회전 이성질체를 닮은 아미노산으로 전환시킨다. 돌연변이는 리딩 프레임에서의 이동 및/또는 조기 중지 코돈의 생성을 야기할 수 있다. 돌연변이는 하나 이상의 유전자의 발현에 영향을 미치는 유전자 또는 유전자위의 조절 영역에 대한 변화를 야기할 수 있다.

[0074] 가이드 RNA

[0075] 본 개시내용은 폴리뉴클레오타이드 내부의 특이적 표적 부위로 연관된 엔도뉴클레아제의 활성을 유도할 수 있는 가이드 RNA(gRNA)를 제공한다. 가이드 RNA는 관심 표적 핵산 서열 및 CRISPR 반복 서열에 혼성화하는 적어도 하나의 스페이서 서열을 포함할 수 있다. CRISPR II형 시스템에서, gRNA는 또한 tracrRNA 서열로 지칭되는 제2 RNA를 포함한다. CRISPR II형 가이드 RNA(gRNA)에서, CRISPR 반복 서열 및 tracrRNA 서열은 서로에 혼성화하여 듀플렉스를 형성한다. CRISPR V형 시스템에서, gRNA는 듀플렉스를 형성하는 crRNA를 포함한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 gRNA 및 엔도뉴클레아제가 복합체를 형성하도록 엔도뉴클레아제와 결합할 수 있다. gRNA는 엔도뉴클레아제와의 이의 회합으로 인해 복합체에 표적 특이성을 제공할 수 있다. 따라서 게놈-표적화 핵산은 엔도뉴클레아제의 활성을 유도할 수 있다.

[0076] 예시적인 가이드 RNA는 15개 내지 200개의 뉴클레오타이드를 포함하는 스페이서 서열을 포함하며, 여기서 gRNA는 GRCh38 인간 게놈 조립체에 기초하여 게놈 위치를 표적화한다. 당업자가 이해한 바와 같이, 각각의 gRNA는 이의 게놈 표적 부위 또는 영역에 상보적인 스페이서 서열을 포함하도록 설계될 수 있다. 문헌[Jinek *et al.*, Science, 2012, 337, 816~821] 및 문헌[Deltcheva *et al.*, Nature, 2011, 471, 602~607]을 참조한다.

[0077] gRNA는 이중-분자 가이드 RNA일 수 있다. gRNA는 단일-분자 가이드 RNA일 수 있다.

[0078] 이중-분자 가이드 RNA는 RNA의 2개의 가닥을 포함할 수 있다. 제1 가닥은 5'에서 3' 방향으로 선택적인 스페이서 연장 서열, 스페이서 서열 및 최소 CRISPR 반복 서열을 포함한다. 제2 가닥은 최소 tracrRNA 서열(최소 CRISPR 반복 서열에 상보적임), 3' tracrRNA 서열 및 선택적인 tracrRNA 연장 서열을 포함할 수 있다.

[0079] 단일-분자 가이드 RNA(sgRNA)는 5'에서 3' 방향으로 선택적인 스페이서 연장 서열, 스페이서 서열, 최소 CRISPR 반복 서열, 단일-분자 가이드 링커, 최소 tracrRNA 서열, 3' tracrRNA 서열 및 선택적인 tracrRNA 연장 서열을 포함할 수 있다. 선택적인 tracrRNA 연장은 가이드 RNA에 추가의 기능성(예를 들어, 안정성)을 기여하는 요소를 포함할 수 있다. 단일-분자 가이드 링커는 최소 CRISPR 반복부 및 최소 tracrRNA 서열을 연결하여 헤어핀 구조를 형성할 수 있다. 선택적인 tracrRNA 연장은 하나 이상의 헤어핀을 포함할 수 있다.

[0080] 일부 실시형태에서, sgRNA는 sgRNA 서열의 5' 말단에서 20개의 뉴클레오타이드 스페이서 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 sgRNA 서열의 5' 말단에서 20개 미만의 뉴클레오타이드 스페이서 서열을 포함한다. 일부

실시형태에서, sgRNA는 sgRNA 서열의 5' 말단에서 20개 초과 뉴클레오타이드 스페이스 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 sgRNA 서열의 5' 말단에서 17개 내지 30개의 뉴클레오타이드를 갖는 가변 길이 스페이스 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 1개, 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 120개, 140개, 160개, 180개 또는 200개 초과 뉴클레오타이드 길이를 갖는 스페이스 연장 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 3개, 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개 또는 100개의 미만의 뉴클레오타이드 길이를 갖는 스페이스 연장 서열을 포함한다.

[0081] 일부 실시형태에서, sgRNA는 다른 모이어티(예를 들어, 안정성 제어 서열, 엔도리보뉴클레아제 결합 서열 또는 리보자임)를 포함하는 스페이스 연장 서열을 포함한다. 모이어티는 핵산 표적화 핵산의 안정성을 감소 또는 증가시킬 수 있다. 모이어티는 전사 종결자 분절(즉, 전사 종결 서열)일 수 있다. 모이어티는 진핵 세포에서 기능할 수 있다. 모이어티는 원핵 세포에서 기능할 수 있다. 모이어티는 진핵 세포 및 원핵 세포 둘 다에서 기능할 수 있다. 적합한 모이어티의 비제한적인 예로는 5' 캡(예를 들어, 7-메틸구아닐레이트 캡(m7 G)), (예를 들어, 단백질 및 단백질 복합체에 의한 조절된 안정성 및/또는 조절된 접근성을 허용하기 위한) 리보스위치 서열, dsRNA 듀플렉스(즉, 헤어핀)를 형성하는 서열, RNA를 세포 이하 위치(예를 들어, 핵, 미토콘드리아, 엽록체 등)로 표적화하는 서열, 추적(예를 들어, 형광 분자에 대한 직접 접합, 형광 검출을 용이하게 하는 모이어티에 대한 접합, 형광 검출을 가능하게 하는 서열 등)을 제공하는 변형 또는 서열, 및/또는 단백질(예를 들어, 전사 활성화자, 전사 억제자, DNA 메틸트랜스퍼라아제, DNA 데메틸라아제, 히스톤 아세틸트랜스퍼라아제, 히스톤 데아세틸라아제 등을 포함하는, DNA에 작용하는 단백질)에 대한 결합 부위를 제공하는 변형 또는 서열을 들 수 있다.

[0082] 일부 실시형태에서, sgRNA는 표적 폴리뉴클레오타이드 내의 서열에 혼성화하는 스페이스 서열을 포함한다. gRNA의 스페이스는 혼성화(즉, 염기쌍 형성)를 통해 서열 특이적 방식으로 표적 폴리뉴클레오타이드와 상호 작용할 수 있다. 스페이스의 뉴클레오타이드 서열은 관심 표적 핵산의 서열의 따라 변경될 수 있다.

[0083] CRISPR-엔도뉴클레아제 시스템에서, 스페이스 서열은 시스템에서 사용된 엔도뉴클레아제의 PAM의 5'에 위치한 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하도록 설계될 수 있다. 스페이스는 표적 서열과 완벽히 일치할 수 있거나, 미스매치를 가질 수 있다. 각각의 엔도뉴클레아제, 예를 들어 Cas9 뉴클레아제는 이것이 표적 DNA에서 인식하는 특정 PAM 서열을 갖는다. 예를 들어, S. 피오게네스 Cas9는 서열 5'-NRG-3'를 포함하는 PAM을 인식하며, 여기서 R은 A 또는 G 중 어느 하나를 포함하고, N은 임의의 뉴클레오타이드이고, N은 스페이스 서열에 의해 표적화된 표적 핵산 서열의 바로 3'에 있다.

[0084] 표적 폴리뉴클레오타이드 서열은 20개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 폴리뉴클레오타이드는 20개 미만의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 폴리뉴클레오타이드는 20개 초과 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 폴리뉴클레오타이드는 적어도 5개, 10개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 30개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 폴리뉴클레오타이드는 최대 5개, 10개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 30개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 폴리뉴클레오타이드 서열은 PAM의 제1 뉴클레오타이드의 바로 5'에 20개의 염기를 포함할 수 있다.

[0085] 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼성화하는 스페이스 서열은 적어도 약 6개의 뉴클레오타이드(nt) 길이를 가질 수 있다. 스페이스 서열은 적어도 약 6 nt, 적어도 약 10 nt, 적어도 약 15 nt, 적어도 약 18 nt, 적어도 약 19 nt, 적어도 약 20 nt, 적어도 약 25 nt, 적어도 약 30 nt, 적어도 약 35 nt 또는 적어도 약 40 nt, 약 6 nt 내지 약 80 nt, 약 6 nt 내지 약 50 nt, 약 6 nt 내지 약 45 nt, 약 6 nt 내지 약 40 nt, 약 6 nt 내지 약 35 nt, 약 6 nt 내지 약 30 nt, 약 6 nt 내지 약 25 nt, 약 6 nt 내지 약 20 nt, 약 6 nt 내지 약 19 nt, 약 10 nt 내지 약 50 nt, 약 10 nt 내지 약 45 nt, 약 10 nt 내지 약 40 nt, 약 10 nt 내지 약 35 nt, 약 10 nt 내지 약 30 nt, 약 10 nt 내지 약 25 nt, 약 10 nt 내지 약 20 nt, 약 10 nt 내지 약 19 nt, 약 19 nt 내지 약 25 nt, 약 19 nt 내지 약 30 nt, 약 19 nt 내지 약 35 nt, 약 19 nt 내지 약 40 nt, 약 19 nt 내지 약 45 nt, 약 19 nt 내지 약 50 nt, 약 19 nt 내지 약 60 nt, 약 20 nt 내지 약 25 nt, 약 20 nt 내지 약 30 nt, 약 20 nt 내지 약 35 nt, 약 20 nt 내지 약 40 nt, 약 20 nt 내지 약 45 nt, 약 20 nt 내지 약 50 nt 또는 약 20 nt 내지 약 60 nt일 수 있다. 일부 예에서, 스페이스 서열은 20개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 스페이스는 19개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 스페이스는 18개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 스페이스는 22개의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

- [0086] 일부 예에서, 스페이서 서열과 표적 핵산 사이의 상보성 비율(%)은 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 100%이다. 일부 예에서, 스페이서 서열과 표적 핵산 사이의 상보성 비율(%)은 최대 약 30%, 최대 약 40%, 최대 약 50%, 최대 약 60%, 최대 약 65%, 최대 약 70%, 최대 약 75%, 최대 약 80%, 최대 약 85%, 최대 약 90%, 최대 약 95%, 최대 약 97%, 최대 약 98%, 최대 약 99% 또는 100%이다. 일부 예에서, 스페이서 서열과 표적 핵산 사이의 상보성 비율(%)은 표적 핵산의 상보적 가닥의 표적 서열의 6개의 인접한 5'-가장 근접 뉴클레오타이드에 대해 100%이다. 스페이서 서열과 표적 핵산 사이의 상보성 비율(%)은 약 20개의 인접한 뉴클레오타이드에 대해 적어도 60%일 수 있다. 스페이서 서열 및 표적 핵산의 길이는 벌지(bulge) 또는 벌지들로서 생각될 수 있는 1개 내지 6개의 뉴클레오타이드만큼 상이할 수 있다.
- [0087] tracrRNA 서열은 세포에서 최소 CRISPR 반복 서열에 혼성화하는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 최소 tracrRNA 서열 및 최소 CRISPR 반복 서열은 듀플렉스, 즉 염기쌍 형성된 이중 가닥 구조를 형성할 수 있다. 종합하면, 최소 tracrRNA 서열 및 최소 CRISPR 반복부는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제에 결합할 수 있다. 최소 tracrRNA 서열의 적어도 일부는 최소 CRISPR 반복 서열에 혼성화할 수 있다. 최소 tracrRNA 서열은 최소 CRISPR 반복 서열에 대해 적어도 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 100% 상보적일 수 있다.
- [0088] 최소 tracrRNA 서열은 약 7개의 뉴클레오타이드 내지 약 100개의 뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 최소 tracrRNA 서열은 약 7개의 뉴클레오타이드(nt) 내지 약 50 nt, 약 7 nt 내지 약 40 nt, 약 7 nt 내지 약 30 nt, 약 7 nt 내지 약 25 nt, 약 7 nt 내지 약 20 nt, 약 7 nt 내지 약 15 nt, 약 8 nt 내지 약 40 nt, 약 8 nt 내지 약 30 nt, 약 8 nt 내지 약 25 nt, 약 8 nt 내지 약 20 nt, 약 8 nt 내지 약 15 nt, 약 15 nt 내지 약 100 nt, 약 15 nt 내지 약 80 nt, 약 15 nt 내지 약 50 nt, 약 15 nt 내지 약 40 nt, 약 15 nt 내지 약 30 nt 또는 약 15 nt 내지 약 25 nt 길이일 수 있다. 최소 tracrRNA 서열은 대략 9개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 최소 tracrRNA 서열은 대략 12개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 최소 tracrRNA는 상기 문헌[Jinek *et al.*]에 기술되어 있는 tracrRNA nt 23개 내지 48개로 이루어질 수 있다.
- [0089] 최소 tracrRNA 서열은 적어도 6개, 7개 또는 8개의 인접한 뉴클레오타이드의 스트레치에 걸쳐 최소 tracrRNA(예를 들어, S. 피요게네스에서 유래한 야생형 tracrRNA) 기준 서열과 적어도 약 60% 동일할 수 있다. 예를 들어, 최소 tracrRNA 서열은 적어도 6개, 7개 또는 8개의 인접한 뉴클레오타이드의 스트레치에 걸쳐 최소 tracrRNA 기준 서열과 적어도 약 65% 동일하거나, 약 70% 동일하거나, 약 75% 동일하거나, 약 80% 동일하거나, 약 85% 동일하거나, 약 90% 동일하거나, 약 95% 동일하거나, 약 98% 동일하거나, 약 99% 동일하거나, 100% 동일할 수 있다.
- [0090] 최소 CRISPR RNA와 최소 tracrRNA 사이의 듀플렉스는 이중 나선을 포함할 수 있다. 최소 CRISPR RNA와 최소 tracrRNA 사이의 듀플렉스는 적어도 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 최소 CRISPR RNA와 최소 tracrRNA 사이의 듀플렉스는 최대 약 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0091] 듀플렉스는 미스매치(즉, 듀플렉스의 2개의 가닥은 100% 상보적이지 않음)를 포함할 수 있다. 듀플렉스는 적어도 약 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 또는 그 이상의 미스매치를 포함할 수 있다. 듀플렉스는 최대 약 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 또는 그 이상의 미스매치를 포함할 수 있다. 듀플렉스는 2개 이하의 미스매치를 포함할 수 있다.
- [0092] 일부 실시형태에서, tracrRNA는 3' tracrRNA일 수 있다. 일부 실시형태에서, 3' tracrRNA 서열은 기준 tracrRNA 서열(예를 들어, S. 피요게네스에서 유래한 tracrRNA)과 적어도 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다.
- [0093] 일부 실시형태에서, gRNA는 tracrRNA 연장 서열을 포함할 수 있다. tracrRNA 연장 서열은 약 1개의 뉴클레오타이드 내지 약 400개의 뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다. tracrRNA 연장 서열은 1개, 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개, 100개, 120개, 140개, 160개, 180개 또는 200개 초과 뉴클레오타이드의 길이를 가질 수 있다. tracrRNA 연장 서열은 약 20개 내지 약 5,000개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다. tracrRNA 연장 서열은 5개, 10개, 15개, 20개, 25개, 30개, 35개, 40개, 45개, 50개, 60개, 70개, 80개, 90개 또는 100개 미만의 뉴클레오타이드 길이를 가질 수 있다. tracrRNA 연장 서열은 10개 미만의 뉴클레오타이드 길이를 포함할 수 있다. tracrRNA 연장 서열은 10개 내지 30

개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. tracrRNA 연장 서열은 30개 내지 70개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다.

[0094] tracrRNA 연장 서열은 기능적 모이어티(예를 들어, 안정성 제어 서열, 리보자임, 엔도리보뉴클레아제 결합 서열)를 포함할 수 있다. 기능적 모이어티는 전사 종결자 분절(즉, 전사 종결 서열)을 포함할 수 있다. 기능적 모이어티는 약 10개의 뉴클레오타이드(nt) 내지 약 100개의 뉴클레오타이드, 약 10 nt 내지 약 20 nt, 약 20 nt 내지 약 30 nt, 약 30 nt 내지 약 40 nt, 약 40 nt 내지 약 50 nt, 약 50 nt 내지 약 60 nt, 약 60 nt 내지 약 70 nt, 약 70 nt 내지 약 80 nt, 약 80 nt 내지 약 90 nt, 또는 약 90 nt 내지 약 100 nt, 약 15 nt 내지 약 80 nt, 약 15 nt 내지 약 50 nt, 약 15 nt 내지 약 40 nt, 약 15 nt 내지 약 30 nt, 또는 약 15 nt 내지 약 25 nt의 총 길이를 가질 수 있다.

[0095] 일부 실시형태에서, sgRNA는 약 3개의 뉴클레오타이드 내지 약 100개의 뉴클레오타이드 길이를 갖는 링커 서열을 포함할 수 있다. 상기 문헌[Jinek *et al.*]에서는, 예를 들어 단순한 4-뉴클레오타이드 "테트라루프"(-GAAA-)가 사용되었다(문헌[Jinek *et al.*, Science, 2012, 337(6096): 816-821]). 예시적인 링커는 약 3개의 뉴클레오타이드(nt) 내지 약 90 nt, 약 3 nt 내지 약 80 nt, 약 3 nt 내지 약 70 nt, 약 3 nt 내지 약 60 nt, 약 3 nt 내지 약 50 nt, 약 3 nt 내지 약 40 nt, 약 3 nt 내지 약 30 nt, 약 3 nt 내지 약 20 nt, 약 3 nt 내지 약 10 nt의 길이를 갖는다. 예를 들어, 링커는 약 3 nt 내지 약 5 nt, 약 5 nt 내지 약 10 nt, 약 10 nt 내지 약 15 nt, 약 15 nt 내지 약 20 nt, 약 20 nt 내지 약 25 nt, 약 25 nt 내지 약 30 nt, 약 30 nt 내지 약 35 nt, 약 35 nt 내지 약 40 nt, 약 40 nt 내지 약 50 nt, 약 50 nt 내지 약 60 nt, 약 60 nt 내지 약 70 nt, 약 70 nt 내지 약 80 nt, 약 80 nt 내지 약 90 nt 또는 약 90 nt 내지 약 100 nt의 길이를 가질 수 있다. 단일-분자 가이드 핵산의 링커는 4개 내지 40개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 링커는 적어도 약 100개, 500개, 1,000개, 1,500개, 2,000개, 2,500개, 3,000개, 3,500개, 4,000개, 4,500개, 5,000개, 5,500개, 6,000개, 6,500개 또는 7,000개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드일 수 있다. 링커는 최대 약 100개, 500개, 1,000개, 1,500개, 2,000개, 2,500개, 3,000개, 3,500개, 4,000개, 4,500개, 5,000개, 5,500개, 6,000, 6,500개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드일 수 있다.

[0096] 링커는 다양한 서열 중 임의의 것을 포함할 수 있지만, 일부 예에서 링커는 가이드의 기타 기능적 영역을 간섭할 수 있는 분자 내 결합을 야기할 수 있는 가이드 RNA의 기타 부분과 상동성이 있는 광범위한 영역을 갖는 서열을 포함하지 않을 것이다. 상기 문헌[Jinek *et al.*]에서는, 단순한 4-뉴클레오타이드 서열 -GAAA-가 사용되었지만(문헌[Jinek *et al.*, Science, 2012, 337(6096): 816-821]), 보다 긴 서열을 포함하는 많은 기타 서열이 마찬가지로 사용될 수 있다.

[0097] 링커 서열은 기능적 모이어티를 포함할 수 있다. 예를 들어, 링커 서열은 압타머, 리보자임, 단백질-상호 작용 헤어핀, 단백질 결합 부위, CRISPR 어레이, 인트론 또는 엑손을 포함하는 하나 이상의 특성부를 포함할 수 있다. 링커 서열은 적어도 약 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 또는 그 이상의 기능적 모이어티를 포함할 수 있다. 일부 예에서, 링커 서열은 최대 약 1개, 2개, 3개, 4개 또는 5개 또는 그 이상의 기능적 모이어티를 포함할 수 있다.

[0098] 일부 실시형태에서, sgRNA는, 예를 들어 sgRNA 서열의 3' 말단에 우라실을 포함하지 않는다. 일부 실시형태에서, sgRNA는, 예를 들어 sgRNA 서열의 3' 말단에 하나 이상의 우라실을 포함한다. 일부 실시형태에서, sgRNA는 sgRNA 서열의 3' 말단에 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 우라실(U)을 포함한다.

[0099] sgRNA는 화학적으로 변형될 수 있다. 일부 실시형태에서, 화학적으로 변형된 gRNA는 화학적 변형, 예를 들어 2'-O-메틸 당 변형을 갖는 적어도 하나의 뉴클레오타이드를 포함하는 gRNA이다. 일부 실시형태에서, 화학적으로 변형된 gRNA는 변형된 핵산 골격을 포함한다. 일부 실시형태에서, 화학적으로 변형된 gRNA는 2'-O-메틸-포스포로티오에이트 잔기를 포함한다. 일부 실시형태에서, 화학적 변형은 당해 기술분야에 기술되어 있는 바와 같이, 안정성을 향상시키고/시키거나, 선천성 면역 반응의 가능성 또는 정도를 감소시키고/시키거나, 기타 속성을 향상시킨다.

[0100] 일부 실시형태에서, 변형된 gRNA는 변형된 골격, 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 모르폴리노, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬 또는 사이클로알킬 당간 연결 또는 단쇄 이중 원자성 또는 이중 환식 당간 연결을 포함할 수 있다.

[0101] 모르폴리노-기반 화합물은 문헌[Braasch and David Corey, Biochemistry, 2002, 41(14): 4503-4510]; 문헌[Genesis, 2001, Volume 30, Issue 3]; 문헌[Heasman, Dev. Biol., 2002, 243: 209-214]; 문헌[Nasevicius *et*

al., Nat. Genet., 2000, 26: 216~220]; 문헌[Lacerra *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 2000, 97: 9591~9596]; 및 미국 특허 제5,034,506호(1991년 7월 23일자에 허여됨)]에 기술되어 있다.

[0102] 사이클로헥세닐 핵산 올리고뉴클레오타이드 모방체는 문헌[Wang *et al.*, J. Am. Chem. Soc., 2000, 122: 8595~8602]에 기술되어 있다.

[0103] 일부 실시형태에서, 변형된 gRNA는 2' 위치에서 하나 이상의 치환된 당 모이어티, 예를 들어 하기 중 하나를 포함할 수 있다: OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃ O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_nNH₂ 또는 O(CH₂)_n CH₃(여기서, n은 1 내지 약 10임); C1 내지 C10 저급 알킬, 알콕시알콕시, 치환된 저급 알킬, 알크아릴 또는 아르알킬; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S- 또는 N-알킬; O-, S- 또는 N-알케닐; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; 헤테로사이클로알킬; 헤테로사이클로알크아릴; 아미노알킬아미노; 폴리알킬아미노; 치환된 실릴; RNA 개열기; 리포터 기; 인터칼레이터(intercalator); 2'-O-(2-메톡시에틸); 2'-메톡시(2'-O-CH₃); 2'-프로폭시(2'-OCH₂CH₂CH₃); 및 2'-플루오로(2'-F). 또한, 유사한 변형은 gRNA 상의 기타 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오타이드 상의 당의 3' 위치 및 5' 말단 뉴클레오타이드의 5' 위치에서 이루어질 수 있다. 일부 예에서, 뉴클레오타이드 단위의 당과 뉴클레오시드 간 연결, 즉 골격 둘 다는 신규한 기로 대체될 수 있다.

[0104] 가이드 RNA는 또한 추가적으로 또는 대안적으로 핵염기(종종 당해 기술분야에서 단순히 "염기"로 지칭됨) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "비변형된" 또는 "천연" 핵염기는 아데닌(A), 구아닌(G), 티민(T), 사이토신(C) 및 우라실(U)을 포함한다. 변형된 핵염기는 드물게 또는 일시적으로 천연 핵산에서만 발견되는 핵염기, 예를 들어 하이포잔틴, 6-메틸아데닌, 5-Me 피리미딘, 특히 5-메틸사이토신(5-메틸-2' 테옥시사이토신으로도 지칭되고 종종 본원에서 5-Me-C로서 지칭됨), 5-하이드록시메틸사이토신(HMC), 글리코실 HMC 및 겐토비오실 HMC, 및 합성 핵염기, 예를 들어 2-아미노아데닌, 2-(메틸아미노)아데닌, 2-(이미다졸릴알킬)아데닌, 2-(아미노알킬아미노)아데닌 또는 기타 이중 치환된 알킬아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노핵실)아데닌 및 2,6-디아미노퓨린을 포함한다(문헌[Kornberg, A., DNA Replication, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp75~77, 1980]; 문헌[Gebeyehu *et al.*, Nucl. Acids Res. 1997, 15: 4513]). 당해 기술분야에 알려져 있는 "보편적" 염기, 예를 들어 이노신이 또한 포함될 수 있다. 5-Me-C 치환은 핵산 듀플렉스 안정성을 0.6°C 내지 1.2°C 정도 증가시키는 것으로 나타났으며(문헌[Sanghvi, Y. S., in Crooke, S. T. and Lebleu, B., eds., Antisense Research and Applications, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 276~278]), 이는 염기 치환의 양태이다.

[0105] 변형된 핵염기는 기타 합성 및 천연 핵염기, 예를 들어 5-메틸사이토신(5-me-C), 5-하이드록시메틸 사이토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 기타 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 기타 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오사이토신, 5-할로우라실 및 사이토신, 5-프로피닐 우라실 및 사이토신, 6-아조 우라실, 사이토신 및 티민, 5-우라실(슈도-우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 기타 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 기타 5-치환된 우라실 및 사이토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌, 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌을 포함할 수 있다.

[0106] 계놈-표적화 핵산 및 엔도뉴클레아제의 복합체

[0107] gRNA는 엔도뉴클레아제(예를 들어, Cas9와 같은 RNA-가이드 뉴클레아제)와 상호 작용하여 복합체를 형성한다. gRNA는 엔도뉴클레아제를 표적 폴리뉴클레오타이드에 가이딩한다.

[0108] 엔도뉴클레아제 및 gRNA는 각각 세포 또는 개체에 별도로 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 엔도뉴클레아제는 tracrRNA와 함께 하나 이상의 가이드 RNA 또는 하나 이상의 crRNA와 예비 복합체화될 수 있다. 이어서, 예비 복합체화된 재료는 세포 또는 개체에 투여될 수 있다. 이 같은 예비 복합체화된 재료는 리보핵단백질 입자(RNP)로 알려져 있다. RNP 내의 엔도뉴클레아제는, 예를 들어 Cas9 엔도뉴클레아제 또는 Cpf1 엔도뉴클레아제일 수 있다. 엔도뉴클레아제에는 N-말단, C-말단, 또는 N-말단 및 C-말단 둘 다에서 하나 이상의 핵 국소화 신호(NLS)가 측면에 있을 수 있다. 예를 들어, Cas9 엔도뉴클레아제에는 2개의 NLS이 측면에 있을 수 있는데, 제1 NLS가 N 말단에 위치하고, 제2 NLS가 C 말단에 위치한다. NLS는 당해 기술분야에 알려져 있는 임의의 NLS, 예를 들어 SV40 NLS일 수 있다. RNP 내의 엔도뉴클레아제에 대한 계놈-표적화 핵산의 몰비는 약 1:1 내지 약 10:1의 범위일 수 있다. 예를 들어, RNP 내의 Cas9 엔도뉴클레아제에 대한 sgRNA의 몰비는 3:1일 수 있다.

- [0109] 시스템 성분을 암호화하는 핵산
- [0110] 본 개시내용은 본 개시내용의 게놈-표적화 핵산을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산, 본 개시내용의 엔도뉴클레아제, 및/또는 본 개시내용의 방법의 양태를 수행하는 데 필요한 임의의 핵산 또는 단백질성 분자를 제공한다. 암호화 핵산은 RNA, DNA, 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0111] 본 개시내용의 게놈-표적화 핵산을 암호화하는 핵산, 본 개시내용의 엔도뉴클레아제, 및/또는 본 개시내용의 방법의 양태를 수행하는 데 필요한 임의의 핵산 또는 단백질성 분자는 벡터(예를 들어, 재조합 발현 벡터)를 포함할 수 있다.
- [0112] "벡터"란 용어는 이것이 연결되는 다른 핵산을 운반할 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 하나의 유형의 벡터는 추가적인 핵산 분절이 결합될 수 있는 원형의 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 다른 유형의 벡터는 추가적인 핵산 분절이 바이러스 게놈에 결합될 수 있는 바이러스 벡터이다. 특정 벡터는 이들이 도입되는 숙주 세포에서 자가 복제할 수 있다(예를 들어, 박테리아 복제 기원을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 기타 벡터(예를 들어, 비에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포 내로 도입 시에 숙주 세포의 게놈 내에 통합되며, 이로 인해 숙주 게놈과 함께 복제된다.
- [0113] 일부 예에서, 벡터는 이들이 작동 가능하게 연결되는 핵산의 발현을 유도할 수 있다. 이 같은 벡터는 본원에서 "재조합 발현 벡터" 또는 보다 단순하게는 동등한 기능을 하는 "발현 벡터"로서 지칭된다.
- [0114] "작동 가능하게 연결된"이란 용어는 관심 뉴클레오타이드 서열이 뉴클레오타이드 서열의 발현을 허용하는 방식으로 조절 서열(들)에 연결된다는 것을 의미한다. "조절 서열"이란 용어는, 예를 들어 프로모터, 인핸서 및 기타 발현 제어 요소(예를 들어, 폴리아데닐화 신호)를 포함하도록 의도된다. 이 같은 조절 서열은 당해 기술분야에 잘 알려져 있고, 예를 들어 문헌[Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, 1990, 185, Academic Press, San Diego, CA]에 기술되어 있다. 조절 서열은 많은 유형의 숙주 세포에서 뉴클레오타이드 서열의 항시적 발현을 유도하는 것, 및 특정 숙주 세포에서만 뉴클레오타이드 서열(예를 들어, 조직-특이적 조절 서열)의 발현을 유도하는 것을 포함한다. 당업자라면 발현 벡터의 설계가 표적 세포의 선택, 목적하는 발현 수준 등의 선택과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다는 것을 인지할 것이다.
- [0115] 고려되는 발현 벡터로는 백시니아 바이러스, 폴리오바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, SV40, 단순 포진 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 레트로바이러스에 기초한 바이러스 벡터(예를 들어, 췌장 백혈병 바이러스, 비장 괴사 바이러스 및 레트로바이러스, 예를 들어 라우스 육종 바이러스, 하베이(Harvey) 육종 바이러스, 조류 백혈증 바이러스, 렌티바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 골수증식성 육종 바이러스 및 유방 종양 바이러스로부터 유래된 벡터) 및 기타 재조합 벡터를 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 진행 표적 세포용으로 고려되는 기타 벡터로는 벡터 pXT1, pSG5, pSVK3, pBPV, pMSG 및 pSVLSV40(파마시아(Pharmacia))을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 기타 벡터가 숙주 세포와 양립 가능한 한 이들이 사용될 수 있다.
- [0116] 일부 예에서, 벡터는 하나 이상의 전사 및/또는 번역 제어 요소를 포함할 수 있다. 사용된 숙주/벡터 시스템에 따라, 항시적 및 유도성 프로모터, 전사 인핸서 요소, 전사 종결자 등을 포함하는 다수의 적합한 전사 및 번역 제어 요소 중 임의의 것이 발현 벡터에 사용될 수 있다. 벡터는 바이러스 서열 또는 CRISPR 기계 또는 기타 요소의 성분을 불활성화시키는 자가-불활성화 벡터일 수 있다.
- [0117] 적합한 진행 프로모터(즉, 진행 세포에 기능적인 프로모터)의 비제한적인 예로는 사이토메갈로바이러스(CMV) 즉 시 초기, 단순 포진 바이러스(HSV) 티미딘 키나아제, 초기 및 후기 SV40, 레트로바이러스에서 유래한 긴 말단 반복부(LTR), 인간 신장 인자-1 α 프로모터(EF1 α), 닭 베타-액틴 프로모터(CBA), 유비퀴틴 C 프로모터(UBC), 닭 베타-액틴 프로모터(CAG)에 융합된 사이토메갈로바이러스 인핸서를 포함하는 혼성 구조체, 닭 베타-액틴 유전자(CAG 또는 CAGGS)의 프로모터, 제1 엑손 및 제1 인트론에 융합된 사이토메갈로바이러스 인핸서를 포함하는 혼성 구조체, 췌장 줄기 세포 바이러스 프로모터(MSCV), 포스포글리세레이트 키나아제-1 유전자위 프로모터(PGK) 및 마우스 메탈로티오네인-I 프로모터에서 유래한 것을 포함한다.
- [0118] 프로모터는 유도성 프로모터(예를 들어, 열 충격 프로모터, 테트라사이클린-조절된 프로모터, 스테로이드-조절된 프로모터, 금속-조절된 프로모터, 에스트로겐 수용체-조절된 프로모터 등)일 수 있다. 프로모터는 항시적 프로모터(예를 들어, CMV 프로모터, UBC 프로모터, CAG 프로모터)일 수 있다. 일부의 경우, 프로모터는 공간적으로 제한되고/되거나 시간적으로 제한된 프로모터(예를 들어, 조직-특이적 프로모터, 세포 유형-특이적 프로모터 등)일 수 있다.

- [0119] 세포 내로의 본 개시내용의 복합체, 폴리펩타이드 및 핵산의 도입은 바이러스 또는 박테리오파지 감염, 형질감염, 접합, 원형질체 융합, 리포펙션, 전기천공, 뉴클레오펙션(nucleofection), 인산칼슘 침전, 폴리에틸렌이민(PEI)-매개 형질감염, DEAE-텍스트란-매개 형질감염, 리포솜-매개 형질감염, 입자 총 기술, 인산칼슘 침전, 직접 미세주사, 나노입자-매개 핵산 전달 등에 의해 발생할 수 있다.
- [0120] **III. 면역 반응을 회피하고 생존을 증가시키기 위한 전략**
- [0121] 유전자 변형 세포, 즉 보편적 공여자 세포가 개체 내로의 생착 이후에 이들의 생존 또는 생존력을 증가시키고/시키거나 면역 반응을 회피하게 하기 위한 전략이 본원에 기술되어 있다. 일부 실시형태에서, 이들 전략은 보편적 공여자 세포가 비변형 세포보다 더 높은 성공률로 면역 반응을 회피하고/하거나 생존할 수 있도록 한다. 일부 실시형태에서, 유전자 변형 세포는 생존 인자를 암호화하는 적어도 하나의 유전자 내부 또는 부근에서의 적어도 하나의 유전자 변형의 도입을 포함하며, 여기서 유전자 변형은 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입을 포함한다. 보편적 공여자 세포는 하나 이상의 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에서의 적어도 하나의 유전자 변형을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 상기 유전자 변형은 제2 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입을 포함한다.
- [0122] 일부 실시형태에서, 유전자 변형 세포는 비변형 세포에 비해 하나 이상의 MHC-I 및 MHC-II 인간 백혈구 항원의 발현을 감소시키는 적어도 하나의 유전자 내부 또는 부근에서의 적어도 하나의 유전자 변형의 도입; 비변형 세포에 비해 관용원성 인자를 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드의 발현을 증가시키는 적어도 하나의 유전자 변형의 도입; 및 비변형 세포에 비해 생존 인자를 암호화하는 적어도 하나의 유전자의 발현을 변경하는 적어도 하나의 유전자 변형의 도입을 포함한다. 기타 실시형태에서, 유전자 변형 세포는 비변형 세포에 비해 하나 이상의 MHC-I 및 MHC-II 인간 백혈구 항원의 발현을 변경하는 적어도 하나의 유전자 내부 또는 부근에서의 적어도 하나의 결실 또는 삽입-결실 돌연변이; 및 하나 이상의 MHC-I 및 MHC-II HLA의 발현을 변경시키는 유전자의 결실의 부위와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된 부위에서의 적어도 하나의 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 적어도 하나의 삽입을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 유전자 변형 세포는 비변형 세포에 비해 생존 인자를 암호화하는 적어도 하나의 유전자의 발현을 변경시키는 적어도 하나의 유전자 변형을 포함한다.
- [0123] 주요 조직 접합성 복합체(MHC)를 암호화하는 유전자는 인간 Chr. 6p21 상에 위치한다. MHC 유전자에 의해 암호화된 얻어진 단백질은 세포 이식 동안 공여자 적합성에 필수적인 일련의 표면 단백질이다. MHC 유전자는 MHC 클래스 I(MHC-I) 및 MHC 클래스 II(MHC-II)로 분할된다. MHC-I 유전자(HLA-A, HLA-B 및 HLA-C)는 거의 모든 조직 세포 유형에서 발현되어 "비자가" 항원-가공된 펩타이드를 CD8+ T 세포에 제시하며, 그 결과 세포 용해성 CD8+ T 세포에 대한 이의 활성화를 촉진한다. "비자가" MHC-I 분자를 발현하는 이식 또는 생착된 세포는 이들 세포에서 유도되고, 궁극적으로 활성화된 세포 용해성 CD8+ T 세포에 의한 이들의 사멸을 초래하는 강력한 세포 면역 반응을 야기할 것이다. MHC-I 단백질은 소포체에서 베타-2-마이크로글로불린(B2M)과 친밀하게 연관되어 있으며, 이는 세포 표면 상에 기능적 MHC-I 분자를 형성하는 데 필수적이다. 게다가, 면역 조절 기능을 갖는 3개의 비전통적 MHC-Ib 분자(HLA-E, HLA-F 및 HLA-G)가 있다. MHC-II 생체 분자는 HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ 및 HLA-DR을 포함한다. 면역 반응에서의 이들의 일차 기능으로 인해, MHC-I 및 MHC-II 생체 분자는 비숙주 세포의 세포 생착, 예를 들어 재생 의학의 목적을 위한 세포 생착 이후에 면역 거부에 기여한다.
- [0124] MHC-I 세포 표면 분자는 MHC-암호화된 중쇄(HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C) 및 비변이체 하위단위 베타-2-마이크로글로불린(B2M)으로 구성되어 있다. 따라서, 세포 내의 B2M의 농도의 감소는 MHC-I 세포 표면 분자의 세포 표면 발현을 감소시키기 위한 효과적인 방법을 허용한다.
- [0125] 일부 실시형태에서, 세포는 하나 이상의 MHC-I 또는 MHC-II 유전자의 게놈 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 MHC-I 및/또는 MHC-II의 발현을 조절하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열의 게놈 변형을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 유전자 변형은 본원에 기술되어 있는 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 유전자 편집 방법을 이용하여 수행된다.
- [0126] 일부 실시형태에서, 비변형 세포에 비해 하나 이상의 MHC-I 및 MHC-II 인간 백혈구 항원의 발현의 감소는, 예를 들어 직접적으로 MHC-I 및/또는 MHC-II 유전자에서 적어도 하나의 염기쌍의 유전적 결실 및/또는 삽입에 대한 표적화에 의해 달성된다. 일부 실시형태에서, 비변형 세포에 비해 하나 이상의 MHC-I 및 MHC-II 인간 백혈구 항원의 발현의 감소는, 예를 들어 CIITA 유전자에서 유전적 결실에 대한 표적화에 의해 달성된다. 일부 실시형태에서, 비변형 세포에 비해 하나 이상의 MHC-I 및 MHC-II 인간 백혈구 항원의 발현의 감소는, 예를 들어 MHC-I

또는 MHC-II의 적어도 하나의 전사 조절자에서의 유전적 결실에 대한 표적화에 의해 달성된다. 일부 실시형태에서, MHC-I 또는 MHC-II의 전사 조절자는 NLRC5 또는 CIITA 유전자이다. 일부 실시형태에서, MHC-I 또는 MHC-II의 전사 조절자는 RFX5, RFXAP, RFXANK, NFY-A, NFY-B, NFY-C, IRF-1 및/또는 TAP1 유전자이다.

[0127] 일부 실시형태에서, 세포의 계놈은 HLA-A, HLA-B 및/또는 HLA-C 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키도록 변형된다. 일부 실시형태에서, 세포의 계놈은 HLA-A, HLA-B 및/또는 HLA-C 유전자의 프로모터 영역의 전체 또는 일부를 결실시키도록 변형된다. 일부 실시형태에서, 세포의 계놈은 MHC-I 또는 MHC-II의 전사 조절자를 암호화하는 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키도록 변형된다. 일부 실시형태에서, 세포의 계놈은 MHC-I 또는 MHC-II의 전사 조절자를 암호화하는 유전자의 프로모터 영역의 전체 또는 일부를 결실시키도록 변형된다.

[0128] 일부 실시형태에서, 세포의 계놈은 베타-2-마이크로글로불린(B2M)의 발현을 감소시키도록 변형된다. B2M은 모든 다형성 MHC 클래스 I 중쇄의 표면 발현에 필요한 공통 단백질 하위단위를 암호화하는 비다형성 유전자이다. HLA-I 단백질은 소포체에서 B2M과 친밀하게 연관되어 있으며, 이는 기능적인 세포 표면-발현된 HLA-I 분자를 형성하는 데 필수적이다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-GCTACTCTCTCTTCTGGCC-3' 서열(서열 번호 1)을 포함하는 B2M 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-GGCCGAGATGTCTCGCTCCG-3' 서열(서열 번호 2)을 포함하는 B2M 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-CGCGAGCACAGCTAAGGCCA-3' 서열(서열 번호 3)을 포함하는 B2M 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 대안적인 실시형태에서, gRNA는 하기 서열 중 임의의 것을 포함하는 B2M 유전자 내부의 부위를 표적화한다: 5'-TATAAGTGGAGCGTCGCGC-3'(서열 번호 35), 5'-GAGTAGCGGAGCACAGCTA-3'(서열 번호 36), 5'-ACTGGACGCGTCGCGCTGGC-3'(서열 번호 37), 5'-AAGTGGAGCGTCGCGCTGG-3'(서열 번호 38), 5'-GGCCACGGAGCGAGCATCT-3'(서열 번호 39), 5'-GCCCAATGCTGTGCTAGCTTC-3'(서열 번호 40), 5'-CTCGCGTACTCTCTCTTTC-3'(서열 번호 41), 5'-TCCTGAAGCTGACAGCATTC-3'(서열 번호 42), 5'-TTCCTGAAGCTGACAGCATTC-3'(서열 번호 43) 또는 5'-ACTCTCTCTTCTGGCTGG-3'(서열 번호 44). 일부 실시형태에서, gRNA는 서열 번호 1, 서열 번호 2, 서열 번호 3, 서열 번호 35, 서열 번호 36, 서열 번호 37, 서열 번호 38, 서열 번호 39, 서열 번호 40, 서열 번호 41, 서열 번호 42, 서열 번호 43 또는 서열 번호 44 중 임의의 하나의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. gRNA/CRISPR 뉴클레아제 복합체는 B2M 유전자 내의 표적 부위를 표적화하고 개열한다. NHEJ에 의한 이중 가닥 절단부의 보수가 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 결실 및/또는 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 삽입을 초래하여, B2M의 발현을 파괴 또는 제거할 수 있다. 대안적으로, B2M 유전자 내의 각각이 상이한 gRNA를 포함하는 적어도 2개의 CRISPR 시스템에 의해 표적화될 수 있어서, B2M 유전자 내에서의 2개의 부위에서의 개열은 2개의 절단 사이에서의 서열의 결실을 초래하여 B2M의 발현을 제거한다.

[0129] 일부 실시형태에서, 세포의 계놈은 티오레독신-상호 작용 단백질(TXNIP)의 발현을 감소시키도록 변형되어 있다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-GAAGCGTGTCTTCATAGCGC-3' 서열(서열 번호 15)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-TTACTCGTGTCAAAGCCGTT-3' 서열(서열 번호 16)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-TGTCAAAGCCGTTAGGATCC-3' 서열(서열 번호 17)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-GCCGTTAGGATCCTGGCTTG-3' 서열(서열 번호 18)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-GCGGAGTGCTAAAGTGCTT-3' 서열(서열 번호 19)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-TCCGCAAGCCAGGATCCTAA-3' 서열(서열 번호 20)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-GTTCGGCTTTGAGCTTCCTC-3' 서열(서열 번호 21)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-GAGATGGTGATCATGAGACC-3' 서열(서열 번호 22)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-TTGTACTCATATTTGTTTCC-3' 서열(서열 번호 23)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-AACAAATATGAGTACAAGTT-3' 서열(서열 번호 24)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-GAAGCGTGTCTTCATAGCGCAGG-3' 서열(서열 번호 45)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-TTACTCGTGTCAAAGCCGTTAGG-3' 서열(서열 번호 46)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-TGTCAAAGCCGTTAGGATCCTGG-3' 서열(서열 번호 47)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-GCCGTTAGGATCCTGGCTTGGC-3' 서열(서열 번호 48)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-GCGGAGTGCTAAAGTGCTTTGG-3' 서열(서열 번호 49)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-TCCGCAAGCCAGGATCCTAACGG-3' 서열(서열 번호 50)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-GTTCGGCTTTGAGCTTCCTCAGG-3' 서열(서열 번호 51)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실

시형태에서, gRNA는 5'-GAGATGGTGATCATGAGACCTGG-3' 서열(서열 번호 52)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-TTGTACTCATATTGTTTCCAGG-3' 서열(서열 번호 53)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 5'-AACAAATATGAGTACAAGTTCGG-3' 서열(서열 번호 54)을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열 번호 15 내지 서열 번호 24 또는 서열 번호 45 내지 서열 번호 54 중 임의의 하나의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 TXNIP 유전자 내부의 표적 부위를 표적화한다. 일부 실시형태에서, gRNA는 서열 번호 15, 서열 번호 16, 서열 번호 17, 서열 번호 18, 서열 번호 19, 서열 번호 20, 서열 번호 21, 서열 번호 22, 서열 번호 23 또는 서열 번호 24 중 임의의 하나의 폴리뉴클레오타이드 서열을 표적화한다. gRNA/CRISPR 뉴클레아제 복합체는 TXNIP 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하고 개열한다. NHEJ에 의한 이중 가닥 절단부의 보수가 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 결실 및/또는 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 삽입을 초래하여, TXNIP의 발현을 파괴 또는 제거할 수 있다. 대안적으로, TXNIP 유전자 유전자위 내로의 외생성 유전자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입은 TXNIP의 발현을 파괴 또는 제거할 수 있다.

[0130] 일부 실시형태에서, 세포의 계놈은 클래스 II 트랜스활성자(CIITA)의 발현을 감소시키도록 변형되어 있다. CIITA는 단백질의 LR 또는 뉴클레오타이드 결합 도메인(NBD) 류신-풍부 반복부(LRR) 패밀리의 구성원이며, MHC 인핸서오솜(enhanceosome)과 회합하여 MHC-II의 전사를 조절한다. CIITA의 발현은 발생 단계의 기능으로서 B 세포 및 수지상 세포에서 유도되고, 대부분의 세포 유형에서 IFN- γ 에 의해 유도 가능하다.

[0131] 일부 실시형태에서, 세포의 계놈은 NLR 패밀리의 CARD 도메인 함유 5(NLRC5)의 발현을 감소시키도록 변형되어 있다. NLRC5는 MHC-I-매개 면역 반응의 중요한 조절자이고, CIITA와 유사하며, NLRC5는 IFN- γ 에 의해 고도로 유도 가능하고, 핵 내로 전좌할 수 있다. NLRC5는 MHC-I 유전자의 프로모터를 활성화하고, MHC-I, 및 MHC-I 항원 제시에 관련된 관련 유전자의 전사를 유도한다.

[0132] 일부 실시형태에서, 관용원성 인자는 면역-특권 보편적 공여자 세포를 생성하기 위해 유전자 변형 세포 내로 삽입 또는 재삽입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본원에 개시되어 있는 보편적 공여자 세포는 하나 이상의 관용원성 인자를 발현하도록 추가로 변형되어 있다. 예시적인 관용원성 인자로는 HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, PD-L1, CTLA-4-Ig, CD47, CI-억제제 및 IL-35 중 하나 이상을 들 수 있지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 관용원성 인자를 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드의 유전자 변형, 예를 들어 삽입은 보편적 공여자 세포가 생착 이후에 비변형 세포보다 적어도 1.05배, 적어도 1.1배, 적어도 1.25배, 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배 또는 적어도 50배 더 높은 비율로 면역 거부를 억제 또는 회피하도록 한다. 일부 실시형태에서, HLA-E, HLA-G, CTLA-4, CD47 및/또는 PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입은 보편적 공여자 세포가 숙주 개체 내로의 이식 또는 생착 이후에 면역 거부를 억제 또는 회피하도록 한다.

[0133] 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 일반적으로 관용원성 인자를 암호화하는 서열 측면에 있는 좌측 상동성 아암 및 우측 상동성 아암을 포함한다. 상동성 아암은 표적화된 삽입 부위에서 또는 그 부근에서 계놈 DNA에 대한 실질적인 서열 상동성을 갖는다. 예를 들어, 좌측 상동성 아암은 표적 부위 또는 절단 부위의 좌측 또는 상류에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열일 수 있고, 우측 상동성 아암은 표적 부위 또는 절단 부위의 우측 또는 하류에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 각각의 상동성 아암의 근위 말단은 절단 부위와 접하는 계놈 DNA 서열에 상동성일 수 있다. 대안적으로, 각각의 상동성 아암의 근위 말단은 절단 부위로부터 최대 약 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개 또는 70개의 핵염기 이격되어 위치한 계놈 DNA 서열에 상동성일 수 있다. 이와 같이, 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 절단 부위의 약 10개, 20개, 30개, 40개, 50개, 60개 또는 70개의 염기쌍 내의 표적화된 유전자 유전자위 내로 삽입될 수 있고, 절단 부위와 경계를 이룬(그리고 상동체 아암에 상동성을 갖지 않는) 추가적인 계놈 DNA가 결실될 수 있다. 상동성 아암은 약 50개의 뉴클레오타이드 내지 수천 개의 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 상동성 아암은 약 500개의 뉴클레오타이드 내지 약 1,000개의 뉴클레오타이드 길이의 범위일 수 있다. 상동성 아암과 계놈 DNA 사이의 실질적인 서열 상동성은 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%일 수 있다.

[0134] 일부 실시형태에서, 상동성 아암은 B2M 가이드(예를 들어, 서열 번호 1 내지 서열 번호 3, 서열 번호 35 내지 서열 번호 44의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA)와 함께 사용된다. 일부 실시형태에서, 상동성 아암은 B2M 유전자의 출발 부위를 제거하는 임의의 B2M 가이드와 함께 사용되도록 설계된다. 일부 실시형태에서, B2M 상동성 아암은 서열 번호 7 또는 서열 번호 13의 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 서열 번호 7 또는 서열 번호 13의 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 본질

적으로 이들로 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 좌측 B2M 상동성 아암은 서열 번호 7, 또는 서열 번호 7의 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 본질적으로 이들로 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 우측 B2M 상동성 아암은 서열 번호 13, 또는 서열 번호 13의 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 본질적으로 이들로 이루어질 수 있다.

[0135] 일부 실시형태에서, 상동성 아암은 TXNIP 가이드(예를 들어, 서열 번호 15 내지 서열 번호 24의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA)와 함께 사용된다. 일부 실시형태에서, 상동성 아암은 TXNIP(예를 들어, 서열 번호 15 내지 서열 번호 20의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 gRNA)의 엑손 1을 표적화하는 임의의 TXNIP 가이드와 함께 사용되도록 설계된다. 일부 실시형태에서, TXNIP 상동성 아암은 서열 번호 25 또는 서열 번호 32의 폴리뉴클레오타이드 서열, 또는 서열 번호 25 또는 서열 번호 32의 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 본질적으로 이들로 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 좌측 TXNIP 상동성 아암은 서열 번호 25, 또는 서열 번호 25의 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 본질적으로 이들로 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 우측 TXNIP 상동성 아암은 서열 번호 32, 또는 서열 번호 32의 서열과 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하거나 본질적으로 이들로 이루어질 수 있다.

[0136] 적어도 하나의 관용원성 인자를 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 외생성 프로모터는 항시적, 유도성, 시간-, 조직- 또는 세포 유형-특이적 프로모터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 외생성 프로모터는 CMV, EF1a, PGK, CAG 또는 UBC 프로모터이다.

[0137] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 관용원성 인자를 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 안전 하버 유전자위, 예를 들어 AAVS 1 유전자위 내로 삽입된다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 관용원성 인자를 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 MHC-I 유전자, MHC-II 유전자, 또는 MHC-I 또는 MHC-II의 전사 조절자와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된(즉, 그 내부에 또는 부근의) 게놈 DNA의 부위 또는 영역 내로 삽입된다.

[0138] 일부 실시형태에서, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 B2M 유전자 유전자위 내부 또는 부근의 부위에서 삽입된다. 일부 실시형태에서, PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 B2M 유전자 또는 프로모터의 전부 또는 일부의 결실과 동시에 또는 결실 이후에 B2M 유전자 유전자위 내부 또는 부근의 부위에 삽입된다. PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 외생성 프로모터는 CMV 프로모터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 11의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0139] 일부 실시형태에서, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 B2M 유전자 유전자위 내부 또는 부근의 부위에 삽입된다. 일부 실시형태에서, HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 B2M 유전자 또는 프로모터의 전부 또는 일부의 결실과 동시에 또는 결실 이후에 B2M 유전자 유전자위 내부 또는 부근의 부위에 삽입된다. HLA-E를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 외생성 프로모터는 CMV 프로모터일 수 있다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 26, 서열 번호 27, 서열 번호 28, 서열 번호 29, 서열 번호 30 및/또는 서열 번호 30의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드는 서열 번호 55의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0140] 일부 실시형태에서, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 유전자 유전자위 내부 또는 부근의 부위에 삽입된다. 일부 실시형태에서, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 유전자 또는 프로모터의 결실과 동시에 또는 결실 이후에 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 유전자 유전자위 내부 또는 부근의 부위에 삽입된다.

[0141] 일부 실시형태에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 CIITA 유전자 유전자위 내부 또는 부근의 부위에 삽입된다. 일부 실시형태에서, CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 CIITA 유전자 또는 프로모터의 결실과 동시에 또는 결실 이후에 CIITA 유전자 유전자위 내부 또는 부근의 부위에 삽입된다.

[0142] 일부 실시형태에서, HLA-G를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 CIITA 유전자 유전자위 내부 또는 부근의 부위에서 CD47을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입과 동시에 HLA-A, HLA-B 또는 HLA-C 유전자 유전자위 내부 또는 부근의 부위에 삽입된다.

[0143] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 관용원성 인자를 암호화하는 적어도 하나의 폴리뉴클레오타이드는 벡터의 일부로서 세포에 전달될 수 있다. 예를 들어, 벡터는 플라스미드 벡터일 수 있다. 다양한 실시형태에서, 세포에

전달된 플라스미드 벡터의 양은 (약 10^6 개의 세포 당) 약 $0.5 \mu\text{g}$ 내지 약 $10 \mu\text{g}$ 의 범위일 수 있다. 일부 실시형태에서, 플라스미드의 양은 약 $1 \mu\text{g}$ 내지 약 $8 \mu\text{g}$, 약 $2 \mu\text{g}$ 내지 약 $6 \mu\text{g}$ 또는 약 $3 \mu\text{g}$ 내지 약 $5 \mu\text{g}$ 의 범위일 수 있다. 구체적인 실시형태에서, 세포에 전달된 플라스미드 벡터의 양은 약 $4 \mu\text{g}$ 일 수 있다.

[0144] 일부 실시형태에서, 세포는 하나 이상의 생존 인자의 증가 또는 감소된 발현을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 생존 인자를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열의 삽입을 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 하나 이상의 생존 인자의 결실을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 유전자 변형은 본원에 기술되어 있는 방법을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 유전자 편집 방법을 사용하여 수행된다. 일부 실시형태에서, 세포는 비변형 세포에 비해 적어도 하나의 생존 인자의 증가 또는 감소된 발현을 포함한다. 일부 실시형태에서, 생존 인자는 세포 생존에 관련된 구성원 또는 중요한 경로, 예를 들어 저산소증, 반응성 산소 종, 영양소 고갈 및/또는 산화 스트레스이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 생존 인자의 유전자 변형은 보편적 공여자 세포가 생착 이후에 비변형 세포보다 더 긴 기간 동안, 예를 들어 적어도 1.05배, 적어도 1.1배, 적어도 1.25배, 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 또는 적어도 50배 더 긴 기간 동안 생존하도록 한다. 일부 실시형태에서, 생존 인자는 ZNF143, TXNIP, FOXO1, JNK 또는 MANF이다.

[0145] 일부 실시형태에서, 세포는 MANF를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입을 포함하되, 숙주 개체 내로의 이식 또는 생착 이후에 비변형 세포에 비해 더 높은 생존율로 보편적 공여자 세포가 생존하도록 한다. 일부 실시형태에서, MANF를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 안전 하버 유전자위 내에 삽입된다. 일부 실시형태에서, MANF를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 MHC-I, MHC-II, 또는 MHC-I 또는 MHC-II의 전사 조절자에 속하는 유전자 내에 삽입된다.

[0146] 일부 실시형태에서, 세포의 게놈은 ZNF143, TXNIP, FOXO1 및/또는 JNK 유전자의 전체 또는 일부를 결실시키도록 변형된다. 일부 실시형태에서, 세포의 게놈은 ZNF143, TXNIP, FOXO1 및/또는 JNK 유전자의 프로모터 영역의 전체 또는 일부를 결실시키도록 변형된다.

[0147] 일부 실시형태에서, 하나 초과인 생존 인자는 세포 내에서 유전자 변형된다.

[0148] 특정 실시형태에서, MHC-II 발현을 갖지 않고 중간인 MHC-I 발현을 갖는 세포는 MHC-I 또는 MHC-II의 표면 발현을 갖지 않도록 유전자 변형된다. 다른 실시형태에서, MHC-I/II의 표면 발현을 갖지 않는 세포는 PD-L1의 발현, 예를 들어 PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입을 갖도록 추가로 편집된다. 또 다른 실시형태에서, MHC-I/II의 표면 발현을 갖지 않는 세포는 PD-L1의 발현, 예를 들어 PD-L1을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입을 갖도록 추가로 편집되고, 또한 비변형 세포에 비해 생존 인자를 암호화하는 적어도 하나의 유전자의 발현을 증가 또는 감소시키도록 유전자 변형된다.

[0149] 일부 실시형태에서, 세포는, 예를 들어 생착 후 면역 회피 또는 세포 생존에 필수적으로 연루되지 않은 하나 이상의 추가적인 유전자의 유전자 변형에 의한 증가 또는 감소된 발현을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 비변형 세포에 비해 하나 이상의 안전 스위치 단백질의 증가된 발현을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 안전 스위치 단백질을 암호화하는 하나 이상의 추가적인 유전자의 증가된 발현을 포함한다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 또한 자살 유전자이다. 일부 실시형태에서, 안전 스위치는 단순 포진 바이러스-1 티미딘 키나아제(HSV-tk) 또는 유도성 카스파아제-9이다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 안전 스위치를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 게놈, 예를 들어 안전 하버 유전자위 내에 삽입된다. 일부 기타 실시형태에서, 유전자 변형된 하나 이상의 추가적인 유전자는 안전 스위치 단백질; 표적화 양상; 수용체; 신호전달 분자; 전사 인자; 약제학적 활성 단백질 또는 펩타이드; 약물 표적 후보물질; 및 구조체와 통합된, 이의 생착, 트래피킹(trafficking), 호밍, 생존력, 자가 재생, 지속성 및/또는 생존을 조장하는 단백질 중 하나 이상을 암호화한다.

[0150] 본 발명의 하나의 양태는 게놈-조작된 보편적 공여자 세포를 생성하는 방법을 제공하며, 여기서 보편적 공여자 세포는 게놈 내의 하나 이상의 선택된 부위에서의 적어도 하나의 표적화된 게놈 변형을 포함하고, 이 방법은 선택된 부위에서의 표적화된 변형을 허용하도록 하나 이상의 구조체를 상기 세포 내로 도입하고; 선택된 부위를 인식할 수 있는 하나 이상의 엔도뉴클레아제를 사용하여 선택된 부위에서의 하나 이상의 이중 가닥 절단부를 상기 세포 내에 도입하고; 내생성 DNA 보수가 선택된 부위에서 표적화된 삽입 또는 결실을 생성하도록 허용하는 편집된 세포를 배양하여, 게놈-변형된 보편적 공여자 세포를 수득함으로써 본원에 기술되어 있는 바와 같은 세포 유형을 유전적으로 조작하는 단계를 포함한다. 게놈-변형된 보편적 공여자 세포는 다수의 부위가 표적화 및 변형되도록 연속적으로 수회의 게놈 변형을 겪을 수 있다. 당해 기술분야에 잘 알려져 있는 기법을 이용하여 게놈-변형된 세포를 배양하고, 특성분석하고, 선택하고, 확장시킨다. 이러한 방법에 의해 생성된 보편적 공여자

세포는 적어도 하나의 기능적 표적화된 게놈 변형을 포함할 것이고, 이때 게놈-변형된 세포가 줄기 세포이면 이들은 전구 세포 또는 완전 분화된 세포로 분화될 수 있다.

[0151] 일부 기타 실시형태에서, 게놈-조작된 보편적 공여자 세포는 HLA-E, HLA-G, CD47 또는 PD-L1 중 적어도 하나에서 도입 또는 증가된 발현을 포함한다. 일부 실시형태에서, 게놈-조작된 보편적 공여자 세포는 HLA 클래스 I 및/또는 클래스 II 결핍이다. 일부 실시형태에서, 게놈-조작된 보편적 공여자 세포는 B2M 무함유 또는 B2M 저(low)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 게놈-조작된 보편적 공여자 세포는 HLA-E, HLA-G 및 PD-L1 단백질 중 하나 이상을 암호화하는 통합 또는 비통합된 외생성 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 도입된 발현은 상기 세포에 포함된 비발현 또는 낮게 발현된 유전자 중 어느 하나로부터의 증가된 발현이다. 일부 실시형태에서, 비통합된 외생성 폴리뉴클레오타이드는 센다이(Sendai) 바이러스, AAV, 에피솜 또는 플라스미드를 사용하여 도입된다. 일부 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 HLA-E, HLA-G PD-L1 중 하나 이상의 도입된 발현, 및 적어도 하나의 안전 스위치 단백질의 증가된 또는 감소된 발현을 갖는 B2M 무함유이다. 다른 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 HLA-E, HLA-G, PD-L1 중 하나 이상, 및 적어도 하나의 안전 스위치 단백질의 도입된 발현을 갖는 HLA-A, HLA-B 및 HLA-C 무이다. 일부 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 HLA-E, HLA-G PD-L1 중 하나 이상의 도입된 발현, 및 적어도 하나의 생존 인자, 예를 들어 MANF의 증가된 또는 감소된 발현을 갖는 B2M 무함유이다. 본원에 기술되어 있는 유전자 변형 세포 중 임의의 것을 생성하는 방법은 본원에 기술되어 있는 유전자 편집 방법 중 적어도 임의의 것을 이용하여 수행되는 것으로 고려된다.

[0152] IV. 세포 유형

[0153] 본원에 기술되어 있는 바와 같은 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포(및 상응하는 비변형 세포)는 임의의 가능한 부류의 세포 유형에 속할 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포(및 상응하는 비변형 세포)는 포유동물 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포(및 상응하는 비변형 세포)는 인간 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포(및 상응하는 비변형 세포)는 줄기 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포(및 상응하는 비변형 세포)는 다능성 줄기 세포(PSC)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포(및 상응하는 비변형 세포)는 배아 줄기 세포(ESC), 성체 줄기 세포(ASC), 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC) 또는 조혈 줄기 또는 전구 세포(HSPC)(조혈 줄기 세포(HSC)로도 지칭됨)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포(및 상응하는 비변형 세포)는 분화된 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포(및 상응하는 비변형 세포)는 체세포, 예를 들어 면역계 세포 또는 수축 세포, 예를 들어 골격근 세포일 수 있다.

[0154] 본원에 기술되어 있는 세포, 예를 들어 보편적 공여자 줄기 세포는 보편적 줄기 세포주의 면역원성의 평가뿐만 아니라 HLA 발현을 평가하기 위해 관련 세포 유형으로 분화될 수 있다. 일반적으로, 분화는 세포가 분화된 관심 세포로 분화하기에 충분한 기간 및 조건 하에 관심 세포를 유지시키는 단계를 포함한다. 예를 들어, 본원에 개시되어 있는 보편적 줄기 세포는 간엽성 전구 세포(MPC), 저면역원성 심근세포, 근육 전구 세포, 아세포, 내피 세포(EC), 대식세포, 간세포, 베타 세포(예를 들어, 췌장 베타 세포), 췌장 내배엽 전구체, 췌장 내분비 전구체, 조혈 전구 세포 또는 신경 전구 세포(NPC)로 분화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 보편적 공여자 세포는 완성 내배엽 세포, 원시 장관 세포, 후방 앞창자 세포, 췌장 내배엽 세포(PEC), 췌장 내분비 세포, 미성숙 베타 세포 또는 성숙한 베타 세포로 분화될 수 있다.

[0155] 줄기 세포는 증식 및 더 많은 전구 세포의 생성 둘 모두가 가능하고, 이어서 이들은 더 많은 개수의 모계 세포를 생성하는 능력을 가지며, 이는 이어서 분화되거나 분화 가능한 딸세포를 생성할 수 있다. 딸세포 자체는 자손을 증식시키고 생성하도록 유도될 수 있고, 이 자손은 후속적으로 부모 발육 잠재성을 갖는 하나 이상의 세포를 또한 보유하면서 하나 이상의 성숙한 세포 유형으로 분화한다. 이어서, "줄기 세포"란 용어는 특정 상황 하에 실질적인 분화 없이 증식하는 능력을 보유하며 특정 상황 하에 보다 특수화되거나 분화된 표현형으로 분화하는 능력 또는 잠재성을 갖는 세포를 지칭한다. 하나의 양태에서, 전구세포 또는 줄기 세포란 용어는 후손(자손)이 분화에 의해, 예를 들어 배아 세포 및 조직의 점진적 다양화에서 발생하는 바와 같이 완전히 개별적인 특징을 획득함으로써 종종 상이한 방향으로 특수화하는 일반화된 모계 세포를 지칭한다. 세포 분화는 전형적으로 다수의 세포 분열을 통해 발생하는 복잡한 과정이다. 분화된 세포는 자체가 다능성 세포 등으로부터 유래하는 다능성 세포로부터 유래할 수 있다. 이들 다능성 세포 각각이 줄기 세포로 고려될 수 있지만, 각각 생성할 수 있는 세포 유형의 범위는 상당히 달라질 수 있다. 또한, 일부 분화된 세포는 더 높은 발생 잠재성을 갖는 세포를 생성하는 능력을 갖는다. 이 같은 능력은 자연적인 것일 수 있거나, 다양한 인자를 이용한 처리 시에 인공적으로 유도될 수 있다. 많은 생물학적 경우에, 줄기 세포는 하나 초과개의 별개의 세포 유형의 자손을 생성할 수

있으므로 "다능성"일 수 있지만, 이는 "줄기 세포능"에 필요한 것은 아니다.

[0156] "분화된 세포"는 이것이 비교되는 세포보다 발달 경로 이상으로 진행된 세포이다. 따라서, 줄기 세포는 계통-제한된 전구 세포(예를 들어, 근세포 전구 세포)로 분화할 수 있고, 이는 이어서 경로에서 더 나아가 기타 유형의 전구 세포(예를 들어, 근세포 전구체), 및 이후 말기 분화된 세포, 예를 들어 근세포로 분화할 수 있으며, 이는 특정 조직 유형에서 특징적인 역할을 하고, 추가로 증식하는 능력을 보유할 수 있거나 보유하지 않을 수 있다. 일부 실시형태에서, 분화된 세포는 체장 베타 세포일 수 있다.

[0157] 배아 줄기 세포

[0158] 본원에 기술되어 있는 세포는 배아 줄기 세포(ESC)일 수 있다. ESC는 포유동물 배아의 배아세포로부터 유래하고, 임의의 세포 유형으로 분화하고 신속히 증식할 수 있다. 또한, ESC는 정상 핵형을 갖는 것으로 여겨져서, 높은 텔로메라아제 활성을 유지시키고, 현저한 장기간 증식성 잠재성을 나타내며, 따라서 이들 세포는 보편적 공여자 세포로서 사용하기 위한 우수한 후보물질이 된다.

[0159] 성체 줄기 세포

[0160] 본원에 기술되어 있는 세포는 성체 줄기 세포(ASC)일 수 있다. ASC는 포유동물, 예를 들어 인간에서 발견될 수 있는 미분화 세포이다. ASC는 자가 재생하는 이들의 능력, 예를 들어 이들의 미분화 상태를 유지시키면서 수 회의 세포 복제를 통해 계대 배양되는 이의 능력, 및 몇몇 별개의 세포 유형, 예를 들어 교세포로 분화하는 능력에 의해 한정된다. 성체 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 유방 줄기 세포, 장 줄기 세포, 간엽성 줄기 세포, 내피 줄기 세포, 신경 줄기 세포, 후각 성체 줄기 세포, 신경능선 줄기 세포 및 고환 세포를 포함할 수 있는 넓은 종류의 줄기 세포이다.

[0161] 유도된 다능성 줄기 세포

[0162] 본원에 기술되어 있는 세포는 유도된 다능성 줄기 세포(iPSC)일 수 있다. iPSC는 다능성에 관련된 중요한 전사 인자, 예를 들어 OCT4, SOX2, cMYC 및 KLF4를 암호화하는 유전자를 도입함으로써 성체 인간 세포로부터 직접 생성될 수 있다. iPSC는 후속적인 전구 세포가 투여될 동일한 개체로부터 유래될 수 있다. 즉, 체세포는 개체로부터 수득되고, 유도된 다능성 줄기 세포로 재프로그래밍된후, 개체에 투여될 전구 세포(예를 들어, 자가유래 세포)로 재분화될 수 있다. 그러나, 자가유래 세포의 경우에, 생착 후 면역 반응 및 불량한 생존력의 위험성이 여전히 남아 있다.

[0163] 인간 조혈 줄기 및 전구 세포

[0164] 본원에 기술되어 있는 세포는 인간 조혈 줄기 및 전구 세포(hHSPC)일 수 있다. 이러한 줄기 세포 계통은 적혈구 성(적혈구 또는 적색 혈액 세포(RBC)), 골수성(단핵구 및 대식세포, 호중구, 호염기구, 호산구, 거핵세포/혈소판 및 수지상 세포), 및 림프성(T-세포, B-세포, NK-세포)을 비롯한 모든 혈액 세포 유형을 생성한다. 혈액 세포는 또한 자체가 자가 재생에 의한 보충 능력을 갖는 매우 작은 개체군의 다능성 조혈 줄기 세포(HSC)의 증식 및 분화에 의해 제조된다. 분화 동안, HSC의 자손은 다양한 중간 성숙 단계를 거쳐서 성숙에 도달하기 전에 다능성 및 계통-전용 전구 세포를 생성한다. 골수(BM)는 인간에서 주요 조혈작용 부위이고, 정상 조건 하에 적은 개수의 조혈 줄기 및 전구 세포(HSPC)만이 말초 혈액(PB)에서 발견될 수 있다. 사이토카인, 암 치료에서 사용된 일부 골수억제 약물, 및 조혈과 BM 기질 세포 사이의 상호 작용을 파괴하는 화합물을 이용한 처리는 수많은 줄기 세포 및 전구체를 순환에 신속히 동원할 수 있다.

[0165] 기타 세포 유형으로의 세포의 분화

[0166] 본 개시내용의 방법의 다른 단계는 세포를 분화된 세포로 분화시키는 단계를 포함할 수 있다. 분화 단계는 당해 기술분야에 알려져 있는 임의의 방법에 따라 수행될 수 있다. 예를 들어, 인간 iPSC는 액티빈 및 B27 보충제(라이프 테크놀로지스(Life Technologies))를 포함하는 다양한 처리를 사용하여 완성 내배엽으로 분화된다. 완성 내배엽은 간세포로 추가로 분화되고, 처리는 FGF4, HGF, BMP2, BMP4, 온코스타틴 M(Oncostatin M), 덱사메타손(Dexamethasone) 등을 포함한다(문헌[Duan *et al*, Stem Cells, 2010; 28: 674~686]; 문헌[Ma *et al*, Stem Cells Translational Medicine, 2013; 2: 409~419]). 다른 실시형태에서, 분화 단계는 문헌[Sawitza *et al*, Sci Rep. 2015; 5: 13320]에 따라 수행될 수 있다. 분화된 세포는 포유동물, 예를 들어 인간의 임의의 체세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 체세포는 외분비성 분비 상피 세포(예를 들어, 침샘 점액 세포, 전립선 세포), 호르몬-분비 세포(예를 들어, 뇌하수체 전엽 세포, 장관 세포, 췌도), 케라틴화 상피 세포(예를 들어, 상피 각질 형성 세포), 습식 계층화 장벽 상피 세포, 감각 유도자 세포(예를 들어, 광수용체), 자율 뉴런 세포, 감각 기관

및 말초 뉴런 지지 세포(예를 들어, 슈반(Schwann) 세포), 중추 신경계 뉴런, 교세포(예를 들어, 성상세포, 희소돌기신경교), 렌즈 세포(lens cell), 지방세포, 신장 세포, 장벽 기능 세포(예를 들어, 관 세포), 세포 외 기질 세포, 수축성 세포(예를 들어, 골격근 세포, 심근 세포, 평활근 세포), 혈액 세포(예를 들어, 적혈구), 면역계 세포(예를 들어, 거핵세포, 미세아교세포, 호중구, 비만 세포, T 세포, B 세포, 자연 살해 세포), 생식 세포(예를 들어, 정세포), 모세포, 또는 간세포일 수 있다.

[0167] 일반적으로, 본원에 개시되어 있는 보편적 공여자 세포의 개체군은 시간이 지남에 따라 삽입된 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열의 발현을 유지한다. 예를 들어, 보편적 공여자 세포 중 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%는 하나 이상의 관용원성 인자를 발현한다. 게다가, 본원에 개시되어 있는 보편적 공여자 세포로부터 유래하는 계통-제한되거나 완전 분화된 세포의 개체군은 시간이 지남에 따라 삽입된 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열의 발현을 유지한다. 예를 들어, 계통-제한되거나 완전 분화된 세포 중 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 또는 적어도 약 99%는 하나 이상의 관용원성 인자를 발현한다.

[0168] V. 제형 및 투여

[0169] 유전자 편집을 위한 제형 및 전달

[0170] 가이드 RNA, 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 관용원성 인자를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 또는 엔도뉴클레아제를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 본원에 기술되어 있는 바와 같은 엔도뉴클레아제는 당해 기술분야에 알려져 있는 임의의 방식으로 제형화되고 세포로 전달될 수 있다.

[0171] 가이드 RNA 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 특정 투여 방식 및 투여 형태에 따라 약학적으로 허용 가능한 부형제, 예를 들어 담체, 용매, 안정화제, 보조제, 희석제 등으로 제형화될 수 있다. 가이드 RNA 및/또는 폴리뉴클레오타이드 조성물은 제형 및 투여 경로에 따라 생리학적인 상용성 pH, 및 약 3의 pH 내지 약 11의 pH, 약 pH 3 내지 약 pH 7의 범위를 달성하도록 제형화될 수 있다. 일부의 경우, pH는 약 pH 5.0 내지 약 pH 8의 범위로 조절될 수 있다. 일부의 경우, 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 본원에 기술되어 있는 바와 같은 적어도 하나의 화합물을 치료학적 유효량으로 포함할 수 있다. 선택적으로, 조성물은 본원에 기술되어 있는 화합물의 조합을 포함할 수 있거나, 박테리아 성장의 치료 또는 예방에 유용한 제2 활성 성분(예를 들어, 그리고 제한 없이, 항박테리아제 또는 항균제)을 포함할 수 있거나, 본 개시내용의 시약의 조합을 포함할 수 있다.

[0172] 적합한 부형제는, 예를 들어 대형의 느리게 대사되는 거대분자, 예를 들어 단백질, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체 및 불활성 바이러스 입자를 포함하는 담체 분자를 포함한다. 기타 예시적인 부형제는 항산화제(예를 들어, 그리고 제한 없이, 아스코르브산), 킬레이트제(예를 들어, 그리고 제한 없이, EDTA), 탄수화물(예를 들어, 그리고 제한 없이, 텍스트린, 하이드록시알킬셀룰로오스 및 하이드록시알킬메틸셀룰로오스), 스테아르산, 액체(예를 들어, 그리고 제한 없이, 오일, 물, 식염수, 글리세롤 및 에탄올), 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 등을 포함할 수 있다.

[0173] 가이드 RNA 폴리뉴클레오타이드(RNA 또는 DNA) 및/또는 엔도뉴클레아제 폴리뉴클레오타이드(들)(RNA 또는 DNA)는 당해 기술분야에 알려져 있는 바이러스 또는 비-바이러스 전달 비히클에 의해 전달될 수 있다. 대안적으로, 엔도뉴클레아제 폴리펩타이드(들)는 전기천공 또는 지질 나노입자와 같은 당해 기술분야에 알려져 있는 바이러스 또는 비-바이러스 전달 비히클에 의해 전달될 수 있다. 추가의 대안적인 양태에서, DNA 엔도뉴클레아제는 하나 이상의 폴리펩타이드로서 단독으로 또는 tracrRNA와 함께 하나 이상의 가이드 RNA 또는 하나 이상의 crRNA와 예비 복합체화되어 전달될 수 있다.

[0174] 폴리뉴클레오타이드는 나노입자, 리포솜, 리보핵단백질, 양으로 하전된 펩타이드, 소분자 RNA-접합체, 압타머-RNA 키메라 및 RNA-융합 단백질 복합체를 포함하지만 이에 제한되지 않는 비-바이러스 전달 비히클에 의해 전달될 수 있다. 일부 예시적인 비-바이러스 전달 비히클은 문헌[Peer and Lieberman, Gene Therapy, 2011, 18: 1127~1133]에 기술되어 있다(이는 기타 폴리뉴클레오타이드의 전달에 또한 유용한 siRNA에 대한 비-바이러스 전달 비히클에 초점을 맞추고 있음).

[0175] 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드에 있어서, 제형은, 예를 들어 국제 출원 제PCT/US2012/069610호에 교시된 것 중 임의의 것으로부터 선택될 수 있다.

[0176] 가이드 RNA, sgRNA, 및 엔도뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 같은 폴리뉴클레오타이드는 지질 나노입자(LNP)에

의해 세포 또는 개체에 전달될 수 있다.

- [0177] LNP는 1,000 nm, 500 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm 또는 25 nm 미만의 직경을 갖는 임의의 입자를 지칭한다. 대안적으로, 나노입자는 1 nm 내지 1,000 nm, 1 nm 내지 500 nm, 1 nm 내지 250 nm, 25 nm 내지 200 nm, 25 nm 내지 100 nm, 35 nm 내지 75 nm 또는 25 nm 내지 60 nm 크기의 범위일 수 있다.
- [0178] LNP는 양이온성, 음이온성 또는 중성 지질로부터 만들어질 수 있다. 융합생성 인지질 DOPE 또는 막 성분 콜레스테롤과 같은 중성 지질은 형질감염 활성화 및 나노입자 안정성을 향상시키기 위해 '헬퍼 지질'로서 LNP에 포함될 수 있다. 양이온성 지질의 제한은 불량한 안정성 및 신속한 제거율, 및 염증성 또는 항염증성 반응의 생성으로 인한 낮은 효능을 포함한다.
- [0179] LNP는 또한 소수성 지질, 친수성 지질, 또는 소수성 및 친수성 지질 둘 다로 구성될 수 있다.
- [0180] 당해 기술분야에 알려져 있는 임의의 지질 또는 지질의 조합은 LNP를 생성하기 위해 사용될 수 있다. LNP를 생성하기 위해 사용되는 지질의 예로는 DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-콜레스테롤, DOTAP-콜레스테롤, GAP-DMORIE-DPyPE 및 GL67A-DOPE-DMPE-폴리에틸렌 글리콜(PEG)이 있다. 양이온성 지질의 예로는 98N12-5, C12-200, DLin-KC2-DMA(KC2), DLin-MC3-DMA(MC3), XTC, MD1 및 7C1이 있다. 중성 지질의 예로는 DPSC, DPPC, POPC, DOPE 및 SM이 있다. PEG-변형된 지질의 예로는 PEG-DMG, PEG-CerC14 및 PEG-CerC20이 있다.
- [0181] 지질은 LNP를 생성하기 위해 임의의 개수의 몰비로 조합될 수 있다. 게다가, 폴리뉴클레오타이드(들)는 LNP를 생성하기 위해 광범위한 범위의 몰비로 지질(들)과 조합될 수 있다.
- [0182] 제조합 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터는 전달용으로 사용될 수 있다. 전달될 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, 패키징될 AAV 게놈, rep 및 cap 유전자, 및 헬퍼 바이러스 기능이 세포에 제공되는 rAAV 입자를 생성하기 위한 기법은 당해 기술분야에서 표준이다. rAAV의 생성에는 전형적으로 하기 성분이 단일 세포(본원에서 패키징 세포로서 표기됨), 즉 rAAV 게놈, rAAV 게놈과는 별개인(즉, 내부에 없는) AAV rep 및 cap 유전자, 및 헬퍼 바이러스 기능이 내부에 존재할 것이 요구된다. AAV rep 및 cap 유전자는 제조합 바이러스가 유래할 수 있는 임의의 AAV 혈청형에서 유래할 수 있고, 본원에 기술되어 있는 AAV 혈청형을 포함하지만 이에 제한되지 않는 rAAV 게놈 ITR과는 상이한 AAV 혈청형에서 유래할 수 있다. 위형화(pseudotyping)된 rAAV의 생성은, 예를 들어 국제 특허출원 공개공보 제WO 01/83692호에 개시되어 있다.
- [0183] 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포의 제형 및 투여
- [0184] 본원에 기술되어 있는 바와 같은 유전자 변형 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포는 당해 기술분야에 알려져 있는 임의의 방식에 의해 제형화되고 개체에 투여될 수 있다.
- [0185] "투여하는", "도입하는", "주입하는", "생각하는" 및 "이식하는"이란 용어는 목적하는 부위에서 도입된 세포의 적어도 부분적인 국소화를 초래하는 방법 또는 경로에 의해 개체 내에 세포, 예를 들어 전구 세포를 배치한다는 맥락에서 상호 교환 가능하게 사용된다. 세포, 예를 들어 전구 세포 또는 이의 분화된 자손은 개체에서 목적하는 위치로의 전달을 초래하는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있으며, 여기서 이식된 세포 또는 세포의 성분의 적어도 일부가 생존 가능하다. 개체에 대한 투여 이후의 세포의 생존 기간은 수 시간(예를 들어, 24시간) 내지 수 일만큼 짧거나, 수년 또는 심지어 개체의 생애, 즉 장기간 생착만큼 길 수 있다.
- [0186] 본원에 기술되어 있는 바와 같은 유전자 변형 세포, 예를 들어 보편적 공여자 세포는 비변형 세포보다 더 긴 기간 동안 개체에 대한 투여 이후에 생존 가능할 수 있다.
- [0187] 일부 실시형태에서, 본원에 기술되어 있는 바와 같은 세포를 포함하는 조성물은 소정의 기간에 걸쳐 예를 들어 볼루스로서 또는 연속 주입에 의한 정맥 내 투여를 포함할 수 있는 적합한 경로에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 정맥 내 투여는 근육 내, 복강 내, 뇌척수 내, 피하, 관절 내, 활액 내 또는 척추강 내 경로에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 고체 형태, 수성 형태 또는 액체 형태일 수 있다. 일부 실시형태에서, 수성 또는 액체 형태는 분무화 또는 동결 건조될 수 있다. 일부 실시형태에서, 분무화 또는 동결건조된 형태는 수용액 또는 액체 용액으로 재구성될 수 있다.
- [0188] 또한, 세포 조성물은 리포솜 조성물로서 유화 또는 제시될 수 있으며, 단 유화 절차는 세포 생존력에 악영향을 미치지 않는다. 세포 및 임의의 기타 활성 성분은 본원에 기술되어 있는 치료 방법에서 사용하기에 적합한 양으로 약학적으로 허용 가능하고 활성 성분과 양립 가능한 부형제와 혼합될 수 있다.
- [0189] 세포 조성물에 포함된 추가적인 제제는 그 내부에 성분의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함할 수 있다. 약학적

으로 허용 가능한 염은, 예를 들어 염산 또는 인산과 같은 무기산, 또는 아세트산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산과 함께 형성된 산 부가염(폴리펩타이드의 유리 아미노기와 함께 형성됨)을 포함한다. 또한, 유리 카복실기와 함께 형성된 염은, 예를 들어 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화제2철과 같은 무기 염기, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유래할 수 있다.

[0190] 생리학적으로 내약성인 담체는 당해 기술분야에 잘 알려져 있다. 예시적인 액체 담체는 활성 성분 및 물 이외에 어떠한 재료도 함유하지 않거나, 생리학적 pH 값의 인산나트륨, 생리학적 식염수와 같은 완충액을 함유하거나, 둘 다(예를 들어, 포스페이트-완충 식염수)를 함유하는 멸균 수용액이다. 더욱 추가로, 수성 담체는 하나 초과 의 완충염, 및 염(예를 들어, 나트륨 및 염화칼륨), 텍스트로스, 폴리에틸렌 글리콜 및 기타 용질을 함유할 수 있다. 또한, 액체 조성물은 물 이외에 그리고 물을 배제하고 액상을 함유할 수 있다. 이 같은 추가적인 액상의 예로는 글리세린, 식물성 오일(예를 들어, 면실유) 및 유중수 유화액이 있다. 특정 질환 또는 병태의 치료에 효과적인 세포 조성물에 사용되는 활성 화합물의 양은 질환 또는 병태의 성질에 따라 달라질 수 있고, 표준 임상 기법에 의해 결정될 수 있다.

[0191] 일부 실시형태에서, 세포를 포함하는 조성물은 질병을 갖거나 갖는 것으로 의심되거나, 이의 위험성이 있는 개체, 예를 들어 인간 개체에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 조성물은 질병을 갖지 않거나 갖는 것으로 의심되지 않거나, 이의 위험성이 있지 않은 개체에 투여될 수 있다. 일부 실시형태에서, 개체는 건강한 인간이다. 일부 실시형태에서, 개체, 예를 들어 인간 개체는 유전적으로 유전 가능한 질병을 갖거나 갖는 것으로 의심되거나, 이의 위험성이 있다. 일부 실시형태에서, 개체는 질병을 나타내는 증상을 앓고 있거나, 이의 발병 위험성이 있다. 일부 실시형태에서, 질병은 당뇨병, 예를 들어, I형 당뇨병 또는 II형 당뇨병이다.

[0192] VI. 본 개시내용의 특정 조성물 및 방법

[0193] 따라서, 본 개시내용은 특히 하기 비제한적인 조성물 및 방법에 관한 것이다.

[0194] 제1 조성물(조성물 1)에서, 본 개시내용은 생존 인자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 삽입된 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 보편적 공여자 세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 보편적 공여자 세포는 관용원성 인자를 발현하고, 생존 인자의 파괴된 발현을 가지며, 보편적 공여자 세포는 대조군 세포와 비교하여 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는다.

[0195] 다른 조성물(조성물 2)에서, 본 개시내용은 조성물 1에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 대조군 세포는 야생형 세포이거나, 삽입된 뉴클레오타이드 서열을 포함하지 않는 세포이다.

[0196] 다른 조성물(조성물 3)에서, 본 개시내용은 조성물 1 또는 조성물 2에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 생존 인자의 파괴된 발현은 감소 또는 제거된 발현을 포함한다.

[0197] 다른 조성물(조성물 4)에서, 본 개시내용은 조성물 1 내지 조성물 3 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자는 PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 또는 CD47이다.

[0198] 다른 조성물(조성물 5)에서, 본 개시내용은 조성물 1 내지 조성물 4 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 생존 인자는 TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK 또는 MANF이다.

[0199] 다른 조성물(조성물 6)에서, 본 개시내용은 조성물 1 내지 조성물 5 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자는 HLA-E이고, 생존 인자는 TXNIP이다.

[0200] 다른 조성물(조성물 7)에서, 본 개시내용은 조성물 5 또는 조성물 6에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 자체의 신호 펩타이드가 없는 HLA-E에 융합된 B2M 막 단백질에 융합된 HLA-G 제시 펩타이드에 융합된 B2M 신호 펩타이드를 포함하는 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열을 포함한다.

[0201] 다른 조성물(조성물 8)에서, 본 개시내용은 조성물 7에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열은 본질적으로 서열 번호 55로 이루어진다.

[0202] 다른 조성물(조성물 9)에서, 본 개시내용은 조성물 1 내지 조성물 8 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0203] 다른 조성물(조성물 10)에서, 본 개시내용은 조성물 9에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 외생성

프로모터는 CMV, EF1 α , PGK, CAG 또는 UBC 프로모터이다.

- [0204] 다른 조성물(조성물 11)에서, 본 개시내용은 조성물 1 내지 조성물 10 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 삽입된 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함하며, 이때 보편적 공여자 세포는 관용원성 인자를 발현하고, MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자의 파괴된 발현을 갖는다.
- [0205] 다른 조성물(조성물 12)에서, 본 개시내용은 조성물 11에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자의 파괴된 발현은 감소 또는 제거된 발현을 포함한다.
- [0206] 다른 조성물(조성물 13)에서, 본 개시내용은 조성물 11 또는 조성물 12에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 제2 관용원성 인자는 PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 또는 CD47이다.
- [0207] 다른 조성물(조성물 14)에서, 본 개시내용은 조성물 11 내지 조성물 13 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP 또는 RFXANK이다.
- [0208] 다른 조성물(조성물 15)에서, 본 개시내용은 조성물 11 내지 조성물 14 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 제2 관용원성 인자는 PD-L1이고, MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자는 B2M이다.
- [0209] 다른 조성물(조성물 16)에서, 본 개시내용은 조성물 15에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 11로 이루어진다.
- [0210] 다른 조성물(조성물 17)에서, 본 개시내용은 조성물 11 내지 조성물 16 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0211] 다른 조성물(조성물 18)에서, 본 개시내용은 조성물 17에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 외생성 프로모터는 CMV, EF1 α , PGK, CAG 또는 UBC 프로모터이다.
- [0212] 다른 조성물(조성물 19)에서, 본 개시내용은 조성물 11 내지 조성물 18 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자는 HLA-E이고, 생존 인자는 TXNIP이고, 제2 관용원성 인자는 PD-L1이며, MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자는 B2M이다.
- [0213] 다른 조성물(조성물 20)에서, 본 개시내용은 조성물 1 내지 조성물 19 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포는 줄기 세포이다.
- [0214] 다른 조성물(조성물 21)에서, 본 개시내용은 조성물 20에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 줄기 세포는 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포이다.
- [0215] 다른 조성물(조성물 22)에서, 본 개시내용은 조성물 1 내지 조성물 19 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포는 분화된 세포 또는 체세포이다.
- [0216] 다른 조성물(조성물 23)에서, 본 개시내용은 조성물 1 내지 조성물 19 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포는 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포로 분화될 수 있다.
- [0217] 다른 조성물(조성물 24)에서, 본 개시내용은 조성물 23에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 계통-제한된 전구 세포는 채장 내배엽 전구체, 채장 내분비 전구체, 간엽성 전구 세포, 근육 전구 세포, 아세포, 조혈 전구 세포 또는 신경 전구 세포이다.
- [0218] 다른 조성물(조성물 25)에서, 본 개시내용은 조성물 23에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 완전 분화된 체세포는 채장 베타 세포, 상피 세포, 내배엽 세포, 대식세포, 간세포, 지방세포, 신장 세포, 혈액 세포, 심근세포 또는 면역계 세포이다.
- [0219] 다른 조성물(조성물 26)에서, 본 개시내용은 조성물 1 내지 조성물 25 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조

성물을 제공하며, 여기서 조성물은 복수의 보편적 공여자 세포를 포함한다.

- [0220] 다른 조성물(조성물 27)에서, 본 개시내용은 조성물 26에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 복수의 보편적 공여자 세포에서 유래하는 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포의 개체군을 포함한다.
- [0221] 다른 조성물(조성물 28)에서, 본 개시내용은 조성물 27에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 계통-제한된 전구 세포는 췌장 내배엽 전구체, 췌장 내분비 전구체, 간엽성 전구 세포, 근육 전구 세포, 아세포, 조혈 전구 세포 또는 신경 전구 세포이고, 완전 분화된 체세포는 췌장 베타 세포, 상피 세포, 내배엽 세포, 대식 세포, 간세포, 지방세포, 신장 세포, 혈액 세포, 심근세포 또는 면역계 세포이다.
- [0222] 다른 조성물(조성물 29)에서, 본 개시내용은 조성물 6 또는 조성물 19에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 복수의 보편적 공여자 세포를 포함한다.
- [0223] 다른 조성물(조성물 30)에서, 본 개시내용은 조성물 29에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 조성물은 복수의 보편적 공여자 세포에서 유래하는 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포의 개체군을 포함한다.
- [0224] 다른 조성물(조성물 31)에서, 본 개시내용은 조성물 30에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 계통-제한된 전구 세포는 완성 내배엽 세포, 원시 장관 세포, 후방 앞창자 세포, 췌장 내배엽 전구체, 췌장 내분비 전구체, 미성숙 베타 세포 또는 성숙한 베타 세포이고, 완전 분화된 체세포는 췌장 베타 세포이다.
- [0225] 다른 조성물(조성물 32)에서, 본 개시내용은 조성물 26 또는 조성물 29에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 50%, 적어도 약 70% 또는 적어도 약 90%는 제1 관용원성 인자, 제2 관용원성 인자 또는 제1 및 제2 관용원성 인자를 발현한다.
- [0226] 다른 조성물(조성물 33)에서, 본 개시내용은 조성물 27, 조성물 28, 조성물 30 및 조성물 31 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 50%, 적어도 약 70% 또는 적어도 약 90%는 제1 관용원성 인자, 제2 관용원성 인자 또는 제1 및 제2 관용원성 인자를 발현한다.
- [0227] 다른 조성물(조성물 34)에서, 본 개시내용은 조성물 26의 복수의 세포 또는 조성물 27 또는 조성물 28의 세포의 개체군을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0228] 다른 조성물(조성물 35)에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 개체를 치료하는 데 사용하기 위한 조성물 34에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공한다.
- [0229] 다른 조성물(조성물 36)에서, 본 개시내용은 조성물 35에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 개체는 질병을 갖거나 갖는 것으로 의심되거나, 이의 위험성이 있다.
- [0230] 다른 조성물(조성물 37)에서, 본 개시내용은 조성물 36에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 질병은 유전적으로 유전 가능한 질병이다.
- [0231] 다른 조성물(조성물 38)에서, 본 개시내용은 조성물 29의 복수의 세포 또는 조성물 30 또는 조성물 31의 세포의 개체군을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0232] 다른 조성물(조성물 39)에서, 본 개시내용은 당뇨병 치료를 필요로 하는 개체에서 당뇨병을 치료하기 위한 조성물 38에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공한다.
- [0233] 다른 조성물(조성물 40)에서, 본 개시내용은 조성물 39에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 개체는 I형 당뇨병 또는 II형 당뇨병을 갖는다.
- [0234] 다른 조성물(조성물 41)에서, 본 개시내용은 조성물 35 내지 조성물 40 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 개체는 인간이다.
- [0235] 제1 방법(방법 1)에서, 본 개시내용은 세포 투여를 필요로 하는 개체에 투여하기 위한 세포를 수득하는 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (a) 조성물 26, 조성물 29 및 조성물 32 중 임의의 하나에 따른 복수의 보편적 공여자 세포를 수득하거나 이미 수득한 단계; 및 (b) 세포가 계통-제한된 전구 세포 또는 완전히 분화된 체세포로 분화하기에 충분한 시간 및 조건 하에 복수의 보편적 공여자 세포를 유지시키는 단계를 포함한다.
- [0236] 다른 방법(방법 2)에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (a) 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포로의 분화 이후에 조성물 26, 조성물 29 또는 조성물

32 중 임의의 하나에 따른 복수의 보편적 공여자 세포를 수득하거나 이미 수득한 단계; 및 (b) 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포를 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

- [0237] 다른 방법(방법 3)에서, 본 개시내용은 방법 2에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 투여 단계는 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포를 포함하는 장치를 개체에 이식하는 단계를 포함한다.
- [0238] 다른 방법(방법 4)에서, 본 개시내용은 방법 1 내지 방법 3 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 계통-제한된 전구 세포는 췌장 내배엽 전구체, 췌장 내분비 전구체, 간엽성 전구 세포, 근육 전구 세포, 아세포, 조혈 전구 세포 또는 신경 전구 세포이고, 완전 분화된 체세포는 췌장 베타 세포, 상피 세포, 내배엽 세포, 대식세포, 간세포, 지방세포, 신장 세포, 혈액 세포, 심근세포 또는 면역계 세포이다.
- [0239] 다른 방법(방법 5)에서, 본 개시내용은 방법 1 내지 방법 4 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 개체는 질병을 갖거나 갖는 것으로 의심되거나, 질병에 대한 위험성이 있다.
- [0240] 다른 방법(방법 6)에서, 본 개시내용은 방법 5에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 질병은 유전적으로 유전 가능한 질병이다.
- [0241] 다른 방법(방법 7)에서, 본 개시내용은 방법 1 내지 방법 6 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 개체는 인간이다.
- [0242] 다른 방법(방법 8)에서, 본 개시내용은 당뇨병 치료를 필요로 하는 개체에서 당뇨병을 치료하기 위한 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (a) 췌장 내배엽 세포, 췌장 내분비 세포, 미성숙 베타 세포, 성숙한 베타 세포 또는 췌장 베타 세포로의 분화 이후에 조성물 29 또는 조성물 32에 따른 복수의 보편적 공여자 세포를 수득하거나 이미 수득한 단계; 및 (b) 췌장 내배엽 세포, 췌장 내분비 세포, 미성숙 베타 세포, 성숙한 베타 세포 또는 췌장 베타 세포를 개체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0243] 다른 방법(방법 9)에서, 본 개시내용은 방법 8에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 투여 단계는 췌장 내배엽 세포, 췌장 내분비 세포, 미성숙 베타 세포, 성숙한 베타 세포 또는 췌장 베타 세포를 포함하는 장치를 개체에 이식하는 단계를 포함한다.
- [0244] 다른 방법(방법 10)에서, 본 개시내용은 방법 8 또는 방법 9에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 개체는 I형 당뇨병 또는 II형 당뇨병을 갖는다.
- [0245] 다른 방법(방법 11)에서, 본 개시내용은 방법 8 내지 방법 10 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 개체는 인간이다.
- [0246] 다른 조성물(조성물 41)에서, 본 개시내용은 티오레독신-상호 작용 단백질(TXNIP)을 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 삽입된 HLA 클래스 I 조직 적합성 항원인 알파 사슬 E(HLA-E)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 보편적 공여자 세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 보편적 공여자 세포는 HLA-E를 발현하고, TXNIP의 파괴된 발현을 갖고, 보편적 공여자 세포는 대조군과 비교하여 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는다.
- [0247] 다른 조성물(조성물 42)에서, 본 개시내용은 조성물 41에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 대조군 세포는 야생형 세포이거나, 삽입된 뉴클레오타이드 서열을 포함하지 않는 세포이다.
- [0248] 다른 조성물(조성물 43)에서, 본 개시내용은 조성물 41에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 TXNIP의 파괴된 발현은 감소 또는 제거된 발현을 포함한다.
- [0249] 다른 조성물(조성물 44)에서, 본 개시내용은 조성물 41에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 자체의 신호 펩타이드가 없는 HLA-E에 융합된 B2M 막 단백질에 융합된 HLA-G 제시 펩타이드에 융합된 B2M 신호 펩타이드를 포함하는 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열을 포함한다.
- [0250] 다른 조성물(조성물 45)에서, 본 개시내용은 조성물 44에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열은 본질적으로 서열 번호 55로 이루어진다.
- [0251] 다른 조성물(조성물 46)에서, 본 개시내용은 조성물 41에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0252] 다른 조성물(조성물 47)에서, 본 개시내용은 조성물 41에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 외생성 프로모터는 CAG 프로모터이다.

- [0253] 다른 조성물(조성물 48)에서, 본 개시내용은 조성물 41에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포는 줄기 세포이다.
- [0254] 다른 조성물(조성물 49)에서, 본 개시내용은 조성물 48에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 줄기 세포는 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포이다.
- [0255] 다른 조성물(조성물 50)에서, 본 개시내용은 조성물 41에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포는 분화된 세포 또는 체세포이다.
- [0256] 다른 조성물(조성물 51)에서, 본 개시내용은 조성물 41에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포는 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포로 분화될 수 있다.
- [0257] 다른 조성물(조성물 52)에서, 본 개시내용은 조성물 51에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 계통-제한된 전구 세포는 완성 내배엽 세포, 원시 장관 세포, 후방 앞창자 세포, 췌장 내배엽 전구체, 췌장 내분비 전구체, 미성숙 베타 세포 또는 성숙한 베타 세포이고, 완전 분화된 체세포는 췌장 베타 세포이다.
- [0258] 다른 조성물(조성물 53)에서, 본 개시내용은 조성물 41에서 제공된 바와 같은 복수의 보편적 공여자 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0259] 다른 조성물(조성물 54)에서, 본 개시내용은 조성물 53에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 50%는 HLA-E를 발현한다.
- [0260] 다른 조성물(조성물 55)에서, 본 개시내용은 조성물 53에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 70%는 HLA-E를 발현한다.
- [0261] 다른 조성물(조성물 56)에서, 본 개시내용은 조성물 53에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 90%는 HLA-E를 발현한다.
- [0262] 다른 조성물(조성물 57)에서, 본 개시내용은 조성물 53의 복수의 보편적 공여자 세포로부터 유래하는 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포의 개체군을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0263] 다른 조성물(조성물 58)에서, 본 개시내용은 조성물 57에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 계통-제한된 전구 세포는 완성 내배엽 세포, 원시 장관 세포, 후방 앞창자 세포, 췌장 내배엽 전구체, 췌장 내분비 전구체, 미성숙 베타 세포 또는 성숙한 베타 세포이고, 완전 분화된 체세포는 췌장 베타 세포이다.
- [0264] 다른 조성물(조성물 59)에서, 본 개시내용은 조성물 58에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 50%는 HLA-E를 발현한다.
- [0265] 다른 조성물(조성물 60)에서, 본 개시내용은 조성물 59에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 70%는 HLA-E를 발현한다.
- [0266] 다른 조성물(조성물 61)에서, 본 개시내용은 조성물 59에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 90%는 HLA-E를 발현한다.
- [0267] 다른 조성물(조성물 62)에서, 본 개시내용은 HLA 클래스 I 조직 적합성 항원인 알파 사슬 E(HLA-E)의 도입 또는 증가된 발현 및 티오레독신-상호 작용 단백질(TXNIP)의 파괴된 발현을 갖는 유전자 변형 세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 유전자 변형 세포는 비변형 세포와 비교하여 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는다.
- [0268] 다른 조성물(조성물 63)에서, 본 개시내용은 조성물 62에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 이때 조성물은 TXNIP를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 삽입되어 TXNIP 유전자를 파괴하는 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0269] 다른 조성물(조성물 64)에서, 본 개시내용은 조성물 62에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 TXNIP의 파괴된 발현은 감소 또는 제거된 발현을 포함한다.
- [0270] 다른 방법(방법 12)에서, 본 개시내용은 당뇨병 치료를 필요로 하는 개체에서 당뇨병을 치료하기 위한 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 췌장 내배엽 세포, 췌장 내분비 세포, 미성숙 베타 세포, 성숙한 베타 세포 또는 췌장 베타 세포로의 분화 이후에 조성물 53의 복수의 보편적 공여자 세포를 수득하거나 이미 수득한 단계; 및 (b) 췌장 내배엽 세포, 췌장 내분비 세포, 미성숙 베타 세포, 성숙한 베타 세포 또는 췌장 베타 세포를 개체에 투여

하는 단계를 포함한다.

- [0271] 다른 방법(방법 13)에서, 본 개시내용은 방법 12에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 투여 단계는 체장 내배엽 세포, 체장 내분비 세포, 미성숙 베타 세포, 성숙한 베타 세포 또는 체장 베타 세포를 포함하는 장치를 개체에 이식하는 단계를 포함한다.
- [0272] 다른 방법(방법 14)에서, 본 개시내용은 방법 12에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 개체는 I형 당뇨병 또는 II형 당뇨병을 갖는다.
- [0273] 다른 방법(방법 15)에서, 본 개시내용은 방법 12에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 개체는 인간이다.
- [0274] 다른 조성물(조성물 65)에서, 본 개시내용은 보편적 공여자 세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 이때 보편적 공여자 세포는 (a) 베타-2 마이크로글로불린(B2M)을 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 삽입된 예정사-리간드 1(PD-L1)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (b) 티오레독신-상호 작용 단백질(TXNIP)을 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 삽입된 HLA 클래스 I 조직 적합성 항원인 알파 사슬 E(HLA-E)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기서 보편적 공여자 세포는 PD-L1 및 HLA-E를 발현하고, B2M 및 TXNIP의 파괴된 발현을 갖고, 보편적 공여자 세포는 대조군 세포와 비교하여 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는다.
- [0275] 다른 조성물(조성물 66)에서, 본 개시내용은 조성물 65에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 대조군 세포는 야생형 세포이거나, 삽입된 뉴클레오타이드 서열을 포함하지 않는 세포이다.
- [0276] 다른 조성물(조성물 67)에서, 본 개시내용은 조성물 65에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 B2M의 파괴된 발현은 B2M의 감소 또는 제거된 발현을 포함하고, TXNIP의 파괴된 발현은 TXNIP의 감소 또는 제거된 발현을 포함한다.
- [0277] 다른 조성물(조성물 68)에서, 본 개시내용은 조성물 65에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 11로 이루어진다.
- [0278] 다른 조성물(조성물 69)에서, 본 개시내용은 조성물 65에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 자체의 신호 펩타이드가 없는 HLA-E에 융합된 B2M 막 단백질에 융합된 HLA-G 제시 펩타이드에 융합된 B2M 신호 펩타이드를 포함하는 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열을 포함한다.
- [0279] 다른 조성물(조성물 70)에서, 본 개시내용은 조성물 69에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열은 본질적으로 서열 번호 55로 이루어진다.
- [0280] 다른 조성물(조성물 71)에서, 본 개시내용은 조성물 65에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0281] 다른 조성물(조성물 72)에서, 본 개시내용은 조성물 71에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 외생성 프로모터는 CAG 프로모터이다.
- [0282] 다른 조성물(조성물 73)에서, 본 개시내용은 조성물 65에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포는 줄기 세포이다.
- [0283] 다른 조성물(조성물 74)에서, 본 개시내용은 조성물 73에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 줄기 세포는 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포이다.
- [0284] 다른 조성물(조성물 75)에서, 본 개시내용은 조성물 65에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포는 분화된 세포 또는 체세포이다.
- [0285] 다른 조성물(조성물 76)에서, 본 개시내용은 조성물 65에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포는 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포로 분화될 수 있다.
- [0286] 다른 조성물(조성물 77)에서, 본 개시내용은 조성물 76에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 계통-제한된 전구 세포는 완성 내배엽 세포, 원시 장관 세포, 후방 앞장자 세포, 체장 내배엽 전구체, 체장 내분비 전구체, 미성숙 베타 세포 또는 성숙한 베타 세포이고, 완전 분화된 체세포는 체장 베타 세포이다.
- [0287] 다른 조성물(조성물 78)에서, 본 개시내용은 조성물 65에서 제공된 바와 같은 복수의 보편적 공여자 세포를 포

합하는 조성물을 제공한다.

- [0288] 다른 조성물(조성물 79)에서, 본 개시내용은 조성물 78에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 50%는 PD-L1을 발현하고/하거나, 세포의 적어도 약 50%는 HLA-E를 발현한다.
- [0289] 다른 조성물(조성물 80)에서, 본 개시내용은 조성물 78에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 70%는 PD-L1을 발현하고/하거나, 세포의 적어도 약 70%는 HLA-E를 발현한다.
- [0290] 다른 조성물(조성물 81)에서, 본 개시내용은 조성물 78에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 90%는 PD-L1을 발현하고/하거나, 세포의 적어도 약 90%는 HLA-E를 발현한다.
- [0291] 다른 조성물(조성물 82)에서, 본 개시내용은 조성물 78에서 제공된 바와 같은 복수의 보편적 공여자 세포로부터 유래하는 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포의 개체군을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0292] 다른 조성물(조성물 83)에서, 본 개시내용은 조성물 82에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 계통-제한된 전구 세포는 완성 내배엽 세포, 원시 장관 세포, 후방 앞장자 세포, 췌장 내배엽 전구체, 췌장 내분비 전구체, 미성숙 베타 세포 또는 성숙한 베타 세포이고, 완전 분화된 체세포는 췌장 베타 세포이다.
- [0293] 다른 조성물(조성물 84)에서, 본 개시내용은 조성물 83에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 50%는 PD-L1을 발현하고/하거나, 세포의 적어도 약 50%는 HLA-E를 발현한다.
- [0294] 다른 조성물(조성물 85)에서, 본 개시내용은 조성물 83에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 70%는 PD-L1을 발현하고/하거나, 세포의 적어도 약 70%는 HLA-E를 발현한다.
- [0295] 다른 조성물(조성물 86)에서, 본 개시내용은 조성물 83에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 세포의 적어도 약 90%는 PD-L1을 발현하고/하거나, 세포의 적어도 약 90%는 HLA-E를 발현한다.
- [0296] 다른 조성물(조성물 87)에서, 본 개시내용은 PD-L1 및 HLA-E의 도입 또는 증가된 발현 및 B2M 및 TXNIP의 파괴된 발현을 갖는 유전자 변형 세포를 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 유전자 변형 세포는 비변형 세포와 비교하여 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는다.
- [0297] 다른 조성물(조성물 88)에서, 본 개시내용은 조성물 87에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 이때 조성물은 B2M을 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 삽입되어 B2M 유전자를 파괴하는 PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 TXNIP를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 삽입되어 TXNIP 유전자를 파괴하는 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0298] 다른 조성물(조성물 89)에서, 본 개시내용은 조성물 87에서 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 B2M 및 TXNIP의 파괴된 발현은 B2M 및 TXNIP의 감소 또는 제거된 발현을 포함한다.
- [0299] 다른 방법(방법 16)에서, 본 개시내용은 당뇨병 치료를 필요로 하는 개체에서 당뇨병을 치료하기 위한 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (a) 췌장 내배엽 세포, 췌장 내분비 세포, 미성숙 베타 세포, 성숙한 베타 세포 또는 췌장 베타 세포로의 분화 이후에 조성물 78의 복수의 보편적 공여자 세포를 수득하거나 이미 수득한 단계; 및 (b) 췌장 내배엽 세포, 췌장 내분비 세포, 미성숙 베타 세포, 성숙한 베타 세포 또는 췌장 베타 세포를 개체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0300] 다른 방법(방법 17)에서, 본 개시내용은 방법 16에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 투여 단계는 췌장 내배엽 세포, 췌장 내분비 세포, 미성숙 베타 세포, 성숙한 베타 세포 또는 췌장 베타 세포를 포함하는 장치를 개체에 이식하는 단계를 포함한다.
- [0301] 다른 방법(방법 18)에서, 본 개시내용은 방법 16에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 개체는 I형 당뇨병 또는 II형 당뇨병을 갖는다.
- [0302] 다른 방법(방법 19)에서, 본 개시내용은 방법 16에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 개체는 인간이다.
- [0303] 다른 방법(방법 20)에서, 본 개시내용은 보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 세포에 (a) 생존 인자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근의 부위를 표적화하는 제1 부위-지정 뉴클레아제; 및 (b) 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 핵산으로서, 관용원성 인자는 (i) (a)의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동인 뉴클레오타이드 서열 및 (ii) (a)의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동인 뉴클레오타이드 서열이 측면에 있는 것인 제1 핵산을 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 제1

부위-지정 뉴클레아제는 (a)의 표적 부위를 개열하고, (b)의 제1 핵산은 (a)의 부위와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된 부위에 삽입되어 보편적 공여자 세포를 생성하고, 이때 보편적 공여자 세포는 (b)의 핵산이 삽입되지 않은 세포와 비교하여 증가된 세포 생존을 갖는다.

- [0304] 다른 방법(방법 21)에서, 본 개시내용은 방법 20에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 생존 인자는 TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK 또는 MANF이다.
- [0305] 다른 방법(방법 22)에서, 본 개시내용은 방법 20 또는 방법 21에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자는 PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 또는 CD47이다.
- [0306] 다른 방법(방법 23)에서, 본 개시내용은 방법 20 내지 방법 22 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 생존 인자는 TXNIP이다.
- [0307] 다른 방법(방법 24)에서, 본 개시내용은 방법 23에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자는 HLA-E이다.
- [0308] 다른 방법(방법 25)에서, 본 개시내용은 방법 20 내지 방법 24 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 부위-지정 뉴클레아제는 CRISPR 뉴클레아제 및 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 CRISPR 시스템이다.
- [0309] 다른 방법(방법 26)에서, 본 개시내용은 방법 20 내지 방법 25 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 CRISPR 뉴클레아제는 II형 Cas9 뉴클레아제 또는 V형 Cpf1 뉴클레아제이고, CRISPR 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결된다.
- [0310] 다른 방법(방법 27)에서, 본 개시내용은 방법 20 내지 방법 26 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 gRNA는 서열 번호 15 내지 서열 번호 24로 이루어진 표적 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0311] 다른 방법(방법 28)에서, 본 개시내용은 방법 25 내지 방법 27 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 (b)(i)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 25로 이루어지고, (b)(ii)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 32로 이루어진다.
- [0312] 다른 방법(방법 29)에서, 본 개시내용은 방법 20 내지 방법 28 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 이 방법은 세포에 (c) MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 성분 또는 전사 조절자 중 하나 이상을 암호화하는 유전자 내부 또는 부근의 부위를 표적화하는 제2 부위-지정 뉴클레아제; 및 (d) 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 핵산으로서, 제2 관용원성 인자는 (iii) (c)의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동인 뉴클레오타이드 서열 및 (iv) (c)의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동인 뉴클레오타이드 서열이 측면에 있는 것인 제2 핵산을 전달하는 단계를 추가로 포함하며, 이때 (d)의 제2 관용원성 인자는 제1 관용원성 인자(b)와 상이하고, 제2 부위-지정 뉴클레아제는 (c)의 표적 부위를 개열하고, (d)의 제2 핵산은 (c)의 부위와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된 부위에 삽입되고, 보편적 공여자 세포는 (d)의 제2 핵산이 삽입되지 않은 세포와 비교하여 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는다.
- [0313] 다른 방법(방법 30)에서, 본 개시내용은 방법 29에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP 또는 RFXANK이다.
- [0314] 다른 방법(방법 31)에서, 본 개시내용은 방법 29 또는 방법 30에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제2 관용원성 인자는 PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 또는 CD47이다.
- [0315] 다른 방법(방법 32)에서, 본 개시내용은 방법 29 내지 방법 31 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자는 B2M이다.
- [0316] 다른 방법(방법 33)에서, 본 개시내용은 방법 32에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제2 관용원성 인자는 PD-L1이다.
- [0317] 다른 방법(방법 34)에서, 본 개시내용은 방법 29 내지 방법 33 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제2 부위-지정 뉴클레아제는 CRISPR 뉴클레아제 및 gRNA를 포함하는 CRISPR 시스템이다.

- [0318] 다른 방법(방법 35)에서, 본 개시내용은 방법 34에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 CRISPR 뉴클레아제는 II형 Cas9 뉴클레아제 또는 V형 Cfp1 뉴클레아제이고, CRISPR 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결된다.
- [0319] 다른 방법(방법 36)에서, 본 개시내용은 방법 34 또는 방법 35에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 gRNA는 서열 번호 1 내지 서열 번호 3 또는 서열 번호 35 내지 서열 번호 44로 이루어진 표적 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0320] 다른 방법(방법 37)에서, 본 개시내용은 방법 34 내지 방법 36 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 (d)(iii)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 7로 이루어지고, (d)(iv)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 13으로 이루어진다.
- [0321] 다른 방법(방법 38)에서, 본 개시내용은 방법 25 내지 방법 28 또는 방법 34 내지 방법 37 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 CRISPR 뉴클레아제 및 gRNA는 1:3의 몰비로 존재한다.
- [0322] 다른 방법(방법 39)에서, 본 개시내용은 방법 20 내지 방법 38 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0323] 다른 방법(방법 40)에서, 본 개시내용은 방법 39에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 외생성 프로모터는 항시적, 유도성, 시간-, 조직- 또는 세포 유형-특이적 프로모터이며, 선택적으로 외생성 프로모터는 CMV, EF1 α , PGK, CAG 또는 UBC 프로모터이다.
- [0324] 다른 방법(방법 41)에서, 본 개시내용은 보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (a) 생존 인자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근의 부위를 표적화하는 제1 부위-지정 뉴클레아제; (b) 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 핵산으로서, 제1 관용원성 인자는 (i) (a)의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동인 뉴클레오타이드 서열 및 (ii) (a)의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동인 뉴클레오타이드 서열이 측면에 있으며, 여기서 제1 부위-지정 뉴클레아제는 (a)의 표적 부위를 개열하고, 상동성 재조합 과정을 통해 (b) 제1 핵산은 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 (a)의 부위와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된 부위에 삽입되어 (a)의 유전자를 파괴하는 부위 내로 삽입하기 위한 주형으로서 사용되는 것인 제1 핵산; (c) MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자 중 하나 이상을 암호화하는 유전자 내부 또는 부근의 부위를 표적화하는 제2 부위-지정 뉴클레아제; 및 (d) 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 핵산으로서, 제2 관용원성 인자는 (iii) (c)의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열 및 (iv) (c)의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열이 측면에 있으며, 여기서 (d)의 관용원성 인자는 관용원성 인자(b)와 상이하고, 제2 부위-지정 뉴클레아제는 (c)의 표적 부위를 개열하고, 상동성 재조합 과정을 통해 (d)의 제2 핵산은 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 (c)의 부위와 부분적으로 중첩하거나 완전히 중첩하거나, 그 내부에 포함된 부위에 삽입되어 (c)의 유전자를 파괴하는 부위 내로 삽입하여 보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 주형으로서 사용되는 것인 제2 핵산을 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 보편적 공여자 세포는 (b)의 제1 핵산 및 (d)의 제2 핵산이 삽입되지 않은 세포와 비교하여 증가된 세포 생존을 갖는다.
- [0325] 다른 방법(방법 42)에서, 본 개시내용은 방법 41에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 생존 인자는 TXNIP이고, 제1 관용원성 인자는 HLA-E이고, MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자는 B2M이고, 제2 관용원성 인자는 PD-L1이다.
- [0326] 다른 방법(방법 43)에서, 본 개시내용은 방법 20 내지 방법 42 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 세포는 포유동물 세포이고, 선택적으로 세포는 인간 세포이다.
- [0327] 다른 방법(방법 44)에서, 본 개시내용은 방법 20 내지 방법 43 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 세포는 줄기 세포이다.
- [0328] 다른 방법(방법 45)에서, 본 개시내용은 방법 20 내지 방법 43 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 세포는 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포이다.
- [0329] 다른 방법(방법 46)에서, 본 개시내용은 방법 20 내지 방법 43 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제

공하며, 여기서 세포는 분화된 세포 또는 체세포이다.

- [0330] 다른 방법(방법 47)에서, 본 개시내용은 방법 20 내지 방법 43 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 보편적 공여자 세포는 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포로 분화될 수 있다.
- [0331] 다른 방법(방법 48)에서, 본 개시내용은 방법 47에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 계통-제한된 전구 세포는 췌장 내배엽 전구체, 췌장 내분비 전구체, 간엽성 전구 세포, 근육 전구 세포, 아세포, 조혈 전구 세포 또는 신경 전구 세포이다.
- [0332] 다른 방법(방법 49)에서, 본 개시내용은 방법 47에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 완전 분화된 체세포는 내분비성 분비 세포(예를 들어, 췌장 베타 세포), 상피 세포, 내배엽 세포, 대식세포, 간세포, 지방세포, 신장 세포, 혈액 세포 또는 면역계 세포이다.
- [0333] 다른 방법(방법 49A)에서, 본 개시내용은 방법 47에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 완전 분화된 체세포는 심근세포 또는 면역계 세포이다.
- [0334] 다른 조성물(조성물 90)에서, 본 개시내용은 방법 20 내지 방법 49 중 임의의 하나에 의해 생성된 복수의 보편적 공여자 세포를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0335] 다른 조성물(조성물 91)에서, 본 개시내용은 세포가 분화를 겪기에 충분한 시간 및 조건 하에 유지되는, 조성물 90에 의해 제공된 바와 같은 조성물을 제공한다.
- [0336] 다른 조성물(조성물 92)에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 개체를 치료하는 데 사용하기 위한, 조성물 90 또는 조성물 91에 의해 제공된 바와 같은 조성물을 제공한다.
- [0337] 다른 조성물(조성물 93)에서, 본 개시내용은 조성물 92에 의해 제공된 바와 같은 조성물을 제공하며, 여기서 개체는 질병을 갖거나 갖는 것으로 의심되거나, 이에 대한 위험성이 있는 인간이다.
- [0338] 다른 방법(방법 50)에서, 본 개시내용은 조성물 90 또는 조성물 91의 복수의 보편적 공여자 세포를 개체에 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다.
- [0339] 다른 방법(방법 51)에서, 본 개시내용은 치료를 필요로 하는 개체를 치료하기 위한 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (a) 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포로의 분화 이후에 조성물 90의 복수의 보편적 공여자 세포를 수득하거나 이미 수득한 단계; 및 (b) 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포를 개체에 투여하는 단계를 포함한다.
- [0340] 다른 방법(방법 52)에서, 본 개시내용은 세포 투여를 필요로 하는 개체에 투여하기 위한 세포를 수득하는 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (a) 제31항의 보편적 공여자 세포를 수득하거나 이미 수득한 단계; 및 (b) 세포가 계통-제한된 전구 세포 또는 완전 분화된 체세포로 분화하기에 충분한 시간 및 조건 하에 보편적 공여자 세포를 유지시키는 단계를 포함한다.
- [0341] 다른 방법(방법 53)에서, 본 개시내용은 방법 51 또는 방법 52에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 계통-제한된 전구 세포는 췌장 내배엽 전구체, 췌장 내분비 전구체, 간엽성 전구 세포, 근육 전구 세포, 아세포, 조혈 전구 세포 또는 신경 전구 세포이다.
- [0342] 다른 방법(방법 54)에서, 본 개시내용은 방법 51 또는 방법 52에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 완전 분화된 체세포는 내분비성 분비 세포(예를 들어, 췌장 베타 세포), 상피 세포, 내배엽 세포, 대식세포, 간세포, 지방세포, 신장 세포, 혈액 세포 또는 면역계 세포이다.
- [0343] 다른 방법(방법 54A)에서, 본 개시내용은 방법 51 또는 방법 52에서 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 완전 분화된 체세포는 심근세포이다.
- [0344] 다른 방법(방법 55)에서, 본 개시내용은 방법 50 내지 방법 54 중 임의의 하나에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 개체는 질병을 갖거나 갖는 것으로 의심되거나, 이에 대한 위험성이 있는 인간이다.
- [0345] 다른 방법(방법 56)에서, 본 개시내용은 방법 55에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 질병은 유전적으로 유전 가능한 질병이다.
- [0346] 다른 조성물(조성물 93)에서, 본 개시내용은 서열 번호 15 내지 서열 번호 24로 이루어진 표적 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함하는 가이드 RNA를 제공한다.

- [0347] 다른 방법(방법 57)에서, 본 개시내용은 보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 시험관 내 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (a) RNA-가이드 뉴클레아제; (b) 티오레독신-상호 작용 단백질(TXNIP) 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하는 가이드 RNA(gRNA); 및 (c) 핵산을 포함하는 벡터로서, 핵산은 (i) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 본질적으로 서열 번호 25로 이루어지고 표적 부위의 50개의 핵염기의 좌측 또는 내부에 위치한 게놈 영역과 상동성인 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열; 및 (iii) 서열 번호 32로 이루어지고 표적 부위의 50개의 핵염기의 우측 또는 내부에 위치한 게놈 영역과 상동성인 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 벡터를 줄기 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 이때 (i)는 (ii) 및 (iii)이 측면에 있고; TXNIP 유전자 유전자위는 표적 부위에서 개열되고, 핵산은 TXNIP 유전자 유전자위 내에 삽입되어 TXNIP 유전자를 파괴하고 보편적 공여자 세포를 생성하며, 보편적 공여자 세포는 대조군 세포와 비교하여 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는다.
- [0348] 다른 방법(방법 57A)에서, 본 개시내용은 방법 57에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 핵산은 표적 부위의 50개의 염기쌍 내부에 있는 TXNIP 유전자 유전자위 내에 삽입된다.
- [0349] 다른 방법(방법 58)에서, 본 개시내용은 방법 57에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 대조군 세포는 야생형 세포이거나, 삽입된 핵산을 포함하지 않는 세포이다.
- [0350] 다른 방법(방법 59)에서, 본 개시내용은 방법 57에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 파괴된 TXNIP 유전자는 TXNIP의 감소 또는 제거된 발현을 갖는다.
- [0351] 다른 방법(방법 60)에서, 본 개시내용은 방법 57에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 gRNA는 서열 번호 15 내지 서열 번호 24로 이루어진 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0352] 다른 방법(방법 61)에서, 본 개시내용은 방법 57에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 gRNA는 서열 번호 20으로 이루어진 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0353] 다른 방법(방법 62)에서, 본 개시내용은 방법 57에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 벡터는 플라스미드 벡터이다.
- [0354] 다른 방법(방법 63)에서, 본 개시내용은 방법 57에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 관용원성 인자는 HLA 클래스 I 조직 적합성 항원인 알파 사슬 E(HLA-E)이다.
- [0355] 다른 방법(방법 64)에서, 본 개시내용은 방법 63에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 자체의 신호 펩타이드가 없는 HLA-E에 융합된 B2M 막 단백질에 융합된 HLA-G 제시 펩타이드에 융합된 B2M 신호 펩타이드를 포함하는 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열을 포함한다.
- [0356] 다른 방법(방법 65)에서, 본 개시내용은 방법 63에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열은 본질적으로 서열 번호 55로 이루어진다.
- [0357] 다른 방법(방법 66)에서, 본 개시내용은 방법 65에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0358] 다른 방법(방법 67)에서, 본 개시내용은 방법 66에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 외생성 프로모터는 CMV, EF1 α , PGK, CAG 또는 UBC 프로모터이다.
- [0359] 다른 방법(방법 68)에서, 본 개시내용은 방법 57에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이다.
- [0360] 다른 방법(방법 69)에서, 본 개시내용은 방법 68에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 Cas9 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결된다.
- [0361] 다른 방법(방법 70)에서, 본 개시내용은 방법 69에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 Cas9 뉴클레아제 및 gRNA는 1:3의 몰비로 존재한다.
- [0362] 다른 방법(방법 71)에서, 본 개시내용은 방법 57에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 줄기 세포는 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포이다.
- [0363] 다른 방법(방법 72)에서, 본 개시내용은 방법 57에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 줄기 세포는 인간 줄기 세포이다.

- [0364] 다른 방법(방법 73)에서, 본 개시내용은 보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 시험관 내 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (a) RNA-가이드 뉴클레아제;(b) 티오레독신-상호 작용 단백질(TXNIP) 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하는 가이드 RNA(gRNA); 및 (c) 핵산을 포함하는 벡터로서, 핵산은 (i) 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 표적 부위의 50개의 핵염기의 좌측 또는 내부에 위치한 게놈 영역과 상동성인 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열; 및 (iii) 표적 부위의 50개의 핵염기의 우측 또는 내부에 위치한 게놈 영역과 상동성인 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 벡터를 줄기 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 이때 (i)는 (ii) 및 (iii)이 측면에 있고, 벡터는 서열 번호 34 또는 서열 번호 56으로 이루어진 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; TXNIP 유전자 유전자위는 표적 부위에서 개열되고, 핵산은 TXNIP 유전자 유전자위 내에 삽입되어 TXNIP 유전자를 파괴하고 보편적 공여자 세포를 생성하며, 보편적 공여자 세포는 대조군 세포와 비교하여 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는다.
- [0365] 다른 방법(방법 73A)에서, 본 개시내용은 방법 73에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 핵산은 표적 부위의 50개의 염기쌍 내부의 XNIP 유전자 유전자위 내에 삽입된다.
- [0366] 다른 방법(방법 74)에서, 본 개시내용은 방법 73에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 대조군 세포는 야생형 세포이거나, 삽입된 핵산을 포함하지 않는 세포이다.
- [0367] 다른 방법(방법 75)에서, 본 개시내용은 방법 73에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 파괴된 TXNIP 유전자는 TXNIP의 감소 또는 제거된 발현을 갖는다.
- [0368] 다른 방법(방법 76)에서, 본 개시내용은 방법 73에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 gRNA는 서열 번호 15 내지 서열 번호 24로 이루어진 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0369] 다른 방법(방법 77)에서, 본 개시내용은 방법 73에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 gRNA는 서열 번호 20으로 이루어진 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0370] 다른 방법(방법 78)에서, 본 개시내용은 방법 73에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 벡터는 플라스미드 벡터이다.
- [0371] 다른 방법(방법 79)에서, 본 개시내용은 방법 73에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 관용원성 인자는 HLA 클래스 I 조직 적합성 항원인 알파 사슬 E(HLA-E)이다.
- [0372] 다른 방법(방법 80)에서, 본 개시내용은 방법 73에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이다.
- [0373] 다른 방법(방법 81)에서, 본 개시내용은 방법 80에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 Cas9 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결된다.
- [0374] 다른 방법(방법 82)에서, 본 개시내용은 방법 80에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 Cas9 뉴클레아제 및 gRNA는 1:3의 몰비로 존재한다.
- [0375] 다른 방법(방법 83)에서, 본 개시내용은 방법 73에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 줄기 세포는 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포이다.
- [0376] 다른 방법(방법 84)에서, 본 개시내용은 방법 73에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 줄기 세포는 인간 줄기 세포이다.
- [0377] 다른 방법(방법 85)에서, 본 개시내용은 보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 시험관 내 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (a) RNA-가이드 뉴클레아제, 및 베타-2 마이크로글로불린(B2M) 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하는 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 제1 리보핵단백질(RNP) 복합체; (b) 핵산을 포함하는 제1 벡터로서, 핵산은 (i) 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 본질적으로 서열 번호 7로 이루어지고 B2M 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 50개의 핵염기의 좌측 또는 내부에 위치한 게놈 영역과 상동성인 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열; 및 (iii) 본질적으로 서열 번호 13으로 이루어지고 B2M 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 50개의 핵염기의 우측 또는 내부에 위치한 게놈 영역과 상동성인 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기서 (i)는 (ii) 및 (iii)이 측면에 있고; B2M 유전자 유전자위는 표적 부위에서 개열되고, 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산은 B2M 유전자 유전자위 내에 삽입되어 B2M 유전자를 파괴하는 것인 제1 벡터; (c) RNA-가이드 뉴클레아제, 및 티오레독신-상호 작용 단백질(TXNIP) 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하는 gRNA를 포함하는 제2 RNP 복합체; 및 (d) 핵산을 포함하는 제2 벡터로서,

핵산은 (i) 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) 본질적으로 서열 번호 25로 이루어지고 TXNIP 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 50개의 핵염기의 좌측 또는 내부에 위치한 게놈 영역과 상동성인 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열; 및 (iii) 본질적으로 서열 번호 32로 이루어지고 TXNIP 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 50개의 핵염기의 우측 또는 내부에 위치한 게놈 영역과 상동성인 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기서 (i)는 (ii) 및 (iii)이 측면에 있고; TXNIP 유전자 유전자위는 표적 부위에서 개열되고, 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산은 TXNIP 유전자 유전자위 내에 삽입되어 TXNIP 유전자를 파괴하고 보편적 공여자 세포를 생성하는 것인 제2 벡터를 줄기 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 보편적 공여자 세포는 대조군 세포에 비해 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는다.

- [0378] 다른 방법(방법 85A)에서, 본 개시내용은 방법 85에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 (b)에서의 핵산은 표적 부위의 50개의 염기쌍 내부의 B2M 유전자 유전자위 내에 삽입되고/되거나, (d)에서의 핵산은 표적 부위의 50개의 염기쌍 내부의 TXNIP 유전자 유전자위 내에 삽입된다.
- [0379] 다른 방법(방법 86)에서, 본 개시내용은 방법 85에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 대조군 세포는 야생형 세포이거나, 삽입된 핵산을 포함하지 않는 세포이다.
- [0380] 다른 방법(방법 87)에서, 본 개시내용은 방법 85에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 파괴된 B2M 유전자는 B2M의 감소 또는 제거된 발현을 갖고, 파괴된 TXNIP 유전자는 TXNIP의 감소 또는 제거된 발현을 갖는다.
- [0381] 다른 방법(방법 88)에서, 본 개시내용은 방법 85에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 RNP 복합체의 gRNA는 서열 번호 1 내지 서열 번호 3 또는 서열 번호 35 내지 서열 번호 44로 이루어진 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함하고, 제2 RNP 복합체의 gRNA는 서열 번호 15 내지 서열 번호 24로 이루어진 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0382] 다른 방법(방법 89)에서, 본 개시내용은 방법 85에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 RNP 복합체의 gRNA는 서열 번호 2로 이루어진 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함하고, 제2 RNP 복합체의 gRNA는 서열 번호 20으로 이루어진 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0383] 다른 방법(방법 90)에서, 본 개시내용은 방법 85에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 벡터는 플라스미드 벡터이고, 제2 벡터는 플라스미드 벡터이다.
- [0384] 다른 방법(방법 91)에서, 본 개시내용은 방법 85에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자는 예정사-리간드 1(PD-L1)이고, 제2 관용원성 인자는 HLA 클래스 I 조직 적합성 항원인 알파 사슬 E(HLA-E)이다.
- [0385] 다른 방법(방법 92)에서, 본 개시내용은 방법 91에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 11로 이루어진다.
- [0386] 다른 방법(방법 93)에서, 본 개시내용은 방법 91에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 자체의 신호 펩타이드가 없는 HLA-E에 융합된 B2M 막 단백질에 융합된 HLA-G 제시 펩타이드에 융합된 B2M 신호 펩타이드를 포함하는 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열을 포함하고, HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열은 본질적으로 서열 번호 55로 이루어진다.
- [0387] 다른 방법(방법 94)에서, 본 개시내용은 방법 85에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0388] 다른 방법(방법 95)에서, 본 개시내용은 방법 94에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 외생성 프로모터는 CMV, EF1 α , PGK, CAG 또는 UBC 프로모터이다.
- [0389] 다른 방법(방법 96)에서, 본 개시내용은 방법 85에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 RNP 복합체 및 제2 RNP 복합체 각각은 gRNA에 대한 RNA-가이드 뉴클레아제를 1:3의 몰비로 포함한다.
- [0390] 다른 방법(방법 97)에서, 본 개시내용은 방법 85에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 RNP 복합체 및 제2 RNP 복합체 각각의 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이다.
- [0391] 다른 방법(방법 98)에서, 본 개시내용은 방법 97에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 Cas9 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결된다.

- [0392] 다른 방법(방법 99)에서, 본 개시내용은 방법 85에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 줄기 세포는 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포이다.
- [0393] 다른 방법(방법 100)에서, 본 개시내용은 방법 85에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 줄기 세포는 인간 줄기 세포이다.
- [0394] 다른 방법(방법 101)에서, 본 개시내용은 보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 시험관 내 방법을 제공하며, 이때 이 방법은 (a) RNA-가이드 뉴클레아제, 및 베타-2 마이크로글로불린(B2M) 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하는 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 제1 리보핵단백질(RNP) 복합체; (b) 핵산을 포함하는 제1 벡터로서, 핵산은 (i) 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) B2M 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 50개의 핵염기의 좌측 및 내부에 위치한 게놈 영역과 상동성인 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열; 및 (iii) B2M 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 50개의 핵염기의 우측 및 내부에 위치한 게놈 영역과 상동성인 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기서 (i)는 (ii) 및 (iii)이 측면에 있고, 제1 벡터는 서열 번호 33으로 이루어진 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, B2M 유전자 유전자위는 표적 부위에서 개열되고, 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산은 B2M 유전자 유전자위 내에 삽입되어 B2M 유전자를 파괴하는 것인 제1 벡터; (c) RNA-가이드 뉴클레아제, 및 티오레독신-상호 작용 단백질(TXNIP) 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하는 gRNA를 포함하는 제2 RNP 복합체; 및 (d) 핵산을 포함하는 제2 벡터로서, 핵산은 (i) 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열; (ii) TXNIP 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 50개의 핵염기의 좌측 및 내부에 위치한 게놈 영역과 상동성인 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열; 및 (iii) TXNIP 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 50개의 핵염기의 우측 및 내부에 위치한 게놈 영역과 상동성인 서열을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 여기서 (i)는 (ii) 및 (iii)이 측면에 있고, 제2 벡터는 서열 번호 34 또는 서열 번호 56으로 이루어진 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, TXNIP 유전자 유전자위는 표적 부위에서 개열되고, 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산은 TXNIP 유전자 유전자위 내에 삽입되어 TXNIP 유전자를 파괴하고 보편적 공여자 세포를 생성하는 것인 제2 벡터를 줄기 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 보편적 공여자 세포는 대조군 세포와 비교하여 증가된 면역 회피 및/또는 세포 생존을 갖는다.
- [0395] 다른 방법(방법 101A)에서, 본 개시내용은 방법 101에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 (b)에서의 핵산은 표적 부위의 50개의 염기쌍 내부의 B2M 유전자 유전자위 내에 삽입되고/되거나, (d)에서의 핵산은 표적 부위의 50개의 염기쌍 내부의 TXNIP 유전자 유전자위 내에 삽입된다.
- [0396] 다른 방법(방법 102)에서, 본 개시내용은 방법 101에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 대조군 세포는 야생형 세포이거나, 삽입된 핵산을 포함하지 않는 세포이다.
- [0397] 다른 방법(방법 103)에서, 본 개시내용은 방법 10에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 파괴된 B2M 유전자는 B2M의 감소 또는 제거된 발현을 갖고, 파괴된 TXNIP 유전자는 TXNIP의 감소 또는 제거된 발현을 갖는다.
- [0398] 다른 방법(방법 104)에서, 본 개시내용은 방법 101에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 RNP 복합체의 gRNA는 서열 번호 1 내지 서열 번호 3 또는 서열 번호 35 내지 서열 번호 44로 이루어진 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함하고, 제2 RNP 복합체의 gRNA는 서열 번호 15 내지 서열 번호 24로 이루어진 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0399] 다른 방법(방법 105)에서, 본 개시내용은 방법 101에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 RNP 복합체의 gRNA는 서열 번호 2로 이루어진 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함하고, 제2 RNP 복합체의 gRNA는 서열 번호 20으로 이루어진 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0400] 다른 방법(방법 106)에서, 본 개시내용은 방법 101에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 벡터는 플라스미드 벡터이고, 제2 벡터는 플라스미드 벡터이다.
- [0401] 다른 방법(방법 107)에서, 본 개시내용은 방법 101에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자는 예정사-리간드 1(PD-L1)이고, 제2 관용원성 인자는 HLA 클래스 I 조직 적합성 항원인 알파 사슬 E(HLA-E)이다.
- [0402] 다른 방법(방법 108)에서, 본 개시내용은 방법 101에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 RNP 복합체 및 제2 RNP 복합체 각각은 gRNA에 대한 RNA-가이드 뉴클레아제를 1:3의 몰비로 포함한다.
- [0403] 다른 방법(방법 109)에서, 본 개시내용은 방법 101에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 제1 RNP

복합체 및 제2 RNP 복합체 각각의 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이다.

- [0404] 다른 방법(방법 110)에서, 본 개시내용은 방법 109에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 Cas9 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결된다.
- [0405] 다른 방법(방법 111)에서, 본 개시내용은 방법 101에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 줄기 세포는 배아 줄기 세포, 성체 줄기 세포, 유도된 다능성 줄기 세포 또는 조혈 줄기 세포이다.
- [0406] 다른 방법(방법 112)에서, 본 개시내용은 방법 101에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 줄기 세포는 인간 줄기 세포이다.
- [0407] 제1 과정(과정 1)에서, 본 개시내용은 보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 과정을 제공하며, 이때 이 과정은 (a) 베타-2 마이크로글로불린(B2M)을 암호화하는 유전자 내부 또는 부근의 예정사-리간드 1(PD-L1)을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 삽입함으로써 줄기 세포를 변형시켜 PD-L1 양성 세포를 생성하는 단계; (b) PD-L1 양성 세포를 부유화시키는 단계; (c) 티오레독신-상호 작용 단백질(TXNIP)을 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 HLA 클래스 I 조직 적합성 항원인 알파 사슬 E(HLA-E)를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 삽입함으로써 (b)로부터 PD-L1 양성 세포를 변형시켜 PD-L1, HLA-E 이중 양성 세포를 생성하는 단계; (d) PD-L1, HLA-E 이중 양성 세포를 부유화시키는 단계; (e) PD-L1, HLA-E 이중 양성 세포를 선택하기 위한 단일 세포 분류 단계; (f) (e)로부터의 세포를 보편적 공여자 세포로서 특성분석하는 단계; 및 (g) 장기간 저장을 위해 보편적 공여자 세포를 냉동시키는 단계를 포함한다.
- [0408] 다른 과정(과정 2)에서, 본 개시내용은 과정 1에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (a)에서의 변형 단계는 (1) RNA-가이드 뉴클레아제, 및 B2M 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하는 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 제1 리보핵단백질(RNP) 복합체, 및 (2) 핵산을 포함하는 제1 벡터로서, 핵산은 (i) B2M 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열, (ii) PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (iii) B2M 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 제1 벡터를 줄기 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 B2M 유전자 유전자위는 표적 부위에서 개열하고, PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산은 B2M 유전자 유전자위 내에 삽입되어 B2M 유전자를 파괴한다.
- [0409] 다른 과정(과정 2A)에서, 본 개시내용은 과정 2에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 핵산은 표적 부위의 50개의 염기쌍 내부의 B2M 유전자 유전자위 내에 삽입된다.
- [0410] 다른 과정(과정 3)에서, 본 개시내용은 과정 2에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제1 RNP 복합체의 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이고, 제1 RNP 복합체의 gRNA는 서열 번호 2로 이루어진 표적 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0411] 다른 과정(과정 4)에서, 본 개시내용은 과정 3에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 Cas9 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결된다.
- [0412] 다른 과정(과정 5)에서, 본 개시내용은 과정 2에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제1 RNP는 gRNA:RNA-가이드 뉴클레아제를 3:1의 몰비로 포함한다.
- [0413] 다른 과정(과정 6)에서, 본 개시내용은 과정 2에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (a)(2)(i)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 7로 이루어지고, (a)(2)(iii)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 13로 이루어진다.
- [0414] 다른 과정(과정 7)에서, 본 개시내용은 과정 2에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 11로 이루어진다.
- [0415] 다른 과정(과정 8)에서, 본 개시내용은 과정 2에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 CAG 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0416] 다른 과정(과정 9)에서, 본 개시내용은 과정 2에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제1 벡터는 플라스미드 벡터이고, 서열 번호 33으로 이루어진 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0417] 다른 과정(과정 10)에서, 본 개시내용은 과정 2에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (a)(1) 및 (a)(2)의 전달 단계는 전기천공을 포함한다.

- [0418] 다른 과정(과정 11)에서, 본 개시내용은 과정 1에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (b)에서의 PD-L1 양성 세포의 부유화 단계는 자기 보조 세포 분류(MACS), 단일 세포 클로닝, 상기 PD-L1 양성 세포의 확장 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0419] 다른 과정(과정 12)에서, 본 개시내용은 과정 1에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (c)에서의 변형 단계는 (1) RNA-가이드 뉴클레아제, 및 TXNIP 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하는 gRNA를 포함하는 제2 RNP 복합체, 및 (2) 핵산을 포함하는 제2 벡터로서, 핵산은 (i) TXNIP 유전자 유전자위내의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열, (ii) HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (iii) TXNIP 유전자 유전자위내의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 제2 벡터를 PD-L1 양성 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 TXNIP 유전자 유전자위는 표적 부위에서 개열되고, HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산은 TXNIP 유전자 유전자위 내에 삽입되어 TXNIP 유전자를 파괴한다.
- [0420] 다른 과정(과정 12A)에서, 본 개시내용은 과정 12에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 핵산은 표적 부위의 50개의 염기쌍 내부의 TXNIP 유전자 유전자위 내에 삽입된다.
- [0421] 다른 과정(과정 13)에서, 본 개시내용은 과정 12에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제2 RNP 복합체의 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이고, 제2 RNP 복합체의 gRNA는 서열 번호 20으로 이루어진 표적 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0422] 다른 과정(과정 14)에서, 본 개시내용은 과정 13에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 Cas9 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결된다.
- [0423] 다른 과정(과정 15)에서, 본 개시내용은 과정 12에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제2 RNP는 gRNA:RNA-가이드 뉴클레아제를 3:1의 몰비로 포함한다.
- [0424] 다른 과정(과정 16)에서, 본 개시내용은 과정 12에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (c)(2)(i)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 25로 이루어지고, (c)(2)(iii)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 32로 이루어진다.
- [0425] 다른 과정(과정 17)에서, 본 개시내용은 과정 12에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 자체의 신호 펩타이드가 없는 HLA-E에 융합된 B2M 막 단백질에 융합된 HLA-G 제시 펩타이드에 융합된 B2M 신호 펩타이드를 포함하는 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열을 포함한다.
- [0426] 다른 과정(과정 18)에서, 본 개시내용은 과정 17에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열은 본질적으로 서열 번호 55로 이루어진다.
- [0427] 다른 과정(과정 19)에서, 본 개시내용은 과정 12에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 CAG 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0428] 다른 과정(과정 20)에서, 본 개시내용은 과정 12에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제2 벡터는 플라스미드 벡터이고, 서열 번호 34 또는 서열 번호 56으로 이루어진 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0429] 다른 과정(과정 21)에서, 본 개시내용은 과정 12에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (c)(1) 및 (c)(2)의 전달 단계는 전기천공을 포함한다.
- [0430] 다른 과정(과정 22)에서, 본 개시내용은 과정 제1항에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (d)에서의 PD-L1, HLA-E 이중 양성 세포의 부유화 단계는 자기 보조 세포 분류, 단일 세포 클로닝, 상기 PD-L1, HLA-E 이중 양성 세포의 확장 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0431] 다른 과정(과정 23)에서, 본 개시내용은 과정 1에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (e)에서의 단일 세포 분류는 형광 활성화 세포 분류(FACS), 단일 세포 클로닝, 상기 단일 세포-분류된 세포의 확장 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0432] 다른 과정(과정 24)에서, 본 개시내용은 과정 1에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (f)에서의 특성 분석 단계는 접합성 및/또는 삽입-결실 프로파일에 대한 DNA 분석을 포함한다.
- [0433] 다른 과정(과정 25)에서, 본 개시내용은 과정 1에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (f)에서의 특성 분석 단계는 형태, 생존력, 핵형분석(karyotyping), 내독소 수준, 마이코플라스마 수준, 온/오프 표적 분석, 무

작위 벡터 삽입, 잔류 Cas9, 잔류 벡터, 다능성 상태, 분화능 또는 이들의 조합에 대한 세포 분석을 포함한다.

- [0434] 다른 과정(과정 26)에서, 본 개시내용은 과정 1에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 이 과정은 (f)에서의 특성분석 이전에 냉동 단계를 추가로 포함한다.
- [0435] 다른 과정(과정 27)에서, 본 개시내용은 과정 1에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 이 과정은 (a)에서 생성된 PD-L1 양성 세포를 확장시키는 단계, (c)에서 생성된 PD-L1, HLA-E 이중 양성 세포를 확장시키는 단계, (e)에서 선택된 PD-L1, HLA-E 이중 양성 세포를 확장시키는 단계, 또는 이들의 조합을 추가로 포함한다.
- [0436] 다른 과정(과정 28)에서, 본 개시내용은 보편적 공여자 세포를 생성하기 위한 과정을 제공하며, 여기서 이 과정은 (a) MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체의 성분 또는 전사 조절자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 삽입함으로써 줄기 세포를 변형시켜 제1 관용원성 인자 양성 세포를 생성하는 단계; (b) 제1 관용원성 인자 양성 세포를 부유화시키는 단계; (c) 생존 인자를 암호화하는 유전자 내부 또는 부근에 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 삽입함으로써 (b)로부터의 제1 관용원성 인자 양성 세포를 변형시켜 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포를 생성하는 단계; (d) 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포를 부유화시키는 단계; (e) 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포를 선택하기 위한 단일 세포 분류 단계; (f) (e)로부터의 세포를 보편적 공여자 세포로서 특성분석하는 단계; 및 (g) 장기간 저장을 위해 보편적 공여자 세포를 냉동시키는 단계를 포함한다.
- [0437] 다른 과정(과정 29)에서, 본 개시내용은 과정 28에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (b)에서의 제1 관용원성 인자 양성 세포의 부유화 단계는 자기 보조 세포 분류(MACS), 단일 세포 클로닝, 상기 제1 관용원성 인자 양성 세포의 확장 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0438] 다른 과정(과정 30)에서, 본 개시내용은 과정 28 또는 과정 29에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (d)에서의 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포의 부유화 단계는 자기 보조 세포 분류, 단일 세포 클로닝, 상기 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포의 확장 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0439] 다른 과정(과정 31)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 30 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 이 과정은 (a)에서 생성된 제1 관용원성 인자 양성 세포를 확장시키는 단계, (c)에서 생성된 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포를 확장시키는 단계, (e)에서 선택된 제1 관용원성 인자 양성/제2 관용원성 인자 양성 세포를 확장시키는 단계, 또는 이들의 조합을 추가로 포함한다.
- [0440] 다른 과정(과정 32)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 31 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (a)에서의 변형 단계는 (1) RNA-가이드 뉴클레아제, 및 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내의 표적 부위를 표적화하는 제1 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 제1 리보핵단백질(RNP) 복합체, 및 (2) 제1 핵산을 포함하는 제1 벡터로서, 제1 핵산은 (i) MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역에 상동성인 뉴클레오타이드 서열, (ii) 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (iii) MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내의 표적 부위의 우측에 위치한 영역에 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 제1 벡터를 줄기 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자는 표적 부위에서 개월되고, 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 핵산은 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내에 삽입되어 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자의 성분 또는 전사 조절자를 파괴한다.
- [0441] 다른 과정(과정 32A)에서, 본 개시내용은 과정 32에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 핵산은 표적 부위의 50개의 염기쌍 내부의 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내에 삽입된다.
- [0442] 다른 과정(과정 33)에서, 본 개시내용은 과정 32에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제1 RNA-가이드 뉴클레아제 및 제1 gRNA는 제1 리보핵단백질(RNP) 복합체를 형성한다.
- [0443] 다른 과정(과정 34)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 33 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (a)에서의 변형 단계는 (1) 제1 RNA-가이드 뉴클레아제, 및 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내의 표적 부위를 표적화하는 제1

가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 제1 리보핵단백질(RNP) 복합체, 및 (2) 제1 핵산을 포함하는 제1 벡터로서, 제1 핵산은 (i) MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열, (ii) 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (iii) MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 제1 벡터를 줄기 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자는 표적 부위에서 개열되고, 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 핵산은 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내에 삽입되어 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자의 성분 또는 전사 조절자를 파괴한다.

- [0444] 다른 과정(과정 34A)에서, 본 개시내용은 과정 34에 의해 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 핵산은 표적 부위의 50개의 염기쌍 내부의 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자 유전자위의 성분 또는 전사 조절자 내에 삽입된다.
- [0445] 다른 과정(과정 35)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 34 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자의 성분 또는 전사 조절자는 HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DP, HLA-DM, HLA-DOA, HLA-DOB, HLA-DQ, HLA-DR, B2M, NLRC5, CIITA, RFX5, RFXAP 또는 RFXANK이다.
- [0446] 다른 과정(과정 36)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 35 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 MHC-I 또는 MHC-II 인간 백혈구 항원 또는 MHC-I 또는 MHC-II 복합체 유전자의 성분 또는 전사 조절자는 B2M이다.
- [0447] 다른 과정(과정 37)에서, 본 개시내용은 과정 36에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (a)(2)(i)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 7로 이루어지고, (a)(2)(iii)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 13로 이루어진다.
- [0448] 다른 과정(과정 38)에서, 본 개시내용은 과정 36 또는 과정 37에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제1 gRNA는 서열 번호 2로 이루어진 표적 서열에 상응하는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0449] 다른 과정(과정 39)에서, 본 개시내용은 과정 32 내지 과정 38 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제1 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이다.
- [0450] 다른 과정(과정 40)에서, 본 개시내용은 과정 39에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 Cas9 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결된다.
- [0451] 다른 과정(과정 41)에서, 본 개시내용은 과정 32 내지 과정 40 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제1 RNP는 제1 gRNA:제1 RNA-가이드 뉴클레아제를 3:1의 몰비로 포함한다.
- [0452] 다른 과정(과정 42)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 41 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자는 PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 또는 CD47이다.
- [0453] 다른 과정(과정 43)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 42 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0454] 다른 과정(과정 44)에서, 본 개시내용은 과정 43에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 외생성 프로모터는 CMV, EF1 α , PGK, CAG 또는 UBC 프로모터이다.
- [0455] 다른 과정(과정 45)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 44 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제1 관용원성 인자는 PD-L1이다.
- [0456] 다른 과정(과정 46)에서, 본 개시내용은 과정 45에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 11로 이루어진다.
- [0457] 다른 과정(과정 47)에서, 본 개시내용은 과정 46에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 PD-L1을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 CAG 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

- [0458] 다른 과정(과정 48)에서, 본 개시내용은 과정 45 내지 과정 47 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제1 벡터는 서열 번호 33으로 이루어진 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0459] 다른 과정(과정 49)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 48 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (c)에서의 변형 단계는 (1) 제2 RNA-가이드 뉴클레아제, 및 생존 인자 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하는 제2 가이드 RNA(gRNA), 및 (2) 제2 핵산을 포함하는 제2 벡터로서, 제2 핵산은 (i) 생존 인자 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열, (ii) 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (iii) 생존 인자 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 제2 벡터를 줄기 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 생존 인자 유전자 유전자위는 표적 부위에서 개열되고, 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 핵산은 생존 인자 유전자 유전자위 내에 삽입되어 생존 인자 유전자를 파괴한다.
- [0460] 다른 과정(과정 49A)에서, 본 개시내용은 과정 49에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 핵산은 표적 부위의 50개의 염기쌍 내부의 생존 인자 유전자 유전자위 내에 삽입된다.
- [0461] 다른 과정(과정 50)에서, 본 개시내용은 과정 49에 의해 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제2 RNA-가이드 뉴클레아제 및 제2 gRNA는 제2 리보핵단백질(RNP) 복합체를 형성한다.
- [0462] 다른 과정(과정 51)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 48 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (c)에서의 변형 단계는 (1) 제2 RNA-가이드 뉴클레아제, 및 생존 인자 유전자 유전자위 내의 표적 부위를 표적화하는 제2 가이드 RNA(gRNA)를 포함하는 제2 리보핵단백질(RNP) 복합체, 및 (2) 제2 핵산을 포함하는 제2 벡터로서, 제2 핵산은 (i) 생존 인자 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 좌측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열, (ii) 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열, 및 (iii) 제2 생존 인자 유전자 유전자위 내의 표적 부위의 우측에 위치한 영역과 상동성인 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 제2 벡터를 제1 관용원성 인자 양성 세포에 전달하는 단계를 포함하며, 여기서 생존 인자 유전자 유전자위는 표적 부위에서 개열되고, 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제2 핵산은 생존 인자 유전자 유전자위에 삽입되어 생존 인자 유전자를 파괴한다.
- [0463] 다른 과정(과정 51A)에서, 본 개시내용은 과정 51에 의해 제공된 바와 같은 방법을 제공하며, 여기서 핵산은 표적 부위의 50개의 염기쌍 내부의 생존 인자 유전자 유전자위 내에 삽입된다.
- [0464] 다른 과정(과정 52)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 51 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 생존 유전자는 TXNIP, ZNF143, FOXO1, JNK 또는 MANF이다.
- [0465] 다른 과정(과정 53)에서, 본 개시내용은 과정 52에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 생존 유전자는 TXNIP이다.
- [0466] 다른 과정(과정 54)에서, 본 개시내용은 과정 53에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제2 gRNA는 서열 번호 20으로 이루어진 표적 서열에 상응하는 스페이스 서열을 포함한다.
- [0467] 다른 과정(과정 55)에서, 본 개시내용은 과정 52 또는 과정 53에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (c)(2)(i)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 25로 이루어지고, (c)(2)(iii)의 뉴클레오타이드 서열은 본질적으로 서열 번호 32로 이루어진다.
- [0468] 다른 과정(과정 56)에서, 본 개시내용은 과정 49 내지 과정 55 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제2 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제이다.
- [0469] 다른 과정(과정 57)에서, 본 개시내용은 과정 56에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 Cas9 뉴클레아제는 적어도 하나의 핵 국소화 신호에 연결된다.
- [0470] 다른 과정(과정 58)에서, 본 개시내용은 과정 49 내지 과정 57 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제2 RNP는 제2 gRNA:제2 RNA-가이드 뉴클레아제를 3:1의 물비로 포함한다.
- [0471] 다른 과정(과정 59)에서, 본 개시내용은 과정 49 내지 과정 58 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제2 관용원성 인자는 PD-L1, HLA-E, HLA-G, CTLA-4 또는 CD47이다.
- [0472] 다른 과정(과정 60)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 59 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제2 관용원성 인자를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 외생성 프로모터에 작동 가능하게 연결

된다.

- [0473] 다른 과정(과정 61)에서, 본 개시내용은 과정 60에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 외생성 프로모터는 CMV, EF1 α , PGK, CAG 또는 UBC 프로모터이다.
- [0474] 다른 과정(과정 62)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 61 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제2 관용원성 인자는 HLA-E이다.
- [0475] 다른 과정(과정 63)에서, 본 개시내용은 과정 62에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 자체의 신호 펩타이드가 없는 HLA-E에 융합된 B2M 막 단백질에 융합된 HLA-G 제1 펩타이드에 융합된 B2M 신호 펩타이드를 포함하는 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열을 포함한다.
- [0476] 다른 과정(과정 64)에서, 본 개시내용은 과정 63에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 HLA-E 삼량체를 암호화하는 서열은 본질적으로 서열 번호 55로 이루어진다.
- [0477] 다른 과정(과정 65)에서, 본 개시내용은 과정 63 또는 과정 64에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 HLA-E를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 CAG 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.
- [0478] 다른 과정(과정 66)에서, 본 개시내용은 과정 62 내지 과정 65 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 제2 벡터는 서열 번호 34 또는 서열 번호 56으로 이루어진 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0479] 다른 과정(과정 67)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 66 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (e)에서의 단일 세포 분류는 형광 활성화 세포 분류(FACS), 단일 세포 클로닝, 상기 단일 세포-분류된 세포의 확장 또는 이들의 조합을 포함한다.
- [0480] 다른 과정(과정 68)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 67 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (f)에서의 특성분석 단계는 접합성 및/또는 삽입-결실 프로파일에 대한 DNA 분석을 포함한다.
- [0481] 다른 과정(과정 69)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 68 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 (f)에서의 특성분석 단계는 형태, 생존력, 핵형분석, 내독소 수준, 마이코플라스마 수준, 온/오프 표적 분석, 무작위 벡터 삽입, 잔류 Cas9, 잔류 벡터, 다능성 상태, 분화능 또는 이들의 조합에 대한 세포 분석을 포함한다.
- [0482] 다른 과정(과정 70)에서, 본 개시내용은 과정 28 내지 과정 69 중 임의의 하나에서 제공된 바와 같은 과정을 제공하며, 여기서 이 과정은 (f)에서의 특성분석 이전에 냉동 단계를 추가로 포함한다.

[0483] VII. 실시예

[0484] 하기 실시예에는 본 개시내용에 따른 구체적인 보편적 공여자 세포의 생성 및 특성분석이 기술되어 있다.

[0485] 실시예 1: 세포 유지 및 확장

[0486] **hESC/hiPSC의 유지.** 인간 배아 줄기 세포주 CyT49(독점 hES 세포주: 캘리포니아주 샌디에고 소재의 비아사이트 인코포레이티드(ViaCyte, Inc.))의 세포를 문헌[Schulz *et al.* (2012) PLoS ONE 7(5): e37004]에 기술되어 있는 바와 같이 유지하고, 배양하고, 계대배양하고, 증식하고, 플레이팅하였다. CyT49 세포를 ACCUTASE[®] (Stemcell Technologies 07920 또는 균등물)을 사용하여 해리시켰다.

[0487] 인간 유도된 다능성 줄기 세포(hiPSC)(예를 들어, TC1133 세포주(론자(Lonza)))를 BIOLAMININ 521 CTG(BioLamina 카탈로그 번호: CT521)-코팅된 조직 배양 플레이트 상에서 StemFlex Complete(라이프 테크놀로지스, A3349401)에서 유지하였다. 플레이트를 37°C에서 2시간 동안 DPBS 중의 BIOLAMININ, 칼슘, 마그네슘(라이프 테크놀로지스, 14040133)의 1:10 또는 1:20 희석하여 예비 코팅하였다. 세포를 StemFlex 배지로 매일 공급하였다. 세포의 계대배양을 위해, CyT49에 대해 동일한 밀도의 세포를 사용하였다. 단일 세포로서 세포의 플레이팅을 위해, 세포를 BIOLAMININ-코팅된 플레이트 상의 StemFlex에서 1% RevitaCell[™] Supplement(100X)(썬코퍼서(ThermoFisher) 카탈로그 번호: A2644501)와 함께 플레이팅하였다.

[0488] **hiPSC의 단일 세포 클로닝.** 단일 세포 클로닝을 위해, hiPSC(hESC 또는 hiPSC)에는 ACCUTASE[®]을 이용한 해리 전 3시간 내지 4시간에 (1X Revitacell의 최종 농도에 대해) StemFlex Complete와 Revitacell을 공급하였다. 해리 이후, 세포를 BIOLAMININ-코팅된 96-웰 조직 배양 플레이트의 웰 당 단일 세포로서 분류하였다. WOLF FACS 분류기(Nanocollect)는 웰 내로 단일 세포를 분류하기 위해 사용되었다. 플레이트를 100 μ l 내지 200 μ l의 StemFlex

Complete와 Revitacell로 예비 충전하였다. 세포 접종 3일 후, 세포에 새로운 StemFlex를 공급하고, 100 μ l 내지 200 μ l의 배지를 격일로 계속해서 공급하였다. 성장 10일 후, 세포에는 12일 내지 14일까지 StemFlex를 매일 공급하였다. 이때, 플레이트를 ACCUTASE[®]로 해리시키고, 수집된 세포 현탁액을 1:2로 분할하고, 절반은 유지를 위해 새로운 96-웰 플레이트로 보내고, 절반은 DNA 추출 용액인 QuickExtract[™] DNA Extraction Solution(루시젠(Lucigen))으로 보냈다. DNA 추출 후, PCR을 수행하여 표적화된 DNA 유전자위에서 목적하는 유전자 편집의 존재 여부를 평가하였다. 생어 시퀀싱(Sanger sequencing)을 목적하는 편집을 검증하기 위해 사용하였다.

[0489] **단일 세포 유래의 hPSC 클론의 확장.** CyT49(비아사이트)에 있어서, 성공적으로 표적화된 클론을 BIOLAMININ-코팅된 플레이트에서가 아니라 순수한 10% XF KSR A10H10 배지를 갖는 24-웰 플레이트 상에서 계대배양하였다. 24-웰 단계 후, CyT49 클론을 문헌[Schulz *et al.* (2012) PLoS ONE 7(5): e37004]에 기술되어 있는 바와 같이 계대배양하였다.

[0490] hiPSC(TC1133)에 있어서, 세포를 계대배양 단계에서 Revitacell을 첨가한 BIOLAMININ-코팅된 플레이트 상에서의 클로닝 및 정기적인 유지 과정 내내 StemFlex Complete에서 유지하였다.

[0491] **실시예 2: B2M 녹아웃(KO) 인간 다능성 줄기 세포(hPSC)의 생성**

[0492] **hPSC에서의 B2M에 대한 가이드 RNA(gRNA)의 선택.** 3개의 B2M 표적화 gRNA를 B2M 암호화 서열의 엑손 1을 표적화 하도록 설계하였다. 이들 gRNA는 gRNA 설계 소프트웨어를 사용하여 서열 상동성 예측에 기초하여 예측된 낮은 오프-표적 점수를 가졌다. gRNA의 표적 서열은 표 1에 나타나 있다. gRNA는 표적 DNA 서열에 상응하는 RNA 서열을 포함한다.

표 1

[0493] **B2M gRNA 표적 서열**

명칭	표적 서열(5'-3')	서열 번호	PAM
B2M-1 gRNA(엑손 1_T12)	GCTACTCTCTCTTTCTGGCC	1	TGG
B2M-2 gRNA(엑손 1_T2)	GGCCGAGATGTCTCGCTCCG	2	TGG
B2M-3 gRNA(엑손 1_T8)	CGCGAGCACAGCTAAGGCCA	3	CGG
엑손 1_T1	TATAAGTGGAGGCGTCGCGC	35	TGG
엑손 1_T3	GAGTAGCGCGAGCACAGCTA	36	AGG
엑손 1_T4	ACTGGACGCGTCGCGCTGGC	37	GGG
엑손 1_T5	AAGTGGAGGCGTCGCGCTGG	38	CGG
엑손 1_T6	GGCCACGGAGCGAGACATCT	39	CGG
엑손 1_T7	GCCCGAATGCTGTACGTTTC	40	AGG
엑손 1_T9	CTCGCGCTACTCTCTCTTTC	41	TGG
엑손 1_T10	TCCTGAAGCTGACAGCATTC	42	GGG
엑손 1_T11	TTCCTGAAGCTGACAGCATT	43	CGG
엑손 1_T13	ACTCTCTCTTCTGGCCTGG	44	AGG

[0494] hPSC에서 이들의 절단 효능을 평가하기 위해, CyT49 세포(비아사이트 독점 hES 세포주)를 125 pmol의 Cas9 및 375 pmol의 gRNA의 절대값으로 3:1(gRNA:Cas9)의 몰비로 Cas9 단백질(바이오메이(Biomay))과 가이드 RNA(신테고(Synthego))(gRNA 서열에 대해 표 3 참조)의 리보핵단백질(RNP) 혼합물과 함께 네온(Neon) 전기천공기(네온 형질감염 시스템; 써모피셔(ThermoFisher) 카탈로그 번호: MPK5000)를 사용하여 전기천공하였다. RNP 복합체를 형성하기 위해, gRNA 및 Cas9를 25 μ l의 총 부피가 되도록 R-완충액(네온 형질감염 시스템 100 μ l 키트; 써모피셔 카탈로그 번호: MPK10096)이 담겨 있는 하나의 용기에 모으고, 실온에서 15분 동안 배양하였다. 세포를 ACCUTASE[®]을 사용하여 해리시킨 후, DMEM/F12 배지(집코(Gibco), 카탈로그 번호: 11320033)에 재현탁시키고, NC-200(케모메텍(Chemometec))을 사용하여 계수하고, 원심분리하였다. 총 1×10^6 개의 세포를 RNP 복합체로 재현탁시키고, R-완충액을 125 μ l의 총 부피가 되도록 첨가하였다. 이어서, 이러한 혼합물을 1,100 V에서 30 밀리초(ms) 동안 2 펄스로 전기천공하였다. 전기천공 후, 세포를 StemFlex 배지와 RevitaCell로 충전된 에펜도르프 튜브에 피펫팅하였다. 이어서, 이러한 세포 현탁액을 1:20 희석하여 BIOLAMININ 521 CTG로 예비 코팅된 조직 배양 접시에 플레이트팅하였다. 세포를 48시간 동안 정상산소상태 배양기(normoxia incubator; 37°C, 8% CO₂)에서 배양하였다. 48시간 후, QuickExtract(위스콘신주 미들턴 소재의 루시젠; 카탈로그 번호: QE09050)를 사용하여

게놈 DNA를 세포로부터 수확하였다.

[0495] 표적 B2M 서열에 대한 PCR을 수행하였으며, 얻어진 증폭된 DNA를 TIDE 분석에 의해 절단 효능에 대해 평가하였다. Platinum Taq Supermix(인비트로젠(Invitrogen); 카탈로그 번호: 125320176 및 카탈로그 번호: 11495017)를 사용하여 관련 영역에 대한 PCR을 수행하였다. PCR 프라이머의 서열은 표 2에 나타나 있고, 사이클링 조건은 표 3에 나타나 있다.

표 2

[0496] B2M TIDE 프라이머

명칭	유형	서열(5'-3')	서열 번호
B2MF2	전방향	CAGACAGCAAACTCACCCAG	4
B2MR2	역방향	AAACTTTGTCCCGACCTCC	5

표 3

[0497] B2M PCR 사이클링 매개변수

단계	온도	시간	사이클
변성	94℃	2분	1
변성	94℃	15초	38
어닐링	55℃	30초	
연장	68℃	45초	
신장	68℃	5분	1
유지	4	유지	

[0498] 얻어진 앰플리콘에 대해 PCR 클리핑 및 생어 서열분석이 진행되었다. 생어 서열분석 결과는 가이드 서열과 함께 쓰나미(Tsunami) 소프트웨어 내에 입력되었다. 소프트웨어에 의해 삽입-결실 비율(%) 및 동일성을 계산하였다. 이어서, 특정 gRNA는 hPSC에서 이들의 삽입-결실 빈도에 기초하여 선택되었다. 도 1은 B2M-1, B2M-2 및 B2M-3 gRNA의 절단 효능을 보여준다.

[0499] 서열 유사성 예측 부위의 혼성 포획 분석을 사용하여 선택된 gRNA의 오프-표적을 줄기 세포-유래 DNA에서 평가하였다. B2M-2 및 B2M-3 가이드는 검출 가능한 오프-표적 효과를 나타내지 않았다. B2M-2 gRNA는 이의 높은 온-표적 활성 및 검출 불가능한 오프-표적 활성으로 인해 추가의 클론 생성을 위해 선택되었다.

[0500] B2M KO hPSC 클론 생성 및 특성분석. B2M-2 gRNA를 사용하여 CyT49 hESC(비아사이트)를 전기천공하고, WOLF FACS 분류기(Nanocelllect)를 사용하여 전기천공 3일 후에 StemFlex와 Revitacell을 첨가한 BIOLAMININ 521 CTG-코팅된 96-웰 플레이트에 단일 세포로 분류하였다. 콜로니가 단일 세포로서 재접종시기에 충분히 클 때까지 격일로 배지를 변경하면서 플레이팅된 단일 세포를 정상산소상태 배양기(37℃, 8% CO₂)에서 성장시켰다. 샘플이 포화상태가 된 경우에 이를 유지 및 게놈 DNA 추출을 위해 분할하였다.

[0501] 클론의 B2M KO 상태를 PCR 및 생어 서열분석을 통해 확인하였다. 표적 B2M 영역의 얻어진 DNA 서열을 삽입-결실 동일성 및 접합성을 결정하기 위해 Snapgene 소프트웨어에서 정렬하였다. 목적하는 편집을 갖는 클론을 팽창시키고, B2M 발현을 위한 유세포 분석 평가를 통해 추가로 검증하였다(사용된 항체의 목록에 대해 표 4 참조). 클론을 인터페론-감마 처리(25 ng/ml, 알앤디 시스템즈(R & D Systems), 285-IF) 유무에 따라 평가하였다. 도 2a는 야생형 세포에서의 B2M 발현을 보여주고, 도 2b는 B2M KO 세포에서의 B2M 발현을 보여준다. 클론의 핵형 상태를 셀라인 제네틱스(Cell Line Genetics) 서비스(위스콘신주 매디슨 소재)를 통해 평가하고, 정상 핵형을 보고하였다.

표 4

[0502] 다능성 유세포 분석법을 위한 항체

항원	클론	형광단	제조사	카탈로그 번호
Oct3/4	40/3	알렉사(Alexa) 647	BD 바이오사이언스 (BD Bioscience)	560329

SOX2	030-678	PE	BD 바이오사이언스	562195
B2M	2M2	PE	바이오레전드(Biolegend)	316305
HLA-ABC	W6/32	알렉사 488	바이오레전드	311415
mIgG1 카파	N/A	PE	BD 바이오사이언스	555749
PD-L1	B7-H1	알렉사-488	써모피셔	53-5983-42
HLA-E	3D12	PE	써모피셔	12-9953-42

[0503] 클론이 다능성 마커 OCT4 및 SOX2에 대한 세포 내 유세포 분석법을 통해 다능성을 보유한다는 것을 확인하였다. 확인된 다능성 클론을 이전에 확립된 방법(문헌[Schulz *et al.* (2012) PLoS ONE 7(5): e37004])을 사용하여 채장 내분비 전구체로 분화시켰다.

[0504] **실시예 3: B2M KO/PD-L1 녹인(KI) 인간 다능성 줄기 세포(hPSC)의 생성**

[0505] **B2M KO/PD-L1 KI 전략의 설계.** B2M의 출발 코돈이 PD-L1을 삽입하도록 상동성-유도 보수(HDR)를 겪은 후에 제거되어 부분적인 B2M 발현의 임의의 기회를 무효화하도록 PD-L1(CD274)을 B2M 유전자위 내에 삽입하기 위한 플라스미드를 설계하였다. 도 3은 플라스미드의 개략도를 보여주며, 표 5에는 플라스미드 내부의 요소 및 위치가 확인되어 있다. 공여자 플라스미드는 엑손 1 주변의 B2M 유전자위에 동일한 서열을 갖는 800개 염기쌍의 상동성 아암이 측면에 있는 PD-L1의 CAGGS 프로모터-구동형 cDNA를 함유하고 있었다. 플라스미드의 완전한 서열은 서열 번호 33을 포함한다.

표 5

[0506] **B2M-CAGGS-PD-L1 공여자 플라스미드의 요소**

요소	위치(크기: bp)	서열 번호
좌측 ITR	1 내지 130(130)	6
LHA-B2M	145 내지 944(800)	7
CMV 인핸서	973 내지 1,352(380)	8
닭 β-액틴 프로모터	1,355 내지 1,630(276)	9
키메라 인트론	1,631 내지 2,639(1009)	10
PD-L1	2,684 내지 3,556(873)	11
bGH 폴리(A) 신호	3,574 내지 3,798(225)	12
RHA-B2M	3,805 내지 4,604(800)	13
우측 ITR	4,646 내지 4,786(141)	14
전체 플라스미드	7,133 bp	33

[0507] 표적화된 B2M 유전자위에서 PD-L1 이식 유전자의 삽입을 용이하게 하기 위해 B2M-2 gRNA를 사용하였다. PD-L1 공여자 플라스미드를 B2M 표적화 gRNA 및 Cas9 단백질로 이루어진 RNP 복합체와 함께 도입하였다. CyT49 세포(비아사이트) 100만 개 당 4 μg의 플라스미드 DNA를 RNP와 함께 전달하였다. 실시예 2에 기술되어 있는 바와 같이 전기천공을 수행하였다. 전기천공 7일 후, 세포를 StemFlex와 Revitacell을 첨가한 BIOLAMININ 521 CTG-코팅된 96-웰 플레이트에 WOLF FACS-분류기(Nanocollect)를 사용하여 PD-L1 표면 발현에 대해 분류하였다. FACS 분류를 위해, 편집되지 않은 세포는 음성 대조군으로서 작용하였다. PD-L1 양성 세포를 분류 및 단일 세포 클로닝용으로 선택하였다.

[0508] PD-L1 표면 발현을 검출하기 위해, 항-PD-L1 형광 항체를 사용하였다(표 4 참조). 콜로니가 단일 세포로서 재접종시키기에 충분히 클 때까지 격일로 배지를 변경하면서 플레이팅된 단일 세포를 정상산소상태 배양기(normoxia incubator; 37°C, 8% CO₂)에서 성장시켰다. 샘플이 포화상태가 된 경우에 이를 유지 및 게놈 DNA 추출을 위해 분할하였다.

[0509] KI-통합된 DNA의 증폭만을 가능하게 하는 PD-L1 cDNA 삽입에 대해 플라스미드 상동성 아암의 외부로부터의 영역을 증폭시키는 프라이머를 사용하여 정확히 표적화된 클론을 PD-L1 녹인(KI) 삽입을 위한 PCR을 통해 확인하였다. KI가 이형 접합성 또는 동형 접합성 방식으로 발생하는지를 평가하기 위해 온-표적 삽입을 PCR에 의해 접합성에 대해 시험하였다. 이형 접합성 클론이 확인되면, KI 음성 대립유전자를 생어 서열분석용으로 송부하여 KI 음성 대립유전자가 비-KI 대립유전자 내에 B2M-과과 삽입-결실을 함유하고 있는지를 검증하였다. 3,000만 개의 세포의 개체군 크기에 도달할 때까지 (KI 삽입 또는 삽입-결실 형성을 통해) 완전한 B2M 과과를 갖는 정확한 KI

클론을 증가하는 조직 배양 형식으로 확장시켰다. 대략 10개의 클론을 이러한 방식으로 확장시키고, 세포 내 유세포 분석법을 통해 OCT4 및 SOX2를 시험하여 다능성인 것으로 확인하였다(도 4). 이어서, 상술한 시험을 통과한 클론을 하기 기술되어 있는 바와 같이 핵형 분석(셀라인 제네틱스)을 위해 추가로 시험하였다. 이어서, 추가적으로 클론을 하기 기술되어 있는 바와 같이 확립된 프로토콜(문헌[Schulz *et al.* (2012) PLoS ONE 7(5): e37004])을 통해 체장 내배엽 전구체(PEC)로 분화하는 이들의 역량(competence)에 대해 시험하였다. B2M의 소실을 유세포 분석법을 통해 인터페론-감마 처리(25 ng/ml, 알앤디 시스템즈, 285-IF)의 유무에 따른 B2M의 발현의 결여에 의해 추가로 확인하였다. 도 5a 및 도 5b는 각각 야생형 및 B2M KO/PD-L1 KI 세포에서의 PD-L1 발현을 보여준다.

실시예 4: 편집된 클론의 핵형 분석

편집된 배아 줄기(ES) 세포의 G-밴드 핵형 분석. 100만 개의 편집된 ES 세포를 배양 배지(DMEM/F12+10% Xeno-부재 KSR과 10 ng/ml의 액티빈 및 10 ng/ml의 헤레굴린(Heregulin))를 갖는 T-25 배양 플라스크에서 계대배양하였다. 하룻밤 동안 배양한 후, 3개의 T25 배양 플라스크를 핵형 분석; 염색체 1, 염색체 12, 염색체 17, 염색체 20에 대한 FISH 분석; 및 표준 8x60K 어레이를 이용한 어레이 비교 게놈 혼성화(aCGH) 분석을 위해 사이토지네틱스 레보라토리(Cytogenetics Laboratory; 셀라인 제네틱스 인코포레이티드)로 전적하였다. 비절단 가이드("NCG"), B2M KO 클론 및 B2M HO/PD-L1 HI 클론("V1-A")으로 전기천공된 선택된 세포의 G-밴딩 결과가 표 6에 나타나 있다.

표 6

G-밴드 핵형분석 결과

세포주	유형	계대배양	핵형분석 분석	FISH 분석	aCGH 어레이 분석
NCG#1	비절단 가이드	P36	정상	정상	통과
NCG#2	비절단 가이드	P36	정상	정상	통과
B2M KO#1	B2M KO	P38	정상	정상	통과
B2M KO#2	B2M KO	P36	정상	정상	통과
B2M KO#3	B2M KO	P36	정상	정상	통과
V1-A003	B2M KO/PD-L1 KI	P37	정상	정상	통과
V1-A004	B2M KO/PD-L1 KI	P38	정상	정상	통과
V1-A007	B2M KO/PD-L1 KI	P37	정상	정상	통과
V1-A008	B2M KO/PD-L1 KI	P38	정상	정상	통과

실시예 5: 체장 내배엽 세포(PEC)로의 편집된 인간 배아 줄기 세포의 분화

편집된 인간 배아 줄기 세포(ES)의 유지. 다양한 계대배양(P38-42)에서의 편집된 인간 배아 줄기 세포를 hESM 배지(DMEM/F12+10% KSR+ 10 ng/ml의 액티빈 A 및 10 ng/ml의 헤레굴린) 및 최종 10% 인간 AB 혈청을 이용한 4 일간의 계대배양에 대해 33,000 세포/cm² 또는 3일간의 계대배양에 대해 50,000 세포/cm²로 집중하였다.

PEC 분화를 위한 편집된 인간 배아 줄기 세포의 응집. 편집된 ES를 ACCUTASE[®]을 이용하여 단일 세포로 해리시킨 후, 원심분리하고, 1 ml 당 100만 개의 세포로 DMEM/F12 배지에서 2% StemPro(카탈로그 번호: A1000701, 캘리포니아 소재의 인비트로젠)에 재현탁하였으며, 총 3.50억개 내지 4억개의 세포를 분화 전 18시간 내지 20시간 동안 8 RPM ± 0.5 RPM의 회전 속도로 하나의 850 cm² 롤러 병(카탈로그 번호: 431198, 뉴욕주 소재의 코닝(Corning))에 집중하였다. 편집된 인간 배아 줄기 세포로부터의 ES 응집체를 문헌[Schulz *et al.* (2012) PLoS ONE 7(5): e37004]에 기술되어 있는 바와 같이 롤러 병을 사용하여 체장 계통으로 분화시켰다.

실시예 6: 분화된 체장 내배엽 세포(PEC)의 특성분석

단계 1(DE)에서의 FOXA2 및 SOX17 및 PEC 단계에서의 CHGA, PDX1 및 NKX6.1에 대한 유세포 분석법. hESC-유래 단계 1 응집체 또는 hESC-유래 체장 응집체를 PBS로 세척한 후, ACCUMAX[™](카탈로그 번호: A7089, 미주리주 소재의 시그마(Sigma))를 사용하여 37°C에서 단일 세포 현탁액으로 효소적으로 해리하였다. MACS 분리 완충액(카탈로그 번호: 130-091-221, 독일 노르트 라인-웨스트팔리아 소재의 밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec))을 첨가하고, 현탁액을 40 µm 필터를 통해 통과시키고, 펠릿화하였다. 세포 내 마커 염색을 위해, 세포를 4%(wt/v) 파라포름알데하이드에서 30분 동안 고정하고, FACS 완충액(PBS, 0.1%(wt/v) BSA, 0.1%(wt/v) NaN₃)에서 세척한후,

세포를 얼음에서 30분 동안 Perm 완충액(PBS, 0.2%(v/v) 트리톤 X-100(카탈로그 번호: A16046, 매사추세츠주 소재의 알파 에사르(Alfa Aesar)), 5%(v/v) 정상 당나귀 혈청, 0.1%(wt/v) NaN_3)을 이용하여 투과시킨 후, 세척 완충액(PBS, 1%(wt/v) BSA, 0.1%(wt/v) NaN_3)으로 세척하였다. 세포를 4℃에서 하룻밤 동안 차단 완충액(PBS, 0.1%(v/v) 트리톤 X-100, 5%(v/v) 정상 당나귀 혈청, 0.1%(wt/v) NaN_3)으로 희석된 1차 항체(표 7)와 함께 배양하였다. 세포를 IC 완충액에서 세척한 후, 4℃에서 60분 동안 적절한 2차 항체와 함께 배양하였다. 세포를 IC 완충액에서 세척한 후, FACS 완충액에서 세척하였다. 유세포 분석 데이터를 노보사이트(NovoCyte) 유세포 분석기(브뤼셀 소재의 ACEA 바이오사이언시스(ACEA Biosciences))에 의해 획득하였다. 데이터를 FlowJo 소프트웨어(트리스타 인코포레이티드(Tree Star, Inc.))를 사용하여 분석하였다. 온전한 세포는 전방(저각도) 및 측면(직각(90°)) 광 산란기에 기초하여 확인하였다. 항체 대조군 및 미분화 세포를 사용하여 배경을 추정하였다. 도면에서, 대표적인 유세포 분석 플롯은 하위 개체군 중 하나에 대해 나타나 있다. 도면에 보고된 숫자는 온전한 세포 게이트로부터의 총 세포의 비율(%)을 나타낸다.

표 7

분화된 PEC의 특성분석을 위한 유세포 분석용 항체

항원	형광단	공급처	희석
SOX17	AF647	BD 바이오사이언스(카탈로그 번호: 562594)	1:50
FOXA2	PE	밀테니 바이오테크놀로지 (카탈로그 번호: 130-107-773)	1:10
PDX1	PE	BD 바이오사이언스(카탈로그 번호: 562161)	1:2.5
NKX6.1	AF647	BD 바이오사이언스(카탈로그 번호: 563338)	1:2.5
CHGA	AF405	노부스(Novus; 카탈로그 번호: NBP2-33198AF405)	1:1000

DE 단계에서, FOXA2 및 SOX17 이중 양성 세포의 개체군은 CyT49 야생형 분화된 세포로부터 총 세포의 90%를 초과하였다. PD-L1 KI/B2M KO 및 B2M KO 세포는 야생형 세포와 비교하여 DE의 비슷한 비율(%)을 보여주었다(도 6 및 도 7).

PEC 단계에서, 크로모그라닌(chromogranin; CHGA), PDX1 및 NKX6.1에 대한 유세포 분석법을 수행하였다. PEC 단계에서의 이중 개체군은 체장 전구체 및 초기 내분비 세포를 포함한다(도 8). 이중 개체군의 파이 차트(도 9)로부터, 분화된 편집된 세포(PD-L1 KI/B2M KO 또는 B2M KO)로부터의 세포 개체군의 분포는 야생형 세포와 매우 유사하였다.

표적화된 RNAseq. 유전자 발현 분석을 위한 표적화된 RNAseq를 Illumina TruSeq 및 111개의 유전자를 표적화하는 올리고의 커스텀 패널을 사용하여 수행하였다. 패널은 체장 분화 동안 발달 단계의 마커인 유전자를 주로 함유하였다. 각각의 분화 단계의 종료 시, 10 μL 의 APV(응집된 펠릿 부피)를 수집하고, 온-칼럼 DNase 처리를 포함하는 퀴아젠(Qiagen) RNeasy 또는 RNeasy 96 스핀 칼럼 프로토콜을 사용하여 추출하였다. Qubit와 조합된 TapeStation을 사용하거나, 퀴아젠 QIAxcel을 사용하여 정량화 및 품질 관리를 수행하였다. 50 ng 내지 200 ng의 RNA를 Qubit와 조합된 TapeStation을 사용하거나, 퀴아젠 QIAxcel을 사용하여 얻어진 dsDNA 라이브러리의 정량화 및 품질 관리 이전에 Illumina TruSeq 라이브러리 제조 프로토콜에 따라 가공하였으며, 여기서 제조 프로토콜은 cDNA 합성, 커스텀 올리고 풀의 혼성화, 세척, 연장, 결합된 올리고의 결합, 라이브러리의 PCR 증폭 및 라이브러리의 클리닝으로 이루어졌다. 라이브러리를 후속적으로 4 nM의 농도로 희석하고, 풀링한 후, 변성시키고, PhiX 대조군에서 스카이킹하고, 추가로 Illumina MiSeq 서열분석기에 로딩되기 전에 10 pM 내지 12 pM로 희석하였다. 서열분석 실행 후, 초기 데이터 분석을 BaseSpace를 통해 자동 수행하여 커스텀 프로브 각각에 대한 원시 판독 계수를 생성하였다. 이어서, 각각의 유전자에 대하여 이들 판독 계수는 (0에 의한 하류 분할을 방지하기 위해) 1의 판독 계수를 첨가하여 그 유전자에 상응하는 모든 프로브에 대해 합계하였다. 유전자 SF3B2에 대해 정규화를 수행하고, 전형적으로 단계 0에 대한 배수 변화로서 판독을 가시화하였다. 데이터가 주성분 분석을 위해 가공되는 경우, DEseq 방법을 사용하여 정규화를 수행하였다.

선택된 유전자 발현은 도 10에 나타나 있다. PD-L1 KI/B2M KO 또는 B2M KO 세포로부터의 FOXA2, CHGA, PDX1 및 NKX6.1의 동적 발현 패턴은 야생형 세포와 유사하였다.

PEC 단계에서의 B2M 및 PD-L1 발현의 확인. PEC 단계에서, 분화된 응집체를 48시간 동안 인터페론-감마(50 ng/

ml)의 유무에 따라 처리하였다. 응집체를 PBS로 세척한 후, ACCUMAX™(카탈로그 번호: A7089, 미주리주 소재의 시그마)를 사용하여 37℃에서 단일 세포 현탁액으로 효소적으로 해리시켰다. MACS 분리 완충액(카탈로그 번호: 130-091-221; 독일 노르트 라인-웨스트팔리아 소재의 밀테니 바이오텍)을 첨가하고, 현탁액을 40 µm 필터를 통해 통과시키고, 펠릿화하였다. 표면 마커 염색을 위해, 해리된 세포를 20분 동안 MACS 분리 완충액에서 희석된 형광-접합된 항체와 함께 배양한 후, MACS 분리 완충액에서 세척하였다. 세포를 흐름 획득을 위해 FACS 완충액에 재현탁시켰다. 유세포 분석 데이터를 노보사이트 유세포 분석기로 획득하였다. 도 11a 내지 도 11f에 나타나 있는 바와 같이, B2M 발현은 B2M KO(도 11b) 또는 PD-L1 KI/B2M KO(도 11c)으로부터 분화된 PEC에서의 검출 한계보다 낮고, PD-L1은 PD-L1 KI/B2M KO(도 11f)로부터 분화된 PEC에서 발현되었다. 일반적으로, 약 90% 초과 PEC가 PD-L1을 발현하였으며, 이는 세포의 균질한 개체군을 나타낸다. 종종, 유전자-편집된 줄기 세포의 분화 이후에 시간의 경과에 따른 이식 유전자 발현의 소실이 존재한다(문헌[Hong *et al.*, Mol. Ther., 2017, 25(1): 44~53]).

[0524] **PEC 세포의 면역 표현형.** PEC 단계에서, 분화된 응집체를 48시간 동안 인터페론-감마(50 ng/ml)의 유무에 따라 처리하였다. 응집체를 MHC 클래스 I 및 II 염색을 위해 수확하였다. 야생형 세포 또는 편집된 세포(PD-L1 KI/B2M KO 및 B2M KO)로부터 PEC 단계에서의 MHC 클래스 II 발현은 없었다(도 12d 내지 도 12f). HLA-ABC(MHC 클래스 I)의 발현은 낮았으며(야생형 세포로부터 1.3%), 이는 IFN-γ 자극 시 고도로 조절되었다. 그러나, HLA-ABC는 편집된 세포(PD-L1 KI/B2M KO 및 B2M KO 세포)에서 IFN-γ 자극 하에서도 발현되지 않았다(도 12a 내지 도 12c).

[0525] **실시예 7: TXNIP KO 인간 다능성 줄기 세포(hPSC)의 생성**

[0526] **TXNIP를 위한 가이드 RNA(gRNA)의 선택.** 10개의 TXNIP 표적화 gRNA를 TXNIP 암호화 서열의 엑손 1 및 엑손 2를 표적화하기 위해 설계하였다(표 8). PAM 서열은 표 8에 나타나 있는 표적 서열에서 볼드체로 나타나 있으며, 가이드 서열에 상응하는 DNA 서열은 표 8에 나타나 있다. 이들 gRNA는 gRNA 설계 소프트웨어를 사용하여 서열 상동성 예측에 기초하여 예측된 낮은 오프-표적 점수를 가졌다.

표 8

[0527] **선택된 TXNIP 표적 서열 및 gRNA 서열**

명칭	표적 서열(5'-3') (폴드체의 PAM 서열)	서열 번호	가이드 서열(5'-3')의 DNA 버전	서열 번호
TXNIP_엑손 1_T1	GAAGCGTGTCTTCATAGCGC AGG	45	GAAGCGTGTCTTCATAGCGC	15
TXNIP_엑손 1_T21	TTACTCGTGTCAAAGCCGTT AGG	46	TTACTCGTGTCAAAGCCGTT	16
TXNIP_엑손 1_T22	TGTCAAAGCCGTTAGGATCCT TGG	47	TGTCAAAGCCGTTAGGATCC	17
TXNIP_엑손 1_T23	GCCGTTAGGATCCTGGCTT GCGG	48	GCCGTTAGGATCCTGGCTTG	18
TXNIP_엑손 1_T25	GCGGAGTGGCTAAAGTGCTT TGG	49	GCGGAGTGGCTAAAGTGCTT	19
TXNIP_엑손 1_T5	TCCGCAAGCCAGGATCCTAA CGG	50	TCCGCAAGCCAGGATCCTAA	20
TXNIP_엑손 2_T4	GTTTCGGCTTTGAGCTTCCTC AGG	51	GTTTCGGCTTTGAGCTTCCTC	21
TXNIP_엑손 2_T2	GAGATGGTGATCATGAGACCT TGG	52	GAGATGGTGATCATGAGACC	22
TXNIP_엑손 2_T1	TTGTACTCATATTGTTTCC AGG	53	TTGTACTCATATTGTTTCC	23
TXNIP_엑손 2_T3	AACAAATATGAGTACAAGTT CGG	54	AACAAATATGAGTACAAGTT	24

[0528] **TXNIP KO hiPSC 클론의 생성 및 특성분석.** hiPSC에서 이들 gRNA의 절단 효능을 평가하기 위해, TC1133 hiPSC 세포를 125 pmol의 Cas9 및 375 pmol의 gRNA의 절대값으로 3:1(gRNA:Cas9)의 몰비로 Cas9 단백질(바이오메이)과 가이드 RNA(신테고)의 RNP 혼합물과 함께 네온 전기천공기(네온 형질감염 시스템; 써모피셔 카탈로그 번호: MPK5000)를 사용하여 전기천공하였다. RNP 복합체를 형성하기 위해, gRNA 및 Cas9를 25 µl의 총 부피가 되도록 R-완충액이 담겨 있는 하나의 용기에 모으고, 실온에서 15분 동안 배양하였다. 세포를 ACCUTASE®을 사용하여 해리시킨 후, DMEM/F12 배지(집코; 카탈로그 번호: 11320033)에 재현탁시키고, NC-200(케모메텍)을 사용하여 계수하고, 원심분리하였다. 총 1 x 10⁶개의 세포를 RNP 복합체와 함께 재현탁시키고, R-완충액을 125 µl의 총 부피가 되도록 첨가하였다. 이어서, 이러한 혼합물을 하기 매개변수, 즉 2 펄스, 30 밀리초, 1,100 V를 이용하여 전기천공하였다. 전기천공 후, 세포를 StemFlex 배지와 RevitaCell로 충전된 에펜도르프 튜브에 피펫팅하였다. 이

어서, 이러한 세포 현탁액을 BIOLAMININ 521 CTG로 예비 코팅된 조직 배양 접시에 플레이팅하였다. 세포를 48시간 동안 정상산소상태 배양기(37℃, 8% CO₂)에서 배양하였다. 48시간 후, QuickExtract를 사용하여 게놈 DNA를 세포로부터 수확하였다.

[0529] 표적 TXNIP 서열에 대한 PCR을 수행하였으며, 얻어진 증폭된 DNA를 생어 서열분석하였다. 쓰나미 소프트웨어를 사용하여 삽입-결실 비율(%)에 대한 출력 서열분석 데이터를 분석하기 위해 TIDE 분석을 사용하였다. 도 13은 TXNIP gRNA에 대한 절단 효능을 보여준다. 이어서, hPSC에서의 이들의 삽입-결실 빈도에 기초하여 gRNA를 선택하였다.

[0530] 서열 유사성 예상 부위의 혼성 포획 분석을 사용하여 가장 절단 효율적인 gRNA의 오프-표적을 줄기 세포-유래 DNA에서 평가하였다. TXNIP gRNA T5가 검출 가능한 오프-표적 효과를 나타내지 않았고 높은 온-표적 활성을 보였기 때문에 이를 이용한 추가의 실험을 수행하였다.

[0531] **TXNIP KO hPSC 클론의 생성 및 특성분석.** TXNIP gRNA T5를 사용하여 CyT49 hESC(비아사이트)를 전기천공하고, WOLF FACS 분류기(Nanocelllect)를 사용하여 전기천공 3일 후에 StemFlex와 Revitacell을 첨가한 BIOLAMININ 521 CTG 96-웰 플레이트에 단일 세포로 분류하였다. 콜로니가 단일 세포로서 재접종시기에 충분히 클 때까지 격일로 배지를 변경하면서 플레이팅된 단일 세포를 정상산소상태 배양기(37℃, 8% CO₂)에서 성장시켰다. 샘플이 포화상태가 된 경우에 이를 유지 및 게놈 DNA 추출을 위해 분할하였다.

[0532] 클론의 TXNIP KO 상태를 PCR 및 생어 서열분석을 통해 확인하였다. 표적 TXNIP 영역의 얻어진 DNA 서열을 삽입-결실 동일성 및 접합성을 결정하기 위해 Snapgene 소프트웨어에서 정렬하였다. 목적하는 편집을 갖는 클론을 팽창시키고, TXNIP발현을 위한 유세포 분석 평가를 통해 추가로 검증하였다. 클론의 핵형 상태를 셀라인 제네틱스 서비스를 통해 평가하고, 정상 핵형을 보고하였다(표 9).

표 9

[0533] 핵형 분석

세포주	계대배양	핵형분석 분석	FISH 분석	aCGH 어레이 분석
TXNIPKO#2	P31	정상	정상	통과
TXNIPKO#13	P31	정상	정상	통과

[0534] 클론이 다능성 마커 OCT4 및 SOX2에 대한 세포 내 유세포 분석법을 통해 다능성을 보유한다는 것을 확인하였다. 확인된 다능성 클론을 이전에 확립된 방법(문헌[Schulz *et al.* (2012) PLoS ONE 7(5): e37004])을 사용하여 체장 내분비 전구체로 분화시켰다.

[0535] 상술한 바와 같이, Illumina TruSeq 및 올리고의 커스텀 패널을 사용하여 유전자 발현 분석을 위한 표적화된 RNAseq를 수행하였다. 선택된 유전자 발현은 도 20에 나타나 있다. TXNIP KO 세포로부터의 FOXA2, CHGA, PDX1 및 NKX6.1의 동적 발현 패턴은 야생형 세포와 유사하였다. PEC 단계에서, 크로모그라닌(CHGA), PDX1 및 NKX6.1에 대한 유세포 분석법을 또한 수행하였다. PEC 단계에서의 이중 개체군은 30.6%의 체장 전구 세포(즉, CHGA-/NKX6.1+/PDX1+)를 포함하였다(도 21).

[0536] **실시예 8: B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 인간 다능성 줄기 세포(hPSC)의 생성**

[0537] **B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 전략의 설계.** PD-L1 암호화 서열이 B2M 유전자위에 삽입되고(그 결과 B2M 유전자를 녹아웃시킴) HLA-E 암호화 서열이 TXNIP 유전자위 내에 삽입된(그 결과 TXNIP 유전자를 녹아웃시킴) 세포를 생성하였다.

[0538] PD-L1(CD274)을 B2M 유전자위 내에 삽입하기 위한 플라스미드 설계는 실시예 3에 나타났다. 공여자 플라스미드는 엑손 1 주변의 B2M 유전자위에 대해 동일한 서열을 갖는 800개의 염기쌍의 상동성 아암이 측면에 있는 PD-L1의 CAGGS 프로모터-구동형 cDNA를 함유한다. 표적화된 B2M 유전자위에서의 PD-L1 이식 유전자의 삽입을 용이하게 하기 위해 B2M-2 gRNA를 사용하였다. B2M 표적화 gRNA 및 Cas9 단백질로 이루어진 RNP 복합체와 함께 PD-L1 공여자 플라스미드를 도입하였다. CyT49 세포(비아사이트) 100만 개 당 4 µg의 플라스미드 DNA를 RNP와 함께 전달하였다. 실시예 2에 기술되어 있는 바와 같이 전기천공을 수행하였다. 전기천공 7일 후, 밀테니 시약(항-마우스 IgG MicroBeads 카탈로그 번호: 130-048-401, LS Columns 카탈로그 번호: 130-042-401 및 MidiMACS Separator 카탈로그 번호: 130-042-302) 또는 씨모피셔 시약(DynaMagTM-15 Magnet 카탈로그 번호: 12301D,

Cellection™ Pan Mouse IgG Kit 카탈로그 번호: 11531D, Dynabeads™ Pan Mouse IgG 카탈로그 번호: 11042)을 사용하여 세포를 자기 보조 세포 분류(MACS)를 통해 PD-L1 양성 세포에 대해 부유화하였다.

[0539] 부유화된 PD-L1 양성 개체군을 확장시킨 후, HLA-E 서열을 포함하는 공여자 플라스미드를 사용하여 HLA-E 삼량체 cDNA 이식 유전자를 CRISPR-유도 HDR을 통해 TXNIP 게놈 유전자위 내에 삽입하였다. HLA-E 삼량체 cDNA는 자체의 신호 펩타이드가 없는 HLA-E 단백질에 융합된 B2M 막 단백질에 융합된 HLA-G 제시 펩타이드에 융합된 B2M 신호 펩타이드로 구성되어 있었다. 이러한 삼량체 설계는 이전에 공개되어 있었다(문헌[Gornalusse *et al.* (2017) Nat. Biotechnol. 35(8): 765~772]). HLA-E 삼량체 암호화 서열(링커를 포함함)은 서열 번호 55(즉, 서열 번호 26 내지 서열 번호 31)이다. HLA-E 전달을 위한 공여자 플라스미드는 엑손 1 주변의 TXNIP 유전자위에 대해 동일한 서열을 갖는 800개의 염기쌍의 상동성 아암이 측면에 있는 HLA-E 삼량체의 발현을 구동하는 CAGGS 프로모터를 함유한다(도 14, 표 10 및 표 11). 일부 실시형태에서, 공여자 플라스미드는 서열 번호 34 또는 서열 번호 56을 포함한다.

표 10

[0540] TXNIP-CAGGS-HLA-E 공여자 플라스미드 1의 요소

요소	위치(크기: bp)	서열 번호
좌측 ITR	1 내지 130(130)	6
LHA-TXNIP	145 내지 944(800)	25
CMV 인핸서	973 내지 1,352(380)	8
닭 β-액틴 프로모터	1,355 내지 1,630(276)	9
키메라 인트론	1,631 내지 2,639(1,009)	10
B2M 신호 서열	2,684 내지 2,743(60)	26
HLA-G 펩타이드	2,744 내지 2,770(27)	27
GS 링커	2,771 내지 2,815(45)	28
B2M 막 단백질	2,816 내지 3,112(297)	29
GS 링커	3,113 내지 3,172(60)	30
HLA-E	3,173 내지 4,183(1,011)	31
bGH 폴리(A) 신호	4,204 내지 4,428(225)	12
RHA-TXNIP	4,435 내지 5,234(800)	32
우측 ITR	5,276 내지 5,416(141)	14
전체 플라스미드	7,763 bp	34

표 11

[0541] TXNIP-CAGGS-HLA-E 공여자 플라스미드 2의 요소

요소	(크기: bp)	서열 번호
좌측 ITR	1 내지 130 (130)	6
LHA-TXNIP	145 내지 944 (800)	25
CMV 인핸서	973 내지 1,352 (380)	8
닭 β-액틴 프로모터	1,355 내지 1,630 (276)	9
키메라 인트론(절두형)	1,631 내지 2,336 (706)	57
B2M 신호 서열	2,381 내지 2,440 (60)	26
HLA-G 펩타이드	2,441 내지 2,467 (27)	27
GS 링커	2,468 내지 2,512 (45)	28
B2M 막 단백질	2,513 내지 2,809 (297)	29
GS 링커	2,810 내지 2,869 (60)	30
HLA-E	2,870 내지 3,880 (1,011)	31
bGH 폴리(A) 신호	3,901 내지 4,125 (225)	12
RHA-TXNIP	4,132 내지 4,931 (800)	32
우측 ITR	4,973 내지 5,113 (141)	14
전체 플라스미드	7,460 bp	56

[0542] 표적화된 TXNIP 유전자위에서의 HLA-E 이식 유전자의 삽입을 용이하게 하기 위해 TXNIP-T5 gRNA를 사용하였다.

TXNIP-T5 gRNA 및 Cas9 단백질로 이루어진 RNP 복합체와 함께 HLA-E 공여자 플라스미드를 도입하였다. PD-L1+ 세포 100만 개 당 4 μ g의 HLA-E 공여자 플라스미드 DNA(서열 번호 56)를 RNP와 함께 전달하였다. 대안적으로, HLA-E 공여자 플라스미드 DNA(서열 번호 34)를 사용할 수 있다. 실시예 2에 기술되어 있는 바와 같이 전기천공을 수행하였다. 전기천공 7일 후, 밀테니 시약 또는 써모피셔 시약을 사용하여 세포를 MACS를 통해 HLA-E 양성 세포에 대해 부유화하였다. HLA-E 부유화 후, 세포를 StemFlex와 Revitacell을 첨가한 BIOLAMININ 521 CTG-코팅된 96-웰 플레이트에 WOLF FACS-분류기(Nanocollect)를 사용하여 단일 세포로 분류하였다. 콜로니가 단일 세포로서 재접종시킴에 충분히 클 때까지 격일로 배지를 변경하면서 플레이트된 단일 세포를 정상산소상태 배양기(37°C, 8% CO₂)에서 성장시켰다. 샘플이 포화상태가 된 경우에 이를 유지 및 계능 DNA 추출을 위해 분할하였다. MACS 부유화, 및 HLA-E 및 PD-L1 이중 양성 세포용 게이팅 세트(gating set)가 구비된 96-웰 플레이트 내로의 FACS 분류를 위해 항-PD-L1 및 항-HLA-E 항체(표 4)를 사용하였다. FACS 분류를 위해 편집되지 않은 세포는 음성 대조군으로서 작용하였다.

[0543] KI-통합된 DNA만의 증폭을 가능하게 하는 PD-L1 cDNA 삽입 또는 HLA-E cDNA 삽입에 대해 각각 플라스미드 상동성 아암의 외부로부터의 영역을 증폭시키는 프라이머를 사용하여 정확히 표적화된 클론을 PD-L1 KI 삽입 및 HLA-E KI 삽입을 위한 PCR을 통해 확인하였다. KI가 이형 접합성 또는 동형 접합성 방식으로 발생하는지를 평가하기 위해 온-표적 삽입을 PCR에 의해 접합성에 대해 시험하였다. 이형 접합성 클론이 확인되면, KI 음성 대립 유전자를 생어 서열분석용으로 증부하여 KI 음성 대립유전자가 B2M-파괴 삽입-결실 또는 TXNIP-파괴 삽입-결실을 각각 함유하고 있는지를 검증하였다. 3,000만 개의 세포의 개체군 크기에 도달할 때까지 (KI 삽입 또는 삽입-결실 형성을 통해) 완전한 B2M 및 TXNIP 파괴를 갖는 정확한 KI 클론을 증가하는 조직 배양 형식으로 확장시켰다. 대략 10개의 클론을 이러한 방식으로 확장시키고, 세포 내 유세포 분석법을 통해 OCT4 및 SOX2를 시험하여 다능성인 것으로 확인하였다(도 15).

[0544] 이어서, 하기 기술되어 있는 바와 같이, 상술한 시험을 통과한 클론을 핵형 분석(셀라인 제네틱스)을 위해 추가로 시험하였다. 선택된 B2M KO/PD-L1 KI + TXNIP KO/HLA-E KI("V1-B") 클론의 G-밴딩 결과는 표 12에 나타나 있다. 이어서, 추가로 V1-B 클론을 체장 내배엽 전구체(PEC)로 분화하는 이들의 역량에 대해 시험하였다.

표 12

[0545] G-밴딩 결과

세포주	계대배양	핵형분석 분석	FISH 분석	aCGH 어레이 분석
V1-B003	P37	정상	정상	통과
V1-B007	P37	정상	정상	통과
V1-B008	P36	정상	정상	통과

[0546] 이전에 보고된 체장 내분비 프로토콜(문헌[Rezania *et al.* (2014) Nat. Biotechnol. 32(11): 1121~1133])에 따라 단계 6 세포로의 분화 이후에 PD-L1 및 HLA-E를 계속해서 발현시켰다(도 16). 분화된 세포의 개체군은 이식 유전자의 발현 측면에서 동질하며, 예를 들어 세포의 94.4%는 PD-L1을 발현하고, 세포의 97.0%는 HLA-E를 발현한다. 도 22a는 야생형 및 비절단 가이드 대조군 세포와 비교하여 단계 6으로 분화된 다양한 클론 세포("S6-V1B-H9," "S6-V1B-3B11," "S6-V1B-1G7" 및 "S6-V1B-3C2")의 유사한 형태를 보여준다. B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 클론의 선택된 유전자 발현은 도 23a 내지 도 23f에 나타나 있다. B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 클론 세포로부터의 INS, NKX6.1, GCG, GCG 및 SST의 동적 발현 패턴은 야생형 세포와 유사하였다(도 23a). 다양한 분화된 B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 클론("S6-V1B-H9," "S6-V1B-3B11," "S6-V1B-1G7" 및 "S6-V1B-3C2")으로부터의 단계 6 마커인 INS(도 23b), NKX6.1(도 23c), GCG(도 23d), SST(도 23e) 및 GCG(도 23f)의 발현 수준은 단계 6 야생형 세포 및 야생형 체도에서의 수준과 유사하였다. 미분화된 B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 클론("ES-V1B-H9")을 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0547] 도 24a 및 도 24b는 B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 클론으로부터 분화된 단계 6 세포에서의 INS 및 GCG 발현(도 24a) 및 INS 및 NKX6.1 발현(도 24b)에 대한 유세포 분석 평가를 보여준다. 도 25a 및 도 25b는 2개의 B2M KO/PD-L1 KI 및 TXNIP KO/HLA-E KI 클론("S6-V1B003" 및 "V1B-H9")으로부터 분화된 단계 6 세포에서의 INS 발현(도 25a) 및 NKX6.1 발현(도 25b)의 비율(%)을 보여준다. 둘 다에서의 발현은 야생형 및 비절단 가이드 대조군 세포의 발현과 유사하였다.

[0548] PEC 단계에서, 크로모그라닌(CHGA), PDX1 및 NKX6.1에 대한 유세포 분석법을 수행하였다. PEC 단계에서의 이중

개체군은 체장 전구체, 초기 내분비 세포를 포함한다(도 17). 상기에 기술한 바와 같이, 유전자 발현 분석을 위한 표적화된 RNAseq를 수행하였다. TXNIP KO 클론에 대한 선택된 유전자 발현은 도 18a에 나타나 있고, V1-B 클론에 대한 선택된 유전자 발현은 도 18b에 나타나 있다. V1-B 또는 TXNIP KO 클론 세포로부터의 FOXA2, CHGA, PDX1 및 NKX6.1의 동적 발현 패턴은 야생형 세포와 유사하였다.

[0549] 서열 번호 56의 뉴클레오타이드를 포함하는 HLA-E 공여자 벡터를 사용하여 HLA-E 암호화 서열이 TXNIP 유전자위 내에 삽입된(그 결과 TXNIP 유전자를 녹아웃시킴) 세포를 생성하였다. 상기에 기술한 바와 같이, 유전자 발현 분석에 대한 선택된 RNAseq를 수행하였다. TXNIP KO/HLA-E KI 클론에 대해 선택된 유전자 발현은 도 28에 나타나 있다. TXNIP KO/HLA-E KI 세포로부터의 FOXA2, CHGA, PDX1 및 NKX6.1의 동적 발현 패턴은 야생형 세포와 유사하였다.

[0550] 대안적으로, 서열 번호 34의 뉴클레오타이드를 포함하는 HLA-E 공여자 벡터를 사용하여 HLA-E 암호화 서열이 TXNIP 유전자위 내에 삽입된 세포를 생성하였다. 벌크-편집된 세포를 PEC 단계로 분화하였으며, 이 세포는 세포의 개체군의 적어도 75%에서 HLA-E를 발현하였다(데이터 미도시). TXNIP KO 세포로부터 분화된 PEC 세포에서의 PDX1 및 NKX6.1 발현에 대한 유세포 분석 평가는 야생형 세포로부터 분화된 PEC 세포와 유사하였다(데이터 미도시).

[0551] **실시예 9: T-세포 활성화/증식 검정**

[0552] PEC-분화된 세포를 시험관 내 인간 T-세포 활성화/증식 검정을 통해 면역 반응을 촉발하는 이들의 능력에 대해 시험하였다. 새로운 공여자 PBMC를 헤마케어(Hemacare)로부터 구입하였으며, CD3+ T-세포를 Pan T-Cell Isolation Kit, 인간(밀테니 카탈로그 번호: 130-096-535)을 사용하여 정제하였다. 단리된 T-세포를 제조사 지시에 따라 CellTrace™ CFSE 세포 증식 키트 프로토콜(써모피셔 카탈로그 번호: C34554)로 표지하고, 5일 동안 분화된 PEC와 동시 배양하였다. T-세포 확장 및 활성화를 위한 Dynabeads™ 인간 T-활성자 CD3/CD28(써모피셔 카탈로그 번호: 11161D)을 T-세포를 활성화하기 위한 양성 대조군으로서 사용하였다. T-세포 단독을 CFSE로 표지하고, 음성 대조군으로서 사용하였다. CD3+ CFSE+ 세포의 비율(%)을 측정하여 T-세포 증식의 비율(%)을 평가하였다(도 19a 내지 도 19b). WT PEC는 T-세포 단독 대조군보다 높게 T-세포 증식을 촉발하였다. B2M KO, B2M KO/PD-L1 KI 및 B2M KO/PD-L1 KI + TXNIP KO/HLA-E KI CyT49-유래 PEC는 T-세포 단독 대조군보다 높게 T-세포 증식을 촉발하지 않았으며, 이는 편집된 세포의 저면역원성 성질을 보여주는 것이다.

[0553] **실시예 10: 유전자-표적화된 클론주의 생체 내 효능 연구**

[0554] 하기 유전자 변형, 즉 1) B2M 발현의 표적화된 결실 및 PD-L1의 강제 발현, 2) B2M 발현의 표적화된 결실 및 HLA-E의 강제 발현, 또는 3) TXNIP의 표적화된 결실을 갖는 CyT49-유래 클론성 hES 세포주로부터 체장 내배엽 세포를 생성하였다. 또한, 클론성의 미변형 세포주를 비절단 가이드-RNA(NCG)를 이용한 형질감염으로부터 수득하였다.

[0555] 표준 절차에 따라서 상기된 클론주로부터 유래하는 체장 내배엽 응집체를 천공 장치(PD)에 로딩하여 시험 또는 대조군 물질을 생성하였다. PD는 피하 이식 시에 직접적인 혈관형성을 허용하며, 캡슐화된 체장 전구 세포는 생체 내에서 글루코코스-반응성의 인슐린 생성 세포를 비롯한 기능성 체장 내분비 세포로 성숙한다.

[0556] 표 13에 요약된 바와 같이, 각각이 상술한 4개의 클론주 또는 야생형 CyT49 hES(비아사이트) 세포의 분화로부터 수득된 대략 7×10^6 개의 체장 내배엽 세포를 함유하는 2개의 물질을 5개 그룹의 무흉선 누드 래트에 피하 이식하였다.

표 13

연구 설계

[0557]

그룹 번호	그룹 ID	hESC 기원	유전자 변형		동물의 수	종료점
			녹아웃 (기능 상실)	녹인 (기능 획득)		

1	대조군	미변형 CyT49	없음	없음	그룹 당 6마리	20주
2	NCG	CyT49 하위 클론	없음	없음		
3	TXNIP KO	CyT49 하위 클론	TXNIP	없음		
4	B2M KO/PD-L1	CyT49 하위 클론	B2M	PD-L1		
5	B2M KO/HLA-E	CyT49 하위 클론	B2M	HLA-E		

[0558] 12주에 시작하여 모든 생존한 동물에 대해 글루코오스-자극된 인슐린 분비(GSIS) 시험을 통한 효능 평가가 이루어졌다. 3 g/kg의 글루코오스의 복강 내 투여 이전 및 이후에 단식하지 않은 동물로부터 혈액 샘플을 수득하였다. 표준 효소 결합 면역 흡착 검정을 통해 인간 C-펩타이드의 혈청 농도를 결정하였다.

[0559] 12주, 16주 및 20주에 GSIS 시험을 수행하였다. 결과에 따르면 특히 12주의 시점을 넘어서면 실험 그룹들 사이에는 실질적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 대조군(그룹 1; 40 pM 미만 내지 2.0 nM; 평균 1.1 nM)에서 검출된 C-펩타이드 수준과 비교하여 그룹 3(TXNIP KO, 평균 1.5 nM)의 6마리 동물 중 2마리에서 C 펩타이드 수준이 증가하였다. 기타 그룹인 그룹 2(NCG, 평균 0.5 nM), 그룹 4(B2M KO/PD-L1 KI, 평균 0.5 nM) 및 그룹 5(B2M KO/HLA-E KI, 평균 0.4 nM)는 대조군과 비교하여 유사한 범위의 C-펩타이드 수준을 나타냈지만, 보다 많은 동물이 상기 범위의 하단 부근에 있었다. 그러나, 이들 차이는 통계적으로 유의하지 않았다. 이들 결과에 따르면 도입된 유전자 변형 또는 클론주를 생성하기 위해 요구되는 조작 중 어떠한 것도 당해 세포주가 시험관 내에서 체장 내배엽 세포로 분화하고, 후속적으로 생체 내에서 기능성 베타 세포를 생성하는 능력에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

[0560] 20주에, GSIS 시험 이후 동물을 안락사시키고, 외식된 시험 물질을 중성의 완충 포르말린에 고정하고, 슬라이드로 가공하고, H&E로 염색하고, 인슐린 및 글루카곤에 대한 면역 조직 화학에 의해 염색하였다.

[0561] GSIS 시험을 통한 생체 내 효능 평가에서는 각각이 하위 세트의 유전자 변형을 갖는 클론성 세포주로부터 유래하는 체장 내배엽 세포를 이용하여 제형화된, 편집되지 않은 대조군 물질과 편집된 시험 물질 사이에는 실질적 차이가 없는 것으로 나타났다. 상기 결과는 개별 유전자 변형 및 이들이 도입된 과정은 생체 내에서 용인될 수 있다는 것을 암시한다.

[0562] **실시예 11. B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI 세포주의 생체 내 효능 연구**

[0563] 상기 실시예 8에서 기술되어 있는 바와 같이, 본질적으로 4개의 클론주를 생성하고, 천공 장치에 로딩하여 시험 물질을 형성하였다. 대조군 물질은 변형되지 않은 CyT49 세포(비아사이트)를 함유하고 있었다. 약 7×10^6 개의 체장 내배엽 세포를 포함하는 물질을 무흉선 누드 래트 내에 피하 이식하였다(래트 당 2개의 물질, 그룹 당 8마리의 래트).

[0564] 12주, 16주, 20주 및 24주에, 모든 생존한 동물에 대해 글루코오스-자극된 인슐린 분비(GSIS) 시험이 이루어졌다. 3 g/kg의 글루코오스의 복강 내 투여 이전 및 이후에 단식한 동물로부터 혈액 샘플을 수득하였다. 표준 효소 결합 면역 흡착 검정을 통해 인간 C-펩타이드의 혈청 농도를 결정하였다. 이식 후 12주에 대부분의 동물에서 혈청 C-펩타이드가 검출되었다. 이식 후 16주, 20주 및 24주에 혈청 C-펩타이드 수준은 표 14에 나타나 있다. 유전자-편집된 세포 대 대조군 세포가 이식된 동물의 그룹 사이에는 어떠한 통계적으로 유의한 차이도 관찰되지 않았다.

표 14

생체 내 혈청 C-펩타이드 수준

[0565]

그룹	혈청 C-펩타이드(pmol)		
	평균	하위 95%	상위 95%
유전자-편집된 세포 - 16주	729	40	1,418
유전자-편집된 세포 - 20주	1,080	391	1,769
유전자-편집된 세포 - 24주	1,676	987	2,365
대조군 세포 - 16주	1,075	386	1,764
대조군 세포 - 20주	1,883	1,193	2,572
대조군 세포 - 24주	2,466	1,777	3,155

[0566] 25주에, 음식에 대한 접근 없이 혈액 글루코오스 감소에 따른 혈청 인간 C-펩타이드 변화를 평가하기 위해 생존한 동물에 대해 인슐린 검사(인슐린 내성 시험(ITT))가 이루어질 것이다. 체중 1 kg 당 1 유닛의 인슐린의 복강 내 투여 이전, 및 투여 이후 다수의 시점(15분, 30분, 60분)에 단식한 동물로부터 혈액 샘플을 획득할 것이다. 표준 효소 결합 면역 흡착 검정을 통해 인간 C-펩타이드의 혈청 농도를 결정할 것이다.

[0567] 26주에, 생존한 동물을 안락사시키고, 외식된 시험 물질을 슬라이드로 가공하고, H&E로 염색하고, 인슐린 및 글루카곤에 대한 면역 조직 화학(IHC)에 의해 염색하여 인간 췌장 내분비 세포를 확인할 것이다. 시험 물질 외식편의 루멘(lumen) 외부의 이식편 유래 세포의 잠재적인 위치를 확인하기 위해 인간-특이적 핵 마커 NuMA1에 대한 추가적인 IHC를 수행할 것이다.

[0568] **실시예 12. B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI 세포주의 생체 내 효능 연구**

[0569] B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI 췌장 내배엽 세포의 응집체(대략 7×10^6 개의 세포를 함유함)를 시험 물질로 제형화하였다. 46마리의 무흉선 누드 래트에 2개의 시험 물질을 각각 피하 이식할 것이다. 연구 중인 동물은 GSIS, ITT 및 비단식 혈액 글루코오스(NFBG)에 대해 평가할 것이다. 13주, 17주, 26주 및 39주의 예정된 종결 시점에 그룹 당 10마리의 동물을 안락사시킨 반면, 가능한 예정되지 않은 조기 종결을 설명하기 위해 6마리의 추가적인 동물에 대해 연구할 것이다. 각각의 동물로부터 2개의 외식된 시험 물질을 조직학적 평가 또는 총 C-펩타이드 함량 평가 중 하나에 무작위로 배정할 것이다. 표 15에는 연구 설계가 나타나 있다.

표 15

[0570] 연구 설계

그룹 번호	시험 물질의 개수	동물의 수	GSIS 시점(주)	ITT 시점(주)	종료점(주)	외식편 분석
1	20	10마리 수컷	12	해당 없음	13	각 그룹의 경우: 조직학 5마리의 동물 C-펩타이드 함량 5마리의 동물
2	20	10마리 수컷	12, 16	해당 없음	17	
3	20	10마리 수컷	12, 16, 20, 24	25	26	
4	최대 32	최대 16마리 수컷	12, 16, 20, 24, 30, 36	25, 33	39	
총	92	46마리 수컷				

[0571] 12주, 16주, 20주, 24주, 30주 및 36주에, 모든 생존한 동물에 대해 글루코오스-자극된 인슐린 분비(GSIS) 시험을 통한 효능 평가가 이루어질 것이다. 3g/kg 글루코오스의 복강 내 투여 이전 및 이후에 단식한 동물로부터 혈액 샘플을 획득할 것이다. 인간 C-펩타이드의 혈청 농도를 표준 효소 결합 면역 흡착 검정을 통해 결정할 것이다.

[0572] 25주 및 33주에, 음식에 대한 접근 없이 혈액 글루코오스 감소에 따른 혈청 인간 C-펩타이드 변화를 평가하기 위해 생존한 동물에 대해 인슐린 검사(인슐린 내성 시험(ITT))가 이루어질 것이다. 체중 1 kg 당 1 유닛의 인슐린의 복강 내 투여 이전, 및 투여 이후 다수의 시점(15분, 30분, 60분)에 단식한 동물로부터 혈액 샘플을 획득할 것이다. 표준 효소 결합 면역 흡착 검정을 통해 인간 C-펩타이드의 혈청 농도를 결정할 것이다.

[0573] GSIS 및 ITT 시험을 위한 단식의 개시 전, 그리고 대략 12주, 16주, 20주, 24주, 25주, 30주, 33주 및 36주에 비-단식 혈액 글루코오스(NFBG)를 측정할 것이다.

[0574] 표 13에서 확인된 예정된 종료점에, 동물을 안락사시킬 것이다. CO₂ 흡입 후 양측 개흉술(bilateral thoracotomy)에 의해 안락사를 수행할 것이다. 예정된 종결 및 예정되지 않은 종결 모두에 대해 전체 부검을 수행할 것이고, 육안적 이상을 기록할 것이다.

[0575] 소정의 외식편을 냉동시킨 후, 루멘 함량을 균질화할 것이다. 표준 효소 결합 면역 흡착 검정을 통해 균질액의 총 C-펩타이드 함량을 결정할 것이다. 총 외식편 C-펩타이드 함량을 사용하여 임상적 투여를 계획할 것이다.

[0576] 소정의 외식된 시험 물질을 중성의 완충 포르말린에 고정하고, 슬라이드로 가공하고, H&E로 염색하고, 인슐린 및 글루카곤에 대한 면역 조직 화학에 의해 염색하여 인간 췌장 내분비 세포를 확인할 것이다. 시험 물질 외식편의 루멘 외부의 이식편 유래 세포의 잠재적인 위치를 확인하기 위해 인간-특이적 핵 마커 NuMA1에 대한 추가

적인 IHC를 수행할 것이다.

[0577] **실시예 13: 인간 iPSC에서 B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI의 생성**

[0578] PD-L1 암호화 서열이 B2M 유전자위 내에 삽입된 인간 iPSC(iPSC 0025)를 생성하였다. B2M-2 gRNA(서열 번호 2)와 Cas9 단백질을 3:1(gRNA:Cas9)의 몰비로 조합함으로써 RNP 복합체를 형성하였다. RNP 복합체를 형성하기 위해, gRNA 및 Cas9를 25 μ l의 총 부피가 되도록 R-완충액이 담겨 있는 하나의 용기에 모으고, 실온에서 15분 동안 배양하였다. 세포를 ACCUTASE[®]을 이용하여 해리시킨 후, DMEM/F12 배지(집코, 카탈로그 번호: 11320033)에서 재현탁하고, NC-200(케모메텍)을 사용하여 계수하고, 원심분리하였다. 총 1×10^6 개의 세포를 RNP 복합체와 함께 재현탁하였다. 125 μ l의 총 부피에 대해 4 μ g의 B2M-CAGGS-PD-L1 공여자 플라스미드(서열 번호 33) 및 R-완충액을 첨가하였다. 이어서, 이러한 혼합물을 하기 매개변수, 즉 2 펄스, 30 밀리초, 1,100 V를 이용하여 전기천공하였다. 전기천공 7일 후, 본질적으로 상기 실시예 8에 기술되어 있는 바와 같이 밀테니 시약 또는 씨모피서 시약을 사용하여 세포를 MACS를 통해 PD-L1 양성 세포에 대해 부유화하였다.

[0579] 부유화된 PD-L1 양성 개체군을 확장시킨 후, 본질적으로 상술한 바와 같이 TXNIP-T5 gRNA(서열 번호 20) 및 Cas9 단백질을 3:1(gRNA:Cas9)의 몰비로 포함하는 RNP 복합체 및 4 μ g의 TXNIP-CAGGS-HLA-E 공여자 플라스미드 2(서열 번호 56)와 함께 세포를 전기천공하였다. 전기천공 7일 후, 밀테니 시약 또는 씨모피서 시약을 사용하여 세포를 MACS를 통해 HLA-E 양성 세포에 대해 부유화하였다. HLA-E 부유화 후, 세포를 StemFlex와 Revitacell을 첨가한 BIOLAMININ 521 CTG-코팅된 96-웰 플레이트에 WOLF FACS-분류기(Nanocelllect)를 사용하여 단일 세포로 분류하였다. 콜로니가 단일 세포로서 재접종시기에 충분히 클 때까지 격일로 배지를 변경하면서 플레이트팅된 단일 세포를 정상산소상태 배양기(37°C, 8% CO₂)에서 성장시켰다. 샘플이 포화상태가 된 경우에 이를 유지 및 계능 DNA 추출을 위해 분할하였다. MACS 부유화, 및 HLA-E 및 PD-L1 이중 양성 세포용 게이팅 세트가 구비된 96-웰 플레이트 내로의 FACS 분류를 위해 항-PD-L1 및 항-HLA-E 항체(표 4)를 사용하였다. FACS 분류를 위해 편집되지 않은 세포는 음성 대조군으로서 작용하였다.

[0580] KI-통합된 DNA만의 증폭을 가능하게 하는 PD-L1 cDNA 삽입 또는 HLA-E cDNA 삽입에 대해 각각 플라스미드 상동성 아암의 외부로부터의 영역을 증폭시키는 프라이머를 사용하여 정확히 표적화된 클론을 PD-L1 KI 삽입 및 HLA-E KI 삽입을 위한 PCR을 통해 확인하였다. KI가 이형 접합성 또는 동형 접합성 방식으로 발생하는지를 평가하기 위해 온-표적 삽입을 PCR에 의해 접합성에 대해 시험하였다. 이형 접합성 클론이 확인되면, KI 음성 대립 유전자를 생어 서열분석용으로 송부하여 KI 음성 대립유전자가 B2M-파괴 삽입-결실 또는 TXNIP-파괴 삽입-결실을 각각 함유하고 있는지를 검증하였다. 3,000만 개의 세포의 개체군 크기에 도달할 때까지 (KI 삽입 또는 삽입-결실 형성을 통해) 완전한 B2M 및 TXNIP 파괴를 갖는 정확한 KI 클론을 증가하는 조직 배양 형식으로 확장시켰다. 선택된 클론을 이러한 방식으로 확장시키고, 세포 내 유세포 분석법을 통해 OCT4 및 SOX2를 시험하여 다능성인 것으로 확인하였다.

[0581] 4개의 편집된 hiPSC 클론(VI-B)을 문헌[Rezania *et al.* Nat Biotechnol. 2014 Nov; 32(11): 1121~33]의 체장내분비 프로토콜을 사용하여 분화시켰다. 단계 4에서, 크로모그라닌(CHGA), PDX1 및 NKX6.1에 대한 유세포 분석법을 수행하였다. 상이한 대표적인 밀도로 집중된 클론(클론 1)의 PDX1 및 NKX6.1에 대한 결과는 도 26a에 나타나 있다. CHGA는 4개의 클론 모두에 대해 음성이었다. PD-L1 및 HLA-E에 대한 유세포 분석법을 또한 수행하였다. 클론(클론 1)의 PD-L1 및 HLA-E에 대한 결과는 도 26b에 나타나 있다.

[0582] **실시예 14: B2M KO/PD-L1 KI, TXNIP KO/HLA-E KI 인간 다능성 줄기 세포(hPSC) 극저온 세포 은행을 제조하기 위한 과정**

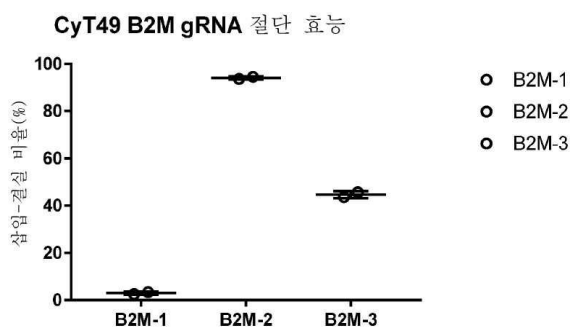
[0583] B2M-2 gRNA(서열 번호 2) 및 Cas9 단백질을 3:1(gRNA:Cas9)의 몰비로 포함하는 RNP 복합체, 및 4 μ g의 B2M-CAGGS-PD-L1 공여자 플라스미드(서열 번호 33)와 함께 CyT49 hESC(비아사이트)를 1,100 V에서 30 밀리초 동안 2 펄스로 전기천공하였다. 전기천공 후, 세포를 StemFlex 배지와 RevitaCell로 충전된 에펜도르프 튜브에 피펫팅하였다. 이어서, 이러한 세포 현탁액을 1:20 희석하여 BIOLAMININ 521 CTG로 예비 코팅된 조직 배양 접시에 플레이트팅하였다. 세포를 정상산소상태 배양기(37°C, 8% CO₂)에서 배양하였다.

[0584] 전기천공 7일 후, 알렉사-488-표지된 항-PD-L1 항체 및 자성 비드(DYNABEADS[®] Pan Mouse IgG; 씨모피서)를 사용하여 세포를 MACS를 통해 PD-L1 양성 세포에 대해 부유화하였다. PD-L1 양성 세포는 XF-KSR 확장 배지(집코)에서 7일 동안 배양함으로써 확장하였다.

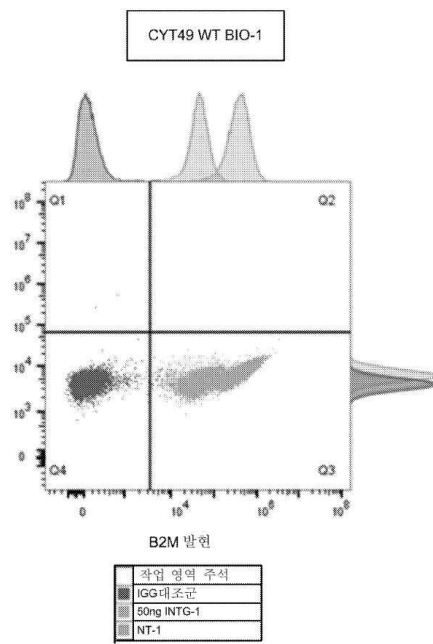
- [0585] 이어서, TXNIP-T5 gRNA(서열 번호 20) 및 Cas9 단백질을 3:1(gRNA:Cas9)의 물비로 포함하는 RNP 복합체, 및 4 μ g의 TXNIP-CAGGS-HLA-E 공여자 플라스미드 2(서열 번호 56)와 함께 PD-L1 양성 세포를 1,100 V에서 30 밀리초 동안 2 펄스로 전기천공하였다. 전기천공 후, 세포를 StemFlex 배지와 RevitaCell로 충전된 에펜도르프 튜브에 피펫팅하였다. 이어서, 이러한 세포 현탁액을 1:20 희석하여 BIOLAMININ 521 CTG로 예비 코팅된 조직 배양 접시에 플레이팅하였다. 세포를 정상산소상태 배양기(37°C, 8% CO₂)에서 배양하였다.
- [0586] 전기천공 7일 후, PE-표지된 항-HLA-E 항체 및 자성 비드(DYNABEADS[®] Pan Mouse IgG; 써모피셔)를 사용하여 세포를 MACS를 통해 HLA-E 양성 세포에 대해 부유화하였다. PD-L1 및 HLA-E 이중 양성 세포는 XF-KSR 확장 배지(집코)에서 5일 동안 배양함으로써 확장하였다.
- [0587] PD-L1 및 HLA-E 이중 양성 세포를 단일 세포로 분류하였다. 이를 위해, 세포에 ACCUTASE[®]를 이용한 해리 전 3 시간 내지 4시간에 (1X Revitacell의 최종 농도에 대해) StemFlex Complete와 Revitacell을 공급하였다. 해리 후, 단일 세포를 BIOLAMININ-코팅된 96-웰 조직 배양 플레이트의 단일 웰에 분류하였다. 상술한 항-PD-L1 및 항-HLA-E 항체를 사용하여 단일 세포를 웰에 분류하기 위해 WOLF FACS-분류기(Nanocelllect)를 사용하였다. 플레이트를 100 μ l 내지 200 μ l의 StemFlex Complete와 Revitacell로 예비 충전하였다. 세포 접종 3일 후, 세포에 새로운 StemFlex를 공급하고, 100 μ l 내지 200 μ l의 배지를 격일로 계속해서 공급하였다. 성장 10일 후, 세포에는 12일 내지 14일째 날까지 StemFlex를 매일 공급하였다. 이때, 플레이트를 ACCUTASE[®]로 해리시키고, 수집된 세포 현탁액을 2개의 96-웰 플레이트 내에 1:2로 분할하고, 이를 약 4일 동안 배양하였다.
- [0588] 시각 분석(형태) 및 DNA 분석(접합성 분석 및 삽입-결실 프로파일에 대한 PCR 및 DNA 서열분석)을 위해 세포의 일부를 수확하고, 나머지 세포는 배양하고, T175 플라스크에서의 배양을 위해 확장시켰다. 배양한 지 약 2주 후, 냉동을 위해 클론을 선택하였다. 표준 절차를 사용하여 세포를 냉동 이전 및 이후에 형태, 생존력, 내독소, 마이코플라스마, 핵형, 다능성, 분화능, 온/오프 표적 분석, 무작위 플라스미드 통합, 잔류 Cas9/플라스미드에 대해 특성분석하였다. 세포를 극저온 배지에서 냉동시키고, -80°C 또는 액체 질소에서 극저온 바이알에 저장하였다.
- [0589] 상기 과정에 의해 특정 B2M KO/PD-L1 KI + TXNIP KO/HLA-E KI 클론("시드 클론")을 제조하고 단리하였다. 시드 클론을 PEC 단계로 분화시키고, 특성분석하였다. 도 27a는 PEC 단계에서의 시드 클론의 형태가 야생형 세포와 유사하다는 것을 보여준다. 도 27b는 시드 클론으로부터 분화된 세포에서의 분화 시간 과정에 걸친 FOXA2, CHGA, PDX1 및 NKX6.1의 동적 발현 패턴이 야생형 세포와 유사하다는 것을 보여준다. 도 27c는 분화된 개체군에서의 CHGA-/NKX6.1+/PDX1+ 세포의 비율(%)을 보여준다.

도면

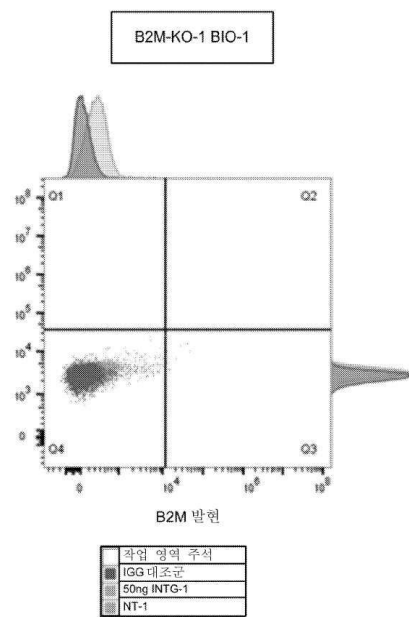
도면1



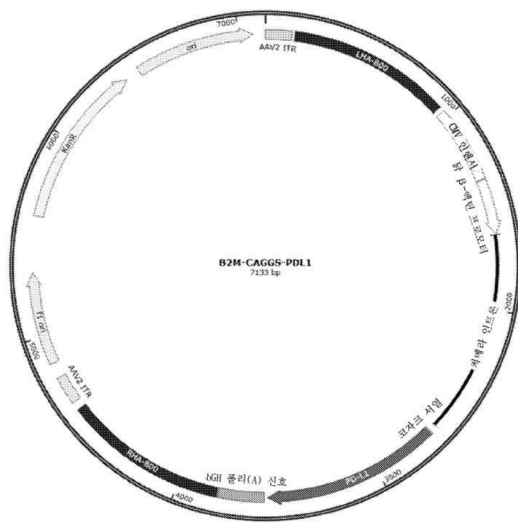
도면2a



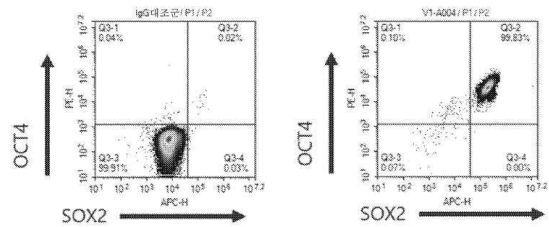
도면2b



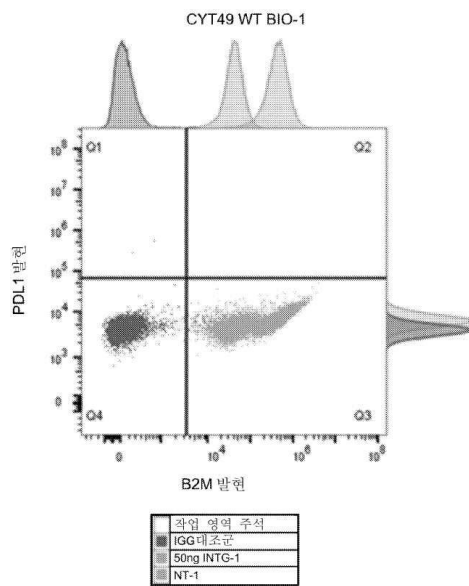
도면3



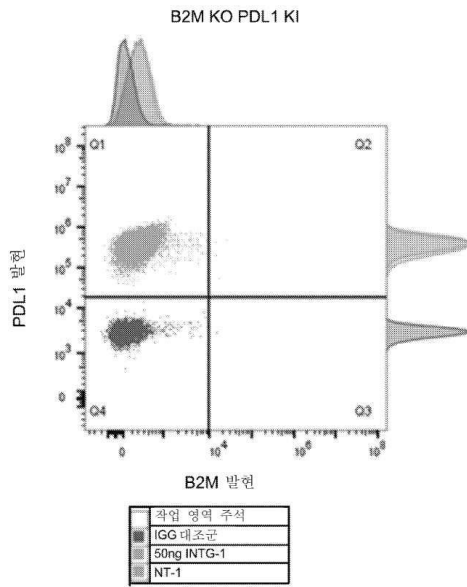
도면4



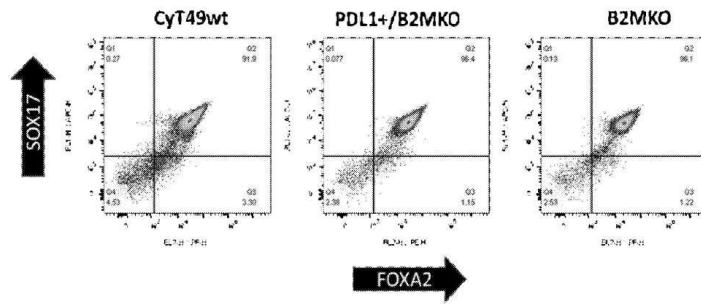
도면5a



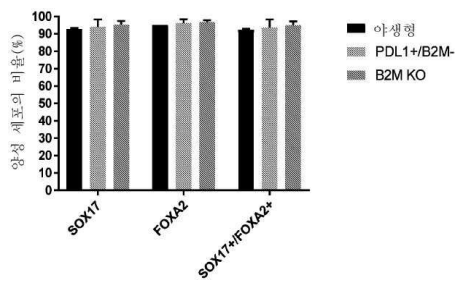
도면5b



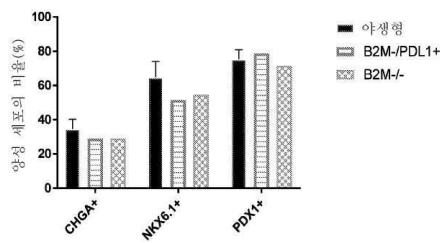
도면6



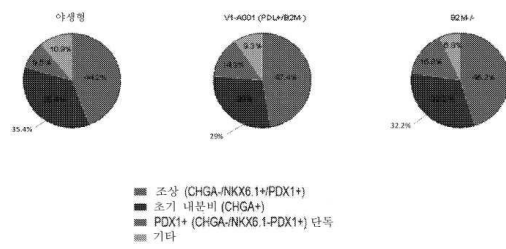
도면7



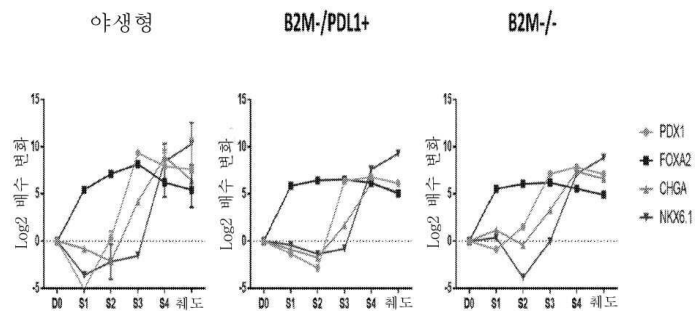
도면8



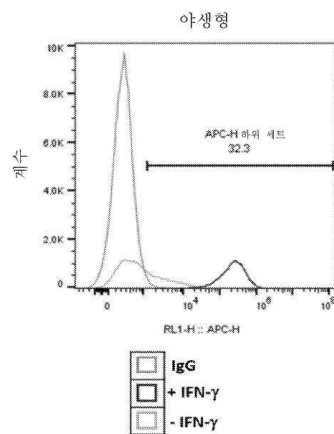
도면9



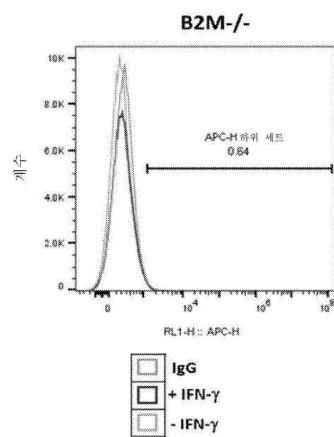
도면10



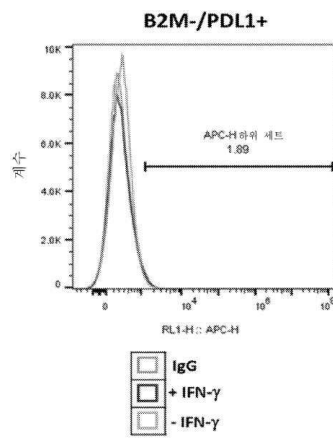
도면11a



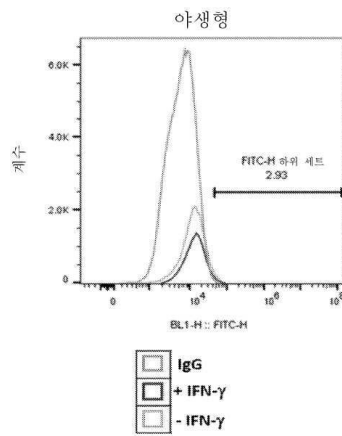
도면11b



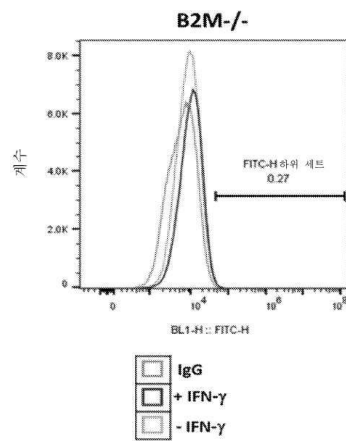
도면11c



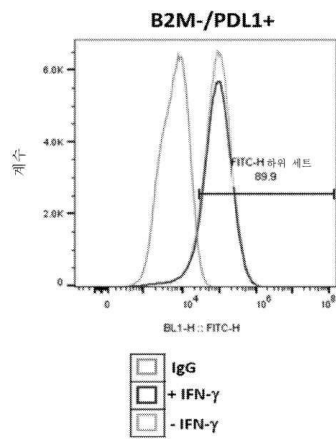
도면11d



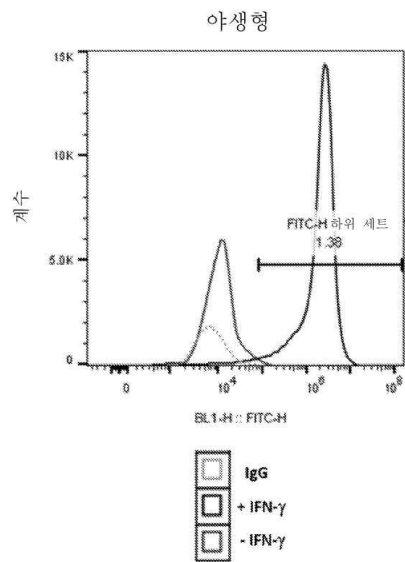
도면11e



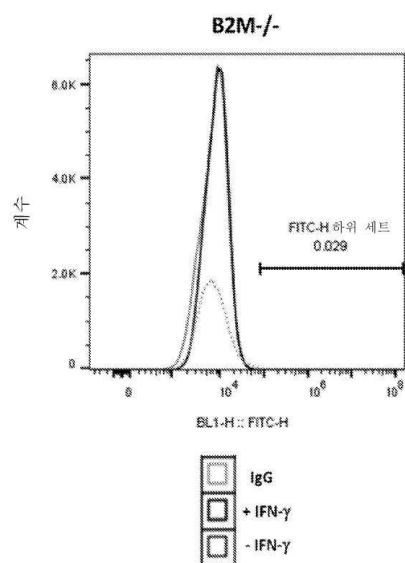
도면11f



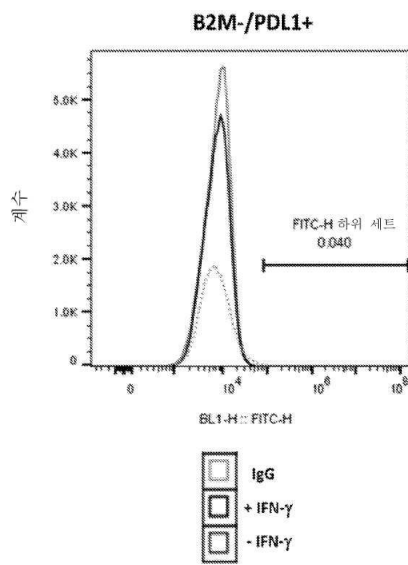
도면12a



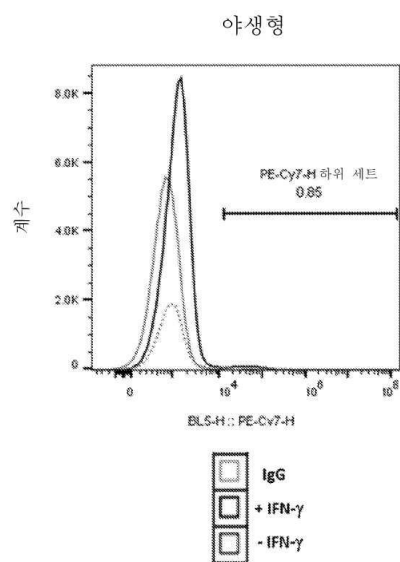
도면12b



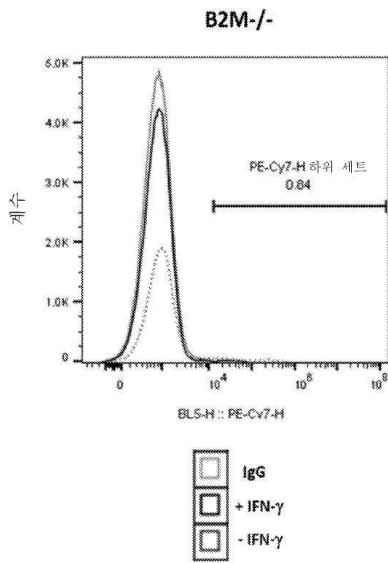
도면12c



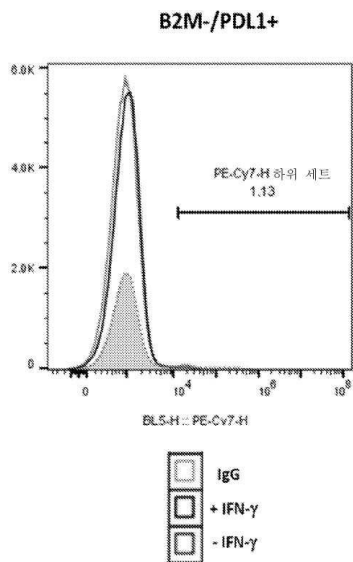
도면12d



도면12e

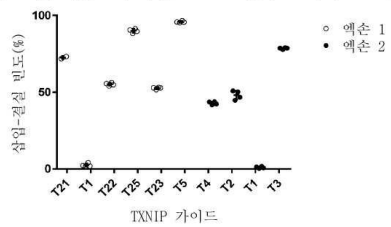


도면12f

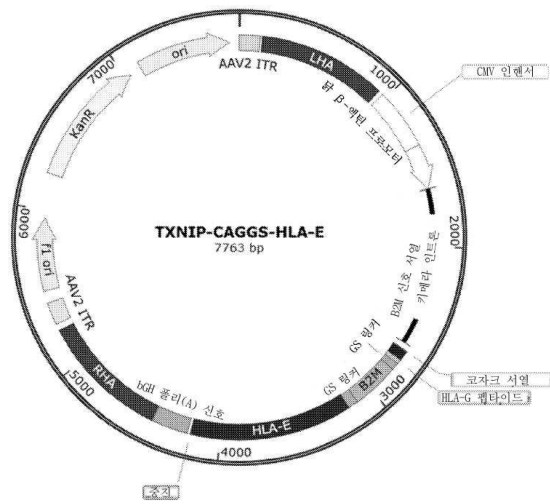


도면13

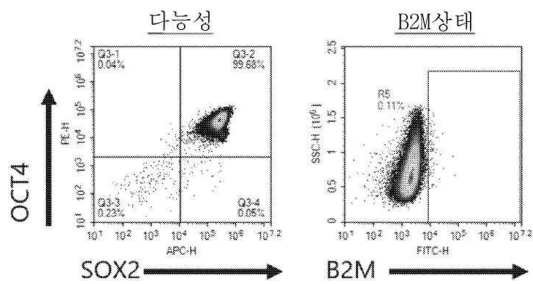
엑손 1 및 엑손 2에 대한 TXNIP 신테고 가이드 스크린



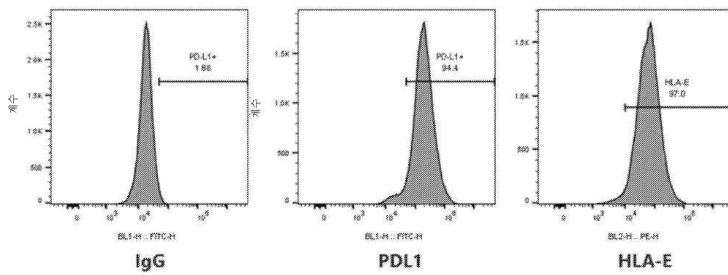
도면14



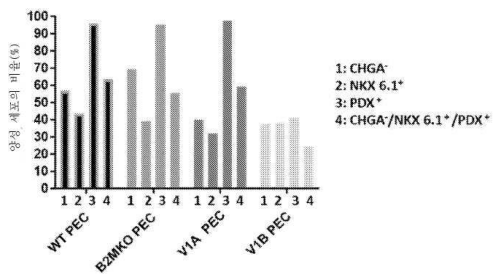
도면15



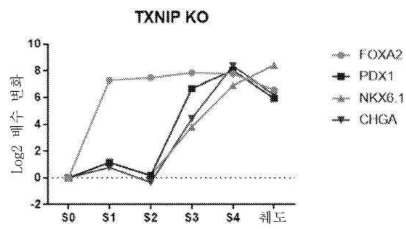
도면16



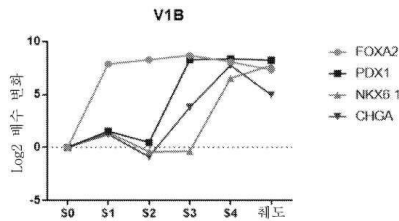
도면17



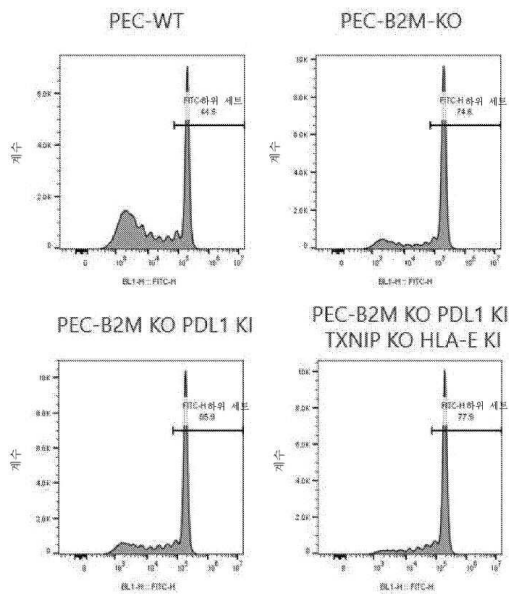
도면18a



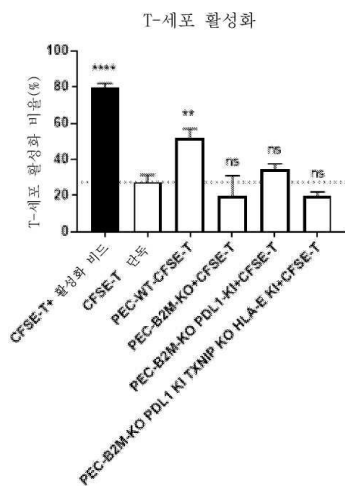
도면18b



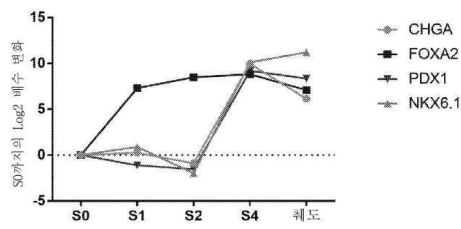
도면19a



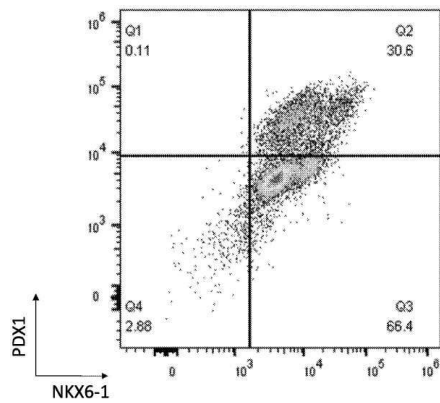
도면19b



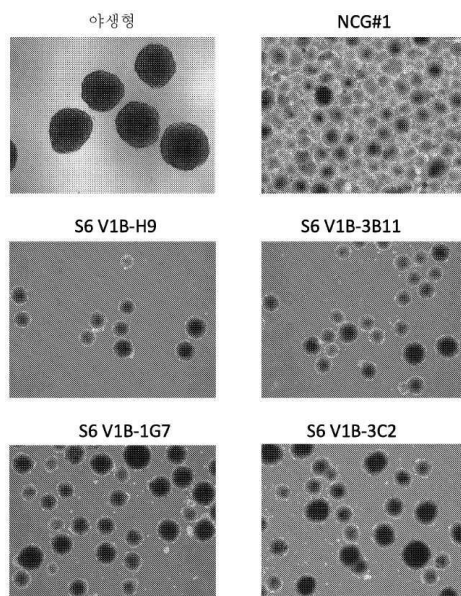
도면20



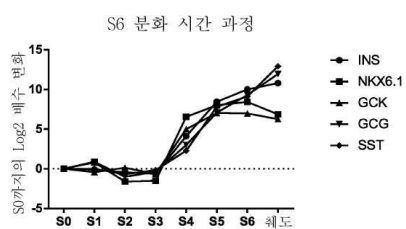
도면21



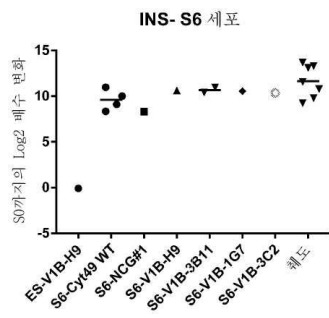
도면22



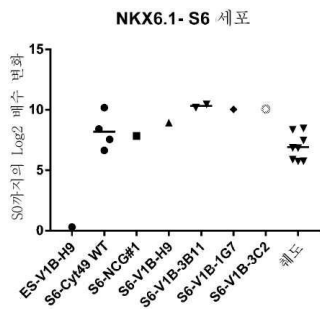
도면23a



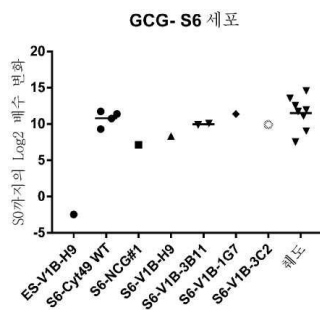
도면23b



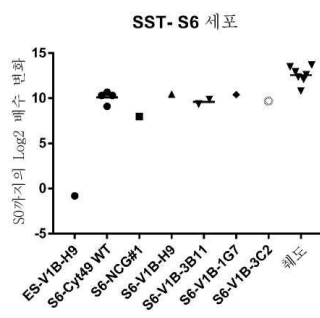
도면23c



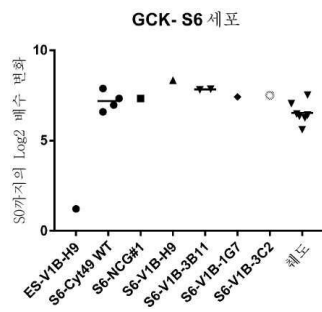
도면23d



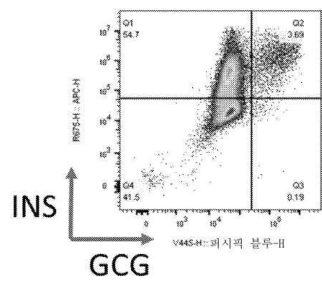
도면23e



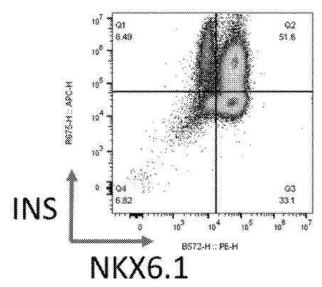
도면23f



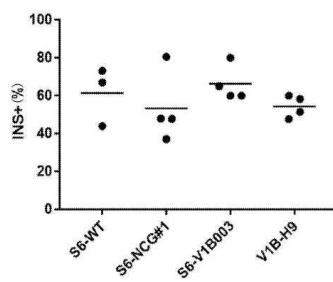
도면24a



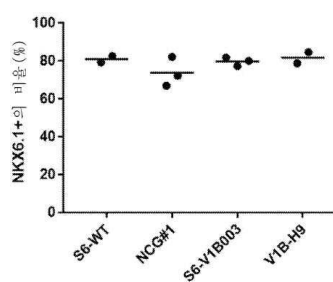
도면24b



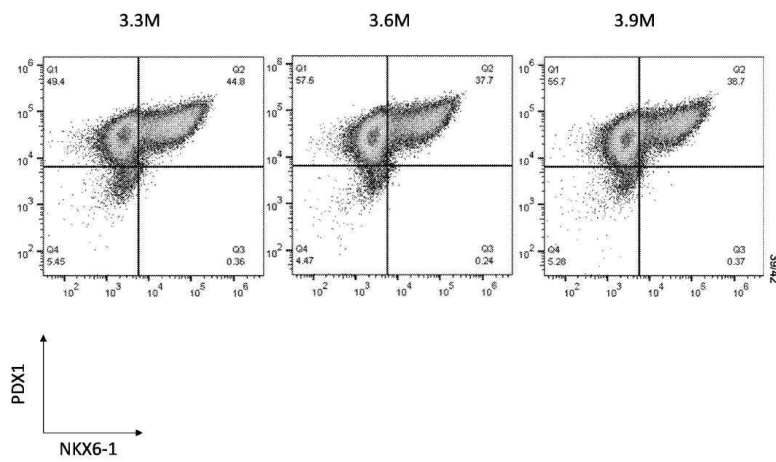
도면25a



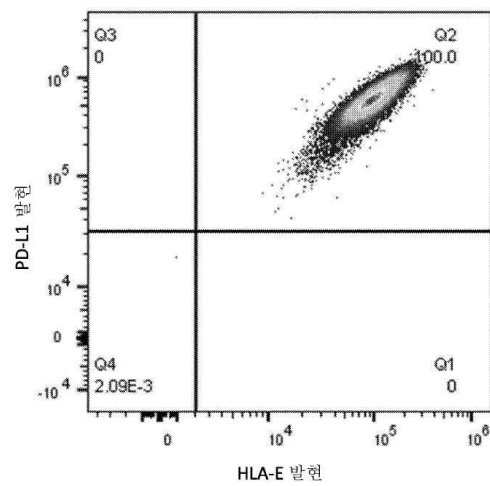
도면25b



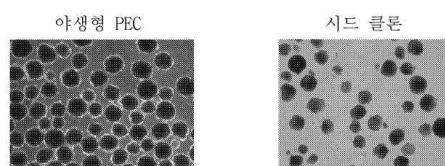
도면26a



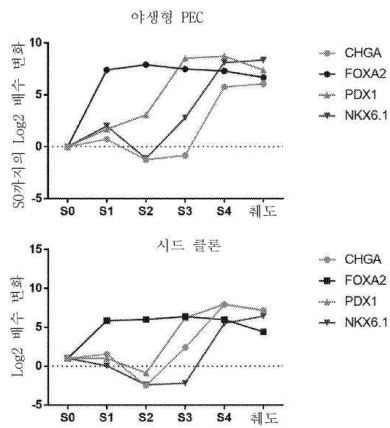
도면26b



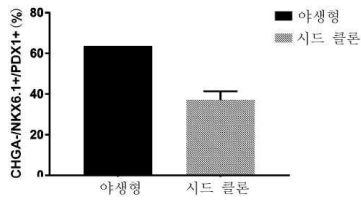
도면27a



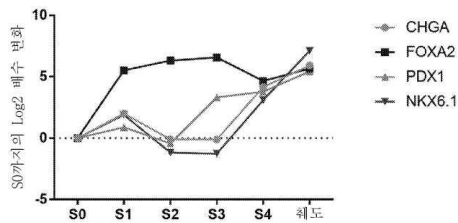
도면27b



도면27c



도면28



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> CRISPR Therapeutics AG

REZANIA, Alireza

RAMOS-ZAYAS, Rebeca

<120> UNIVERSAL DONOR CELLS

<130> 100867-666508 CT124-PCT

<150> 62/896,473

<151> 2019-09-05

<150> 62/979,771

<151> 2020-02-21

<160> 57

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 gctactctct ctttctggcc 20
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 ggccgagatg tctcgctccg 20
 <210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 cgcgagcaca gctaaggcca 20
 <210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <400> 4
 cagacagcaa actcaccag 20
 <210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <400> 5
 aaactttgtc ccgaccctcc 20
 <210> 6

<211> 130

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 6

cctgcaggca gctgcgcgt cgctcgctca ctgaggccgc cggggtcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gaggggcaa ctccatcact	120
aggggttcct	130

<210> 7

<211> 800

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gttctaggtt ggaaactaag agaagatgt acctagagg cgctggaagc tctaaagccc	60
tagcagttac tgcttttact attagtggc gtttttttct ccccccgcc ccccgacaaa	120

tcaacagaac aaagaaaatt acctaaacag caaggacata gggaggaact tcttggcaca	180
gaactttcca aacacttttt cctgaaggga tacaagaagc aagaaaggta ctctttcact	240
aggaccttct ctgagctgtc ctgagatgc ttttgggact atttttctta cccagagaat	300
ggagaaaccc tgcagggaat tccaagctg tagttataaa cagaagtctt cttcttgcta	360
ggtagcattc aaagatctta atcttctggg ttccggttt ctgaatgaa aaatgcaggt	420
ccgagcagtt aactggctgg ggcaccattt gcaagtcact tagcatctct ggggccagtc	480
tgcaaagcga gggggcagcc ttaatgtgcc tccagcctga agtcctagaa tgagcgcccg	540

gtgtccaag ctggggcgcg caccacagat cggaggcgcg cgatgtacag acagcaaact	600
caccagctct agtgcagcc ttcttaacaa tcacgagact ctaagaaaag gaaactgaaa	660
acgggaaagt cctctctctt aacctggcac tgcgtcgtg gcttgagac aggtgacggt	720
ccctgcgggc ctgtctctga ttggctgggc acgcgtttta tataagtga ggcgtcgcgc	780
tggcgggcat tcctgaagct	800

<210> 8

<211> 380

<212> DNA

<213> Cytomegalovirus

<400> 8

gacattgatt attgactagt tattaatagt aatcaattac ggggtcatta gttcatagcc 60

catatatgga gttccgcgtt acataactta cggtaaattgg cccgcctggc tgaccgcca 120

acgacccccg cccattgacg tcaataatga cgtatgttcc catagtaacg ccaataggga 180

ctttccattg acgtcaatgg gtggactatt tacggtaaac tgcccacttg gcagtacatc 240

aagtgtatca tatgccaaatg acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggccccgct 300

ggcattatgc ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtac atctacgtat 360

tagtcacgcg tattaccatg 380

<210> 9

<211> 276

<212> DNA

<213> Gallus gallus

<400> 9

tcgaggtgag cccacagttc tgcctcactc tccccatctc cccccctcc ccacccccaa 60

ttttgtatgtt atttattttt taattatttt gtgcagcgat gggggcgagg gggggggggg 120

gcgcgccag gcggggcgagg gcggggcgag gggcgaggcg gagaggtgcg 180

gcggcagcca atcagagcgg cgcgctccga aagtttcctt ttatggcgag gcggcgaggc 240

cggcgggcct ataaaaagcg aagcgcgcgg cgggcg 276

<210> 10

<211> 1009

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 10

ggagtcgctg cgttgccttc gccccgtgcc ccgctccgag ccgctcgcg ccgccgccc 60

cggtctgac tgaccgcgtt actccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctctccg 120

ggctgtaatt agcgttggg ttaatgacgg ctcttttctt ttctgtggct gcgtgaaagc 180

cttaaagggc tccgggaggc ccttttgtgc gggggggagc ggctcggggg gtgcgtgcgt 240

gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgctgcgg cccgcgctgc ccggcggctg tgagcgtgc 300

gggcgcggcg cggggctttg tgcgctccgc gtgtgcgca ggggagcgcg gccggggcg 360

gtgccccgcg gtgcgggggg gctgcgaggg gaacaaagcg tcgctgcggg gtgtgtgcgt 420

gggggggtga gcaggggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccccc ctgcaccccc 480

ctccccgagt tgctgagcac ggcccggcctt cgggtgcggg gctccgtgcg gggcgtggcg 540
 cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc ggggcggggc 600
 cgcctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcgc cggcggtg 660
 tcgaggcgcg gcgagccga gccattgcct tttatggtaa tcgtgcgaga gggcgcaggg 720
 acttcctttg tcccaaatct ggcggagccg aaatctggga ggcgcgcgcg caccctct 780
 agcgggcgcg ggcgaagcgg tgcggcgcgc gcaggaagga aatgggcggg gagggccttc 840
 gtgcgtcgcc gcgccgccgt ccccttctcc atctccagcc tcggggctgc cgcaggggga 900

cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg tgaccggcgg 960
 ctctagagcc tctgctaacc atgttcacgc cttcttcttt ttctacag 1009

<210> 11

<211> 873

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

atgaggatat ttgtgtctt tatattcatg acctactggc atttgcgtgaa cgcatttact 60
 gtcacggttc ccaaggacct atatgtggtg gagtatggtg gcaatatgac aattgaatgc 120
 aaattccag tagaaaaaca attagacctg gctgcactaa ttgtctattg ggaaatggag 180
 gataagaaca ttattcaatt tgtgcatgga gaggaagacc tgaagggtca gcatagtagc 240

tacagacaga gggcccggct gttgaaggac cagctctccc tgggaaatgc tgcacttcag 300
 atcacagatg tgaatttga ggatgcaggg gtgtaccgt gcatgacag ctatggtggt 360
 gccgactaca agcgaattac tgtgaaagtc aatgccccat acaacaaat caaccaaaga 420
 attttggttg tggatccagt cacctctgaa catgaactga catgtcaggc tgagggtac 480
 cccaaggcgc aagtcatctg gacaagcagt gaccatcaag tcctgagtgg taagaccacc 540
 accaccaatt ccaagagaga ggagaaactt ttcaatgtga ccagcacact gagaatcaac 600
 acaacaacta atgagatttt ctactgcact tttaggagat tagatcctga ggaaaacat 660

acagctgaat tggatcatcc agaactacct ctggcacatc ctccaaatga aaggactcac 720
 ttggtaatc tgggagccat cttattatgc ctgggtgtag cactgacatt catcttcgt 780
 ttaagaaaag ggagaatgat ggatgtgaaa aaatgtggca tccaagatac aaactcaaag 840
 aagcaaagt atacacattt ggaggagacg taa 873

<210> 12

<211> 225

<212> DNA

<213> Bos taurus

<400> 12

ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg ttgcccctc ccccgtcct tccttgacct 60

tggaagggtg cactccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 120

tgagtaggtg tcattctatt ctggggggtg gggtagggca ggacagcaag ggggaggatt 180

gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtagggctc tatgg 225

<210> 13

<211> 800

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

ccagcgtgag tctctctac cctcccgtc tggctcttc tctcccgtc tgcacctct 60

gtggccctcg ctgtgcttc tcgtccgtg acttccctc tccaagttct ccttggtggc 120

ccgccgtggg gctagtccag ggctggatct cggggaagcg gcggggtggc ctgggagtg 180

ggaagggggt gcgcaccgg gacgcgcgt acttgccct ttcggcgggg agcaggggag 240

acctttggcc tacggcgacg ggagggtcgg gacaaagttt agggcgtcga taagcgtcag 300

agcgccgagg ttgggggagg gtttctctc cgtcttttcg cggggcctct ggctcccca 360

gcgcagctgg agtgggggac gggtaggctc gtccaaagg cgcggcgtg aggtttgtga 420

acgcgtggag gggcgcttgg ggtctggggg aggcgtcgcc cgggtaagcc tgtctgctgc 480

ggctctgctt cccttagact ggagagctgt ggacttcgtc taggcgcccg ctaagttcgc 540

atgtcctagc acctctgggt ctatgtgggg ccacaccgtg gggaggaaac agcacgcgac 600

gtttgtagaa tgcttgctg tgatacaaag cggtttcgaa taattaactt atttgttccc 660

atcacatgtc acctttaaaa aattataaga actaccggtt attgacatct ttctgtgtgc 720

caaggacttt atgtgctttg cgctatttaa ttttgaaaac agttatcttc cgccatagat 780

aactactatg gttatcttct 800

<210> 14

<211> 141

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 14

aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgtcg ctactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120
gagcgcgag ctgcctgcag g 141

<210> 15
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 15
gaagcgtgtc ttcatagcgc 20
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 16
ttactcgtgt caaagccgtt 20
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 17
tgtcaaagcc gttaggatcc 20
<210> 18
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 18
gccgttagga tcctggcttg 20
<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 19
gcggagtggc taaagtgctt 20
<210> 20

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 20
 tccgcaagcc aggatcctaa 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 21
 gttcggcttt gagcttcctc 20

 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 22
 gagatggtga tcatgagacc 20
 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 23
 ttgtactcat attgtttcc 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 aacaaatatg agtacaagtt 20
 <210> 25
 <211> 800
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 25

accgctctca gaccagaaac gtccacaccc gccctccgat ggctgtgc cctggctagg	60
ttttagggtc agtgggatcc tccttccact ggacccggga gaagacgctc aacagccccc	120
tccttccctt ccttctctc cttctctcc ttccccctc cctgcgccgc tccagagcgc	180
aacaaccatt ttccagcca ggagcacacc gtgtccacgc gccacagcga tctcactgat	240
tggtcgggct cctggtaaac aaggaccggg cagccaatgg gagggatgtg cacgagggca	300
gcacgagcct ccgggccagc gctcgcgtgg ctcttctggc ccgggctact atatagagac	360
gtttccgctt cctgcttgaa actaaccctt cttttctcc aaaggagtgc ttgtggagat	420
cggatctttt ctccagcaat tgggggaaaag aaggcttttt ctctgaatta gcttagtgta	480
accagcggcg tatatttttt aggcgccttt tcgaaaacct agtagttaat attcatttgt	540
ttaaatctta tttatttttt aagctcaaac tgcttaagaa taccttaatt ccttaaagtg	600
aaataatfff ttgcaaaggg gtttctcga ttggagctt ttttttctt ccaccgtcat	660
ttctaactct taaaaccaac tcagttccat catggtgatg ttcaagaaga tcaagtcttt	720
tgaggtggtc tttaacgacc ctgaaaaggt gtacggcagt ggcgagaagg tggctggccg	780
ggtgatagtg gaggtgtgtg	800

<210> 26

<211> 60

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 26

atgtctcgtt ccgtggcctt agctgtgctc gcgtactct ctctttctgg cctggaggct	60
--	----

<210> 27

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

gtcatggcgc cccgaaccct cttctctg	27
--------------------------------	----

<210> 28

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 28
 ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcg 45

<210> 29
 <211> 297
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29
 atccagcgta ctccaaagat tcaggtttac tcacgtcatc cagcagagaa tggaaagtca 60
 aatttcctga attgctatgt gtctgggttt catccatccg acattgaagt tgacttactg 120
 aagaatggag agagaattga aaaagtggag cattcagact tgtctttcag caaggactgg 180
 tctttctatc tcttgtacta cactgaattc acccccactg aaaaagatga gtatgcctgc 240
 cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtgggatcg agacatg 297

<210> 30
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized

<400>
 > 30
 ggtgggtggtg gttctggtgg tgggtggttct ggcggcgggcg gctccggtgg tgggtgatcc 60

<210> 31
 <211> 1011
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 31
 ggctcccact ccttgaagta ttccacaact tccgtgtccc ggcccggcgg cggggagccc 60
 cgcttcatct ctgtgggcta cgtggacgac acccagttcg tgcgtttcga caacgacgcc 120
 gcgagtccga ggatggtgcc gcgggcggcg tggatggagc aggaggggtc agagtattgg 180
 gaccgggaga cacggagcgc caggacacc gcacagattt tccgagtga tctgcggacg 240
 ctgcgcggct actacaatca gagcaggcc gggtctcaca ccctgcagtg gatgcatggc 300

tgcgagctgg ggcccacgg gcgcttctc cgcgggtatg aacagttcgc ctacgacggc 360
 aaggattatc tcacctgaa tgaggacctg cgctcctgga ccgcggtgga cacggcggct 420
 cagatctccg agcaaaagtc aatgatgcc tctgaggcgg agcaccagag agcctacctg 480

gaagacacat gcgtggagt gctccacaaa tacctggaga aggggaagga gacgtgctt 540
cacctggagc ccccaaagac acacgtgact caccaccca tctctgacca tgaggccacc 600
ctgaggtgct gggccctggg cttctaccct gcggagatca cactgacctg gcagcaggat 660
ggggagggcc ataccagga cacggagctc gtggagacca ggcctgcagg ggatggaacc 720

ttccagaagt gggcagctgt ggtggtgcct tctggagagg agcagagata cacgtgcat 780
gtgcagcatg aggggctacc cgagcccgct accctgagat ggaagccggc tccccagccc 840
accatcccca tcgtgggcat cattgctggc ctggttctcc ttggatctgt ggtctctgga 900
gctgtggttg ctgctgtgat atggaggaag aagagctcag gtgaaaagg agggagctac 960
tctaaggctg agtggagcga cagtccccag gggtctgagt ctcacagctt g 1011

<210> 32

<211> 800

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

cagggatccc agcagtgcaa acagacttcg gactacctgc gctatgaaga cacgttctt 60

ctggaagacc agccaacagg taagcggccc aattcattgt tggagggtga aagctgatta 120
gagaagagaa ttgaatacac aaaacctgta cgaatgttt taagttgctc agtttgagt 180
gtttgaatta cgtgttgttg cttccttttt tctgttttaa tttgcagaca ttctcctccc 240
ccccaaaaa aaagggtgat ttgtacaatt ttttatggtg ctgtgtccta aaggggatcc 300
tgaggggcgt tgccctgggt agttaaagtc ttatgtgtgc ataagttgct tattctttgt 360
ctacttccta ttgagatgt tagtagagaa ctgtcctggg tgaatcttc agtattgcag 420
ggcttggcaa cttgctgccc gacaaaatac atcagaattt ctccttaaga acaatatggg 480

atggattaaa aaatatatat atgggatgaa attgggggta cttcaatacc ttgcatgcca 540
cccaagcatt cttatcaca cagatgcatt ttaagtgtaa cagcaagcct aatggctact 600
cgattttctt tccttcagg tgagaatgag atggtgatca tgagacctgg aaacaaatat 660
gagtacaagt tcggctttga gcttcctcag gggtaaatat cagctaaatg catctttgaa 720
cttttctgtc taaaatatct tgccctcctt tgatcactta ctgttcttgg agagcgtttt 780
aaaattttca ttttcttgac 800

<210> 33

<211> 7133

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 33

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgctc ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggccaa ctccatcact	120
aggggttccct gcggccgcac gcgtgttcta ggggtggaac taagagaatg atgtacctag	180
agggcgctgg aagctctaaa gccctagcag ttactgcttt tactattagt ggtcgttttt	240
tttccccccc cgcccccca caaatcaaca gaacaaagaa aattacctaa acagcaagga	300
catagggagg aacttcttgg cacagaactt tccaaacact ttttctgaa gggatacaag	360
aagcaagaaa ggtactcttt cactaggacc ttctctgagc tgtcctcagg atgcttttgg	420
gactatTTTT cttaccaga gaatggagaa accctgcagg gaattccaa gctgtagtta	480
taaacagaag ttctccttct gctaggtagc attcaaagat cttaatcttc tgggtttccg	540
ttttctcgaa tgaaaaatgc aggtccgagc agttaactgg ctggggcacc attagcaagt	600
cacttagcat ctctggggcc agtctgcaaa gcgagggggc agccttaatg tgcctccagc	660
ctgaagtctt agaatgagcg cccggtgtcc caagctgggg cgcgacccc agatcgagg	720
gcgccgatgt acagacagca aactcaccca gtctagtga tgccttctta aacatcacga	780
gactctaaga aaaggaaact gaaaacggga aagtcctct ctctaacctg gcaatgcgtc	840
gctggcttgg agacaggiga cggtccttgc gggccttgtc ctgattggct gggcacgcgt	900
ttaatataag tggaggcgtc gcgctggcgg gcatctctga agctaagctt gtggacgata	960
tcgaattcgc acgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat	1020
tagttcatag cccatatatg gagtccgcg ttacataact tacggtaaat gggccgcctg	1080
gctgaccgcc caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa	1140
cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtaggacta ttacggtaa actgcccact	1200
tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacgta	1260
aatggccgcg ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt	1320
acatctacgt attagtcacg gctattacca tgggtcgagg tgagccccac gttctgcttc	1380
acttccccca tctccccccc cteccacccc ccaattttgt attttttat tttttaatta	1440
ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg	1500
cgaggggcgg ggcggggcga ggcggagagg tgcggcgga gccaatcaga gcggcgcgct	1560
ccgaaagttt ctttttatgg cgaggcggcg gcggcgggcg ccctataaaa agcgaagcgc	1620

gcggcgggcg ggagtcgctg cgttgccttc gccccgtgcc ccgctccgcg cgcctcgcg 1680

ccgccgccc cggtctgac tgaccgcgtt actccacag gtgagcgggc gggacggccc 1740

ttctctccg ggctgtaatt agcgttgggt ttaatgacgg ctcttttctt ttctgtggt 1800

gcgtgaaagc cttaaagggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc ggctcggggg 1860

gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgctgcgg cccgcgtgc ccggcggtg 1920

tgagcgtgc gggcgcgcg cggggctttg tgcgtccgc gtgtgcgga ggggagcgcg 1980

gccggggcg gtgccccgc gtgcggggg gctgcgagg gaacaaaggc tgcgtgcggg 2040

gtgtgtgcgt gggggggtga gcagggggtg tggcgcggc ggtcgggctg taaccccc 2100

ctgcacccc ctccccagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtgcg 2160

gggcgtggcg cggggtcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggaggtggg ggtgccgggc 2220

ggggcggggc cgcctcggc cggggagggc tgggggagg ggcgcggcg ccccgagcg 2280

ccggcggtg tcgagcgcg gcgagccga gccattgcct tttatggtaa tcgtgcgaga 2340

gggcgcaggg acttctttg tcccaaatct ggcgagccg aaatctggga ggcgcccg 2400

cacccctct agcggcgcg ggcgaagcg tgcggcgcg gcaggaagga aatggcggg 2460

gagggccttc gtgcgtgcc gcgcccggt ccccttctcc atctccagc tcgggctgc 2520

cgcagggga cggtgcctt cgggggggac ggggcaggc ggggttcggc ttctggcgtg 2580

tgaccggcg ctctagagc tctgtaacc atgttcagc cttcttctt ttcctacagg 2640

gggatccgt tttctgcag aattcgccct tgacgtgcc accatgagga ttttgcgtg 2700

ctttatattc atgacctact ggcatctgt gaacgcatct actgtcacg ttcceaagga 2760

cctatatgtg gtagagtatg gtagcaatat gacaattgaa tgcaaattcc cagtagaaaa 2820

acaattagac ctggctgac taattgtcta ttgggaaatg gaggataaga acattattca 2880

atttgtgcat ggagaggaag acctgaaggt tcagcatagt agctacagac agaggccccg 2940

gctgttgaag gaccagctct ccctgggaaa tgctgcactt cagatcacag atgtgaaatt 3000

gcaggatgca ggggtgtacc gctgcatgat cagctatggt ggtgccgact acaagcgaat 3060

tacttgaaa gtcaatgccc catacaaaa aatcaacaa agaattttgg ttgtggatcc 3120

agtcacctct gaacatgaac tgacatgtca ggctgaggc taccceaagg ccgaagtc 3180

ctggacaagc agtgaccatc aagtcctgag tgtaagacc accaccacca attccaagag 3240

agaggagaaa cttttcaatg tgaccagcac actgagaatc aacacaaca ctaatgagat 3300

tttctactgc acttttagga gattagatcc taggaaaac catacagctg aattggtcat 3360

cccagaacta ccctcggcac atccctccaaa tgaaaggact cacttggtaa ttctgggagc 3420

catcttatta tgccttggtg tagcactgac attcatcttc cgtttaagaa aaggggagaat 3480

gatggatgtg aaaaaatgtg gcatccaaga tacaactca aagaagcaaa gtgatacaca 3540

tttggaggag acgtaaccgc tgatcagcct cgactgtgcc ttctagtgc cagccatctg 3600

ttgtttgcc cccccgtg ctttcttga ccttgaagg tgccactccc actgtccttt 3660

cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcat gtctgagtag gtgtcattct attctggggg 3720

gtgggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg catgctgggg 3780

atgcggtggg ctctatgggt cgaccagcg tgagtctctc ctaccctccc gctctggtcc 3840

ttctctccc gctctgacc ctctgtggc ctcgtgtgc tctctgctc cgtgacttcc 3900

cttctccaag ttctccttgg tggcccgccg tggggctagt ccagggtgg atctcgggga 3960

agcggcgggg tggcctggga gtggggaagg ggggtgcgcac ccgggacgcg cgctacttgc 4020

ccctttcggc ggggagcagg ggagacctt ggctacggc gacgggaggg tcgggacaaa 4080

gtttaggcg tcgataagcg tcagagcgcc gaggttggg gaggtttct cttccgctct 4140

ttcgggggc ctctggctcc ccagcgcag ctggagtggg ggacgggtag gctcgtccca 4200

aaggcgcggc gctgaggttt gtgaacgcgt ggaggggcgc ttgggtctg ggggaggcgt 4260

cgccgggta agcctgtctg ctgcggctct gttccctta gactggagag ctgtggactt 4320

cgtctaggcg cccgctaagt tcgcatgtcc tagcacctct gggctctatg ggggccacac 4380

cgtggggagg aaacagcacg cgacgtttgt agaatgcttg gctgtgatac aaagcggttt 4440

cgaataatta acttatttgt tcccatcaca tgtcactttt aaaaaattat aagaactacc 4500

cgttattgac atctttctgt gtgccaagga ctttatgtgc tttgcgtcat ttaattttga 4560

aaacagtat cttccgcat agataactac tatggttacc ttctggtaac cacgtgcgga 4620

ccgaggctgc agcgtctcc tccctaggaa ccctagtga tggagtggc cactccctct 4680

ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgcg cccgggcttt 4740

gccccggcg cctcagttag cgagcgagcg cgcagctgcc tgcagggcg cctgatcgcg 4800

tatctctcc ttacgatct gtgcggtatt tcacaccgca tacgtcaaag caaccatagt 4860

acgcgcctg tagcggcgca ttaagcgcg cggtgtgtt ggttacgcgc agcgtgaccg 4920

ctacacttgc cagcgcccta gcgccgctc ctttcgttt cttcccttcc tttctcgcca 4980

cgttcggcg ctttcccgct caagctctaa atcgggggct ccttttaggg ttccgattta 5040

gtgctttacg gcacctgac cccaaaaaac ttgatttggg tgatggttca cgtagtgggc 5100

catcgccctg atagacggtt ttctgacctt tgacgttga gtccacttc tttaatagt 5160

gactcttgtt ccaaactgga acaactca accctatctc gggctattct ttgtattat 5220

aagggatttt gccgatttcg gcctatttgt taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta 5280
acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta caattttatg gtgcactctc agtacaatct 5340
gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc gacacccgcc aacacccgct gacgcgccct 5400
gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct 5460

gcatgtgtca gaggttttca cgtcatcac cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga 5520
tacgcctatt ttataggtt aatgtcatga acaataaaac tgtctgtta cataaacagt 5580
aatacaaggg gtgttatgag ccatattcaa cgggaaacgt cgaggccgcg attaaattcc 5640
aacatggatg ctgatttata tgggtataaa tgggctcgcg ataatgtcgg gcaatcaggt 5700
gcgacaatct atcgcttgta tgggaagccc gatgcgccag agttgtttct gaaacatggc 5760
aaaggtagcg ttgccaatga tgttacagat gagatggta gactaaactg gctgacggaa 5820
tttatgcctc ttccgaccat caagcatttt atccgtactc ctgatgatgc atggttactc 5880

accactgcga tccccgaaa aacagcattc caggtattag aagaatatcc tgattcaggt 5940
gaaaatattg ttgatgcgt ggcagtgttc ctgcgccggt tgcattcgat tcctgtttgt 6000
aattgtcctt ttaacagcga tcgcgtattt cgtctcgtc aggcgcaatc acgaatgaat 6060
aacggtttgg ttgatgcgag tgattttgat gacgagcgta atggctggcc tgttgaacaa 6120
gtctggaaaag aaatgcataa acttttgcca ttctaccgg attcagtcgt cactcatggt 6180
gatttctcac ttgataacct tatttttgac gaggggaaat taataggttg tattgatgtt 6240
ggacgagtcg gaatcgaga ccgataccag gatcttgcca tcctatggaa ctgcctcgggt 6300

gagttttctc cttcattaca gaaacggctt ttcaaaaat atggtattga taatcctgat 6360
atgaataaat tgcagtttca ttgatgtc ctgatgtttt tctaattctca tgacaaaat 6420
cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 6480
ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct 6540
accagcgggtg gtttggttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggttaactgg 6600
cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt cttcttagtg tagccgtagt taggccacca 6660
cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc 6720

tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat agttaccgga 6780
taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttctgtcaca cagcccagct tggagcgaac 6840
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga 6900
aggagaaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 6960
ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttcc gccacctctg 7020
acttgagcgt cgatttttgt gatgtctgtc aggggggcgg agcctatgga aaaacgccag 7080

caacgcggcc tttttacggt tcctggccct ttgctggcct tttgtccaca tgt 7133

<210> 34

<211> 7763

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthesized

<400> 34

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gaggggccaa ctccatcact 120
aggggttctt gcggccgcac gcgtaccgct ctgagaccag aaacgtccac acccgccctc 180
cgatggcctg tcgccctggc taggttttag ggtcagtggg atcctccttc cactggaccc 240
gggagaagac gctcaacagc cccctccttc cctccttcc tctccttctt ctcttcccc 300
cctccttgcg ccgtccaga gcgcaacaac cattttccca gccaggagca caccgtgtcc 360

acgcgccaca gcgatctcac tgattggctg ggctcctggg aaacaaggac cgggcagcca 420
atgggaggga tgtgcacgag ggcagcacga gcctccgggc cagcgctcgc gtggctcttc 480
tggcccgggc tactatatag agacgtttcc gcctcctgct tgaaactaac cctctttttt 540
ctccaaagga gtgcttggg agatcggatc ttttctccag caattggggg aaagaaggct 600
ttttctctga attagcttag tgtaaccagc ggcgtatatt ttttaggcgc cttttcgaaa 660
acctagtagt taatattcat ttgtttaaat cttattttat ttttaagctc aaactgctta 720
agaatacctt aattccttaa agtgaaataa ttttttgcaa aggggtttcc tcgatttga 780

gctttttttt tcttcaccg tcatttctaa ctcttaaaac caactcagtt ccatcatggt 840
gatgttcaag aagatcaagt cttttgaggt ggtctttaac gacctgaaa aggtgtacgg 900
cagtggcgag aaggtggctg gccgggtgat agtggagggtg tgtgaagctt gtggacgata 960
tcgaattcgc acgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcac 1020
tagttcatag ccataatag gagttccgcg ttacataact tacggtaaat ggccccctg 1080
gctgaccgcc caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa 1140
cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat ggggtggacta tttacggtaa actgcccact 1200

tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta 1260
aatggcccgc ctggcattat gccagtaga tgaccttatg ggactttcct acttggcagt 1320
acatctacgt attagtcatc gctattacca tgggtcgagg tgagccccac gttctgcttc 1380
actctcccca tctccccccc ctccccacc ccaattttgt attttttat tttttaatta 1440

ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg	1500
cgaggggcgg ggcggggcga ggcggagagg tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgct	1560
ccgaaagttt ccttttatgg cgaggcggcg gcggcggcgg ccctataaaa agcgaagcgc	1620
gcggcgggcg ggagtgcgtg cgttgccttc gccccgtgcc ccgctccgcg ccgcctcgcg	1680
ccgccccccc cggtctgac tgaccgcgtt actccacag gtgagcgggc gggacggccc	1740
ttctctccg ggctgtaatt agcgttggg ttaatgacgg ctctttctt ttctgtggt	1800
gcgtgaaagc cttaaagggc tccgggaggg ccctttgtgc gggggggagc ggctcggggg	1860
gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg cccgcgtgc ccggcggctg	1920
tgagcgtgc gggcgcggcg cggggctttg tgcgtccgc gtgtgcgca ggggagcgcg	1980
gccgggggcg gtccccgcg gtgcgggggg gctgcgagg gaacaaaggc tgcgtgcggg	2040
gtgtgtgcgt gggggggtga gcagggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccc	2100
ctgcaccccc ctccccagt tgcgtgacac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtgcg	2160
gggcgtggcg cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc	2220
ggggcggggc cgctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcg	2280
ccggcggctg tcgagggcgc gcgagccgca gccattgcct tttatggtaa tcgtgcgaga	2340
gggcgcaggg acttctttg tcccaaatct ggcgagccg aaatctggga ggcgccgcg	2400
cacccctct agcgggcgcg ggcgaagcgg tgcggcgcg gcaggaagga aatgggcggg	2460
gagggccttc gtgcgtgcc gcgccccgt ccccttctcc atctccagc tcgggctgc	2520
cgcaggggga cggtgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg	2580
tgaccggcgg ctctagagcc tctgtaacc atgttcatgc cttcttctt ttctacagg	2640
ggggatccgt ttatctgcag aattcgccct tgacgtgcc accatgtctc gctccgtggc	2700
cttagctgtg ctgcgtac tctcttttc tggcctggag gctgtcatgg cccccgaac	2760
cctcttctg ggtggaggcg gttcaggcgg aggtggctct ggcggtggcg gatcgatcca	2820
gcgtactcca aagattcagg ttactcacg tcatccagca gagaatggaa agtcaaattt	2880
cttgaattgc taigtgtctg ggtttcatcc atccgacatt gaagttgact tactgaagaa	2940
tggagagaga attgaaaaa tggagcattc agacttgtct ttcagcaagg actggtcttt	3000
ctatctctt tactacactg aattcacccc cactgaaaaa gatgagtatg cctgccgtgt	3060
gaacatgtg actttgtcac agcccaagat agttaagtgg gatcgagaca tgggtggtgg	3120
tggttctggt ggtggtggt ctggcggcgg cggtccggg ggtggtggat ccggctccca	3180
ctccttgaag tatttcaca ctccgtgtc ccggcccggc cgcggggagc cccgttcat	3240

ctctgtgggc tacgtggacg acaccagtt cgtgcgttc gacaacgacg ccgcgagtc 3300

gaggatggtg ccgcgggcgc cgtggatgga gcaggagggg tcagagtatt gggaccggga 3360

gacacggagc gccagggaca ccgcacagat ttccgagtg aatctgcgga cgtgcgcgg 3420

ctactacaat cagagcgagg ccgggtctca caccctgcag tggatgcatg gctgcgagct 3480

ggggcccgac gggcgttcc tccgcggtga tgaacagttc gcctacgacg gcaaggatta 3540

tctcacctg aatgaggacc tgcgtcctg gaccgcggtg gacacggcgg ctcagatctc 3600

cgagcaaaag tcaaatgatg cctctgaggc ggagcaccag agagcctacc tggaaagacac 3660

atgcgtggag tggctccaca aatactgga gaagggaag gagacgctgc ttcacctgga 3720

gccccaaag acacacgtga ctcaccaccc catctctgac catgaggcca ccctgaggtg 3780

ctgggacctg ggcttctacc ctgcggagat cacactgacc tggcagcagg atggggaggg 3840

ccataccag gacacggagc tcgtggagac caggcctgca ggggatggaa ccttcagaa 3900

gtgggcagct gtggtgtgc cttctggaga ggagcagaga tacacgtgcc atgtgcagca 3960

tgaggggcta cccgagcccg tcacctgag atggaagccg gcttccagc ccaccatccc 4020

catcgtgggc atcattgtg gcctggttct ccttggatct gtggtctctg gagctgtggt 4080

tgctgtgtg atatggagga agaagagctc aggtggaaaa ggaggagct actctaagc 4140

tgagtggagc gacagtgcc aggggtctga gtctcacagc ttgtaaccgc tgatcagcct 4200

cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgcc ctcctccgtg ccttccttga 4260

ccctggaagg tgccactccc actgtcctt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt 4320

gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg 4380

attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcggtggg ctctatgggt cgaccaggga 4440

tcccagcagt gcaaacagac ttcggagtac ctgcgctatg aagacacgt tcttctggaa 4500

gaccagccaa caggtaagcg gccaattca ttgttggagg gtgaaagctg attagagaag 4560

agaattgaat acacaaaacc tgtacgaaat gttttaagtt gctcagttg agtggtttga 4620

attacgtgtt gttgcttct ttttctgtt ttaatttga gacattctcc tccccccca 4680

aaaaaaaggg tgatttgtac aatttttat ggtgctgtgt cctaaagggg atcctgaggg 4740

gcgttgctc gggtagttaa agtcttatgt gtgcataagt tgcttattct ttgtctactt 4800

cctattttag atgttagtag agaactgtcc tgggtgaatc tttcagtatt gcagggttgg 4860

gcaacttgct gcccacaaa atacatcaga atttctcttt aagaacaata tgggatggat 4920

taaaaaatat atatatggga tgaaattggg ggtacttcaa taccttgcac gccaccaag 4980

cattccttat cacacagatg cttttaagt gtaacagcaa gcctaattggc tactcgattt 5040
tctttccctt caggtgagaa tgagatggtg atcatgagac ctggaaacaa atatgagtac 5100
aagttcggct ttgagcttcc tcaggggtaa atatcagcta aatgcatctt tgaacttttc 5160
tgtctaaaat atcttgcctt cttttgatca cttactgttc ttggagagcg ttttaaaatt 5220
ttcattttct tgacggtaac cacgtgcgga ccgaggtctc agcgtcgtcc tcctaggaa 5280
cccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccggg 5340
cgaccaaagg tcgcccgaag cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag cgagcgagcg 5400

cgcagctgcc tgcagggcg cctgatgcgg tattttctcc ttacgcattt gtgcggtatt 5460
tcacaccgca tacgtcaaag caaccatagt acgcgcctg tagcggcgca ttaagcgcg 5520
cgggtgtggt ggttacgcgc agcgtgaccg ctacacttgc cagcgcccta gcgccgctc 5580
ctttcgcttt cttcccttcc tttctcgcca cgttcgcccgt ctttccccgt caagctctaa 5640
atcgggggct ccttttaggg ttccgattta gtgctttacg gcacctcgac ccaaaaaaac 5700
ttgatttggg tgatggttca cgtagtgggc catcgccctg atagacggtt tttcgccctt 5760
tgacgttggg gtccacgttc tttaatagt gactcttgtt ccaaactgga acaacactca 5820

accctatctc gggctattct ttgatttat aagggtttt gccgatttcg gcctatttgt 5880
taaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgttta 5940
caattttatg gtgcactctc agtacaatct gctctgatgc cgcatagtta agccagcccc 6000
gacacccgcc aacacccgct gacgcgcctt gacgggcttg tctgctccg gcatccgctt 6060
acagacaagc tgtgaccgtc tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac 6120
cgaaacgcgc gagacgaaag ggcctcgtga tacgcctatt tttataggtt aatgtcatga 6180
acaataaaac tgtctgctta cataaacagt aatacaaggg gtgttatgag ccatattcaa 6240

cgggaaacgt cgaggccgag attaaattcc aacatggatg ctgatttata tgggtataaa 6300
tgggctcgcg ataattgtcg gcaatcaggt gcgacaatct atcgcttgta tgggaagccc 6360
gatgcgccag agttgtttct gaaacatggc aaaggtagcg ttgccaatga ttttacagat 6420
gagatggtca gactaaactg gctgacggaa tttatgcctc ttcgacat caagcatttt 6480
atccgtactc ctgatgatgc atggttactc accactgcga tccccgaaa aacagcattc 6540
caggtattag aagaatatcc tgattcaggt gaaaatattg ttgatgcgtt ggcagtgttc 6600
ctgcgccggt tgcatcgtat tcctgtttgt aattgtcctt ttaacagcga tcgcgtattt 6660

cgtctcgtc aggcgcaatc acgaatgaat aacggtttgg ttgatgcgag tgattttgat 6720
gacgagcgtg atggctggcc tgttgaacaa gtctggaaag aaatgcataa acttttgcca 6780
ttctcaccgg attcagtcgt cactcatggt gattttctac ttgataacct tatttttgac 6840

gaggggaaat taataggttg tattgatgtt ggacgagtcg gaatcgaga cggataccag 6900
gatcttgcca tcctatggaa ctgcctcggg gagttttctc cttcattaca gaaacggctt 6960
tttcaaaaat atggtattga taatcctgat atgaataaat tgcagtttca tttgatgctc 7020
gatgagtttt tctaattctca tgaccaaaaat cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc 7080

gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttctc tgcgcgtaat 7140
ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct accagcgggtg gtttgtttgc cggatcaaga 7200
gctaccaact ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt 7260
ccttctagt tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata 7320
cctcgtcttg ctaatcctgt taccagtggc tgcgtccagt ggcgataagt cgtgtcttac 7380
cgggttggac tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg 7440
ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg 7500

tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggttaag 7560
cggcaggggc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaaacg cctggtatct 7620
ttatagtcct gtcgggttct gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc 7680
agggggggcg agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcttggcctt 7740
ttgctggcct tttgctcaca tgt 7763

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

tataagtgga ggcgtcgcgc 20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

gagtagcgcg agcacagcta 20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37
actggacgcg tcgcgctggc 20

<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 38
aagtggaggc gtcgcgctgg 20

<210> 39
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 39

ggccacggag cgagacatct 20

<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 40
gcccgaatgc tgcagcttc 20

<210> 41
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 41
ctcgcgtac tctctcttc 20

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 42
tcctgaagct gacagcatc 20

<210> 43

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	43	
ttcctgaagc tgacagcatt		20
<210>	44	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	44	
actctctctt tctggcctgg		20
<210>	45	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	45	
gaagcgtgtc ttcatagcgc agg		23
<210>	46	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	46	
ttactcgtgt caaagccgtt agg		23
<210>	47	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	47	
tgtcaaagcc gttaggatcc tgg		23
<210>	48	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	48	

gccgttagga tcctggcttg cgg	23
<210> 49	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 49	
gcggagtggc taaagtgctt tgg	23
<210> 50	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 50	
tccgcaagcc aggatcctaa cgg	23
<210> 51	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 51	
gttcggcttt gagcttcctc agg	23
<210> 52	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 52	
gagatggtga tcatgagacc tgg	23
<210> 53	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 53	
ttgtactcat attgtttcc agg	23
<210> 54	
<211> 23	

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 54
 aacaaatatg agtacaagtt cgg 23
 <210> 55
 <211> 1500
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthesized
 <400> 55
 atgtctcgct ccgtggcctt agctgtgctc gcgtactct ctctttctgg cctggaggct 60
 gtcatggcgc cccgaacctt ctctctgggt ggaggcgggt caggcggagg tggctctggc 120
 ggtggcggat cgatccagcg tactccaaag attcaggttt actcacgtca tccagcagag 180

 aatggaaagt caaatctctt gaattgctat gtgtctgggt ttcattccatc cgacattgaa 240
 gtgacttac tgaagaatgg agagagaatt gaaaaagtgg agcattcaga ctgtctttc 300
 agcaaggact ggtctttcta tctctgttac tacactgaat tcacccccac tgaanaagat 360
 gagtatgctt gccgtgtgaa ccatgtgact ttgtcacagc ccaagatagt taagtgggat 420
 cgagacatgg gtggtgggtg ttctgggtgt gggtgttctg gcggcggcgg ctccggtggt 480
 ggtggatccg gctccactc cttgaagtat ttccacactt ccgtgtcccg gcccggccgc 540
 ggggagcccc gcttcatctc tgtgggctac gtggacgaca ccagttcgt gcgcttcgac 600

 aacgacgccg cgagtccgag gatggtgccg cgggcgccgt ggatggagca ggaggggtca 660
 gagtattggg accgggagac acggagcgcc agggacaccg cacagatttt ccgagtgaat 720
 ctgcggacgc tgcgcggcta ctacaatcag agcgaggccg ggtctcacac cctgcagtgg 780
 atgcatggct gcgagctggg gcccagcggg cgcttctctc gcgggtatga acagtctgcc 840
 tacgacggca aggattatct cacctgaat gaggacctgc gctcctggac cgcggtggac 900
 acggcggctc agatctccga gcaaaagtca aatgatgcct ctgaggcgga gcaccagaga 960
 gcctacctgg aagacacatg cgtggagtgg ctccacaaat acctggagaa ggggaaggag 1020

 acgtgcttc acctggagcc cccaaagaca cacgtgactc accaccccat ctctgacat 1080
 gaggccacc ttaggtgctg ggccctgggc ttctacctg cgagatcac actgacctgg 1140
 cagcaggatg gggagggcca taccaggac acggagctcg tggagaccag gcctgcaggg 1200
 gatggaacct tccagaagtg ggcagctgtg gtggtgcctt ctggagagga gcagagatac 1260
 acgtgccatg tgcagcatga ggggctacc gagcccgta ccctgagatg gaagccggct 1320

tcccagccca ccatcccat cgtgggcac attgctggcc tggttctcct tggatctgtg	1380
gtctctggag ctgtggttgc tgctgtgata tggaggaaga agagctcagg tggaaaagga	1440
gggagctact ctaaggetga gtggagcgac agtggccagg ggtctgagtc tcacagcttg	1500
<210> 56	
<211> 7460	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthesized	
<400> 56	
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gaggggccaa ctccatcact	120
aggggttctt gcgcccgcac gcgtaccgct ctgagaccag aaacgtccac acccgccctc	180
cgatggcctg tcgccctggc taggttttag ggtcagtggg atcctccttc cactggaccc	240
gggagaagac gctcaacagc cccctccttc cctccttcc tctccttct ctccttcccc	300
cctccctgcg ccgctccaga gcgcaacaac cattttccca gccaggagca caccgtgtcc	360
acgcgccaca gcgactcac tgattggtcg ggctcctggt aaacaaggac cgggcagcca	420
atgggaggga tgtgcacgag ggcagcacga gcctccgggc cagcgctcgc gtggctcttc	480
tggcccgggc tactatatag agacgtttcc gcctcctgct tgaaactaac cctcttttt	540
ctccaaagga gtgcttgtgg agatcggatc ttttctccag caattggggg aaagaaggct	600
ttttctctga attagcttag tgtaaccagc ggcttatatt ttttaggcgc cttttcgaaa	660
acctagtagt taatattcat ttgtttaaat cttattttat ttttaagctc aaactgctta	720
agaatacctt aattccttaa agtgaataaa ttttttgcaa aggggtttcc tcgatttga	780
gtttttttt tcttccaccg tcatttctaa ctcttaaac caactcagtt ccatcatggt	840
gatgttcaag aagatcaagt cttttgaggt ggtctttaac gacctgaaa aggtgtacgg	900
cagtggcgag aaggtggctg gccgggtgat agtggagggtg tgtgaagctt gtggacgata	960
tcgaattcgc acgacattga ttattgacta gttattaata gtaatcaatt acggggtcat	1020
tagttcatag cccatatatg gatttccgcg ttacataact tacggtaaat ggccccctg	1080
gtgaccgcc caacgacccc cgccattga cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa	1140
cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtgacta tttacggtaa actgcccact	1200
tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta	1260
aatggccgc ctggcattat gccagtaga tgacctatg ggactttcct acttggcagt	1320

acatctacgt attagtcatc gctattacca tgggtcgagg tgagccccac gtctctgttc 1380
 actctcccca tctcccccc cteccaccc ccaattttgt atttatttat tttttaatta 1440
 ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg ggggcgcgcg ccaggcgggg cggggcgggg 1500
 cgaggggcgg ggcggggcga ggcggagagg tgcggcggca gccaatcaga gcggcgcgct 1560

 ccgaaagttt ctttttatgg cgaggcggcg gcggcggcgg ccctataaaa agcgaagcgc 1620
 gcggcgggcg ggagtcgctg cgttgccttc gccccgtgcc ccgctccgcg ccgcctcgcg 1680
 ccgccgcgcc cggctctgac tgaccgcgtt actccacag tgagcgggc gggacggccc 1740
 ttctctccg ggcgtgaatt agcgtttggt ttaatgacgg ctgctttctt ttctgtggct 1800
 gcgtgaaagc cttaaagggc tccgggaggg ccttttgtgc gggggggagc ggctcggggg 1860
 gtgcgtgcgt gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg cccgcgtgc ccggcggctg 1920
 tgagcgtgc gggcgcggcg cggggctttg tgcgtccgc gtgtgcgcga ggggagcgcg 1980

 gccgggggcg gtccccgcg gtgcgggggg gctgcgagg gaacaaaggc tgcgtgcggg 2040
 gtgtgtgcgt gggggggtga gcagggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccc 2100
 ctgcaccccc ctccccaggt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtgcg 2160
 gggcgtggcg cggggctcgc cgtgccgggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccgggc 2220
 ggggcggggc cgcctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcg 2280
 ccggcggctc tagagcctt gctaaccatg ttcatgcctt cttcttttct ctacaggggg 2340
 gatccgttta tctgcagaat tcgcccttga cgtcgccacc atgtctcgct ccgtggcctt 2400

 agctgtgtc gcgctaact ctctttctgg cctggaggct gtcattggcg cccgaaccct 2460
 ctctctgggt ggaggcggtt caggcggagg tggtcttggc ggtggcggat cgatccagcg 2520
 tactccaaag attcaggtt actcacgtca tccagcagag aatggaaagt caaatctct 2580
 gaattgctat gtgtctgggt ttcatccatc cgacattgaa gttgacttac tgaagaatgg 2640
 agagagaatt gaaaaagtgg agcattcaga ctgtctttc agcaaggact ggtctttcta 2700
 tctctgtac tacactgaat tcacccccac tgaaaaagat gattatgcct gccgtgtgaa 2760
 ccatgtgact ttgtcacagc ccaagatagt taagtgggat cgagacatgg gtggtggtgg 2820

 ttctggtggt ggtggttctg gcggcggcgg ctccggtggt ggtggatccg gctccactc 2880
 ctgaaagtat ttccacactt ccgtgtcccg gcccgccgc ggggagcccc gcttcatctc 2940
 tgtgggctac gtggacgaca ccagttcgt gcgcttcgac aacgacgcc cgagtcgag 3000
 gatggtgccg cgggcgccgt ggatggagca ggagggtca gattattggg accgggagac 3060
 acggagcgcc agggacaccg cacagatttt ccgagtgaat ctgcggacgc tgcgcggcta 3120
 ctacaatcag agcaggccg ggtctcacac cctgcagtgg atgcatggct gcgagctggg 3180

gccccgacggg cgcttcctcc gcgggtatga acagttcgcc tacgacggca aggattatct 3240

cacctgaat gaggacctgc gctcctggac cgcggtggac acggcggctc agatctccga 3300

gcaaaagtca aatgatgcct ctgaggcgga gcaccagaga gcctacctgg aagacacatg 3360

cgtggagtgg ctccacaaat acctggagaa ggggaaggag acgctgcttc acctggagcc 3420

cccaaagaca cactgtactc accaccccat ctctgacatg gaggccaccc tgaggtgctg 3480

ggccctgggc ttctacctg cgagatcac actgacctgg cagcaggatg gggagggcca 3540

taccaggac acggagctcg tggagaccag gcctgcaggg gatggaacct tccagaagtg 3600

ggcagctgtg gtggtgcctt ctggagagga gcagagatac acgtgccatg tgcagcatga 3660

ggggctaccc gagcccgta ccctgagatg gaagccggct tcccagccca ccatcccat 3720

cgtgggcac attgctggcc tggttctcct tggatctgtg gtctctggag ctgtggttgc 3780

tgctgtgata tggaggaaga agagctcagg tggaaaagga gggagctact ctaaggctga 3840

gtggagcgac agtgcacagg ggtctgagtc tcacagcttg taaccgctga tcagcctcga 3900

ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgccctc ccccgctcct tccttgacct 3960

tggaaggctg cactcccat gtcttttctc aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 4020

tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg gggtagggca ggacagcaag ggggaggatt 4080

gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtagggctc tatgggtcga ccagggatcc 4140

cagcagtga aacagacttc ggagtacctg cgctatgaag acacgcttct tctggaagac 4200

cagccaacag gtaagcggcc caattcattg ttggagggtg aaagctgatt agagaagaga 4260

attgaataca caaaacctgt acgaaatgtt ttaagttgct cagtttgagt ggtttgaatt 4320

acgtgttgtt gcttcctttt ttctgtttta atttgcagac attctcctcc cccccaaaa 4380

aaaagggtga ttgtacaat tttttatggt gctgtgtcct aaaggggatc ctgaggggcg 4440

ttgcctcggg tagttaaagt cttatgtgtg cataagttgc ttattctttg tctacttct 4500

atttgagatg ttagtagaga actgtcctgg gtgaatcttt cagtattgca gggcttggca 4560

acttgcctgc cgacaaaata catcagaatt tctctttaag aacaatatgg gatggattaa 4620

aaaatatata tatgggatga aattgggggt acttcaatac cttgcatgcc acccaagcat 4680

tccttatcac acagatgcat ttaagtgt acagcaagcc taatggctac tcgattttct 4740

ttcccttcag gtgagaatga gatggtgatc atgagacctg gaaacaaata tgagtacaag 4800

ttcggtttg agcttctca ggggtaaaata tcagctaaat gcatctttga acttttctgt 4860

ctaaaatata ttgccctcct ttgatcactt actgttcttg gagagcgttt taaaattttc 4920

attttcttga cggttaaccac gtgcggaccg aggcctgcagc gtcgtcctcc ctaggaaccc 4980
 ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgtctcgt cgctcactga ggccgggcga 5040
 ccaaaggctg cccgacgccc gggctttgcc cggcgccgct cagtgcgcga gcgagcgcgc 5100
 agctgcctgc agggcgccct gatgcggtat tttctcctta cgcatctgtg cggatattca 5160
 caccgcatac gtcaaagcaa ccatagtagc cgcctcttag cggcgcatta agcgcggcgg 5220
 gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag cgccttagcg cccgctcctt 5280
 tcgctttctt cctttccttt ctgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa gctctaaatc 5340

 gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaacttg 5400
 atttgggtga tggttcacgt agtgggcat cgcctgata gacggttttt cgccctttga 5460
 cgttgagtc cactttcttt aatagtggac tcttgttcca aactggaaca aactcaacc 5520
 ctatctcggg ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa 5580
 aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttta caaatatta acgtttacaa 5640
 ttttatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccg atagttaagc cagccccgac 5700
 acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggtttgtct gctcccgga tccgcttaca 5760

 gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag gttttaccg tcataccga 5820
 aacgcgcgag acgaaagggc ctctgatac gcctattttt ataggttaat gtcataaaca 5880
 ataaaactgt ctgcttacat aaacagtaat acaaggggtg ttatgagcca tattcaacgg 5940
 gaaacgtcga ggccgcgatt aaattccaac atggatgctg atttatatgg gtataaatgg 6000
 gctcgcgata atgtcgggca atcaggtgcg acaatctatc gcttgatagg gaagcccgat 6060
 gcgccagagt tgtttctgaa acatggcaaa ggtagcgttg ccaatgatgt tacagatgag 6120
 atggtcagac taaactggct gacgaattt atgcctcttc cgaccatcaa gcattttatc 6180

 cgtaactctg atgatgcatg gttactcacc actgcgatcc ccgaaaaac agcattccag 6240
 gtattagaag aatatacctga ttcaggtgaa aatattgttg atgcgctggc agtgttcctg 6300
 cgccggttgc attcgattcc tgtttgtaat tgctctttta acagcgatcg cgtatttcgt 6360
 ctgcctcagg cgcaatcacg aatgaataac ggtttggttg atgcgagtga tttgatgac 6420
 gagcgtaatg gctggcctgt tgaacaagtc tggaaagaaa tgcataaact tttgccattc 6480
 tcaccggatt cagtcgtcac tcatggtgat tttcacttg ataaccttat tttgacgag 6540
 gggaattaa taggttgtat tgatgttga cagtcggaa tcgcagaccg ataccaggat 6600

 cttgccatcc tatggaactg cctcggtagg ttttctcctt cattacagaa acggcttttt 6660
 caaaaatatg gtattgataa tcttgatatg aataaattgc agtttcattt gatgctcgat 6720
 gaggttttct aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc 6780

agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg 6840
ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcgggtggtt tgtttgccgg atcaagagct 6900
accaactctt tttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct 6960
tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct 7020

cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg 7080
gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgagcagg tcgggctgaa cgggggggttc 7140
gtgcacacag ccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga 7200
gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg gaaaaaggcg gacaggtatc cggtaaagcg 7260
cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta 7320
tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg 7380
ggggcggagc ctatgaaaaa acgccagcaa cgggcctttt ttacggttcc tggccttttg 7440

ctggcctttt gctcacatgt 7460

<210> 57
<211> 706
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthesized
<400> 57

ggagtcgctg cgttgccttc gccccgtgcc ccgctccgcg ccgcctcgcg ccgcccgccc 60
cggtctgac tgaccgcgtt actccacag gtgagcgggc gggacggccc ttctctccg 120
ggctgtaatt agcgtttggt ttaatgacgg ctcgtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc 180
cttaaagggc tccgggaggg ccccttgtgc gggggggagc ggctcggggg gtgcgtgcgt 240
gtgtgtgtgc gtggggagcg ccgcgtgcgg ccgcgctgc ccggcggctg tgagcgtgc 300

gggcgcggcg cggggctttg tgcgtccgc gtgtgcgcga ggggagcgcg gccggggcg 360
gtgccccgcg gtgcggggg gctgcgagg gaacaaagc tgctgcggg gtgtgtcgt 420
gggggggtga gcaggggtg tgggcgcggc ggtcgggctg taaccccc ctgcacccc 480
ctccccagt tgctgagcac ggcccggctt cgggtgcggg gctccgtgc gggcgtggcg 540
cggggctgc cgtgccggc ggggggtggc ggcaggtggg ggtgccggc ggggcggggc 600
cgctcgggc cggggagggc tcgggggagg ggcgcggcgg ccccgagcg ccggcggctc 660
tagagcctct gctaaccatg ttcatgcctt cttcttttct ctacag 706