



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년11월13일

(11) 등록번호 10-2730214

(24) 등록일자 2024년11월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/90* (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)  
*A61K 48/00* (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)  
*C12N 9/22* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 15/90* (2013.01)  
*A61K 35/17* (2023.05)
- (21) 출원번호 10-2020-7016374
- (22) 출원일자(국제) 2018년11월09일  
 심사청구일자 2021년10월21일
- (85) 번역문제출일자 2020년06월08일
- (65) 공개번호 10-2020-0079539
- (43) 공개일자 2020년07월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/060038
- (87) 국제공개번호 WO 2019/094725  
 국제공개일자 2019년05월16일
- (30) 우선권주장  
 62/583,724 2017년11월09일 미국(US)  
 62/716,002 2018년08월08일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌  
 W02017100861 A1  
 (뒷면에 계속)

- (73) 특허권자  
 상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드  
 미국 캘리포니아주 94804 리치먼드 스위트 에이  
 100 501 카날 불러바드
- (72) 발명자  
 콘웨이, 앤써니  
 미국 94804 캘리포니아주 리치먼드 스위트  
 에이100 커널 불러바드 501 포인트 리치먼드 테크  
 센터 상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드 내  
 리, 게리 케이.  
 미국 94804 캘리포니아주 리치먼드 스위트  
 에이100 커널 불러바드 501 포인트 리치먼드 테크  
 센터 상가모 테라퓨틱스, 인코포레이티드 내
- (74) 대리인  
 양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 17 항

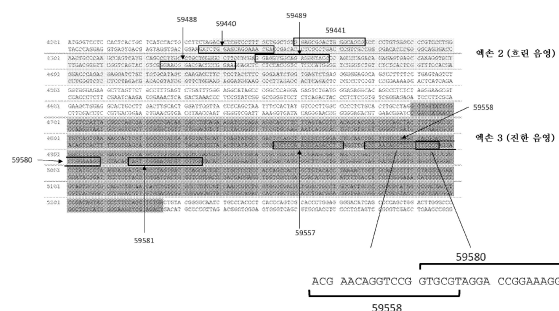
심사관 : 최성호

(54) 발명의 명칭 시토키인 유도성 SH2-함유 단백질 (CISH) 유전자의 유전자 변형

## (57) 요약

본 개시내용은 계능 조작, 특히 CISH 유전자의 표적화된 유전자 변형의 분야에 관한 것이다.

## 대표도



(52) CPC특허분류

**A61K 48/00** (2024.01)

**C12N 5/0636** (2023.05)

**C12N 9/22** (2013.01)

**C12N 2510/00** (2013.01)

**C12N 2710/10343** (2013.01)

**C12N 2750/14143** (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

W02017023803 A1\*

KR1020150047498 A

US20170281682 A1

US08563314 B2

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

내인성 CISH 유전자의 엑손 2 또는 엑손 3 내에 게놈 변형을 포함하는 유전자 변형된 세포이며,

CISH 유전자가 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN)에 의한 절단 후에 변형되고,

아연 핑거 뉴클레아제가 각각의 도메인이 인식 나선 영역을 포함하는 6개의 아연 핑거 도메인을 포함하는 아연 핑거 단백질을 포함하고, ZFN 표적 부위에 결합하며,

게놈 변형이 ZFN 표적 부위 내에 또는 ZFN 표적 부위의 1 내지 100개 염기 쌍 내에 존재하고,

아연 핑거 단백질이 하기 표의 단일 행에 나타난 바와 같이 정리된 SBS#59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581, 또는 SBS#59580이라고 지칭되는 단백질의 인식 나선 영역을 포함하고:

SBS #	설계					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
59488	RSDHLSQ (서열식별 번호:2)	QNATRTK (서열식별 번호:3)	RSDNLSE (서열식별 번호:4)	KRCNLRC (서열식별 번호:5)	DRSTRTK (서열식별 번호:6)	RRDNLHS (서열식별 번호:7)
59489	GHTSLKR (서열식별 번호:8)	TSGHLSR (서열식별 번호:9)	RSDNLAR (서열식별 번호:10)	QNVSRPR (서열식별 번호:11)	TSGHLSR (서열식별 번호:9)	QSGHLSR (서열식별 번호:12)
59440	RWQYLPT (서열식별 번호:13)	DRSALAR (서열식별 번호:14)	RSDNLAR (서열식별 번호:10)	DRSNLTR (서열식별 번호:15)	QSGNLAR (서열식별 번호:16)	ATCCLAH (서열식별 번호:17)
59441	RSDDLTR (서열식별 번호:18)	QAATLSR (서열식별 번호:19)	RSDHLSA (서열식별 번호:20)	DRSDLSR (서열식별 번호:21)	RSDDLTR (서열식별 번호:18)	DRSHLAR (서열식별 번호:22)
59558	QSGDLTR (서열식별 번호:23)	QSGNLHV (서열식별 번호:24)	QSGHLAR (서열식별 번호:25)	NRYDLMT (서열식별 번호:26)	RSDSLRL (서열식별 번호:27)	CREYRGK (서열식별 번호:28)
59557	QSSHLTR (서열식별 번호:29)	QSSDLTR (서열식별 번호:30)	QSGNLAR (서열식별 번호:16)	RLDILQQ (서열식별 번호:31)	RSDNLST (서열식별 번호:32)	DNSYLPR (서열식별 번호:33)
59581	DRSNLSR (서열식별 번호:34)	LRQDLKR (서열식별 번호:35)	RSDNLST (서열식별 번호:32)	DNSNRIN (서열식별 번호:36)	QSSDLRL (서열식별 번호:37)	WKWNLRA (서열식별 번호:38)
59580	RSDSLRL (서열식별 번호:27)	CREYRGK (서열식별 번호:28)	QSGHLAR (서열식별 번호:25)	QKGTLGE (서열식별 번호:39)	RSDNLST (서열식별 번호:32)	QSGHLSR (서열식별 번호:12)

ZFN 표적 부위가 하기에 나타난 바와 같은 핵산 서열을 포함하는 것인, 유전자 변형된 세포:

표적 부위	
5'	ggAAGGCCcCAGCAGGCAAGGgctgcat (서열식별번호: 40)
5'	gaGGAGGTgGCAGAGGGTACCcagccc (서열식별번호: 41)
5'	ccAGCAAAGGACGAGGTCTAGaaggcag (서열식별번호: 42)
5'	gtGGAGCGGACTGGGCAGCGgccctgt (서열식별번호: 43)
5'	gaTGCGTGgCCTGGACAAGCAgttgag (서열식별번호: 44)
5'	gaGTCCAGACGGAAGCTGGAgtcggcat (서열식별번호: 45)
5'	atAGTGCTgCACAAGGCTGACcatcc (서열식별번호: 46)
5'	ccGGAAGgCCAGGATGCGTGgcctgga (서열식별번호: 47)

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 게놈 변형이 삽입 및/또는 결실로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 유전자 변형된 세포.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 하나 이상의 트랜스진이 CISH 유전자에 통합된 것인 유전자 변형된 세포.

### 청구항 4

제3항에 있어서, 트랜스진이 키메라 항원 수용체 (CAR), 면역조정 인자, 또는 조작된 또는 외인성 T 세포 수용체 (TCR)를 코딩하는 것인 유전자 변형된 세포.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 조작된 TCR이 항체-커플링된 T-세포 수용체 (ACTR)인 유전자 변형된 세포.

### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 유전자 변형된 세포로부터 유래된 세포.

### 청구항 7

각각의 도메인이 인식 나선 영역을 포함하는 6개의 아연 핑거 도메인을 포함하며, 하기 표의 단일 행에 나타낸 바와 같이 정리된 SBS#59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581, 또는 SBS#59580이라고 지칭되는 단백질의 인식 나선 영역을 포함하는 아연 핑거 단백질.

SBS #	설계					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
59488	RSDHLSQ (서열식별 번호:2)	QNATRTK (서열식별 번호:3)	RSDNLSE (서열식별 번호:4)	KRCNLRC (서열식별 번호:5)	DRSTRTK (서열식별 번호:6)	RRDNLHS (서열식별 번호:7)
59489	GHTSLKR (서열식별 번호:8)	TSGHLSR (서열식별 번호:9)	RSDNLAR (서열식별 번호:10)	QNVSRPR (서열식별 번호:11)	TSGHLSR (서열식별 번호:9)	QSGHLSR (서열식별 번호:12)
59440	RWQYLPT (서열식별 번호:13)	DRSALAR (서열식별 번호:14)	RSDNLAR (서열식별 번호:10)	DRSNLTR (서열식별 번호:15)	QSGNLAR (서열식별 번호:16)	ATCCLAH (서열식별 번호:17)
59441	RSDDLTR (서열식별 번호:18)	QAATLSR (서열식별 번호:19)	RSDHLSA (서열식별 번호:20)	DRSDLSR (서열식별 번호:21)	RSDDLTR (서열식별 번호:18)	DRSHLAR (서열식별 번호:22)
59558	QSGDLTR (서열식별 번호:23)	QSGNLHV (서열식별 번호:24)	QSGHLAR (서열식별 번호:25)	NRYDLMT (서열식별 번호:26)	RSDSLLR (서열식별 번호:27)	CREYRGK (서열식별 번호:28)
59557	QSSHLTR (서열식별 번호:29)	QSSDLTR (서열식별 번호:30)	QSGNLAR (서열식별 번호:16)	RLDILQQ (서열식별 번호:31)	RSDNLST (서열식별 번호:32)	DNSYLPR (서열식별 번호:33)
59581	DRSNLSR (서열식별 번호:34)	LRQDLKR (서열식별 번호:35)	RSDNLST (서열식별 번호:32)	DNSNRIN (서열식별 번호:36)	QSSDLSR (서열식별 번호:37)	WKWNLRA (서열식별 번호:38)
59580	RSDSLLR (서열식별 번호:27)	CREYRGK (서열식별 번호:28)	QSGHLAR (서열식별 번호:25)	QKGTIGE (서열식별 번호:39)	RSDNLST (서열식별 번호:32)	QSGHLSR (서열식별 번호:12)

### 청구항 8

제7항의 아연 핑거 단백질 및 야생형 또는 조작된 절단 도메인 또는 야생형 또는 조작된 절단 하프-도메인을 포함하는 융합 단백질.

### 청구항 9

하나 이상의 제7항의 아연 핑거 단백질 또는 하나 이상의 제8항의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드.

### 청구항 10

하나 이상의 제7항의 아연 핑거 단백질 또는 하나 이상의 제8항의 융합 단백질; 및/또는

하나 이상의 제7항의 아연 핑거 단백질 또는 하나 이상의 제8항의 융합 단백질을 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드

를 포함하는 단리된 세포.

#### 청구항 11

제10항의 단리된 세포로부터 유래된 단리된 세포.

#### 청구항 12

하나 이상의 제7항의 아연 핑거 단백질 또는 하나 이상의 제8항의 융합 단백질,

하나 이상의 제7항의 아연 핑거 단백질 또는 하나 이상의 제8항의 융합 단백질을 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드, 및/또는

하기를 포함하는 하나 이상의 단리된 세포 또는 상기 하나 이상의 단리된 세포로부터 유래된 하나 이상의 단리된 세포

하나 이상의 제7항의 아연 핑거 단백질 또는 하나 이상의 제8항의 융합 단백질; 및/또는

하나 이상의 제7항의 아연 핑거 단백질 또는 하나 이상의 제8항의 융합 단백질을 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드

를 포함하는 키트.

#### 청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 유전자 변형된 세포를 생성하는 방법이며,

CISH 유전자의 엑손 2 또는 엑손 3에서 표적 부위에 결합하는 DNA-결합 도메인을 포함하는 하나 이상의 뉴클레아제를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입하는 것을 포함하며,

여기서 하나 이상의 뉴클레아제는 CISH 유전자에 결합하여 이를 절단하며, 이에 의해 세포를 유전자 변형시키고,

하나 이상의 뉴클레아제 중 적어도 하나는 각각의 도메인이 인식 나선 영역을 포함하는 6개의 징크 핑거 도메인을 포함하는 징크 핑거 단백질을 포함하는 징크 핑거 뉴클레아제이고,

징크 핑거 단백질은 하기 표의 단일 행에 나타난 바와 같이 정리된 SBS#59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581, 또는 SBS#59580이라고 지칭되는 단백질의 인식 나선 영역을 포함하는 것인 방법.

SBS #	설계					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
59488	RSDHLSQ (서열식별 번호:2)	QNATRTK (서열식별 번호:3)	RSDNLSE (서열식별 번호:4)	KRCNLRC (서열식별 번호:5)	DRSTRTK (서열식별 번호:6)	RRDNLHS (서열식별 번호:7)
59489	GHTSLKR (서열식별 번호:8)	TSGHLSR (서열식별 번호:9)	RSDNLAR (서열식별 번호:10)	QNVSRPR (서열식별 번호:11)	TSGHLSR (서열식별 번호:9)	QSGHLSR (서열식별 번호:12)
59440	RWQYLPT (서열식별 번호:13)	DRSALAR (서열식별 번호:14)	RSDNLAR (서열식별 번호:10)	DRSNLTR (서열식별 번호:15)	QSGNLAR (서열식별 번호:16)	ATCCLAH (서열식별 번호:17)
59441	RSDDLTR (서열식별 번호:18)	QAATLSR (서열식별 번호:19)	RSDHLSA (서열식별 번호:20)	DRSDLSR (서열식별 번호:21)	RSDDLTR (서열식별 번호:18)	DRSHLAR (서열식별 번호:22)
59558	QSGDLTR (서열식별 번호:23)	QSGNLHV (서열식별 번호:24)	QSGHLAR (서열식별 번호:25)	NRDYDMT (서열식별 번호:26)	RSDSLLR (서열식별 번호:27)	CREYRGK (서열식별 번호:28)
59557	QSSHLTR (서열식별 번호:29)	QSSDLTR (서열식별 번호:30)	QSGNLAR (서열식별 번호:16)	RLDILQQ (서열식별 번호:31)	RSDNLST (서열식별 번호:32)	DNSYLPR (서열식별 번호:33)
59581	DRSNLSR (서열식별 번호:34)	LRQDLKR (서열식별 번호:35)	RSDNLST (서열식별 번호:32)	DNSNRIN (서열식별 번호:36)	QSSDLSR (서열식별 번호:37)	WKWNLRA (서열식별 번호:38)
59580	RSDSLLR (서열식별 번호:27)	CREYRGK (서열식별 번호:28)	QSGHLAR (서열식별 번호:25)	QKGTIGE (서열식별 번호:39)	RSDNLST (서열식별 번호:32)	QSGHLSR (서열식별 번호:12)

#### 청구항 14

제13항에 있어서, 유전자 변형된 세포가 CISH 유전자에 통합되고 세포에서 발현되는 트랜스진을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 15

단백질을 이를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 방법에 사용하기 위한 제약 조성물이며, 상기 방법은 제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 유전자 변형된 세포를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 세포는 대상체에서 단백질을 코딩하는 트랜스진을 발현하는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 16

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 따른 유전자 변형된 세포를 포함하는 세포 집단.

#### 청구항 17

제16항에 있어서, 유전자 변형된 세포로부터 유래된 유전자 변형된 세포를 더 포함하는 세포 집단.

#### 청구항 18

삭제

#### 청구항 19

삭제

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] <관련 출원에 대한 상호-참조>

[0002] 본 출원은 2017년 11월 9일에 출원된 미국 가출원 번호 62/583,724 및 2018년 8월 8일에 출원된 미국 가출원 번호 62/716,002를 우선권 주장하며, 이들의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.



[0003] <기술분야>

[0004] 본 개시내용은 계능 조작, 특히 시토카인 유도성 SH2-함유 단백질 (CISH 또는 CIS) 유전자의 표적화된 변형의 분야에 관한 것이다.

## 배경 기술

[0005] 세포는 직접 접촉에 의해 또는 분자 "메시지"를 세포외 공간으로 방출함으로써 서로 소통하여, 증식, 이동, 분화를 조정하고, 적절한 세포 표면 수용체 복합체를 발현하는 표적 세포에서 유전자 발현의 변화에 영향을 미친다. 많은 시토카인 및 성장 인자의 경우, 수용체 결합은 JAK/STAT 신호전달 경로에 의해 표적 세포 내에서 신호 도입을 개시한다. 예를 들어, 문헌 [Aaronson, et al. (2002) Science 296(5573):1653-5]; [Rawlings, et al. (2004) J Cell Sci 117(Pt 8):1281-3]; 및 [Jatiani, et al. (2010) Genes Cancer 1(10):979-93]을 참조한다. 리간드가 없는 경우, 수용체의 세포질 말단은 야누스 티로신 키나제 패밀리의 JAK1-3 또는 Tyk2의 불활성 구성원과 회합된다. 리간드 결합은 2개 이상의 수용체 서브유닛 사이에 수용체 복합체의 형성을 유도하며, JAK 단백질을 인접하게 하여 트랜스-인산화를 통한 활성화를 가능하게 한다. 그 후, 활성화된 JAK는 수용체의 세포질 도메인 상의 티로신 잔기를 인산화하여, 전사의 신호 전달인자 및 활성인자 (STAT) 단백질 중 하나에 대한 결합 부위를 생성할 수 있다.

[0006] 포유동물에는 7개의 STAT 단백질, STAT1-4, STAT5a, STAT5b 및 STAT6이 있다. 각각의 STAT 단백질의 구조 내에는, STAT 단백질 자체가 JAK 키나제에 의해 인산화된 티로신일 수 있는 수용체 상의 부위를 함유하는 포스포티로신에 대한 결합을 지시하는 Src 상동성-2 (SH2) 도메인 (문헌 [Sadowski, et al. (1986) Mol Cell Biol 6(12):4396-408] 참조)이 있다. 일단 인산화되면, STAT 단백질은 동종이량체 또는 이종이량체를 형성하고, 이들은 핵으로 수송되어 DNA에 결합하고 근처 유전자의 전사를 자극한다. JAK/STAT 경로가 성장, 세포 증식 및 면역 반응의 조절에 중요한 역할을 하기 때문에, 이 시스템의 조절장애는 암 또는 염증성 질환의 발병에 기여할 수 있다.

[0007] STAT 활성화는 세포내 단백질의 시토카인 신호전달 저해제 (SOCS) 및 시토카인-유도된 SH2 (CISH) 도메인-함유 패밀리를 코딩하는 유전자 세트의 발현을 신속하게 유도한다. 예를 들어, 문헌 [Palmer, et al. (2009) 30(12):592-602]; [Yoshimura, et al. (2007) Nat Rev Immunol 7(6):454-65]; [Trenkove, et al. (2013) Am J Clin Exp Immunol 2(1):1-29]을 참조한다. SOCS/CISH 단백질은 가변 서열 및 기능의 N-말단 도메인을 함유하고, 이어서 표적 단백질을 유비퀴틴으로 표지하여 프로테아좀을 통한 분해를 위해 마킹하는 E3 유비퀴틴 리가제 복합체의 어셈블리를 지시하는 SH2 도메인 및 C 말단 SOCS 도메인을 함유한다. SOCS/CISH 단백질은 수용체 상의 포스포티로신 부위에 대한 결합에 대해 STAT와 경쟁함으로써 JAK/STAT 신호전달을 억제하며, 이에 의해 STAT 활성화를 억제하고, 이들의 턴오버를 향상시키는 다양한 단백질 상에 유비퀴틴 침착을 지시한다. 그러므로, SOCS/CISH 단백질은 시토카인 및 성장 인자 신호전달을 조정하고 리간드가 더 이상 존재하지 않을 때 신호의 붕괴를 향상시키기 위해 고전적인 음성-피드백 루프를 확립한다. 일부 SOCS 단백질은 추가 활성화, 예컨대 JAK의 직접적 억제 및 다른 SOCS 단백질의 턴오버 향상을 가지므로, 수용체 신호 도입의 조절에 추가 복잡성을 제공한다. 문헌 [Kershaw, et al. (2013) Biochem Soc Trans. 41(4):1042-7]을 참조한다.

[0008] CISH (CIS라고도 공지됨)는 에리트로포이에틴 (EPO) 수용체 (EPOR) 상에 리간드 결합 후 신속하게 유도된 (30분 내에) 유전자로 확인된 최초의 SOCS 단백질이었다. 문헌 [Yoshimura, et al. (1995) EMBO J 14(12):2816-26]을 참조한다. 또한, CISH 발현은 적절한 세포 유형에서 인터루킨-2 (IL-2), IL-3 및 과립구-대식세포 콜로니-자극 인자 (GM-CSF)에 의해 유도되었다. 면역침전 분석은 CISH 단백질이 IL-3R 베타 쇄 및 EPOR에 안정적으로 결합하지만, 리간드 결합 후에만 결합한다는 것을 입증하였으며, 이는 수용체의 티로신 인산화가 필요함을 제안한다. CISH 단백질의 과발현은 세포 성장을 저해하였으며, 이는 CISH가 신호 도입에 대한 음성 효과를 갖는다는 것을 나타낸다. 후속적으로, CISH 발현은 STAT5 활성화에 의존적인 것으로 나타났으며, 여러 STAT5 결합 부위가 CISH 프로모터 영역에서 발견되었다. 문헌 [Matsumoto, et al. (1997) Blood 89(9):3148-54]을 참조한다. 또한, CISH는 STAT5의 EPO-의존성 활성화를 억제하고, 다른 STAT5-의존성 수용체의 활성을 저해하였으며, 이는 CISH가 STAT5에 대한 피드백 조정인자임을 나타낸다.

[0009] 다양한 STAT5-의존성 수용체는 성장 호르몬 (GH), 프로락틴 (PRL), 트롬보포이에틴 (TPO), 랩틴, IL-2, IL-5 및 IL-9를 포함하며 (그러나 이에 제한되지는 않음) CISH 발현을 유도한다. 문헌 [Bhattacharya, et al. (2001) Am J Respir Cell Mol Biol 24(3):312-6]을 참조한다. CISH는 GH 수용체 (GHR), PRL 수용체 및 IL-2 수용체 베타-쇄에 결합하고 이로부터의 신호전달을 억제하며, GHR의 내재화 및 비활성화를 촉진하는 것으로 나

타났다. 문헌 [Ram, et al. (1999) Biol Chem 274(50):35553-61]; [Endo, et al. (2003) J Biochem 133(1):109-13]; [Aman, et al. (1999) J Biol Chem 274(42):30266-72]; [Landsman, et al. (2005) J Biol Chem 280(45):37471-80]을 참조한다. Cish mRNA의 발현은 수많은 조직 (간, 신장, 심장, 위, 폐, 난소 및 골격근)에서 발견된다. 문헌 [Palmer, et al. (2009) 30(12):592-602]; [Anderson, et al. (2009) 138(3):537-44]; [Clasen, et al. (2013) J Lipid Res 54(7):1988-97]을 참조한다. 다수의 중요한 시토카인 및 성장 인자의 신호전달 기관에서 그의 명백한 관여에도 불구하고, Cish 녹아웃 마우스는 최소한의 결함을 갖는다 (면역 반응의 미묘한 변화는 제외). 문헌 [Palmer, et al. (2009) Trends Immunol 30(12):592-602]; [Trengeve, et al. (2013) Am J Clin Exp Immunol 2(1):1-29]을 참조한다. 이는 다른 SOCS 패밀리의 단백질의 보상 활성화 때문일 수 있다. 추정 표적 유전자의 생물학에 대한 CISH의 효과는 베타-액틴 프로모터로부터 구동된 Cish를 구성적으로 발현하는 트랜스제닉 마우스에서 관찰되었다. 이들 마우스는 체중 감소, 유선 발달에서의 결함, 및 감마/델타 T 세포, 자연 살해 (NK) 세포 및 NKT 세포의 수의 감소, Stat5a 및/또는 Stat5b 결핍 마우스와 유사한 표현형을 가졌다. 문헌 [Matsumoto, et al. (1999) Mol Cell Biol 19(9):6396-407]을 참조한다.

[0010] CISH는 많은 시토카인 및 성장 인자에 의한 신호전달에 잠재적으로 영향을 미치기 때문에, CISH 활성화 및 변이체가 감염성 질환 및 암과 연관된 것으로 밝혀진 것은 놀라운 일이 아니다. 여러 연구에서 말라리아, 렙토스피라증, B형 간염 바이러스 및 결핵을 포함하여 특정 CISH 다형성을 보유하는 대상체에서 다양한 감염원에 대한 감수성이 증가된 것으로 나타났다. 문헌 [Khor, et al. (2010) N Engl J Med 362(22):2092-101]; [Esteves, et al. (2014) PLoS One 9(9):e108534]; [Hu, et al. (2014) PLoS One 9(6):e100826]; [Tong, et al. (2012) Immunogenetics 64(4):261-5]; [Ji, et al. (2014) Infect Genet Evol 28:240-4]; [Sun, et al. (2014) PLoS 9(3):e92020]을 참조한다. 모든 연구에 공통적인 한 위험 대립유전자 (rs414171, 전사 시작으로부터 -292)는 대안적인 대립유전자와 비교하여 말초 혈액 단핵 세포에서 더 낮은 수준의 CISH 발현을 나타내었다. 문헌 [Khor and Sun, supra]을 참조한다. 유방암에서, CISH의 발현 수준은 정상 조직과 비교하여 유방 암종 및 암 세포주에서 상승되었으며, 이는 CISH가 세포외-신호-조절된 키나제 (ERK)를 활성화시키는 그의 능력에 의해 종양형성에 기여할 수 있다는 추측으로 이어졌다. 문헌 [Raccurt, et al. (2003) Br. J. Cancer 89(3):524-32]. 또한, CISH 변이체는 젖소의 우유 생산 형질과 연관된다. 문헌 [Arun, et al. (2015) Front Genet 6:342]을 참조한다.

[0011] T 세포는 T 세포 수용체(T cell receptor)(TCR)를 통한 자극에 반응할 때 고전적인 JAK/STAT 신호전달 경로를 이용하지 않지만, T 세포가 CD3에 대한 항체에 의해 활성화될 때 Cish 발현은 신속하게 유도된다 (30분 내에). 문헌 [Ji, supra]; [Chen, et al. (2003) Int Immunol 15(3):403-9]; [Palmer, et al. (2015) J Exp Med 212(12):2095-113]; [Yang, et al. (2013) Nat Immunol 14(7):732-40]을 참조한다. STAT5는 아마도 TCR-연관 림프구-특이적 단백질 티로신 키나제 (Lck)에 의해 TCR 자극 후 신속하게 인산화된다. 문헌 [Welte, et al. (1999) Science 283(5399): 222-5]을 참조한다. 또한, IL-2 발현은 TCR 자극에 의해 유도되지만, 동역학이 너무 느려서 Cish 유도를 설명할 수 없다. 문헌 [Yang, et al., supra]; [Li, et al. (2000) J Exp Med 191(6):985-94]을 참조한다. 생체내에서, Cish 발현은 항원-미감염 T 세포에서 낮았지만, 백신접종 후 수집된 항원-경험 중심 기억 (TCM) 및 이펙터 기억 (TEM) CD8+ T 세포에서 점진적으로 증가하였다. 문헌 [Sallusto, et al. (1999) Nature 401(6754):708-12]을 참조한다.

[0012] T 세포 반응성에서의 Cish의 역할이 또한 조사되었다. CD4 프로모터로부터 생체내 Cish의 트랜스제닉 발현은 CD4+ 헬퍼 T 세포 구획에서 구성적 발현을 갖는 마우스를 생성하였다. 문헌 [Li, et al., supra]을 참조한다. 순환 T 세포 하위집단은 영향을 받지 않았지만, 예상되는 저해된 반응성 대신에, CD4+ T 세포는 TCR-유도된 증식 및 시토카인 발현 상승 및 시험관내 생존 증가를 나타내었다. 순환 T 세포 집단은 또한 Cish 녹아웃 마우스에서 정상이었으나, 다시 TCR 자극에 대한 향상된 반응 (증식 및 시토카인 생성)이 CD4+ 및 CD8+ T 세포 서브세트 둘 모두에서 시험관내에서 관찰되었다. 문헌 [Palmer and Yang, supra]을 참조한다. Cish 트랜스제닉 마우스에서 CD4+ T 세포의 향상된 반응성은 Cish 및 단백질 키나제 C 세타 사이의 상호작용에 기인한 반면, Cish에 의한 CD8 T 세포 활성화의 억제체는 포스포리파제 C-감마 1의 향상된 분해에 기인하였기 때문에, Cish 작용에 대한 분자적 근거도 불분명하다.

[0013] Cish 결핍 마우스에서 향상된 T 세포 활성화의 한 결과는 흑색종 모델에서 확립된 종양에 대해 입양적으로 전이된 항원-특이적 CD8 T 세포의 내구성이 있고 더욱 공격적인 반응이었다. 문헌 [Palmer, supra]을 참조한다. 또한, 인간 T 세포에서 CISH 발현을 감소시키는 것은 공동-형질도입된 종양-특이적 TCR의 기능성을 향상시켰다. 이들 데이터는 TCR 신호전달을 조정하는 음성 피드백 활성화의 일부를 경감시키는 것이 종양에 대해 더욱 강력한 면역 반응성을 생성할 수 있음을 제안한다. 그러나, 마우스 모델에서 증가된 항-흑색종 활성화는 더 큰 안구 자



가면역과 연관되었다. 유사하게, 다른 계통의 Cish 결핍 마우스에서 큰 발달 결함이 없었음에도 불구하고, 자발성 폐 질환이 더 나이드는 동물 (> 6개월)에서 발병하였으며, 이는 TH2 및 TH9 CD4 T 세포 서브세트의 향상된 발달에 의해 명백하게 야기된 것이었다. 이들 연구는 면역조절과의 공통적인 도전을 나타내며; 너무 많은 저해는 환자를 감염 및 중앙 발달에 취약하게 하고, 너무 많은 자극은 자가면역 또는 만성 염증성 질환을 유발할 수 있다.

[0014] 아연 핑거 단백질 ("ZFP")로부터의 DNA 결합 도메인 또는 TAL-이펙터 도메인 ("TALE"), 및 모두 표적 DNA 부위에 특이적으로 결합하도록 설계된 아연 핑거 뉴클레아제 ("ZFN"), TALEN, CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템 및 귀소 엔도뉴클레아제를 포함하는 조작된 뉴클레아제를 포함하는 재조합 전사 인자는 내인성 유전자의 유전자 발현을 조절하는 능력을 가지며, 게놈 조작, 유전자 요법, 및 장애, 예컨대 암 및 염증의 치료에 유용하다. 예를 들어, 미국 특허 번호 9,877,988; 9,394,545; 9,150,847; 9,206,404; 9,045,763; 9,005,973; 8,956,828; 8,936,936; 8,945,868; 8,871,905; 8,586,526; 8,563,314; 8,329,986; 8,399,218; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,067,317; 7,262,054; 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; 미국 특허 공개 번호 2003/0232410; 2005/0208489; 2005/0026157; 2005/0064474; 2006/0063231; 2008/0159996; 2010/0218264; 2012/0017290; 2011/0265198; 2013/0137104; 2013/0122591; 2013/0177983; 2013/0177960; 및 2015/0056705를 참조하며, 이들의 개시내용은 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다. 추가로, 표적화된 뉴클레아제는 아르곤나우트(Argonate) 시스템 (예를 들어, 'TtAgo'라고 공지된 티. 테르모필루스(*T. thermophilus*)로부터 유래됨, 문헌 [Swarts, et al. (2014) Nature 507(7491): 258-261] 참조)에 기초하여 개발되고 있으며, 이는 또한 게놈 편집 및 유전자 요법에 사용하기 위한 잠재성을 가질 수 있다.

[0015] 뉴클레아제-매개 유전자 요법은 하나 이상의 불활성화된 유전자를 갖도록 세포를 유전자 조작하고/거나 해당 세포가 해당 세포에서 이전에 생성되지 않은 생성물을 (예를 들어, 트랜스진 삽입을 통해 및/또는 내인성 서열의 보정을 통해) 발현하도록 하기 위해 사용될 수 있다. 트랜스진 삽입의 사용의 예는 하나 이상의 신규 치료 단백질을 코딩하는 하나 이상의 유전자의 삽입, 세포 또는 개체에서 결여된 단백질을 코딩하는 코딩 서열의 삽입, 돌연변이된 유전자 서열을 함유하는 세포에서의 야생형 유전자의 삽입, 및/또는 구조적 핵산, 예컨대 shRNA 또는 siRNA를 코딩하는 서열의 삽입을 포함한다. 내인성 유전자 서열의 '보정'의 유용한 적용의 예는 질환-연관 유전자 돌연변이의 변경, 스플라이스 부위를 코딩하는 서열의 변경, 조절 서열의 변경, 및 단백질의 구조적 특징을 코딩하는 서열의 표적화된 변경을 포함한다. 트랜스진 구축물은 상동성 지정 복구 (HDR)에 의해 또는 비상동성 말단 연결 (NHEJ) 구동된 프로세스 동안 말단 포획에 의해 삽입될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 9,045,763; 9,005,973; 7,888,121; 및 8,703,489를 참조한다.

[0016] 이들 조작된 전사 인자 및 뉴클레아제를 사용한 임상 시험은 이들 분자가 암, HIV 및/또는 혈액 장애 (예컨대, 혈액소병증 및/또는 혈우병)를 포함하는 다양한 상태를 치료할 수 있다는 것을 나타내었다. 예를 들어, 문헌 [Yu, et al. (2006) FASEB J. 20:479-481]; [Tebas, et al. (2014) New Eng J Med 370(10):901]을 참조한다. 그러므로, 이들 접근법은 질환의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0017] 그러나, CISH 조절이 요구되는 암, 염증성 장애 및 기타 질환의 치료 및/또는 예방을 위한, CISH 유전자 보정 및 공여자 전달을 위한 추가 방법 및 조성물에 대한 필요성이 여전히 존재한다.

## 발명의 내용

[0018] <요약>

[0019] 본 발명은 유전자 요법 및 게놈 조작에 사용하기 위한 조성물 및 방법을 기재한다. 구체적으로, 기재된 방법 및 조성물은 내인성 CISH 유전자 (돌연변이체 또는 야생형)의 뉴클레아제-매개 게놈 변형 (예를 들어, 하나 이상의 삽입 및/또는 결실)에 관한 것이다. 게놈 변형(들)은 표적 유전자를 불활성화시키는 삽입 및/또는 결실 ("indel") (예를 들어, 뉴클레아제에 의한 유전자의 절단 후 NHEJ를 통해); 단백질-코딩 서열, 예를 들어 암 또는 염증성 상태를 갖는 대상체에서 결여된 또는 결핍된 단백질을 포함하는 트랜스진 (공여자)의 표적화된 삽입, 및/또는 보정 공여자 (예를 들어, 돌연변이체 유전자를 갖는 세포에서 기능적 CISH를 회복시키는 서열), 키메라 항원 수용체 (CAR) 및/또는 HLA 복합체를 포함하는 융합 단백질 (예를 들어, B2M-HLA-E 또는 B2M-HLA-G 융합 단백질) 또는 그의 하나 이상의 구성성분 또는 조절인자의 표적화된 삽입을 포함할 수 있다. 유전자 변형 및/또는 이들 변형을 포함하는 세포는 생체의 또는 생체내 방법에서 사용될 수 있다.

[0020] 특정 측면에서, 내인성 CISH 유전자의 엑손 2 또는 엑손 3 내에 게놈 변형을 포함하는 유전자 변형된 세포가 본원에 제공된다. 이들 유전자 변형된 세포의 집단이 또한 제공된다. 게놈 변형은 하나 이상의 삽입 및/또는 결

실 (indel) 및/또는 하나 이상의 트랜스진의 CISH 유전자로의 통합 (예를 들어, 트랜스진은 키메라 항원 수용체 (CAR), 면역조정 인자 (예를 들어, PD1, CTLA-4 등), 조작된 또는 외인성 T 세포 수용체 (TCR)(예를 들어, 항체-커플링된 T-세포 수용체 (ACTR)를 코딩함)를 포함할 수 있다. 특정 측면에서, CISH 유전자는 뉴클레아제 (예를 들어, 하나 이상의 아연 핑거 뉴클레아제, 하나 이상의 TALEN 및/또는 하나 이상의 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템)에 의한 절단 후에 변형된다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제는 표 2에 나타난 바와 같은 표적 부위에 결합하는 DNA-결합 도메인을 포함하며, 예를 들어 아연 핑거 뉴클레아제는 인식 나선을 포함하는 4, 5 또는 6개의 아연 핑거 도메인을 포함하는 아연 핑거 단백질, 예컨대 SBS#59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581 또는 SBS#59580이라고 지칭되는 단백질의 인식 나선 영역을 포함하는 아연 핑거 단백질을 포함한다. 또한, 본원에 기재된 임의의 세포로부터 유래된 유전자 변형된 세포 (및 이러한 세포의 집단)가 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포는 조혈 줄기 세포, T 이펙터 세포 및 T 조절 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0021] 다른 측면에서, 인식 나선 영역을 각각 포함하는 6개의 아연 핑거 도메인을 포함하는 아연 핑거 단백질이 본원에 제공되며, 여기서 아연 핑거 단백질은 SBS#59488, SBS#59489, SBS#59440, SBS#59441, SBS#59558, SBS#59557, SBS#59581 또는 SBS#59580이라고 지칭되는 단백질의 인식 나선 영역을 포함한다. 야생형 또는 조작된 절단 도메인 또는 절단 하프-도메인과 아연 핑거 단백질의 융합체를 포함하는, 본원에 기재된 임의의 아연 핑거 단백질을 포함하는 융합 단백질이 또한 제공된다. 본원에 기재된 ZFP 및/또는 융합 단백질 중 하나 이상을 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드가 또한 제공된다. 하나 이상의 단백질 (예를 들어, ZFP 또는 융합 단백질) 및/또는 이들 단백질을 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 단리된 세포 (예를 들어, T 이펙터 세포, T 조절 세포 및/또는 조혈 줄기 세포)가 또한 제공된다. 본원에 기재된 하나 이상의 단백질, 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 및/또는 하나 이상의 단리된 세포를 포함하는 키트가 또한 제공된다.

[0022] 다른 측면에서, 본 발명은 CISH 유전자의 엑손 2 또는 엑손 3에서 표적 부위에 결합하는 DNA-결합 도메인을 포함하는 하나 이상의 뉴클레아제를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입하는 것을 포함하는, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 세포의 생성 방법을 제공하며, 여기서 뉴클레아제는 CISH 유전자에 결합하여 이를 절단하며, 이에 의해 세포를 유전자 변형시킨다. 특정 실시양태에서, 유전자 변형된 세포는 CISH 유전자에 통합되고 세포에서 발현되는 트랜스진을 포함한다. 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 세포를 투여하는 것을 포함하는 단백질을 이를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 방법이 또한 제공되며, 여기서 세포는 대상체에서 트랜스진 (예를 들어, CAR, 면역조정 인자 및/또는 ACTR 등)을 발현한다.

[0023] 한 측면에서, 하나 이상의 뉴클레아제를 사용한 CISH 유전자의 표적화된 변형을 위한 방법 및 조성물이 본원에 개시되어 있다. 뉴클레아제, 예를 들어 조작된 메가뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN) (용어 "ZFN"은 ZFN의 쌍을 포함함), TALE-뉴클레아제 (제한 엔도뉴클레아제 및/또는 메가뉴클레아제로부터의 뉴클레아제 도메인과 TALE 이펙터 도메인의 융합체 (예컨대, mega TALE 및 compact TALEN)를 포함하는 TALEN)(용어 "TALEN"은 TALEN의 쌍을 포함함), Ttango 시스템 및/또는 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템은 세포에서 CISH 유전자 유전자좌에서 DNA를 절단하는데 사용된다. CISH 유전자는 절단후 (예를 들어, 삽입 및/또는 결실 ("indel")에 의해) 및/또는 공여자 트랜스진의 표적화된 삽입에 의해 불활성화될 수 있다. 공여자 트랜스진은 상동성 지정 복구 (HDR) 또는 비상동성 복구 메커니즘 (예를 들어, NHEJ 공여자 포획)을 통한 것일 수 있다. 본원에 기재된 뉴클레아제는 표적 DNA에서 이중-가닥 (DSB) 또는 단일-가닥 파단 (닉(nick))을 유도할 수 있다. 일부 실시양태에서, 2개의 닉을 도입함으로써 DSB를 생성하는데 2개의 니카제가 사용된다. 일부 경우에 니카제는 ZFN이고, 다른 경우에 니카제는 TALEN 또는 CRISPR/Cas 니카제이다. 본원에 기재된 임의의 뉴클레아제 (예를 들어, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas 등)는 CISH 유전자의 인트론 및/또는 엑손 (예를 들어, 엑손 2 또는 3) (인트론 및 엑손과 중첩하는 서열을 포함함), 예를 들어 표 2에 나타난 서열의 9 내지 20개 이상 (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 이상)의 인접 또는 비인접 아미노산을 포함하는 표적 부위를 포함하는 표 2에 나타난 표적 서열을 표적화할 수 있다.

[0024] 한 측면에서, 계놈에서 CISH 유전자의 표적 부위에 결합하는 비자연 발생 아연-핑거 단백질 (ZFP)이 본원에 기재되어 있으며, 여기서 ZFP는 하나 이상의 조작된 아연-핑거 결합 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, ZFP는 관심있는 표적 계놈 영역을 절단하는 아연-핑거 뉴클레아제 (ZFN)이며, 여기서 ZFN은 하나 이상의 조작된 아연-핑거 결합 도메인 및 뉴클레아제 절단 도메인 또는 절단 하프-도메인을 포함한다. 절단 도메인 및 절단 하프-도메인은 예를 들어, 다양한 제한 엔도뉴클레아제 및/또는 귀소 엔도뉴클레아제로부터 수득될 수 있으며, 야생형 또는 조작된 것 (돌연변이체)일 수 있다. 한 실시양태에서, 절단 하프-도메인은 유형 IIS 제한 엔도뉴클레아제 (예를 들어, FokI)로부터 유래된다. 특정 실시양태에서, 아연 핑거 도메인은 표 1의 단일 행에 나타난 바

와 같이 정리된 인식 나선 도메인을 갖는 아연 핑거 단백질에 포함된다. 이들 아연 핑거 단백질을 포함하는 뉴클레아제는 임의의 링커 서열 (예를 들어, 이를 절단 도메인에 연결시킴) 및 임의의 절단 도메인 (예를 들어, 이량체화 돌연변이체, 예컨대 ELD 돌연변이체; 416, 422, 447, 448 및/또는 525 중 하나 이상에서 돌연변이를 갖는 FokI 도메인; 및/또는 니카제 기능성을 야기하는 촉매 도메인 돌연변이체)을 포함할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,703,489; 9,200,266; 8,623,618; 및 7,914,796; 및 미국 특허 공개 번호 2018/0087072를 참조한다. 특정 실시양태에서, ZFN의 ZFP는 표 2에 나타난 서열 (서열식별번호:40-47) 내의 9 내지 18개 이상의 뉴클레오타이드의 표적 부위에 결합한다.

[0025] 또 다른 측면에서, 게놈에서 CISH 유전자의 표적 부위 (예를 들어, 서열식별번호:40-47인 표 2에 나타난 바와 같은 표적 서열의 적어도 9 또는 12개 (예를 들어, 9 내지 20개 이상)의 뉴클레오타이드를 포함하는 표적 부위)에 결합하는 전사 활성인자 유사 이펙터 (TALE) 단백질이 본원에 기재되어 있으며, 여기서 TALE은 하나 이상의 조작된 TALE 결합 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, TALE은 관심있는 표적 게놈 영역을 절단하는 뉴클레아제 (TALEN)이며, 여기서 TALEEN은 하나 이상의 조작된 TALE DNA 결합 도메인 및 뉴클레아제 절단 도메인 또는 절단 하프-도메인을 포함한다. 절단 도메인 및 절단 하프 도메인은 예를 들어, 다양한 제한 엔도뉴클레아제 및/또는 귀소 엔도뉴클레아제 (메가뉴클레아제)로부터 수득될 수 있다. 한 실시양태에서, 절단 하프-도메인은 유형 IIS 제한 엔도뉴클레아제 (예를 들어, FokI)로부터 유래된다. 다른 실시양태에서, 절단 도메인은 메가뉴클레아제로부터 유래되며, 메가뉴클레아제 도메인은 또한 DNA-결합 기능성을 나타낼 수 있다.

[0026] 또 다른 측면에서, 게놈에서 CISH 유전자의 표적 부위에 결합하는 CRISPR/Cas 시스템이 본원에 기재되어 있으며, 여기서 CRISPR/Cas 시스템은 하나 이상의 조작된 단일 가이드 RNA 또는 기능적 등가물, 뿐만 아니라 Cas9 뉴클레아제를 포함한다. 특정 실시양태에서, 단일 가이드 RNA (sgRNA)는 표 2에 나타난 바와 같은 표적 부위의 9, 12개 이상의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 서열 (서열식별번호:40-47)에 결합한다.

[0027] 본원에 기재된 바와 같은 뉴클레아제 (예를 들어, ZFN, CRISPR/Cas 시스템, Ttato 및/또는 TALEN)는 CISH 유전자 내에 또는 이에 인접한 코딩 또는 비코딩 영역, 예를 들어 리더(leader) 서열, 트레일러(trailer) 서열 또는 인트론, 또는 코딩 영역의 상류 또는 하류에 있는 비전사된 영역 내에 관심있는 영역에 결합하고/거나 이를 절단할 수 있다.

[0028] 또 다른 측면에서, 하나 이상의 뉴클레아제 (예를 들어, 본원에 기재된 ZFN, CRISPR/Cas 시스템, Ttato 및/또는 TALEN)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드가 본원에 기재되어 있다. 폴리뉴클레오타이드는 예를 들어, mRNA일 수 있다. 일부 측면에서, mRNA는 화학적으로 변형될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Kormann, et al. (2011) Nature Biotechnology 29(2):154-157] 참조).

[0029] 또 다른 측면에서, 프로모터에 작동가능하게 연결된 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 뉴클레아제 (예를 들어, ZFN, CRISPR/Cas 시스템, Ttato 및/또는 TALEN)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는, ZFN, CRISPR/Cas 시스템, Ttato 및/또는 TALEN 발현 벡터가 본원에 기재되어 있다. 한 실시양태에서, 발현 벡터는 바이러스 벡터 (예를 들어, AAV 벡터)이다. 한 측면에서, 바이러스 벡터는 조직 특이적 트로피즘을 나타낸다.

[0030] 또 다른 측면에서, 하나 이상의 뉴클레아제 (예를 들어, ZFN, CRISPR/Cas 시스템, Ttato 및/또는 TALEN) 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포가 본원에 기재되어 있다.

[0031] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 발현 벡터를 포함하는 제약 조성물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 하나 초과 발현 벡터를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 제1 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제1 발현 벡터 및 제2 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 제2 발현 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드 및 제2 폴리뉴클레오타이드는 상이하다. 일부 실시양태에서, 제1 폴리뉴클레오타이드 및 제2 폴리뉴클레오타이드는 실질적으로 동일하다. 제약 조성물은 공여자 서열 (예를 들어, 질환 또는 장애, 예컨대 LSD 또는 혈우병에서 결여된 또는 결핍된 단백질을 코딩하는 트랜스진)을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 공여자 서열은 발현 벡터와 회합된다.

[0032] 일부 실시양태에서, CISH DNA-결합 도메인 (예를 들어, 아연 핑거 단백질 또는 TALE 또는 sgRNA 또는 메가뉴클레아제) 및 야생형 또는 조작된 절단 도메인 또는 절단 하프-도메인을 포함하는 융합 단백질이 제공된다.

[0033] 본원에 기재된 뉴클레아제는 CISH 유전자의 코딩 영역 내에서 또는 상기 유전자 내의 또는 이에 인접한 비코딩 영역, 예를 들어 리더 서열, 트레일러 서열 또는 인트론, 또는 코딩 영역의 상류 또는 하류에 있는 비전사된 영역 내에서 CISH 유전자에 결합하고/거나 이를 절단할 수 있다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제는 표 2에 나타난 CISH 서열 내의 9-20개 이상의 뉴클레오타이드의 표적 부위에 결합한다.



- [0034] 또 다른 측면에서, DNA-결합 분자 (예를 들어, ZFP, TALE, sgRNA 등) 및 뉴클레아제 (절단) 도메인을 포함하는 뉴클레아제를 포함하는, 본원에 기재된 뉴클레아제 (예를 들어, ZFN, TALEN, TtAgo 및/또는 CRISPR/Cas 시스템) 중 하나 이상을 포함하는 조성물이 본원에 기재되어 있다. 특정 실시양태에서, 조성물은 하나 이상의 뉴클레아제를 제약상 허용가능한 부형제와 조합하여 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 둘 이상의 세트 (쌍)의 뉴클레아제를 포함하며, 각각의 세트는 상이한 특이성을 갖는다. 다른 측면에서, 조성물은 상이한 유형의 뉴클레아제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 조성물은 CISH-뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 반면, 다른 실시양태에서, 조성물은 CISH-특이적 뉴클레아제 단백질을 포함한다. 추가 실시양태에서, 조성물은 하나 이상의 공여자 분자, 예를 들어 그의 임의의 기능적 단편을 포함하는 기능적 CISH 단백질(들)을 코딩하는 공여자를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 공여자는 키메라 항원 수용체 (CAR) 및/또는 다른 면역조정 단백질(들)을 코딩하는 서열, 예컨대 조작된 또는 외인성 T 세포 수용체 (TCR) 유전자, ACTR 서열을 코딩하는 유전자, 베타-2-마이크로글로불린 (B2M) 유전자 및/또는 B2M 및 HLA-E 및/또는 HLA-G를 포함하는 융합 단백질을 포함한다. 다른 측면에서, 공여자는 세포가 기능적 CISH를 발현하도록 세포에서 돌연변이체 CISH 유전자로 통합된 보정 서열을 포함한다.
- [0035] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 하나 이상의 뉴클레아제 또는 뉴클레아제 구성성분 (예를 들어, ZFN, TALEN, TtAgo 또는 CRISPR/Cas 시스템의 뉴클레아제 도메인)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본원에 기재되어 있다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, mRNA 또는 DNA일 수 있다. 일부 측면에서, mRNA는 화학적으로 변형될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Kormann, et al. (2011) Nature Biotechnology 29(2):154-157] 참조). 다른 측면에서, mRNA는 ARCA 캡을 포함할 수 있다 (미국 특허 번호 7,074,596; 및 8,153,773 참조). 추가 실시양태에서, mRNA는 비변형된 및 변형된 뉴클레오티드의 혼합물을 포함할 수 있다 (미국 특허 공개 번호 2012/0195936 참조). 또 다른 측면에서, 프로모터에 작동가능하게 연결된 본원에 기재된 하나 이상의 ZFN, TALEN, TtAgo 또는 CRISPR/Cas 시스템을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 뉴클레아제 발현 벡터가 본원에 기재되어 있다. 한 실시양태에서, 발현 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어 AAV 벡터이다.
- [0036] 또 다른 측면에서, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 뉴클레아제, 하나 이상의 뉴클레아제 발현 벡터 및/또는 하나 이상의 공여자를 포함하는 숙주 세포가 본원에 기재되어 있다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 CISH 유전자를 불활성화시키는 삽입 및/또는 결실, 예를 들어 뉴클레아제에 의한 절단 후 NHEJ (indel)에 의한 불활성화, 또는 절단 후 하나 이상의 외인성 서열 (예를 들어, 트랜스진)의 삽입에 의한 불활성화를 포함한다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 CISH-특이적 뉴클레아제에 의해 매개되는 외인성 서열의 통합이 CISH 단백질의 기능적 버전을 제공하도록 하나 이상의 유전자 (예를 들어, CISH 유전자)의 돌연변이체 버전을 포함한다. 숙주 세포는 하나 이상의 뉴클레아제 발현 벡터로 안정적으로 형질전환되거나 일시적으로 형질감염되거나 이들의 조합일 수 있다. 한 실시양태에서, 숙주 세포는 T 이펙터 세포, T 조절 세포 또는 줄기 세포, 예를 들어 조혈 줄기 세포 또는 유도된 만능성 줄기 세포이다. 다른 실시양태에서, 하나 이상의 뉴클레아제 발현 벡터는 숙주 세포에서 하나 이상의 뉴클레아제를 발현한다. 또 다른 실시양태에서, 숙주 세포는 외인성 폴리뉴클레오티드 공여자 서열 (예를 들어, CISH 단백질을 코딩함)을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 실시양태에서, 숙주 세포는 배아 세포, 예를 들어 하나 이상의 마우스, 래트, 토끼 또는 다른 포유동물 세포 배아 (예를 들어, 비인간 영장류)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 조직을 포함한다. 내인성 CISH 유전자 (예를 들어, 내인성 CISH 유전자의 엑손 2 또는 3)에 변형 (예를 들어, 통합된 공여자 서열)을 포함하는 만능성, 전능성, 다능성 또는 분화된 세포를 포함하는, 본원에 기재된 세포로부터 유래된 세포 또는 세포주가 또한 기재되어 있다. 특정 실시양태에서, 내인성 CISH 유전자 (예를 들어, 내인성 CISH의 엑손 2 또는 엑손 3)에 변형 (예를 들어, 통합된 공여자 서열)을 포함하는 본원에 기재된 바와 같은 분화된 세포가 본원에 기재되어 있으며, 상기 분화된 세포는 본원에 기재된 바와 같은 줄기 세포로부터 유래된다.
- [0037] 또 다른 측면에서, (a) 뉴클레아제(들)가 발현되고 하나 이상의 CISH 유전자가 절단되도록 하는 조건 하에 하나 이상의 CISH 유전자를 표적화하는 하나 이상의 뉴클레아제를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입하는 것을 포함하는, 세포에서 CISH 유전자를 절단하는 방법이 본원에 기재되어 있다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제에 의한 절단 후, 표적 CISH 유전자에서 게놈 서열은 예를 들어 본원에 기재된 바와 같은 뉴클레아제 (또는 뉴클레아제를 코딩하는 벡터)를 사용하여 절단되며, 공여자 서열이 세포에서 발현되도록 ZFN, TALEN, TtAgo 또는 CRISPR/Cas 시스템에 의한 표적화된 절단 후 "공여자" 서열이 유전자에 삽입된다. 공여자 서열은 기능적 CISH 단백질을 코딩할 수 있다. 일부 실시양태에서, 공여자 서열은 부분적 CISH 유전자 서열을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 공여자는 면역조정 분자, 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함한다. 또한, 공여자 서열은 별도의 전달 메커니즘에 존재하는 뉴클레아제 전달 시스템 (예를 들어, 비-바이러스 벡터, LNP

또는 바이러스 벡터)에 존재할 수 있거나 (예를 들어, 네이키드 폴리뉴클레오타이드로서 또는 LNP 전달을 통해 mRNA 형태로 전달된 뉴클레아제 및 바이러스 벡터, 예컨대 AAV를 사용하여 전달된 공여자), 대안적으로, 별도의 및/또는 상이한 핵산 전달 메커니즘을 사용하여 세포에 도입될 수 있다. CISH 유전자좌로의 공여자 뉴클레오타이드 서열의 삽입은 각각 내인성 CISH 유전자 제어 요소의 제어 하에 트랜스진의 발현을 야기할 수 있다. 일부 측면에서, 관심있는 트랜스진의 삽입은 무손상 외인성 단백질 서열의 발현을 야기하고, 임의의 CISH-코딩된 아미노산이 결여된다. 다른 측면에서, 발현된 외인성 단백질은 융합 단백질이고, 트랜스진에 의해 및 CISH 유전자에 의해 코딩된 아미노산을 포함한다. 일부 경우에, CISH 서열은 외인성 단백질의 아미노 (N)-말단 부분 상에 존재할 것이나, 다른 경우에, CISH 서열은 외인성 단백질의 카르복시 (C)-말단 부분 상에 존재할 것이다. 다른 경우에, CISH 서열은 외인성 단백질의 N- 및 C-말단 부분 둘 모두에 존재할 것이다. 공여자는 또한 CISH의 발현이 회복되도록 CISH 단백질을 발현하지 않는 (또는 정상적인 야생형 수준 미만의 수준으로 발현하는) 돌연변이체 내인성 CISH 유전자로 통합된 "보정" 서열일 수 있다.

[0038] 일부 실시양태에서, 본 발명은 생체내에서 CISH 프로모터의 제어 하에 트랜스진을 발현하는데 사용될 수 있는 방법 및 조성물을 기재한다. 일부 측면에서, 트랜스진은 관심있는 치료 단백질을 코딩할 수 있다. 트랜스진은 본 발명의 방법이 단백질 대체에 사용될 수 있도록 단백질을 코딩할 수 있다. 일부 측면에서, 트랜스진은 T-세포 반응성을 조정하고 암 또는 면역 관련 상태를 치료 및/또는 예방하는 단백질을 코딩한다.

[0039] 일부 실시양태에서, 뉴클레아제 표적 및/또는 절단 부위는 트랜스진 (예를 들어, CAR, 야생형 및 조작된 TCR, 예컨대 ACTR)이 CISH의 엑손 영역, 예를 들어 엑손 2 또는 엑손 3으로 통합되도록 CISH 유전자의 엑손 내에 있다. 트랜스진은 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 관심있는 또 다른 내인성 또는 외인성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있으며, 상기 외인성 프로모터는 트랜스진의 발현을 구동한다. 그러므로, (내인성 또는 외인성 프로모터로부터) 발현된 트랜스진을 포함하는 본원의 유전자 변형된 세포는 세포 배양 (단백질이 단리될 수 있음)에서 단백질 (트랜스진으로부터)의 생성을 위한 시험관내 방법 또는 단백질을 이를 필요로 하는 대상체에게 제공하기 위한 생체외 (세포 요법) 방법 (예를 들어, 암을 갖는 대상체에게 CAR 또는 대상체에서 비정상적으로 발현되거나 발현되지 않는 단백질을 제공함)에 사용될 수 있다.

[0040] 또 다른 측면에서, 공여자가 뉴클레아제에 의해 표적화된 내인성 유전자로 통합되도록, CISH 단백질을 코딩하는 하나 이상의 공여자 서열의 존재 하에 하나 이상의 뉴클레아제 (예를 들어, ZFN, TALEN, TtAgo, CRISPR/Cas 시스템)를 코딩하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 세포에게 투여하는 것을 포함하는, 내인성 유전자의 변형 방법이 기재되어 있다. 하나 이상의 공여자 분자(들)의 통합은 상동성-지정 복구 (HDR)를 통해 또는 비상동성 말단 연결 (NHEJ) 연관된 복구에 의해 일어난다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제의 하나 이상의 쌍이 사용되며, 상기 뉴클레아제는 동일한 또는 상이한 핵산에 의해 코딩될 수 있다.

[0041] 또 다른 측면에서, 유전자 변형된 CISH 유전자를 포함하는 세포 (예를 들어, T 이펙터 세포, T 조절 세포 또는 줄기 세포)가 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 유전자 변형된 세포는 CISH 유전자의 엑손 2 및/또는 엑손 3 내에 유전자 변형, 예를 들어 뉴클레아제에 의해 생성된 변형을 포함한다. 특정 실시양태에서, 유전자 변형된 CISH 유전자는 CISH 유전자에 표 2에 나타난 바와 같은 서열의 9-20개 염기 쌍의 표적 부위로 표적화된 뉴클레아제에 의한 절단 후에 하나 이상의 삽입 및/또는 결실 (indel이라고 공지됨)을 포함하며, 여기서 유전자는 뉴클레아제에 의한 절단 후 불활성화된다. 유전자 변형은 표적 부위(들) 및/또는 절단 부위(들) 내에 및/또는 표적 부위의 가장자리의 1-50개 염기 쌍 내에 있을 수 있다. 다른 실시양태에서, 변형은 본원에 기재된 바와 같은 뉴클레아제에 의한 절단 후에 외인성 서열, 예를 들어 트랜스진 (예를 들어, CAR, 면역조정 인자, 조작된 또는 외인성 TCR 또는 ACTR 등)의 삽입을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포는 본원에 기재된 방법에 의해 생성된다. 다른 바람직한 실시양태에서, 트랜스진은 CISH의 엑손 (예를 들어, 엑손 2 또는 3을 포함하나 이에 제한되지는 않음, 표 2에 나타난 바와 같은 서열의 9-20개 뉴클레오타이드의 서열의 5-10개 염기 쌍으로 또는 내에)으로 통합된다. 통합된 트랜스진을 포함하는 세포는 내인성 프로모터 (예를 들어, 각각 CISH 프로모터)로부터 트랜스진을 발현할 수 있거나, 대안적으로 트랜스진은 조절 및 제어 요소, 예컨대 트랜스진의 발현을 구동하는 외인성 프로모터를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 트랜스진을 포함하는 세포는 게놈으로 통합된 임의의 바이러스 벡터 서열을 포함하지 않는다. 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 세포는 시험관내 용도, 예컨대 단백질 생성 (통합된 트랜스진으로부터) 및/또는 암 또는 염증성 질환의 치료에 사용하기 위한 분자의 스크리닝을 포함하는, 변형된 CISH 유전자를 갖는 세포 또는 동물 모델의 제공에 사용될 수 있다. 또한, 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 세포는 세포의 제공 (생체외 세포 요법)을 통해 단백질을 이를 필요로 하는 대상체에게 제공하는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않는 생체내 용도를 위해 사용될 수 있다.

[0042] 본원에 기재된 임의의 방법 및 조성물에서, 세포는 임의의 진핵생물 세포일 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포

는 T 이펙터 세포, T 조절 세포 또는 줄기 세포이다. 다른 실시양태에서, 세포는 환자-유래이며, 예를 들어 자가유래 CD34+ (조혈) 줄기 세포 (예를 들어, 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF) 투여를 통해 골수로부터 말초 혈액으로 환자에서 동원됨)이다. CD34+ 세포는 수확, 정제, 배양될 수 있으며, 뉴클레아제 및/또는 CISH 공여자 (예를 들어, 아데노바이러스 벡터 공여자)는 임의의 적합한 방법에 의해 세포로 도입될 수 있다.

[0043] 일부 측면에서, 줄기 또는 성숙 세포는 세포 요법, 예를 들어 성숙 세포를 사용한 T 세포 이식에 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, T 세포 이식에 사용하기 위한 세포는 관심있는 또 다른 유전자 변형을 함유한다. 한 측면에서, T 세포는 암 마커에 특이적인 삽입된 키메라 항원 수용체 (CAR)를 함유한다. 추가 측면에서, 삽입된 CAR은 B 세포 악성종양의 특징인 CD19 마커에 특이적이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 자가면역 질환에 특이적인 CAR을 포함한다. 일부 실시양태에서, T 세포는 조절 T 세포이며, 이식 거부 예방에 유용한 CAR을 포함한다.

[0044] 또 다른 측면에서, 본 발명의 방법 및 조성물은 본원에 기재된 바와 같은 조성물 (뉴클레아제, 제약 조성물, 폴리뉴클레오티드, 발현 벡터, 세포, 세포주 및/또는 동물, 예컨대 트랜스제닉 동물)의 용도, 예를 들어 암, 예컨대 B 세포 악성종양 (예를 들어, B 세포 급성 림프모구성 백혈병 (B-ALL), B 세포 비호지킨 림프종 (B-NHL), 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 및 호지킨 림프종의 치료에서의 용도 (Wang, et al. (2017) J. Hematol Oncol 10(1):53) 또는 염증성 질환의 치료를 위한 용도 (예를 들어, 결장염, 문헌 [Blat, et al. (2014) Mol Ther 22(5):1018-1028] 참조)를 제공한다. 특정 실시양태에서, 이들 조성물은 암 또는 염증성 장애의 치료에 사용하기 위한 약물 라이브러리 및/또는 다른 치료 조성물 (즉, 항체, 구조적 RNA 등)의 스크리닝에 사용된다. 이러한 스크리닝은 조작된 세포주 또는 일차 세포로 세포 수준에서 시작될 수 있으며, 전체 동물의 치료 수준 (예를 들어, 수의학 또는 인간 요법)까지 진행할 수 있다. 그러므로, 특정 측면에서, 암 또는 염증의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체에게 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 뉴클레아제, 폴리뉴클레오티드 및/또는 세포를 투여하는 것을 포함하는, 암 또는 염증의 치료 및/또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 암 또는 염증의 치료 및/또는 예방 방법이 본원에 기재되어 있다. 방법은 생체외 또는 생체내일 수 있다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포 (예를 들어, CISH 유전자로 통합된 트랜스젠을 포함하는 세포)는 대상체에게 투여된다. 본원에 기재된 임의의 방법에서, 세포는 대상체로부터 유래된 줄기 세포 (환자-유래 줄기 세포)일 수 있다.

[0045] 본원에 기재된 임의의 조성물 및 방법에서, 뉴클레아제는 mRNA 형태로 및/또는 하나 이상의 비-바이러스, LNP 또는 바이러스 벡터(들)를 사용하여 도입된다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제(들)는 mRNA 형태로 도입된다. 다른 실시양태에서, 트랜스젠은 바이러스 벡터, 예를 들어 AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV 8.2, AAV9, AAV rh10, AAV2/8, AAV2/5 및 AAV2/6을 포함하는 아데노-연관 벡터 (AAV)를 사용하여, 또는 렌티바이러스 또는 통합-결합 렌티바이러스 벡터를 통해 도입되며, 뉴클레아제(들)는 mRNA 형태로 도입된다. 추가 실시양태에서, 뉴클레아제(들) 및 공여자 둘 모두는 하나 이상의 바이러스 또는 비-바이러스 벡터를 사용하여 도입된다. 뉴클레아제 및 공여자는 동일한 벡터, 동일한 유형의 상이한 벡터 또는 상이한 유형의 상이한 벡터 상에 운반될 수 있다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제(들)는 mRNA 형태로 (예를 들어, 전기천공을 통해) 도입되고, 공여자는 AAV (예를 들어, AAV2/6), 렌티바이러스 또는 통합 결합 렌티바이러스를 사용하여 도입된다. 특정 실시양태에서, 공여자는 단일-가닥 DNA로서 도입된다.

[0046] 뉴클레아제(들) 및 공여자는 공동으로 또는 순서대로 도입될 수 있다. 순차적으로 도입되는 경우, 뉴클레아제 및 공여자의 투여 사이에 임의의 시간 기간 (예를 들어, 수 초 내지 수 시간)이 경과할 수 있다. 특정 실시양태에서, 공여자가 도입되고, 12-36시간 (또는 그 사이의 임의의 시간) 후, 뉴클레아제(들)가 세포에 도입된다. 특정 실시양태에서, 변형된 세포는 수 시간 내지 수 일 (또는 그 사이의 임의의 시간) 동안 인큐베이션된 후, 분취되고 동결된다.

[0047] 원핵생물 또는 진핵생물 세포, 예컨대 박테리아, 곤충, 효모, 어류, 포유동물 (비인간 포유동물을 포함함), 및 식물 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 세포는 본 발명의 조성물 및 방법을 사용하여 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 세포는 면역 세포, 예를 들어 T-세포 (예를 들어, CD4+, CD3+, CD8+ 등), 수지상 세포, B 세포 등이다. 다른 실시양태에서, 세포는 만능성, 전능성 또는 다능성 줄기 세포, 예를 들어 유도된 만능성 줄기 세포 (iPSC), 조혈 줄기 세포 (예를 들어, CD34+), 배아 줄기 세포 등이다. 본원에 기재된 임의의 방법 또는 조성물에서, CISH-코딩 트랜스젠을 함유하는 세포는 줄기 또는 전조 세포일 수 있다. 본 발명의 방법 및 조성물로 사용될 수 있는 특정 줄기 세포 유형은 배아 줄기 세포 (ESC), 유도된 만능성 줄기 세포 (iPSC) 및 조혈 줄기 세포 (예를 들어, CD34+ 세포)를 포함한다. iPSC는 환자 샘플 및/또는 정상 대조군으로부터 유래될 수 있으며, 여기서 환자 유래된 iPSC는 관심있는 유전자에서 정상 또는 야생형 유전자 서열로 돌연변이될 수



있거나, 정상 세포는 관심있는 유전자에서 공지된 질환 대립유전자로 변경될 수 있다. 유사하게, 조혈 줄기 세포는 환자 또는 공여자로부터 단리될 수 있다. 그 후, 이들 세포는 기능적 단백질(들), 예컨대 CAR을 발현하도록 조작되고, 증식된 후, 환자에게 재도입된다. 특정 실시양태에서, 세포는 환자 유래된 조혈 줄기 세포이다. 다른 실시양태에서, 세포는 COS, CHO (예를 들어, CHO-S, CHO-K1, CHO-DG44, CHO-DUXB11, CHO-DUKX, CHOK1SV), VERO, MDCK, WI38, V79, B14AF28-G3, BHK, HaK, NSO, SP2/0-Ag14, HeLa, HEK293 (예를 들어, HEK293-F, HEK293-H, HEK293-T), 및 perC6 세포이다.

[0048] 그러므로, 외인성 서열 (예컨대, CAR)의 발현과 함께 또는 발현 없이 CISH의 불활성화를 포함하여 CISH 유전자 발현을 조정하기 위한 방법 및 조성물이 본원에 기재되어 있다. 조성물 및 방법은 시험관내에서, 생체내에서 또는 생체외에서 사용하기 위한 것일 수 있으며, 임의로 뉴클레아제에 의한 절단 후 CISH 유전자로 통합된 공여자를 갖는 뉴클레아제의 경우, CISH 유전자로 표적화된 DNA-결합 도메인을 포함하는 뉴클레아제 또는 인공 전사인자를 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포는 암 또는 염증성 질환 상태에 있다. 다른 실시양태에서, 세포는 본원에 기재된 임의의 방법으로 변형되고, 변형된 세포는 이를 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 암 또는 염증성 장애를 갖는 대상체)에게 투여된다. 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 세포를 포함하는, 유전자 변형된 CISH 유전자 (예를 들어, 외인성 서열)를 포함하는 유전자 변형된 세포 (예를 들어, 줄기 세포, 전구 세포, T 세포, 근육 세포 등)가 또한 제공된다. 이들 세포는 암 또는 염증성 질환을 갖는 대상체에게 치료 단백질(들)을 제공하기 위해, 예를 들어 상기 세포(들)를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 사용될 수 있거나, 대안적으로 세포에 의해 생성된 단백질을 단리하고 단백질을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여함으로써 사용될 수 있다 (효소 대체 요법).

[0049] 본 발명의 핵산, 단백질 및/또는 세포를 포함하는 키트가 또한 제공된다. 키트는 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 (예를 들어, 적합한 발현 벡터에 함유된 RNA 분자 또는 ZFN, TALEN, TtAgo 또는 CRISPR/Cas 시스템 코딩 유전자), 또는 뉴클레아제 단백질, 공여자 분자, 적합한 줄기 변형제, 세포의 분취액, 본 발명의 방법을 수행하기 위한 지침서 등을 포함할 수 있다.

[0050] 이들 및 다른 측면은 전체로서 개시내용의 관점에서 통상의 기술자에게 쉽게 명백할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0051] 도 1은 CISH 유전자 (서열식별번호:48)의 엑손 2 및 3 (음영)을 포함하는 부분 서열을 나타내고, 또한 유전자에서 예시적인 뉴클레아제 표적 부위 (박스)를 나타낸다.

도 2A 내지 2D는 지시된 조건 하에 처리된 T 세포의 FACS 분석을 나타낸다. 도 2A ("모의")는 세포가 뉴클레아제 시약으로 처리되지 않았지만 달리 다른 세포와 동일한 방식으로 처리된 결과를 나타낸다. 도 2B ("AAV 단독")는 세포가 AAV-GFP 공여자만을 받은 결과를 나타낸다. 도 2C ("ZFN 단독")는 세포가 CISH-표적화된 뉴클레아제 (mRNA로서 투여됨)만을 받은 결과를 나타내고; 도 2D ("ZFN+AAV")는 세포가 AAV-GFP 공여자 및 CISH-표적화된 ZFN 둘 모두로 처리된 결과를 나타낸다. 나타낸 바와 같이, GFP가 거의 (AAV 단독) 또는 전혀 (모의 및 ZFN 단독) 발현되지 않은 다른 모든 처리 조건과 비교하여, 뉴클레아제 및 공여자로 처리된 세포의 적어도 75%는 GFP를 발현하였다.

도 3은 지시된 조건 하에 처리된 이펙터 T 세포의 FACS 분석을 나타낸다. "공여자 단독"은 AAV-hPGK-GFP 공여자만을 받은 세포를 지칭하고, "ZFN + 공여자"는 AAV-hPGK-GFP 공여자 및 CISH-표적화된 ZFN 둘 모두로 처리된 세포를 지칭한다. 나타낸 바와 같이, 어떠한 GFP도 발현하지 않은 AAV 공여자 단독으로 처리된 세포와 비교하여, 뉴클레아제 및 공여자로 처리된 세포의 약 72.6%는 GFP를 발현하였다.

도 4는 지시된 조건 하에 처리된 이펙터 T 세포의 Miseq 유전형 분석의 결과를 나타내는 그래프이다. "모의"는 뉴클레아제 시약으로 처리되지 않았지만 달리 다른 세포와 동일한 방식으로 처리된 세포를 지칭하고; "PGK-GFP 공여자"는 AAV-hPGK-GFP 공여자만을 받은 세포를 지칭하고; "ZFN"은 CISH-표적화된 뉴클레아제만이 mRNA로서 투여된 세포를 지칭하고; "ZFN + PGK-GFP 공여자"는 AAV-hPGK-GFP 공여자 및 CISH-표적화된 ZFN 둘 모두로 처리된 세포를 지칭한다. 나타낸 바와 같이, 뉴클레아제 (ZFN 및 ZFN + 공여자)로 처리된 세포에서 대립유전자의 약 90%가 변형된 반면, AAV 공여자 및 ZFN 둘 모두로 처리된 세포만이 공여자의 표적화된 통합 (TI)의 높은 수준 (약 45%)을 얻었다. AAV 공여자 단독 또는 모의로 처리된 군은 검출가능한 수준의 게놈 변형을 갖지 않았다.

도 5는 지시된 조건 하에 처리된 이펙터 T 세포의 Miseq 유전형 분석을 나타내는 그래프이다. "모의"는 뉴클레아제 시약으로 처리되지 않았지만 달리 다른 세포와 동일한 방식으로 처리된 세포를 지칭하고, "ZFN + 공여자"

는 상응하는 AAV-GFP 공여자와 함께 AAVS1 또는 CISH-표적화된 ZFN으로 처리된 세포를 지칭한다. 나타낸 바와 같이, 뉴클레아제 (ZFN + 공여자)로 처리된 세포에서 대립유전자의 약 50-60%가 변형된 반면, 모의 군은 검출가능한 수준의 게놈 변형을 갖지 않았다.

도 6은 루미넥스(Luminex) 분석을 통해 면역자극 시토카인 분비에 의해 평가된 바와 같은 이펙터 T 세포 기능성 데이터를 나타내는 그래프이다. "ZFN + 공여자"는 상응하는 AAV-GFP 공여자와 함께 AAVS1 또는 CISH-표적화된 ZFN으로 처리된 세포를 지칭한다. 나타낸 바와 같이, CISH로의 트랜스진 공여자의 TI는 게놈 세이프 하버(safe harbor) 유전자좌 AAVS1로의 TI와 비교하여 이펙터 T 세포의 증가된 면역자극 기능 (즉, TNF $\alpha$  상향조절)을 초래하며, 이는 아마도 대량의 세포에서 CISH 발현의 녹아웃으로 인한 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0052] <상세한 설명>

[0053] 세포 (예를 들어, T-세포 또는 림프구 전구체, 예컨대 CD34+ 조혈 줄기 세포)의 CISH 유전자로의 트랜스진 단백질 (예를 들어, CAR, TCR, ACTR, 및/또는 임의의 다른 치료 단백질) 트랜스진의 통합을 통한 변형을 포함하는, CISH 유전자의 표적화된 변형을 위한 조성물 및 방법이 본원에 개시되어 있다. 방법 및 조성물은 T 이펙터 세포 (CD4+ 또는 CD8+) 및 T 조절 세포 (CD4+, CD25+, CD127lo, FOXP3+)의 변형에 사용될 수 있다. 세포는 암, 염증성 장애, 자가면역 질환 또는 이식을 갖는 대상체에서 기능적 단백질을 발현하는 세포로의 이들 전구체의 후속적 생체내 분화가 세포에 의해 제공되도록 환자에게 주입하기에 적합하며, 상기 세포는 수용자 환자에서 질환을 치료 및/또는 예방할 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 세포 (예를 들어, CISH 유전자에서 indel 및/또는 트랜스진)는 기능적 CISH 단백질을 발현하는 세포로의 이들 줄기 세포의 후속적 생체내 분화가 환자에서 질환 (예를 들어, 암, 염증성 장애 등)을 치료 및/또는 예방하도록 환자에게 주입하기에 적합하다. 또한, 본원에 기재된 바와 같은 세포 (세포 또는 세포주의 집단)는 스크리닝을 위한 세포, 세포주 또는 동물 모델을 생성하고/거나 통합된 트랜스진으로부터 단백질을 생성하기 위해 시험관내에서 사용될 수 있으며, 상기 단백질은 단리되고, 대상체를 치료하는데 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명은 암, 염증성 장애, 자가면역 질환 또는 이식을 치료 및/또는 예방하거나 T 세포를 재지정하는 수용체로서 작용하는 단백질을 포함하는 임의의 기능적 단백질을 코딩하는 서열을 포함하는 공여자의 통합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 CISH 유전자로의 임의의 유전자 변형을 고려한다.

[0055] 일반

[0056] 본원에 개시된 방법의 실행, 뿐만 아니라 조성물의 제조 및 사용은 달리 표시하지 않는 한, 관련 기술분야의 기술 내에 있는 바와 같은 분자 생물학, 생화학, 염색질 구조 및 분석, 전산 화학, 세포 배양, 재조합 DNA 및 관련 분야에서 통상적인 기술을 사용한다. 이들 기술은 문헌에 충분히 설명되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook, et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 and Third edition, 2001]; [Ausubel, et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, 1987 and periodic updates]; [the series METHODS IN ENZYMOLOGY, Academic Press, San Diego]; [Wolffe, CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION, Third edition, Academic Press, San Diego, 1998]; [METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 304, "Chromatin" (P.M. Wassarman and A. P. Wolffe, eds.), Academic Press, San Diego, 1999]; 및 [METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 119, "Chromatin Protocols" (P.B. Becker, ed.) Humana Press, Totowa, 1999]을 참조한다.

[0057] 정의

[0058] 용어 "핵산," "폴리뉴클레오타이드" 및 "올리고뉴클레오타이드"는 상호교환적으로 사용되고, 선형 또는 원형 형태, 및 단일-가닥 또는 이중-가닥 형태의 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중합체를 지칭한다. 본 개시내용의 목적을 위해, 이들 용어는 중합체의 길이와 관련하여 제한되는 것으로 해석되어서는 안된다. 상기 용어는 염기, 당 및/또는 포스페이트 모이어티 (예를 들어, 포스포로티오에이트 백본)에서 변형된 뉴클레오타이드, 뿐만 아니라 자연 뉴클레오타이드의 공지된 유사체를 포함할 수 있다. 일반적으로, 특정 뉴클레오타이드의 유사체는 동일한 염기-쌍형성 특이성을 가지며; 즉, A의 유사체는 T와 염기-쌍을 형성할 것이다.

[0059] 용어 "폴리펩티드," "펩티드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 중합체를 지칭하는데 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 또한 하나 이상의 아미노산이 상응하는 자연-발생 아미노산의 화학적 유사체 또는 변형된 유도체인 아미노산 중합체에 적용된다.

- [0060] "결합"은 거대분자 사이 (예를 들어, 단백질 및 핵산 사이)의 서열-특이적 비공유결합 상호작용을 지칭한다. 상호작용이 전체로서 서열-특이적인 한, 결합 상호작용의 모든 구성성분이 서열-특이적일 필요는 없다 (예를 들어, DNA 백본에서 포스페이트 잔기와와의 접촉). 이러한 상호작용은 일반적으로  $10^{-6} \text{ M}^{-1}$  이하의 해리 상수 ( $K_d$ )를 특징으로 한다. "친화도"는 결합의 세기를 지칭하며, 증가된 결합 친화도는 더 낮은  $K_d$ 와 상관관계가 있다.
- [0061] "결합 도메인"은 또 다른 분자에 비공유결합으로 결합할 수 있는 분자이다. 결합 분자는 예를 들어, DNA 분자 (DNA-결합 단백질, 예컨대 아연 핑거 단백질 또는 TAL-이펙터 도메인 단백질 또는 단일 가이드 RNA), RNA 분자 (RNA-결합 단백질) 및/또는 단백질 분자 (단백질-결합 단백질)에 결합할 수 있다. 단백질-결합 분자의 경우, 이는 그 자체에 결합할 수 있고/거나 (동종이량체, 동종삼량체 등을 형성함), 상이한 단백질 또는 단백질들의 하나 이상의 분자에 결합할 수 있다. 결합 분자는 하나 초과 유형의 결합 활성을 가질 수 있다. 예를 들어, 아연 핑거 단백질은 DNA-결합, RNA-결합 및 단백질-결합 활성을 갖는다. 그러므로, 인공 뉴클레아제 및 전사 인자의 DNA-결합 구성성분을 포함하는 DNA-결합 분자는 ZFP, TALE 및 sgRNA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0062] "아연 핑거 DNA 결합 단백질" (또는 결합 도메인)은 하나 이상의 아연 핑거를 통한 서열-특이적 방식으로 DNA에 결합하는 단백질, 또는 더 큰 단백질 내의 도메인이며, 이는 구조가 아연 이온의 배위를 통해 안정화된 결합 도메인 내의 아미노산 서열의 영역이다. 용어 아연 핑거 DNA 결합 단백질은 종종 아연 핑거 단백질 또는 ZFP로 약칭된다. 인공 뉴클레아제 및 전사 인자는 ZFP DNA-결합 도메인 및 기능적 도메인 (ZFN에 대한 뉴클레아제 도메인 또는 ZFP-TF에 대한 전사 조절 도메인)을 포함할 수 있다. 용어 "아연 핑거 뉴클레아제"는 1개의 ZFN, 뿐만 아니라 표적 유전자를 절단하기 위해 이량체화하는 1쌍의 ZFN (쌍의 구성원은 "좌측 및 우측" 또는 "제1 및 제2" 또는 "쌍"이라고 지칭됨)을 포함한다.
- [0063] "TALE DNA 결합 도메인" 또는 "TALE"은 하나 이상의 TALE 반복 도메인/단위를 포함하는 폴리펩티드이다. 반복 도메인은 그의 동족 표적 DNA 서열에 대한 TALE의 결합에 관여한다. 단일 "반복 단위" ("반복부"라고도 지칭됨)는 전형적으로 길이가 33-35개 아미노산이며, 자연 발생 TALE 단백질 내에 다른 TALE 반복 서열과 적어도 일부 서열 상동성을 나타낸다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,586,526 및 9,458,205를 참조한다. 인공 뉴클레아제 및 전사 인자는 TALE DNA-결합 도메인 및 기능적 도메인을 포함할 수 있다 (TALEN에 대한 뉴클레아제 도메인 또는 TALEN-TF에 대한 전사 조절 도메인). 용어 "TALEN"은 1개의 TALEN, 뿐만 아니라 표적 유전자를 절단하기 위해 이량체화하는 1쌍의 TALEN (쌍의 구성원은 "좌측 및 우측" 또는 "제1 및 제2" 또는 "쌍"이라고 지칭됨)을 포함한다.
- [0064] 아연 핑거 및 TALE 결합 도메인은 예를 들어 자연 발생 아연 핑거 또는 TALE 단백질의 인식 나선 영역의 조작 (하나 이상의 아미노산의 변경)을 통해 미리 결정된 뉴클레오티드 서열에 결합하도록 "조작"될 수 있다. 따라서, 조작된 DNA 결합 단백질 (아연 핑거 또는 TALE)은 비자연 발생 단백질이다. DNA-결합 단백질을 조작하는 방법의 비제한적인 예는 설계 및 선택이다. 설계된 DNA 결합 단백질은 자연에서 발생하지 않는 단백질이며, 그의 설계/조성은 주로 합리적인 기준에 기인한다. 설계를 위한 합리적인 기준은 기존 ZFP 및/또는 TALE 설계 및 결합 데이터의 정보를 저장하는 데이터베이스에서 정보를 처리하기 위한 치환 규칙 및 전산화 알고리즘의 적용을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 6,140,081; 6,453,242; 6,534,261; 및 8,585,526을 참조하며; 또한 국제 특허 공개 번호 WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536; 및 WO 03/016496을 참조한다.
- [0065] "선택된" 아연 핑거 단백질 또는 TALE는 자연에서 발견되지 않는 단백질이며, 그의 생성은 주로 경험적 프로세스, 예컨대 파지 디스플레이, 상호작용 트랩 또는 하이브리드 선택에 기인한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,200,759; 8,586,526; 및 국제 특허 공개 번호 WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; 및 WO 02/099084를 참조한다.
- [0066] "TtAgo"는 유전자 침묵에 관여하는 것으로 생각되는 원핵생물 아르코나우트 단백질이다. TtAgo는 박테리아 테르무스 테르모필루스(*Thermus thermophilus*)로부터 유래된다. 예를 들어, 문헌 [Swartz, et al., *ibid*, G. Sheng, et al. (2013) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 652]을 참조한다. "TtAgo 시스템"은 예를 들어, TtAgo 효소에 의한 절단을 위한 가이드 DNA를 포함하는 필요한 모든 구성성분이다.
- [0067] "재조합"은 비상동성 말단 연결 (NHEJ) 및 상동성 재조합에 의한 공여자 포획을 포함하나 이에 제한되지는 않는 2개의 폴리뉴클레오티드 사이의 유전자 정보의 교환 프로세스를 지칭한다. 본 개시내용의 목적을 위해, "상동성 재조합 (HR)"은 예를 들어, 상동성-지정 복구 메커니즘을 통한 세포에서 이중-가닥 파단의 복구 동안 발생하

는 이러한 교환의 특수화된 형태를 지칭한다. 이 프로세스는 뉴클레오타이드 서열 상동성을 필요로 하고, "표적" 분자 (즉, 이중-가닥 과단을 경험한 분자)의 주형 복구에 대한 "공여자" 분자를 사용하며, "비-교차 유전자 전환" 또는 "짧은 트랙 유전자 전환"이라고 다양하게 공지되어 있으며, 이는 공여자로부터 표적으로의 유전자 정보의 전이를 유발하기 때문이다. 어떠한 특정 이론에도 구속되지를 원하지 않으면서, 이러한 전이는 파괴된 표적 및 공여자 사이에 형성되는 이형이중가닥 DNA의 미스매치 보정, 및/또는 공여자가 표적 및/또는 관련된 프로세스의 일부가 될 것인 유전자 정보를 재합성하는데 사용되는 "합성-의존성 가닥 어닐링"을 수반할 수 있다. 이러한 특수화된 HDR은 종종 공여자 폴리뉴클레오타이드의 서열의 일부 또는 전부가 표적 폴리뉴클레오타이드에 혼입 되도록 표적 분자의 서열의 변경을 초래한다.

[0068] 본 개시내용의 방법에서, 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 표적화된 뉴클레아제는 미리 결정된 부위에서 표적 서열 (예를 들어, 세포 염색질)에서 이중-가닥 과단 (DSB)을 생성한다. DSB는 상동성-지정 복구 또는 비상동성-지정 복구 메커니즘에 의해 결실 및/또는 삽입을 초래할 수 있다. 결실은 임의의 개수의 염기 쌍을 포함할 수 있다. 유사하게, 삽입은 예를 들어, 임의로 과단 영역에서 뉴클레오타이드 서열과 상동성을 갖는 "공여자" 폴리뉴클레오타이드의 통합을 포함하여 임의의 개수의 염기 쌍을 포함할 수 있다. 공여자 서열은 물리적으로 통합될 수 있거나, 대안적으로, 공여자 폴리뉴클레오타이드는 상동성 재조합을 통한 과단의 복구를 위한 주형으로서 사용되며, 이는 공여자에서와 같이 뉴클레오타이드 서열의 전부 또는 일부의 세포 염색질의 도입을 초래한다. 그러므로, 세포 염색질에서 제1 서열은 변경될 수 있고, 특정 실시양태에서, 공여자 폴리뉴클레오타이드에 존재하는 서열로 전환될 수 있다. 그러므로, 용어 "대체하다" 또는 "대체"의 사용은 하나의 뉴클레오타이드 서열을 다른 뉴클레오타이드 서열로 대체하는 것 (즉, 정보 의미에서 서열의 대체)을 나타내는 것으로 이해될 수 있으며, 반드시 하나의 폴리뉴클레오타이드의 다른 폴리뉴클레오타이드로의 물리적 또는 화학적 대체를 필요로 하는 것은 아니다.

[0069] 본원에 기재된 임의의 방법에서, 추가 쌍의 아연-핑거 단백질, TALEN, TtAgo 또는 CRISPR/Cas 시스템은 세포내 추가 표적 부위의 추가 이중-가닥 절단을 위해 사용될 수 있다.

[0070] 본원에 기재된 임의의 방법은 임의의 크기의 공여자의 삽입, 및/또는 관심있는 유전자(들)의 발현을 방해하는 공여자 서열의 표적화된 통합에 의해 세포에서 하나 이상의 표적 서열의 부분적 또는 완전 불활성화를 위해 사용될 수 있다. 부분적으로 또는 완전히 불활성화된 유전자를 갖는 세포주가 또한 제공된다.

[0071] 본원에 기재된 임의의 방법에서, 외인성 뉴클레오타이드 서열 ("공여자 서열" 또는 "트랜스진")은 관심있는 영역에서 게놈 서열과 상동성이 있으나 동일하지 않은 서열을 함유하며, 이에 의해 상동성 재조합을 자극하여 관심있는 영역에서 비동일 서열을 삽입할 수 있다. 그러므로, 특정 실시양태에서, 관심있는 영역에서 서열과 상동성인 공여자 서열의 부분은 대체된 게놈 서열과 약 80 내지 99% (또는 그 사이의 임의의 정수) 서열 동일성을 나타낸다. 다른 실시양태에서, 공여자 및 게놈 서열 사이의 상동성은 99%보다 높으며, 예를 들어 공여자 및 100개 이상의 인접 염기 쌍의 게놈 서열 사이에 오직 1개의 뉴클레오타이드만이 상이할 경우이다. 특정 경우에, 공여자 서열의 비상동성 부분은 새로운 서열이 관심있는 영역에 도입되도록 관심있는 영역에 존재하지 않는 서열을 함유할 수 있다. 이들 경우에, 비상동성 서열은 일반적으로 관심있는 영역에서의 서열과 상동성이 있거나 동일한 50-1,000개의 염기 쌍 (또는 그 사이의 임의의 정수 값) 또는 1,000보다 더 큰 임의의 개수의 염기 쌍의 서열에 의해 플랭킹된다. 다른 실시양태에서, 공여자 서열은 제1 서열과 비상동성이며, 비상동성 재조합 메커니즘에 의해 게놈에 삽입된다.

[0072] "절단"은 DNA 분자의 공유결합 백본의 파손을 지칭한다. 절단은 포스포디에스테르 결합의 효소적 또는 화학적 가수분해를 포함하나 이에 제한되지는 않는 다양한 방법에 의해 개시될 수 있다. 단일-가닥 절단 및 이중-가닥 절단 둘 모두가 가능하고, 이중-가닥 절단은 2개의 별개의 단일-가닥 절단 사건의 결과로서 발생할 수 있다. DNA 절단은 평활 말단 또는 엇갈린 말단의 생성을 초래할 수 있다. 특정 실시양태에서, 융합 폴리펩티드는 표적화된 이중-가닥 DNA 절단을 위해 사용된다.

[0073] "절단 하프-도메인"은 제2 폴리펩티드 (동일한 또는 상이한)와 함께 절단 활성 (바람직하게는 이중-가닥 절단 활성)을 갖는 복합체를 형성하는 폴리펩티드 서열이다. 용어 "제1 및 제2 절단 하프-도메인;" "+ 및 - 절단 하프-도메인" 및 "우측 및 좌측 절단 하프-도메인"은 이량체화하는 절단 하프-도메인의 쌍을 지칭하는데 상호교환적으로 사용된다.

[0074] "조작된 절단 하프-도메인"은 또 다른 절단 하프-도메인 (예를 들어, 또 다른 조작된 절단 하프-도메인)과 편성 이종이량체를 형성하도록 변형된 절단 하프-도메인이다. 또한, 미국 특허 번호 8,623,618; 7,888,121; 7,914,796; 및 8,034,598을 참조하며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.



- [0075] 용어 "서열"은 DNA 또는 RNA일 수 있는 임의의 길이의 뉴클레오타이드 서열을 지칭하며; 선형, 원형 또는 분지형 일 수 있고, 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 용어 "공여자 서열"은 게놈에 삽입된 뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 공여자 서열은 임의의 길이, 예를 들어 2 내지 100,000,000개 뉴클레오타이드 길이 (또는 그 사이의 임의의 정수 값 또는 그 이상), 바람직하게는 약 100 내지 100,000개 뉴클레오타이드 길이 (또는 그 사이의 임의의 정수), 보다 바람직하게는 약 2000 내지 20,000개 뉴클레오타이드 길이 (또는 그 사이의 임의의 값) 및 보다 더 바람직하게는 약 5 내지 15 kb (또는 그 사이의 임의의 값)일 수 있다.
- [0076] "염색질"은 세포 게놈을 포함하는 핵단백질 구조이다. 세포 염색질은 핵산, 주로 DNA, 및 히스톤 및 비-히스톤 염색체 단백질을 포함하는 단백질을 포함한다. 대부분의 진핵생물 세포 염색질은 뉴클레오솜 형태로 존재하며, 여기서 뉴클레오솜 코어는 히스톤 H2A, H2B, H3 및 H4를 각각 2개 포함하는 옥타머와 연관된 대략 150개 염기 쌍의 DNA를 포함하며, 링커 DNA (유기체에 따라 가변 길이의)는 뉴클레오솜 코어 사이에서 연장한다. 히스톤 H1의 분자는 일반적으로 링커 DNA와 연관된다. 본 개시내용의 목적을 위해, 용어 "염색질"은 원핵생물 및 진핵생물 둘 모두의 모든 유형의 세포 핵단백질을 포함하는 것을 의미한다. 세포 염색질은 염색체 및 에피솜 염색질 둘 모두를 포함한다.
- [0077] "염색체"는 세포의 게놈의 전부 또는 일부를 포함하는 염색질 복합체이다. 세포의 게놈은 종종 그의 핵형을 특징으로 하며, 이는 세포의 게놈을 포함하는 염색체 모두의 집합체이다. 세포의 게놈은 하나 이상의 염색체를 포함할 수 있다.
- [0078] "에피솜"은 복제 핵산, 핵단백질 복합체, 또는 세포의 염색체 핵형의 일부가 아닌 핵산을 포함하는 다른 구조이다. 에피솜의 예는 플라스미드 및 특정 바이러스 게놈을 포함한다.
- [0079] "접근가능한 영역"은 핵산에 존재하는 표적 부위가 표적 부위를 인식하는 외인성 분자에 의해 결합될 수 있는 세포 염색질의 부위이다. 어떠한 특정 이론에도 구속되기를 원하지 않으면서, 접근가능한 영역은 뉴클레오솜 구조로 포장되지 않은 영역인 것으로 여겨진다. 접근가능한 영역의 별개의 구조는 종종 화학적 및 효소적 프로브, 예를 들어 뉴클레아제에 대한 그의 민감도에 의해 검출될 수 있다.
- [0080] "표적 부위" 또는 "표적 서열"은 결합을 위한 충분한 조건이 존재하는 경우 결합 분자가 결합할 핵산의 부분을 정의하는 핵산 서열이다. 표적 부위는 임의의 길이, 예를 들어 9 내지 20개 이상의 뉴클레오타이드 및 길이일 수 있고, 결합된 뉴클레오타이드는 인접 또는 비인접일 수 있다.
- [0081] "외인성" 분자는 정상적으로는 세포에 존재하지는 않으나 하나 이상의 유전적, 생화학적 또는 다른 방법에 의해 세포에 도입될 수 있는 분자이다. "세포에서의 정상적인 존재"는 세포의 특정 발달 단계 및 환경 조건과 관련하여 결정된다. 그러므로, 예를 들어 근육의 배아 발달 동안에만 존재하는 분자는 성인 근육 세포와 관련하여 외인성 분자이다. 유사하게, 열 충격에 의해 유도된 분자는 비-열-충격 세포와 관련하여 외인성 분자이다. 외인성 분자는 예를 들어, 기능부전 내인성 분자의 기능하는 버전 또는 정상적으로 기능하는 내인성 분자의 기능부전 버전을 포함할 수 있다.
- [0082] 외인성 분자는 특히, 작은 분자, 예컨대 조합 화학 공정에 의해 생성되는 작은 분자, 또는 거대분자, 예컨대 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질, 당단백질, 지단백질, 다당류, 상기 분자의 임의의 변형된 유도체, 또는 상기 분자 중 하나 이상을 포함하는 임의의 복합체일 수 있다. 핵산은 DNA 및 RNA를 포함하며, 단일-가닥 또는 이중-가닥 일 수 있고; 선형, 분지형 또는 원형일 수 있고; 임의의 길이일 수 있다. 핵산은 이중나선을 형성할 수 있는 것, 뿐만 아니라 삼중나선-형성 핵산을 포함한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,176,996 및 5,422,251을 참조한다. 단백질은 DNA-결합 단백질, 전사 인자, 염색질 리모델링 인자, 메틸화된 DNA 결합 단백질, 폴리머라제, 메틸라제, 데메틸라제, 아세틸라제, 데아세틸라제, 키나제, 포스파타제, 인테그라제, 레코미니나제, 리가제, 토포이소머라제, 기라제 및 헬리카제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0083] 외인성 분자는 내인성 분자와 동일한 유형의 분자, 예를 들어 외인성 단백질 또는 핵산일 수 있다. 예를 들어, 외인성 핵산은 세포에 도입된 감염성 바이러스 게놈, 플라스미드 또는 에피솜, 또는 정상적으로는 세포에 존재하지 않는 염색체를 포함할 수 있다. 외인성 분자를 세포에 도입하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 지질-매개 전이 (즉, 중성 및 양이온성 지질을 포함하는 리포솜), 전기천공, 직접 주사, 세포 융합, 입자 충격, 인산칼슘 공침, DEAE-텍스트란-매개 전이 및 바이러스 벡터-매개 전이를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 외인성 분자는 또한 내인성 분자와 동일한 유형의 분자일 수 있지만, 세포가 유래된 것과는 상이한 종으로부터 유래된다. 예를 들어, 인간 핵산 서열은 원래 마우스 또는 햄스터로부터 유래된 세포주에 도입될 수 있다.

- [0084] 대조적으로, "내인성" 분자는 특정 환경 조건 하에 특정 발달 단계에서 특정 세포에 정상적으로 존재하는 분자이다. 예를 들어, 내인성 핵산은 염색체, 미토콘드리아의 게놈, 엽록체 또는 다른 소기관, 또는 자연-발생 에피솜 핵산을 포함할 수 있다. 추가 내인성 분자는 단백질, 예를 들어 전사 인자 및 효소를 포함할 수 있다.
- [0085] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "외인성 핵산의 생성물"은 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 생성물, 예를 들어 전사 생성물 (폴리뉴클레오티드, 예컨대 RNA) 및 번역 생성물 (폴리펩티드)을 모두 포함한다.
- [0086] "융합" 분자는 2개 이상의 서브유닛 분자가 바람직하게는 공유결합으로 연결된 분자이다. 서브유닛 분자는 동일한 화학적 유형의 분자일 수 있거나, 상이한 화학적 유형의 분자일 수 있다. 제1 유형의 융합 분자의 예는 융합 단백질 (예를 들어, ZFP 또는 TALE DNA-결합 도메인 및 하나 이상의 활성화 도메인 사이의 융합) 및 융합 핵산 (예를 들어, 상기 기재된 융합 단백질을 코딩하는 핵산)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 제2 유형의 융합 분자의 예는 삼중나선-형성 핵산 및 폴리펩티드 사이의 융합, 및 작은 그루브 결합제 및 핵산 사이의 융합을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0087] 세포에서 융합 단백질의 발현은 세포로의 융합 단백질의 전달 또는 세포로의 융합 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 전달에 기인할 수 있으며, 여기서 폴리뉴클레오티드는 전사되고, 전사체는 번역되어 융합 단백질을 생성한다. 트랜스-스플라이싱, 폴리펩티드 절단 및 폴리펩티드 라이게이션은 또한 세포에서 단백질의 발현에 관여할 수 있다. 세포로의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 전달 방법은 본 개시내용의 다른 곳에 제공된다.
- [0088] 본 개시내용의 목적을 위해 "유전자"는 이러한 조절 서열이 코딩 및/또는 전사되는 서열에 인접한 것과 관계없이, 유전자 생성물을 코딩하는 DNA 영역 (하기 참조), 뿐만 아니라 유전자 생성물의 생성을 조절하는 모든 DNA 영역을 포함한다. 따라서, 유전자는 프로모터 서열, 종결자, 번역 조절 서열, 예컨대 리보솜 결합 부위 및 내부 리보솜 진입 부위, 인핸서, 사일런서, 인슐레이터, 경계 요소, 복제 원점, 매트릭스 부착 부위 및 유전자와 제어 영역을 포함하나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0089] "유전자 발현"은 유전자에 함유된 정보를 유전자 생성물로 전환시키는 것을 지칭한다. 유전자 생성물은 유전자의 직접적 전사 생성물 (예를 들어, mRNA, tRNA, rRNA, 안티센스 RNA, 리보자임, 구조적 RNA 또는 임의의 다른 유형의 RNA) 또는 mRNA의 번역에 의해 생성되는 단백질일 수 있다. 유전자 생성물은 또한 프로세스, 예컨대 캡핑, 폴리아데닐화, 메틸화 및 편집에 의해 변형된 RNA, 및 예를 들어, 메틸화, 아세틸화, 인산화, 유비퀴틴화, ADP-리보실화, 미리스틸화 및 글리코실화에 의해 변형된 단백질을 포함한다.
- [0090] 유전자 발현의 "조정"은 유전자의 활성의 변화를 지칭한다. 발현의 조정은 유전자 활성화 및 유전자 억제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 게놈 편집 (예를 들어, 절단, 변경, 불활성화, 무작위 돌연변이)은 발현을 조정하는데 사용될 수 있다. 유전자 불활성화는 본원에 기재된 바와 같은 ZFP, TALE, TtAgo 또는 CRISPR/Cas 시스템을 포함하지 않는 세포와 비교하여 유전자 발현의 임의의 감소를 지칭한다. 그러므로, 유전자 불활성화는 부분적이거나 완전할 수 있다.
- [0091] "관심있는 영역"은 예를 들어, 외인성 분자에 결합하는 것이 바람직한 유전자 또는 유전자 내에 또는 이에 인접한 비코딩 서열과 같은 세포 염색질의 임의의 영역이다. 결합은 표적화된 DNA 절단 및/또는 표적화된 재조합의 목적을 위한 것일 수 있다. 관심있는 영역은 예를 들어, 염색체, 에피솜, 소기관 게놈 (예를 들어, 미토콘드리아, 엽록체), 또는 감염성 바이러스 게놈에 존재할 수 있다. 관심있는 영역은 유전자의 코딩 영역 내에, 예를 들어 리더 서열, 트레일러 서열 또는 인트론과 같은 전사된 비코딩 영역 내에, 또는 코딩 영역의 상류 또는 하류에 있는 비전사된 영역 내에 있을 수 있다. 관심있는 영역은 단일 뉴클레오티드 쌍만큼 작거나, 길이가 2,000개 이하인 뉴클레오티드 쌍, 또는 임의의 정수 값의 뉴클레오티드 쌍일 수 있다.
- [0092] "진핵생물" 세포는 진균 세포 (예컨대, 효모), 식물 세포, 동물 세포, 포유동물 세포, 및 줄기 세포 (만능성 및 다능성)를 포함하는 인간 세포 (예를 들어, T-세포)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0093] "T 이펙터 세포" (Teff)는 자극에 즉시 작용하는 CD4+ 또는 CD8+ T 세포이다. 이들 세포는 분화 후 세포-매개 면역에서 중심적인 역할을 한다. T 세포는 항원 제시 세포에 의한 자극 후에 활성화되고, 중대한 이펙터 기능, 예컨대 세포독성 분자 및 항체의 생성을 수행하는 T 이펙터 세포로 분화된다. T 이펙터 세포는 염증 (예를 들어, 감염)의 부위로 이동하고, 케모카인을 생성하여 추가 면역 세포를 동원한다.
- [0094] "조절 T 세포" (Treg)는 또한 저해제 T 세포라고 공지되어 있으며, 면역계를 조정하고 자기-항원에 대한 내성을 유지하고 자가면역 질환을 예방하는 T 세포의 하위집단이다. Treg는 면역저해성이고, 일반적으로 T 이펙터 세포의 유도 및 증식을 저해하거나 하향조절한다. Treg는 CD4+, CD25+, CD127lo 및 FOXP3+이다.



- [0095] 용어 "자가유래(autologous)"는 나중에 재도입될 동일한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다.
- [0096] 용어 "동종이계"는 물질이 도입되는 개체와 동일한 종의 상이한 개체로부터 유래된 임의의 물질을 지칭한다. 하나 이상의 유전자좌에서의 유전자가 동일하지 않은 경우, 둘 이상의 개체가 서로 동종이계라고 불린다. 일부 측면에서, 동일한 종의 개체로부터의 동종이계 물질은 유전적으로 항원과 상호작용하기에 충분하지 않을 수 있다.
- [0097] 용어 "작동적 연결" 및 "작동적으로 연결된" (또는 "작동가능하게 연결된")은 둘 이상의 구성성분 (예컨대, 서열 요소)의 근위에 관하여 상호교환적으로 사용되며, 여기서 구성성분은 구성성분 둘 모두가 정상적으로 기능하고 구성성분 중 적어도 하나는 다른 구성성분 중 적어도 하나에 가해지는 기능을 매개할 수 있는 가능성을 허용하도록 배열된다. 예시로서, 전사 조절 서열이 하나 이상의 전사 조절 인자의 존재 또는 부재에 반응하여 코딩 서열의 전사 수준을 제어하는 경우, 전사 조절 서열, 예컨대 프로모터는 코딩 서열에 작동적으로 연결된다. 전사 조절 서열은 일반적으로 코딩 서열과 시스에서 작동적으로 연결되지만, 직접적으로 인접할 필요는 없다. 예를 들어, 인핸서는 인접하지 않더라도 코딩 서열에 작동적으로 연결된 전사 조절 서열이다.
- [0098] 융합 폴리펩티드와 관련하여, 용어 "작동적으로 연결된"은 각각의 구성성분이 다른 구성성분으로의 연결에서, 그렇게 연결되지 않은 경우와 동일한 기능을 수행한다는 사실을 지칭할 수 있다. 예를 들어, ZFP, TALE, TtAgo 또는 Cas DNA-결합 도메인이 활성화 도메인에 융합된 융합 폴리펩티드와 관련하여, ZFP, TALE, TtAgo 또는 Cas DNA-결합 도메인 및 활성화 도메인은, 융합 폴리펩티드에서 ZFP, TALE, TtAgo 또는 Cas DNA-결합 도메인 부분이 그의 표적 부위 및/또는 그의 결합 부위에 결합할 수 있는 반면, 활성화 도메인이 유전자 발현을 상향조절할 수 있는 경우, 작동적으로 연결되어 있다. ZFP, TALE, TtAgo 또는 Cas DNA-결합 도메인이 절단 도메인에 융합된 융합 폴리펩티드인 경우, ZFP, TALE, TtAgo 또는 Cas DNA-결합 도메인 및 절단 도메인은, 융합 폴리펩티드에서 ZFP, TALE, TtAgo 또는 Cas DNA-결합 도메인 부분이 그의 표적 부위 및/또는 그의 결합 부위에 결합할 수 있는 반면, 절단 도메인이 표적 부위 근처에서 DNA를 절단할 수 있는 경우, 작동적으로 연결되어 있다.
- [0099] 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산의 "기능적 단편"은 서열이 전장 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산과 동일하지는 않지만 전장 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산과 동일한 기능을 유지하는 단백질, 폴리펩티드 또는 핵산이다. 기능적 단편은 상응하는 천연 분자보다 더 많거나, 더 적거나 또는 동일한 수의 잔기를 보유할 수 있고/거나, 하나 이상의 아미노산 또는 뉴클레오티드 치환을 함유할 수 있다. 핵산의 기능 (예를 들어, 코딩 기능, 또 다른 핵산으로 혼성화하는 능력)을 결정하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 유사하게, 단백질 기능을 결정하는 방법은 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 폴리펩티드의 DNA-결합 기능은 예를 들어, 필터-결합, 전기영동 이동성-이동, 또는 면역침전 검정에 의해 결정될 수 있다. DNA 절단은 겔 전기영동에 의해 결정될 수 있다. 문헌 [Ausubel, et al., supra]을 참조한다. 단백질이 또 다른 단백질과 상호작용하는 능력은 예를 들어, 공동-면역침전, 2-하이브리드 검정 또는 상보성 (유전적 및 생화학적 둘 모두)에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Fields, et al. (1989) Nature 340:245-246]; 미국 특허 번호 5,585,245 및 국제 특허 공개 번호 WO 98/44350을 참조한다.
- [0100] "벡터"는 유전자 서열을 표적 세포로 전이할 수 있다. 전형적으로, "벡터 구축물", "발현 벡터" 및 "유전자 전이 벡터"는 관심있는 유전자의 발현을 지시할 수 있고 유전자 서열을 표적 세포로 전이할 수 있는 임의의 핵산 구축물을 의미한다. 그러므로, 상기 용어는 클로닝 및 발현 비히클, 뿐만 아니라 통합 벡터를 포함한다.
- [0101] 용어 "대상체" 및 "환자"는 상호교환적으로 사용되며, 포유동물, 예컨대 인간 환자 및 비인간 영장류, 뿐만 아니라 실험 동물, 예컨대 토끼, 개, 고양이, 래트, 마우스 및 다른 동물을 지칭한다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "대상체" 또는 "환자"는 본 발명의 뉴클레아제, 공여자 및/또는 유전자 변형된 세포가 투여될 수 있는 임의의 포유동물 환자 또는 대상체를 의미한다. 본 발명의 대상체는 장애를 갖는 대상체를 포함한다.
- [0102] "자가면역 질환"은 면역계가 자가-항원을 공격하는 질환이다. 자가면역 질환의 예는 원관상 홍반 루푸스/심부 홍반 루푸스/ 동창 홍반 루푸스/비대 홍반 루푸스 신장병증을 포함하며, 키메라 수용체는 원관상 홍반 루푸스/심부 홍반 루푸스/ 동창 홍반 루푸스/비대 홍반 루푸스 신장병증과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 원관상 홍반 루푸스/심부 홍반 루푸스/ 동창 홍반 루푸스/비대 홍반 루푸스 신장병증과 연관된 자가항원의 예는 ANA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0103] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 하시모토병이고, 키메라 수용체는 하시모토병과 연관된 자가항원을 포함한다. 하시모토병과 연관된 자가항원의 예는 갑상선 퍼옥시다제 및 티로글로불린을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0104] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 NMDAR 뇌염이고 키메라 수용체는 NMDAR 뇌염과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. NMDAR 뇌염과 연관된 자가항원의 예는 항-N-메틸-D-아스파르테이트 수용체 (NR1 서브유닛)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0105] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 자가면역 용혈성 빈혈이고, 키메라 수용체는 자가면역 용혈성 빈혈과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 자가면역 용혈성 빈혈과 연관된 자가항원의 예는 Rh 혈액형 항원 및 I 항원을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0106] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 심상성 천포창이고, 키메라 수용체는 심상성 천포창과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 심상성 천포창과 연관된 자가항원의 예는 Dsg1/3을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0107] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 수포성 유사천포창이고, 키메라 수용체는 수포성 유사천포창과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 수포성 유사천포창과 연관된 자가항원의 예는 BP 180 및 BP230을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0108] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 중증 근무력증이고, 키메라 수용체는 중증 근무력증과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 중증 근무력증과 연관된 자가항원의 예는 아세틸콜린 니코틴성 시냅스 후 수용체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0109] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 그레이브스병이고, 키메라 수용체는 그레이브스병과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 그레이브스병과 연관된 자가항원의 예는 티로트로핀 수용체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0110] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 특발성 혈소판 감소성 자반증(idiopathic thrombocytopenic purpura)(ITP)이고, 키메라 수용체는 특발성 혈소판 감소성 자반증 (ITP)과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 특발성 혈소판 감소성 자반증과 연관된 자가항원의 예는 혈소판 인테그린 및 GpIIb:IIIa를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0111] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 굿파스처 증후군이고, 키메라 수용체는 굿파스처 증후군과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 굿파스처 증후군과 연관된 자가항원의 예는 콜라겐 알파-3(IV)쇄를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0112] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 류마티스 관절염이고, 키메라 수용체는 류마티스 관절염과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 류마티스 관절염과 연관된 자가항원의 예는 류마티스 인자 및 칼파스타틴을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0113] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 소아 특발성 관절염이고, 키메라 수용체는 소아 특발성 관절염과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 소아 특발성 관절염과 연관된 자가항원의 예는 RF, 시트룰린화 단백질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0114] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 다발성 경화증이고, 키메라 수용체는 다발성 경화증과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 다발성 경화증과 연관된 자가항원의 예는 미엘린 염기성 단백질 (MBP), 미엘린 희돌기교세포 당단백질 (MOG) 펩티드 및 알파-베타-크리스탈린을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0115] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 셀리악병이고, 키메라 수용체는 셀리악병과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 셀리악병과 연관된 자가항원의 예는 조직 트랜스글루타미나제 (TG2)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0116] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 악성 빈혈이고, 키메라 수용체는 악성 빈혈과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 악성 빈혈과 연관된 자가항원의 예는 위벽세포의 내재적 인자를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0117] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 백반증이고, 키메라 수용체는 백반증과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 백반증과 연관된 자가항원의 예는 65-kDa 항원을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0118] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 베체트병이고, 키메라 수용체는 베체트병과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 베체트병과 연관된 자가항원의 예는 포스파티딜세린, 리보솜 인단백질 및 항-호

중구 세포질 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

- [0119] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 경피증이고, 키메라 수용체는 경피증과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 경피증과 연관된 자가항원의 예는 ScI-70, U1-RNP를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0120] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 건선이고, 키메라 수용체는 건선과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 건선과 연관된 자가항원의 예는 칼파스타틴을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0121] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 궤양성 결장염 (UC) 및 크론병이고, 키메라 수용체는 UC 및 크론병과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. UC 및 크론병과 연관된 자가항원의 예는 ANA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0122] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 쇼그렌 증후군이고, 키메라 수용체는 쇼그렌 증후군과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 쇼그렌 증후군과 연관된 자가항원의 예는 SSA 및 항-SSB를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0123] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 베게너 육아종증이고, 키메라 수용체는 베게너 육아종증과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 베게너 육아종증과 연관된 자가항원의 예는 ANA 및 ANCA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0124] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 다발성근염 또는 피부근염이고, 키메라 수용체는 다발성근염 또는 피부근염과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 다발성근염 또는 피부근염과 연관된 자가항원의 예는 Jo-1을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0125] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 원발성 담즙성 간경변증이고, 키메라 수용체는 원발성 담즙성 간경변증과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 원발성 담즙성 간경변증과 연관된 자가항원의 예는 항-미토콘드리아 항체, gp210, p62, sp 100을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0126] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 항인지질 증후군(antiphospholipid syndrome)(APS)이고, 키메라 수용체는 항인지질 증후군과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 항인지질 증후군과 연관된 자가항원의 예는 항인지질 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0127] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 혼합 결합 조직병(mixed connective tissue disease)(MCTD)이고, 키메라 수용체는 혼합 결합 조직병과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 혼합 결합 조직병과 연관된 자가항원의 예는 U1-RNP, U1-70 kd snRNP를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0128] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 밀러 피서 증후군이고, 키메라 수용체는 밀러 피서 증후군과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 밀러 피서 증후군과 연관된 자가항원의 예는 GQ1b ganglioside를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0129] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 길랭-바레 증후군이고, 키메라 수용체는 길랭-바레 증후군과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 길랭-바레 증후군과 연관된 자가항원의 예는 GM1, 아시알로 GM1 및 GD1b를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0130] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 급성 운동 축삭돌기 신경병증이고, 키메라 수용체는 급성 운동 축삭돌기 신경병증과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 급성 운동 축삭돌기 신경병증과 연관된 자가항원의 예는 GM1을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0131] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 자가면역 간염이고, 키메라 수용체는 자가면역 간염과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 자가면역 간염과 연관된 자가항원의 예는 항핵 항체 (ANA) 및 항-평활근 항체 (ASMA), 항-간-신장 마이크로솜-1 항체 (ALKM-1) 및 항-간 시토졸 항체-1 (ALC-1)을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0132] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 포진성 피부염이고, 키메라 수용체는 포진성 피부염과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 포진성 피부염과 연관된 자가항원의 예는 IgA 항-근내막 항체를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0133] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 척-스트라우스 증후군이고, 키메라 수용체는 척-스트라우스 증후군과 연관된

자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 척-스트라우스 증후군과 연관된 자가항원의 예는 항-호중구 세포질 항체 (ANCA)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0134] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 현미경적 다발혈관염이고, 키메라 수용체는 현미경적 다발혈관염과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 현미경적 다발혈관염과 연관된 자가항원의 예는 ANCA를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0135] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 ANCA 혈관염이고, 키메라 수용체는 ANCA 혈관염과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. ANCA 혈관염과 연관된 자가항원의 예는 호중구 과립 단백질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0136] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 급성 류마티스 열이고, 키메라 수용체는 급성 류마티스 열과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 급성 류마티스 열과 연관된 자가항원의 예는 연쇄상구균 세포벽 항원을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0137] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 유형 1 당뇨병 (T1D)이고, 키메라 수용체는 T1D와 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. T1D와 연관된 자가항원의 예는 인슐린 (IAA), 글루탐산 데카르복실라제 (GAD 또는 GAD65) 및 단백질 티로신 포스파타제 (IA2 또는 ICA512)를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0138] 한 실시양태에서, 자가면역 질환은 만성 신장병증이고, 키메라 수용체는 만성 신장병증과 연관된 자가항원 (또는 그의 변이체 또는 단편)을 포함한다. 만성 신장병증과 연관된 자가항원의 예는 PLA2R1 및 THSD7A1을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0139] "줄기"는 줄기 세포-유사 방식으로 작용하는 임의의 세포의 상대 능력, 즉 임의의 특정 줄기 세포가 가질 수 있는 전능성, 만능성 또는 올리고능성 및 증식된 또는 무한정 자기-재생의 정도를 지칭한다. "ACTR"은 외인적으로 공급된 항체에 결합할 수 있는 조작된 T 세포 구성성분인 항체-커플링된 T-세포 수용체이다. ACTR 구성성분에 대한 항체의 결합은 항체에 의해 인식된 항원과 상호작용하기 위해 T 세포를 무장시키고, 그 항원에 직면할 때, T 세포를 포함하는 ACTR은 항원과 상호작용하도록 촉발된다 (미국 특허 공개 번호 2015/0139943 참조).

[0140] 융합 분자

[0141] 세포에서 선택된 표적 유전자 (예를 들어, CISH)의 절단에 유용한 조성물, 예를 들어 뉴클레아제가 본원에 기재되어 있다. 특정 실시양태에서, 융합 분자의 하나 이상의 구성성분 (예를 들어, 뉴클레아제)은 자연적으로 발생한다. 다른 실시양태에서, 융합 분자의 구성성분 (예를 들어, 뉴클레아제) 중 하나 이상은 비자연적으로 발생하며, 즉, DNA-결합 분자 및/또는 절단 도메인(들)에서 조작된다. 예를 들어, 자연-발생 뉴클레아제의 DNA-결합 부분은 선택된 표적 부위에 결합하도록 변경될 수 있다 (예를 들어, 동족 결합 부위와 상이한 부위에 결합하도록 조작된 CRISPR/Cas 시스템 또는 메가뉴클레아제의 단일 가이드 RNA). 다른 실시양태에서, 뉴클레아제는 이중 DNA-결합 및 절단 도메인을 포함한다 (예를 들어, 아연 핑거 뉴클레아제; TAL-이펙터 도메인 DNA 결합 단백질; 이중 절단 도메인을 갖는 메가뉴클레아제 DNA-결합 도메인). 그러므로, 적어도 하나의 ZFN, TALEN, 메가뉴클레아제, CRISPR/Cas 뉴클레아제 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 뉴클레아제가 본 발명의 실시예에 사용될 수 있으며, 상기 뉴클레아제는 표적 유전자를 절단하며, 이러한 절단은 표적 유전자의 게놈 변형을 초래한다 (예를 들어, 절단된 유전자로의 삽입 및/또는 결실).

[0142] 또한, 뉴클레아제 복합체의 조작된 절단 하프-도메인 파트너의 독립적인 적정을 통해 절단 활성의 특이성을 증가시키는 방법이 본원에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 두 파트너 (하프 절단 도메인)의 비율은 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:8, 1:9, 1:10 또는 1:20 비율, 또는 그 사이의 임의의 값으로 제공된다. 다른 실시양태에서, 두 파트너의 비율은 1:30보다 크다. 다른 실시양태에서, 두 파트너는 1:1과 상이한 것으로 선택된 비율로 배치된다. 개별적으로 또는 조합하여 사용되는 경우, 본 발명의 방법 및 조성물은 오프-타겟 절단 활성의 감소를 통해 표적화 특이성의 놀랍고 예상치 못한 증가를 제공한다. 이들 실시양태에서 사용된 뉴클레아제는 ZFN, TALEN, CRISPR/Cas, CRISPR/dCas 및 TtAgo, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0143] A. DNA-결합 분자

[0144] 본원에 기재된 융합 분자는 단백질 도메인 및/또는 폴리뉴클레오타이드 DNA-결합 도메인을 포함하는 임의의 DNA-결합 분자 (DNA-결합 도메인이라고도 지칭됨)를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, DNA-결합 도메인은 표 2에 나타난 서열 (서열식별번호:40-47)의 9 내지 12개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 서열에 결합한다.

[0145] 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물 및 방법은 공여자 분자로의 결합 및/또는 세포의 게놈에서 관심있는



영역으로의 결합을 위해 메가뉴클레아제 (귀소 엔도뉴클레아제) DNA-결합 도메인을 사용한다. 자연-발생 메가뉴클레아제는 15-40개의 염기-쌍 절단 부위를 인식하며, 통상적으로 4개의 패밀리: LAGLIDADG 패밀리, GIY-YIG 패밀리, His-Cyst box 패밀리 및 HNH 패밀리로 그룹화된다. 예시적인 귀소 엔도뉴클레아제는 I-SceI, I-CeuI, PI-PspI, PI-Sce, I-SceIV, I-CsmI, I-PanI, I-SceII, I-PpoI, I-SceIII, I-CreI, I-TevI, I-TevII 및 I-TevIII을 포함한다. 그들의 인식 서열은 공지되어 있다. 또한, 미국 특허 번호 5,420,032 및 6,833,252; 문헌 [Belfort, et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3379-3388]; [Dujon, et al. (1989) Gene 82:115-118]; [Perler, et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22, 1125-1127]; [Jasin (1996) Trends Genet. 12:224-228]; [Gimble, et al. (1996) J. Mol. Biol. 263:163-180]; [Argast, et al. (1998) J. Mol. Biol. 280:345-353] 및 [the New England Biolabs catalogue]을 참조한다. 또한, 귀소 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 DNA-결합 특이성은 비자연 표적 부위에 결합하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Chevalier, et al. (2002) Molec. Cell 10:895-905]; [Epinat, et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:2952-2962]; [Ashworth, et al. (2006) Nature 441:656-659]; [Paques, et al. (2007) Current Gene Therapy 7:49-66]; 및 미국 특허 공개 번호 2007/0117128을 참조한다. 귀소 엔도뉴클레아제 및 메가뉴클레아제의 DNA-결합 도메인은 전체로서 뉴클레아제와 관련하여 변경될 수 있거나 (즉, 뉴클레아제가 동족 절단 도메인을 포함하도록), 이중 절단 도메인에 융합될 수 있다.

[0146] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용된 하나 이상의 뉴클레아제의 DNA-결합 도메인은 자연 발생 또는 조작된 (비자연 발생) TAL 이펙터 DNA 결합 도메인을 포함한다. 예를 들어, 전문이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 8,586,526을 참조한다. 크산토모나스(*Xanthomonas*) 속의 식물 병원성 박테리아는 중요한 작물 식물에서 많은 질환을 일으킨다고 공지되어 있다. 크산토모나스의 병원성은 25개 초과와 상이한 이펙터 단백질을 식물 세포에 주사하는 보존된 유형 III 분비 (T3S) 시스템에 의존한다. 이들 주사된 단백질 중에는 식물 전사 활성인자를 모방하고 식물 전사체를 조작하는 전사 활성인자-유사 (TAL) 이펙터가 있다 (문헌 [Kay, et al. (2007) Science 318:648-651] 참조). 이들 단백질은 DNA 결합 도메인 및 전사 활성화 도메인을 함유한다. 가장 잘 특징화된 TAL-이펙터 중 하나는 크산토모나스 캄페스트그리스 피브이. 베시카토리아(*Xanthomonas campestris pv. Vesicatoria*)로부터의 AvrBs3이다 (문헌 [Bonas, et al. (1989) Mol Gen Genet 218:127-136] 및 국제 특허 공개 번호 WO 2010/079430 참조). TAL-이펙터는 탠덤 반복부의 중앙화된 도메인을 함유하며, 각각의 반복부는 대략 34개의 아미노산을 함유하며, 이는 이들 단백질의 DNA 결합 특이성에 중요하다. 또한, 이들은 핵 편재화 서열 및 산성 전사 활성화 도메인을 함유한다 (검토를 위해, 문헌 [Schornack S, et al. (2006) J Plant Physiol 163(3):256-272] 참조). 또한, 식물병원성 박테리아 랄스토니아 솔라나세아룸(*Ralstonia solanacearum*)에서, brg11 및 hpx17이라고 지칭되는 두 유전자는 알. 솔라나세아룸(*R. solanacearum*) 바이오바(biovar) 1 균주 GMI1000 및 바이오바 4 균주 RS1000에서 크산토모나스의 AvrBs3 패밀리와 상동성인 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Heuer, et al. (2007) Appl and Envir Micro 73(13):4379-4384] 참조). 이들 유전자는 서로 뉴클레오티드 서열이 98.9% 동일하나, hpx17의 반복 도메인에서 1,575 bp의 결실에 의해 상이하다. 그러나, 유전자 생성물 둘 모두는 크산토모나스의 AvrBs3 패밀리 단백질과 40% 미만의 서열 동일성을 갖는다. 예를 들어, 전문이 본원에 참조로 포함된 미국 특허 번호 8,586,526을 참조한다.

[0147] 이들 TAL 이펙터의 특이성은 탠덤 반복부에서 발견되는 서열에 의존한다. 반복된 서열은 대략 102 bp를 포함하고, 반복부는 전형적으로 서로 91-100% 상동성이다 (Bonas, et al., *ibid*). 반복부의 다형성은 통상적으로 위치 12 및 13에 위치되며, TAL-이펙터의 표적 서열에서 인접 뉴클레오티드들의 동일성과 위치 12 및 13에 있는 추가 변이 잔기 (RVD)의 동일성 사이에는 일대일 대응이 있는 것으로 보인다 (문헌 [Moscou and Bogdanove, (2009) Science 326:1501] 및 [Boch, et al. (2009) Science 326:1509-1512] 참조). 실험적으로, 이들 TAL-이펙터의 DNA 인식을 위한 자연 코드는 위치 12 및 13에서 HD 서열이 시토신 (C)에 결합하고, NG가 T에 결합하고, NI가 A, C, G 또는 T에 결합하고, NN이 A 또는 G에 결합하고, ING가 T에 결합하도록 결정되었다. 이들 DNA 결합 반복부는 새로운 조합 및 개수의 반복부를 갖는 단백질로 어셈블리되었으며, 이로써 새로운 서열과 상호작용하고 식물 세포에서 비내인성 리포터 유전자의 발현을 활성화시킬 수 있는 인공 전사 인자가 제조된다 (Boch, et al., *ibid*). 조작된 TAL 단백질은 FokI 절단 하프 도메인에 연결되어 TAL 이펙터 도메인 뉴클레아제 융합체 (TALEN)를 얻었다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,586,526; 문헌 [Christian, et al. (2010) Genetics 186(2):757-61 epub 10.1534/genetics.110.120717]을 참조한다. 특정 실시양태에서, TALE 도메인은 미국 특허 번호 8,586,526에 기재된 바와 같은 N-캡 및/또는 C-캡을 포함한다.

[0148] 특정 실시양태에서, 세포의 게놈의 생체내 절단 및/또는 표적화된 절단을 위해 사용되는 하나 이상의 뉴클레아제의 DNA 결합 도메인은 아연 핑거 단백질을 포함한다. 바람직하게는, 아연 핑거 단백질은 그것이 선택된 표적 부위와 결합하도록 조작된다는 점에서 비자연 발생이다. 예를 들어, 문헌 [Beerli, et al. (2002) Nature

Biotechnol. 20:135-141]; [Pabo, et al. (2001) Ann. Rev. Biochem. 70:313-340]; [Isalan, et al. (2001) Nature Biotechnol. 19:656-660]; [Segal, et al. (2001) Curr. Opin. Biotechnol. 12:632-637]; [Choo, et al. (2000) Curr. Opin. Struct. Biol. 10:411-416]; 미국 특허 번호 6,453,242; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,030,215; 6,794,136; 7,067,317; 7,262,054; 7,070,934; 7,361,635; 7,253,273; 및 미국 특허 공개 번호 2005/0064474; 2007/0218528; 2005/0267061을 참조하며, 모두는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0149] 조작된 아연 핑거 결합 도메인은 자연-발생 아연 핑거 단백질과 비교하여 신규 결합 특이성을 가질 수 있다. 조작하는 방법은 합리적인 설계 및 다양한 유형의 선택을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 합리적인 설계는 예를 들어, 트리플렛 (또는 쿼드러플렛) 뉴클레오티드 서열 및 개별 아연 핑거 아미노산 서열을 포함하는 데이터베이스를 사용하는 것을 포함하며, 여기서 각각의 트리플렛 또는 쿼드러플렛 뉴클레오티드 서열은 특정 트리플렛 또는 쿼드러플렛 서열에 결합하는 아연 핑거의 하나 이상의 아미노산 서열과 회합된다. 예를 들어, 전문이 본원에 참조로 포함된 공동-소유 미국 특허 번호 6,453,242 및 6,534,261을 참조한다.

[0150] 파지 디스플레이 및 2-하이브리드 시스템을 포함하는 예시적인 선택 방법은 미국 특허 번호 5,789,538; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,410,248; 6,140,466; 6,200,759; 및 6,242,568; 뿐만 아니라 국제 특허 공개 번호 WO 98/37186; WO 98/53057; WO 00/27878; WO 01/88197; 및 GB 특허 번호 2,338,237에 개시되어 있다. 또한, 아연 핑거 결합 도메인에 대한 결합 특이성의 향상은 예를 들어, 공동-소유 국제 특허 공개 번호 WO 02/077227에 기재되어 있다.

[0151] 또한, 이들 및 다른 참고문헌에 개시된 바와 같이, 아연 핑거 도메인 및/또는 멀티-핑거 아연 핑거 단백질은 예를 들어, 5개 이상의 아미노산 길이의 링커를 포함하는 임의의 적합한 링커 서열을 사용하여 함께 연결될 수 있다. 또한, 6개 이상의 아미노산 길이의 예시적인 링커 서열에 대하여 미국 특허 번호 6,479,626; 6,903,185; 및 7,153,949를 참조한다. 본원에 기재된 단백질은 단백질의 개별 아연 핑거 사이의 적합한 링커의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0152] ZFP는 ZFN을 형성하기 위해 하나 이상의 뉴클레아제 (절단) 도메인에 작동가능하게 회합 (연결)될 수 있다. 용어 "ZFN"은 표적 유전자를 절단하기 위해 이량체화하는 ZFN의 쌍을 포함한다. 방법 및 조성물은 또한 오프-타겟 부위라고 공지된 다른 의도되지 않은 절단 부위에 비해 그의 의도된 표적에 대해 뉴클레아제 쌍을 포함하는 ZFN의 특이성을 증가시키기 위해 사용될 수 있다 (미국 특허 공개 번호 20180087072 참조). 그러므로, 본원에 기재된 뉴클레아제는 하나 이상의 이들의 DNA 결합 도메인 백본 영역에서의 돌연변이 및/또는 이들의 뉴클레아제 절단 도메인에서의 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 이들 뉴클레아제는 DNA 백본 상의 포스페이트와 비특이적으로 상호작용할 수 있는 ZFP DNA 결합 도메인 ('ZFP 백본') 내 아미노산에 대한 돌연변이를 포함할 수 있지만, DNA 인식 나선의 변화는 포함하지 않는다. 그러므로, 본 발명은 뉴클레오티드 표적 특이성에 필요하지 않은 ZFP 백본에서의 양이온성 아미노산 잔기의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시양태에서, ZFP 백본에서의 이들 돌연변이는 양이온성 아미노산 잔기를 중성 또는 음이온성 아미노산 잔기로 돌연변이시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, ZFP 백본에서의 이들 돌연변이는 극성 아미노산 잔기를 중성 또는 비극성 아미노산 잔기로 돌연변이시키는 것을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 돌연변이는 DNA 결합 나선에 대한 위치 (-5), (-9) 및/또는 위치 (-14)에 만들어진다. 일부 실시양태에서, 아연 핑거는 (-5), (-9) 및/또는 (-14)에 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 추가 실시양태에서, 멀티-핑거 아연 핑거 단백질에서 하나 이상의 아연 핑거는 (-5), (-9) 및/또는 (-14)에 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, (-5), (-9) 및/또는 (-14)의 아미노산 (예를 들어, 아르기닌 (R) 또는 리신 (K))은 알라닌 (A), 류신 (L), Ser (S), Asp (N), Glu (E), Tyr (Y) 및/또는 글루타민 (Q)으로 돌연변이된다.

[0153] 일부 측면에서, DNA-결합 도메인 (예를 들어, ZFP, TALE, sgRNA 등)은 CISH 유전자를 표적화한다. 특정 실시양태에서, DNA-결합 도메인은 CISH 유전자의 엑손 영역, 예를 들어 엑손 2 또는 엑손 3을 표적화한다.

[0154] 표적 부위 (예를 들어, CISH 유전자의 인트론 및/또는 엑손 내)의 선택; ZFP 및 융합 단백질 (및 이를 코딩하는 폴리뉴클레오티드)의 설계 및 구축 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 미국 특허 번호 6,140,081; 5,789,538; 6,453,242; 6,534,261; 5,925,523; 6,007,988; 6,013,453; 6,200,759; 및 국제 특허 공개 번호 WO 95/19431; WO 96/06166; WO 98/53057; WO 98/54311; WO 00/27878; WO 01/60970; WO 01/88197; WO 02/099084; WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536; 및 WO 03/016496에 상세히 기재되어 있다.

[0155] 또한, 이들 및 다른 참고문헌에 개시된 바와 같이, 아연 핑거 도메인 및/또는 멀티-핑거 아연 핑거 단백질은 예



를 들어, 5개 이상의 아미노산 길이의 링커를 포함하는 임의의 적합한 링커 서열을 사용하여 함께 연결될 수 있다. 또한, 6개 이상의 아미노산 길이의 예시적인 링커 서열에 대해 미국 특허 번호 6,479,626; 6,903,185; 및 7,153,949를 참조한다. 본원에 기재된 단백질은 단백질의 개별 아연 핑거 사이의 적합한 링커의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0156] 특정 실시양태에서, DNA-결합 분자는 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템의 일부이다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,697,359 및 미국 특허 공개 번호 2015/0056705를 참조한다. 시스템의 RNA 구성성분을 코딩하는 CRISPR (클러스터된 규칙적으로 이격된 짧은 회문 반복부) 유전자좌, 및 단백질을 코딩하는 cas (CRISPR-연관) 유전자좌 (Jansen, et al. (2002) Mol. Microbiol. 43:1565-1575; Makarova, et al. (2002) Nucleic Acids Res. 30:482-496; Makarova, et al. (2006). Biol. Direct 1:7; Haft, et al. (2005) PLoS Comput. Biol. 1:e60)는 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템의 유전자 서열을 구성한다. 미생물 숙주에서의 CRISPR 유전자좌는 CRISPR-매개 핵산 절단의 특이성을 프로그래밍할 수 있는 비코딩 RNA 요소 뿐만 아니라 CRISPR-연관 (Cas) 유전자의 조합을 함유한다.

[0157] 유형 II CRISPR은 가장 잘 특징화된 시스템 중 하나이며, 4개의 순차적 단계에서 표적화된 DNA 이중-가닥 파단을 수행한다. 첫 번째로, 2개의 비코딩 RNA, pre-crRNA 어레이 및 tracrRNA는 CRISPR 유전자좌로부터 전사된다. 두 번째로, tracrRNA는 pre-crRNA의 반복 영역에 혼성화하고, 개별 스페이서 서열을 함유하는 성숙 crRNA로의 pre-crRNA의 프로세싱을 매개한다. 세 번째로, 성숙 crRNA:tracrRNA 복합체는 crRNA 상의 스페이서와 표적 인식을 위한 추가 요건인 프로토스페이스 인접 모티프(protospacer adjacent motif)(PAM) 옆의 표적 DNA의 프로토스페이스 사이의 왓슨-크릭(Watson-Crick) 염기-쌍형성을 통해 Cas9를 표적 DNA로 향하게 한다. 최종적으로, Cas9는 표적 DNA의 절단을 매개하여, 프로토스페이스 내에 이중-가닥 파단을 생성한다. CRISPR/Cas 시스템의 활성화는 다음 세 단계를 포함한다: (i) '적응'이라 불리는 프로세스에서 미래 공격을 방지하기 위해 외래 DNA 서열을 CRISPR 어레이로 삽입하는 단계, (ii) 관련 단백질의 발현, 뿐만 아니라 어레이의 발현 및 프로세싱 단계, 이어서 (iii) 외래 핵산과의 RNA-매개 간섭. 그러므로, 박테리아 세포에서, 소위 'Cas' 단백질 중 일부는 CRISPR/Cas 시스템의 자연 기능에 관여하며, 기능, 예컨대 외래 DNA의 삽입 등에서 역할을 한다.

[0158] 특정 실시양태에서, Cas 단백질은 자연 발생 Cas 단백질의 "기능적 유도체"일 수 있다. 천연 서열 폴리펩티드의 "기능적 유도체"는 천연 서열 폴리펩티드와 공통적인 정성적 생물학적 특성을 갖는 화합물이다. "기능적 유도체"는 천연 서열의 단편 및 천연 서열 폴리펩티드의 유도체 및 그의 단편을 포함하나 이에 제한되지는 않지만, 상응하는 천연 서열 폴리펩티드와 공통적인 생물학적 활성을 갖는다. 본원에서 고려되는 생물학적 활성은 DNA 기질을 단편으로 가수분해하는 기능적 유도체의 능력이다. 용어 "유도체"는 폴리펩티드의 아미노산 서열 변이체, 공유결합 변형, 및 이들의 융합체 둘 모두를 포함한다. Cas 폴리펩티드 또는 그의 단편의 적합한 유도체는 Cas 단백질 또는 그의 단편의 돌연변이체, 융합체, 공유결합 변형을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. Cas 단백질 또는 그의 단편, 뿐만 아니라 Cas 단백질 또는 그의 단편의 유도체를 포함하는 Cas 단백질은 세포로부터 수득될 수 있거나, 화학적으로 합성될 수 있거나, 또는 이들 두 절차의 조합에 의해 합성될 수 있다. 세포는 Cas 단백질을 자연적으로 생성하는 세포, 또는 Cas 단백질을 자연적으로 생성하고 내인성 Cas 단백질을 더 높은 발현 수준으로 생성하거나 외인적으로 도입된 핵산으로부터 Cas 단백질을 생성하도록 유전자 조작된 세포일 수 있으며, 상기 핵산은 내인성 Cas와 동일한 또는 상이한 Cas를 코딩한다. 일부 경우에, 세포는 Cas 단백질을 자연적으로 생성하지 않으며, Cas 단백질을 생성하도록 유전자 조작된다. 일부 실시양태에서, Cas 단백질은 AAV 벡터를 통한 전달을 위한 작은 Cas9 오르토토그리다 (Ran, et al. (2015) Nature 510:186).

[0159] 일부 실시양태에서, DNA 결합 분자는 TtAgo 시스템의 일부이다 (문헌 [Swarts, et al., *ibid*]; [Sheng, et al., *ibid*] 참조). 진핵생물에서, 유전자 침묵은 아르고나우트 (Ago) 패밀리의 단백질에 의해 매개된다. 이 패러다임에서, Ago는 작은 (19-31 nt) RNA에 결합된다. 이 단백질-RNA 침묵 복합체는 작은 RNA 및 표적 사이의 왓슨-크릭 염기 쌍형성을 통해 표적 RNA를 인식하고, 표적 RNA를 내핵산용해적으로 절단한다 (Vogel (2014) Science 344:972-973). 대조적으로, 원핵생물 Ago 단백질은 작은 단일-가닥 DNA 단편에 결합하고, 외래 (종종 바이러스) DNA를 검출하고 제거하는 기능을 할 수 있다 (Yuan, et al. (2005) Mol. Cell 19, 405; Olovnikov, et al. (2013) Mol. Cell 51:594; Swarts, et al., *ibid*). 예시적인 원핵생물 Ago 단백질은 아퀴팩스 아에올리쿠스(*Aquifex aeolicus*), 로도박터 스파에로이데스(*Rhodobacter sphaeroides*), 및 테르무스 테르모필루스로부터의 단백질을 포함한다.

[0160] 가장 잘-특징화된 원핵생물 Ago 단백질 중 하나는 티. 테르모필루스로부터의 단백질이다 (TtAgo; Swarts, et al., *ibid*). TtAgo는 5' 포스페이트 기를 갖는 15 nt 또는 13-25 nt 단일-가닥 DNA 단편과 회합한다. TtAgo

에 의해 결합된 이 "가이드 DNA"는 단백질-DNA 복합체가 DNA의 제3자 분자에서 왓슨-크릭 상보적 DNA 서열에 결합하도록 지시하는 역할을 한다. 이들 가이드 DNA에서의 서열 정보가 표적 DNA의 확인을 허용하면, TtAgo-가이드 DNA 복합체는 표적 DNA를 절단한다. 이러한 메커니즘은 또한 그의 표적 DNA에 결합되어 있는 동안 TtAgo-가이드 DNA 복합체의 구조에 의해 지지된다 (G. Sheng, et al., *ibid*). 로도박터 스파에로이데스 (RsAgo)로부터의 Ago는 유사한 특성을 갖는다 (Olovnikov, et al., *ibid*).

[0161] 임의의 DNA 서열의 외인성 가이드 DNA는 TtAgo 단백질에 로딩될 수 있다 (Swarts et al., *ibid*). TtAgo 절단의 특이성은 가이드 DNA에 의해 지시되기 때문에, 외인성 조사자-특정된 가이드 DNA로 형성된 TtAgo-DNA 복합체는 따라서 상보적 조사자-특정된 표적 DNA에 대한 TtAgo 표적 DNA 절단을 지시할 것이다. 이러한 방식으로, 이는 DNA에서 표적화된 이중-가닥 파단을 생성할 수 있다. TtAgo-가이드 DNA 시스템 (또는 다른 유기체로부터의 오르토로거스 Ago-가이드 DNA 시스템)의 사용은 세포 내에서 게놈 DNA의 표적화된 절단을 가능하게 한다. 이러한 절단은 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 포유동물 게놈 DNA의 절단을 위해, 포유동물 세포에서의 발현에 최적화된 TtAgo 코돈의 버전을 사용하는 것이 바람직할 것이다. 추가로, TtAgo 단백질이 세포-침투 펩티드에 융합된 시험관내에서 형성된 TtAgo-DNA 복합체로 세포를 처리하는 것이 바람직할 수 있다. 추가로, 37°C에서 개선된 활성을 갖도록 돌연변이유발을 통해 변경된 TtAgo 단백질의 버전을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. Ago-RNA-매개 DNA 절단은 DNA 파단의 이용을 위한 관련 기술분야의 표준 기술을 사용한, 유전자 녹아웃, 표적화된 유전자 첨가, 유전자 보정, 표적화된 유전자 결실을 포함하는 많은 결과에 영향을 미치기 위해 사용될 수 있다.

[0162] 그러므로, 뉴클레아제는 공여자 (트랜스진)를 삽입하는 것이 바람직한 임의의 유전자에서의 표적 부위에 특이적으로 결합하는 DNA-결합 분자를 포함한다.

[0163] B. 절단 도메인

[0164] 임의의 적합한 절단 도메인은 뉴클레아제를 형성하기 위해 DNA-결합 도메인에 작동적으로 연결될 수 있다. 예를 들어, ZFP DNA-결합 도메인은 ZFN을 생성하기 위해 뉴클레아제 도메인에 융합되었다 (그의 조작된 (ZFP) DNA 결합 도메인을 통해 그의 의도된 핵산 표적을 인식하고, DNA가 다양한 유기체에서 게놈 변형에 사용하기 위한 것을 포함하는 뉴클레아제 활성을 통해 ZFP 결합 부위 근처에서 커팅되게 할 수 있는 기능적 실체). 예를 들어, 미국 특허 번호 7,888,121; 8,623,618; 7,888,121; 7,914,796; 및 8,034,598; 및 미국 특허 공개 번호 2011/0201055를 참조한다. 마찬가지로, TALE DNA-결합 도메인은 TALEN을 생성하기 위해 뉴클레아제 도메인에 융합되었다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,586,526을 참조한다.

[0165] 상기 언급된 바와 같이, 절단 도메인은 DNA-결합 도메인, 예를 들어 아연 핑거 DNA-결합 도메인 및 뉴클레아제로부터의 절단 도메인 또는 TALEN DNA-결합 도메인 및 절단 도메인, 또는 메가뉴클레아제 DNA-결합 도메인 및 상이한 뉴클레아제로부터의 절단 도메인과 이중될 수 있다. 이중 절단 도메인은 임의의 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제로부터 수득될 수 있다. 절단 도메인이 유래될 수 있는 예시적인 엔도뉴클레아제는 제한 엔도뉴클레아제 및 귀소 엔도뉴클레아제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. DNA를 절단하는 추가 효소는 공지되어 있다 (예를 들어, S1 뉴클레아제; 녹두 뉴클레아제; 췌장 DNase I; 미세구균 뉴클레아제; 효모 HO 엔도뉴클레아제). 이들 효소 (또는 그의 기능적 단편) 중 하나 이상은 절단 도메인 및 절단 하프-도메인의 공급원으로서 사용될 수 있다.

[0166] 유사하게, 절단 하프-도메인은 절단 활성을 위해 이량체화를 필요로 하는 상기 기재된 바와 같은 임의의 뉴클레아제 또는 그의 부분으로부터 유래될 수 있다. 일반적으로, 융합 단백질이 절단 하프-도메인을 포함하는 경우 절단을 위해 2개의 융합 단백질이 필요하다. 대안적으로, 2개의 절단 하프-도메인을 포함하는 단일 단백질이 사용될 수 있다. 2개의 절단 하프-도메인은 동일한 엔도뉴클레아제 (또는 그의 기능적 단편)으로부터 유래될 수 있거나, 각각의 절단 하프-도메인은 상이한 엔도뉴클레아제 (또는 그의 기능적 단편)로부터 유래될 수 있다. 또한, 2개의 융합 단백질에 대한 표적 부위는 바람직하게는 서로에 대해 배치되어, 2개의 융합 단백질의 각각의 표적 부위로의 결합은 절단 하프-도메인을 서로 공간 배향으로 배치하여, 절단 하프-도메인이 예를 들어, 이량체화에 의해 기능적 절단 도메인을 형성하게 한다. 그러므로, 특정 실시양태에서, 표적 부위의 근처 가장자리는 5-8개 뉴클레오티드 또는 15-18개 뉴클레오티드에 의해 분리된다. 그러나, 임의의 정수의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 쌍이 2개의 표적 부위 사이에 개입할 수 있다 (예를 들어, 2 내지 50개의 뉴클레오티드 쌍 또는 그 이상). 일반적으로, 절단 부위는 표적 부위 사이에 있다.

[0167] 제한 엔도뉴클레아제 (제한 효소)는 많은 종에 존재하며, DNA에 서열-특이적으로 결합하고 (인식 부위에서), 결합 부위에서 또는 그 근처에서 DNA를 절단할 수 있다. 특정 제한 효소 (예를 들어, 유형 IIS)는 인식 부위로부터

터 제거된 부위에서 DNA를 절단하고, 분리가능한 결합 및 절단 도메인을 갖는다. 예를 들어, 유형 IIS 효소 FokI는 한 가닥의 그의 인식 부위로부터 9개 뉴클레오타이드 및 다른 가닥의 그의 인식 부위로부터 13개 뉴클레오타이드에서 DNA의 이중-가닥 절단을 촉매한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 5,356,802; 5,436,150; 및 5,487,994; 뿐만 아니라 문헌 [Li, et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279]; [Li, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768]; [Kim, et al. (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887]; [Kim, et al. (1994b) J. Biol. Chem. 269:31,978-31,982]을 참조한다. 그러므로, 한 실시양태에서, 융합 단백질은 적어도 하나의 유형 IIS 제한 효소로부터의 절단 도메인 (또는 절단 하프-도메인) 및 하나 이상의 아연 핑거 결합 도메인을 포함하며, 이는 조작되거나 조작되지 않을 수 있다.

[0168] 절단 도메인이 결합 도메인으로부터 분리가능한 예시적인 유형 IIS 제한 효소는 FokI이다. 이 특정 효소는 이량체로서 활성이다. Bitinaite, et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:10,570-10,575. 따라서, 본 개시내용의 목적을 위해, 개시된 융합 단백질에 사용된 FokI 효소의 부분은 절단 하프-도메인으로 간주된다. 그러므로, 아연 핑거-FokI 융합을 사용하는 표적화된 이중-가닥 절단 및/또는 세포 서열의 표적화된 대체를 위해, FokI 절단 하프-도메인을 각각 포함하는 2개의 융합 단백질은 촉매적으로 활성인 절단 도메인을 재구성하기 위해 사용될 수 있다. 대안적으로, 아연 핑거 결합 도메인 및 2개의 FokI 절단 하프-도메인을 함유하는 단일 폴리펩티드 분자가 또한 사용될 수 있다. 아연 핑거-FokI 융합을 사용한 표적화된 절단 및 표적화된 서열 변경에 대한 파라미터는 본 개시내용의 다른 곳에 제공된다.

[0169] 절단 도메인 또는 절단 하프-도메인은 절단 활성을 유지하거나 기능적 절단 도메인을 형성하기 위해 다량체화 (예를 들어, 이량체화)하는 능력을 보유하는 단백질의 임의의 부분일 수 있다.

[0170] 예시적인 유형 IIS 제한 효소는 전문이 본원에 포함된 국제 특허 공개 번호 WO 07/014275에 기재되어 있다. 추가 제한 효소는 또한 분리가능한 결합 및 절단 도메인을 함유하고, 이들은 본 개시내용에 의해 고려된다. 예를 들어, 문헌 [Roberts, et al. (2003) Nucleic Acids Res. 31:418-420]을 참조한다.

[0171] 특정 실시양태에서, 절단 도메인은 예를 들어, 미국 특허 번호 8,623,618; 7,888,121; 7,914,796; 및 8,034,598; 및 미국 특허 공개 번호 2011/0201055에 기재된 바와 같이 동종이량체화를 최소화하거나 방지하는 하나 이상의 조작된 절단 하프-도메인 (이량체화 도메인 돌연변이체라고도 지칭됨)을 포함하며, 이들 모두의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. FokI의 위치 446, 447, 479, 483, 484, 486, 487, 490, 491, 496, 498, 499, 500, 531, 534, 537 및 538의 아미노산 잔기는 모두 FokI 절단 하프-도메인의 이량체화에 영향을 미치기 위한 표적이다.

[0172] 특정 실시양태에서, 조작된 절단 하프 도메인은 FokI로부터 유래되고, 하기 나타낸 바와 같은 야생형 전장 FokI에 대해 넘버링된 아미노산 잔기 416, 422, 447, 448 및/또는 525 중 하나 이상에 하나 이상의 돌연변이를 포함한다 (예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2018/0087072 참조):

[0173] 야생형 FokI 절단 하프 도메인 (서열식별번호:1)

```
QLVKSELEKKSELNRHKLKYPHEYLIELIEIARNSTQDRILEMKVMEFFMKVYGYRG
KHLGGSRKPDGAIYTVGSPIDYGVIVDTKAYSGGYNLPIGQADEMQRYVEENQTRNK
HINPNNEWKVPSSVTEFKFLFVSGHFKGNKYKAQLTRLNHITNCNGAVLSVEELLIG
GEMIKAGTLTLEEVRRKFNNGEINF
```

[0174]

[0175] 이들 돌연변이는 FokI 도메인 및 DNA 분자 사이의 비특이적 상호작용을 저하시킨다. 다른 실시양태에서, FokI로부터 유래된 절단 하프 도메인은 아미노산 잔기 414-426, 443-450, 467-488, 501-502, 및/또는 521-531 중 하나 이상에 돌연변이를 포함한다. 돌연변이는 FokI와 상동성인 자연 제한 효소에서 발견된 잔기에 대한 돌연변이를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 돌연변이는 치환, 예를 들어 상이한 아미노산, 예를 들어 세린 (S), 예를 들어 R416S 또는 K525S에 의한 야생형 잔기의 치환이다. 바람직한 실시양태에서, 위치 416, 422, 447, 448 및/또는 525에서의 돌연변이는 양으로 하전된 아미노산을 비하전된 또는 음으로 하전된 아미노산으로 대체하는 것을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 조작된 절단 하프 도메인은 하나 이상의 아미노산 잔기 416, 422, 447, 448 또는 525에서의 돌연변이 이외에 아미노산 잔기 499, 496 및 486에서의 돌연변이를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 융합 단백질을 제공하며, 여기서 조작된 절단 하프-도메인은 위치 416, 422, 447, 448 또는 525에서의 하나 이상의 돌연변이 이외에, 위치 486의 야생형 Gln (Q) 잔기가 Glu (E) 잔기로 대체되고, 위치 499의 야생형 Ile (I) 잔기가 Leu (L) 잔기로 대체되고, 위치 496의 야생형 Asn (N) 잔기가 Asp (D) 또는 Glu (E) 잔기 ("ELD" 또는 "ELE")로 대체된 폴리펩티드를 포함한다.

[0176] 하나 초과 돌연변이를 갖는 절단 도메인, 예를 들어 "E490K:I538K"라고 지칭되는 조작된 절단 하프-도메인을

생성하기 위한 하나의 절단 하프-도메인에서 위치 490 (E→K) 및 538 (I→K)에서의 돌연변이, "Q486E:I499L"이라고 지칭되는 조작된 절단 하프-도메인을 생성하기 위한 또 다른 절단 하프-도메인에서 위치 486 (Q→E) 및 499 (I→L)에서의 돌연변이; 위치 486의 야생형 Gln (Q) 잔기를 Glu (E) 잔기로 대체하고, 위치 499의 야생형 Iso (I) 잔기를 Leu (L) 잔기로 대체하고, 위치 496의 야생형 Asn (N) 잔기를 Asp (D) 또는 Glu (E) 잔기로 대체하는 돌연변이 (각각 "ELD" 및 "ELE" 도메인이라고도 지칭됨); 위치 490, 538 및 537에서의 돌연변이 (야생형 FokI에 대해 넘버링됨), 예를 들어 위치 490의 야생형 Glu (E) 잔기를 Lys (K) 잔기로 대체하고, 위치 538의 야생형 Iso (I) 잔기를 Lys (K) 잔기로 대체하고, 위치 537의 야생형 His (H) 잔기를 Lys (K) 잔기 또는 Arg (R) 잔기로 대체하는 돌연변이 (각각 "KKK" 및 "KKR" 도메인이라고도 지칭됨)를 포함하는 조작된 절단 하프-도메인; 및/또는 위치 490 및 537에서의 돌연변이 (야생형 FokI에 대해 넘버링됨), 예를 들어 위치 490의 야생형 Glu (E) 잔기를 Lys (K) 잔기로 대체하고, 위치 537의 야생형 His (H) 잔기를 Lys (K) 잔기 또는 Arg (R) 잔기로 대체하는 돌연변이 (각각 "KIK" 및 "KIR" 도메인이라고도 지칭됨)를 포함하는 조작된 절단 하프-도메인이 사용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 7,914,796; 8,034,598; 및 8,623,618을 참조하며, 이들의 개시내용은 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다. 다른 실시양태에서, 조작된 절단 하프 도메인은 "샤키 (Sharkey)" 및/또는 "샤키" 돌연변이를 포함한다 (문헌 [Guo, et al. (2010) J. Mol. Biol. 400(1):96-107] 참조).

[0177] 대안적으로, 뉴클레아제는 소위 "스플릿-효소" 기술을 사용하여 핵산 표적 부위에서 생체내에서 어셈블리될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2009/0068164 참조). 이러한 스플릿 효소의 구성성분은 별도의 발현 구축물 상에서 발현될 수 있거나, 개별 구성성분이 예를 들어 자기-절단 2A 펩티드 또는 IRES 서열에 의해 분리된 하나의 오픈 리딩 프레임에 연결될 수 있다. 구성성분은 개별 아연 핑거 결합 도메인 또는 메가뉴클레아제 핵산 결합 도메인의 도메인일 수 있다.

[0178] 뉴클레아제는 예를 들어 미국 특허 번호 8,563,314에 기재된 바와 같은 효모-기반 염색체 시스템에 사용하기 전에 활성화에 대해 스크리닝될 수 있다.

[0179] Cas9 관련된 CRISPR/Cas 시스템은 2개의 RNA 비코딩 구성성분을 포함한다: 동일한 직접적 반복부 (DR)에 의해 이격된 뉴클레아제 가이드 서열 (스페이서)을 함유하는 tracrRNA 및 pre-crRNA 어레이. 게놈 조작을 성취하기 위해 CRISPR/Cas 시스템을 사용하기 위해서는, 이들 RNA의 기능 둘 모두가 존재해야 한다 (문헌 [Cong, et al. (2013) Scienceexpress 1/10.1126/science 1231143] 참조). 일부 실시양태에서, tracrRNA 및 pre-crRNA는 별도의 발현 구축물을 통해 또는 별도의 RNA로서 공급된다. 다른 실시양태에서, 키메라 RNA는 조작된 성숙 crRNA (표적 특이성을 부여함)가 tracrRNA에 융합되어 (Cas9와의 상호작용을 제공함) 키메라 cr-RNA-tracrRNA 하이브리드 (단일 가이드 RNA라고도 지칭됨)를 생성하도록 구축된다 (문헌 [Jinek, et al. (2012) Science 337:816-821]; [Jinek, et al. (2013) eLife 2:e00471. DOI: 10.7554/eLife.00471] 및 [Cong, ibid] 참조).

[0180] 일부 실시양태에서, CRISPR-Cpf1 시스템이 사용된다. 프란시셀라(*Francisella*) spp에서 확인된 CRISPR-Cpf1 시스템은 인간 세포에서 강력한 DNA 간섭을 매개하는 클래스 2 CRISPR-Cas 시스템이다. 기능적으로 보존되었지만, Cpf1 및 Cas9는 그의 가이드 RNA 및 기질 특이성을 포함하여 많은 측면에서 상이하다 (문헌 [Fagerlund, et al. (2015) Genom Bio 16:251] 참조). Cas9 및 Cpf1 단백질 사이의 주요 차이점은 Cpf1이 tracrRNA를 사용하지 않으므로 crRNA만을 필요로 한다는 것이다. FnCpf1 crRNA는 42-44개 뉴클레오티드 길이 (19-뉴클레오티드 반복부 및 23-25-뉴클레오티드 스페이서)이고, 단일 줄기-루프를 함유하며, 이는 이차 구조를 유지하는 서열 변화를 견딘다. 또한, Cpf1 crRNA는 Cas9에 의해 요구되는 약 100-뉴클레오티드 조작된 sgRNA보다 유의하게 더 짧고, FnCpf1에 대한 PAM 요건은 변위된 가닥에서 5'-TTN-3' 및 5'-CTA-3'이다. Cas9 및 Cpf1 둘 모두는 표적 DNA에서 이중 가닥 파단을 만들지만, Cas9는 그의 RuvC- 및 HNH-유사 도메인을 사용하여 가이드 RNA의 시드 서열 내에 평활-말단 커트를 만드는 반면, Cpf1은 RuvC-유사 도메인을 사용하여 시드의 외부에 엇갈린 커트를 생성한다. Cpf1은 중대한 시드 영역에서 벗어나 엇갈린 커트를 만들기 때문에, NHEJ는 표적 부위를 방해하지 않을 것이며, 따라서 원하는 HDR 재조합 사건이 발생할 때까지 Cpf1은 동일한 부위를 계속 커팅할 수 있음을 보장한다. 그러므로, 본원에 기재된 방법 및 조성물에서, 용어 "Cas"는 Cas9 및 Cpf1 단백질을 모두를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 그러므로, 본원에서 사용된 바와 같은 "CRISPR/Cas 시스템"은 뉴클레아제 및/또는 전사 인자 시스템 둘 모두를 포함하는 CRISPR/Cas 및/또는 CRISPR/Cpf1 시스템 둘 모두를 지칭한다.

[0181] 표적 부위

[0182] 상기 상세히 기재된 바와 같이, DNA-결합 도메인은 선택된 임의의 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 조작된 DNA-결합 도메인은 자연-발생 DNA-결합 도메인과 비교하여 신규 결합 특이성을 가질 수 있다.



- [0183] 특정 실시양태에서, 뉴클레아제(들)는 CISH 유전자, 예를 들어 유전자의 인트론 및/또는 엑손 (예를 들어, 엑손 2 또는 3)을 표적화한다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제는 표 2에 나타난 바와 같은 서열 내에 9-20개 이상의 뉴클레오티드 (인접 또는 비인접)의 표적 부위에 결합한다.
- [0184] 특정 실시양태에서, 뉴클레아제는 "세이프 하버" 유전자좌, 예컨대 인간 세포에서 AAVS1, HPRT, ALB 및 CCR5 유전자, 및 뮤린 세포에서 Rosa26 (예를 들어, 미국 특허 번호 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; 8,586,526; 미국 특허 공개 번호 2003/0232410; 2005/0208489; 2005/0026157; 2006/0063231; 2008/0159996; 2010/00218264; 2012/0017290; 2011/0265198; 2013/0137104; 2013/0122591; 2013/0177983; 및 2013/0177960 참조), 및 식물에서 Zp15 유전자좌 (미국 특허 번호 8,329,986 참조)를 표적화한다.
- [0185] 적합한 표적 유전자의 추가 비제한적인 예는 베타 ( $\beta$ ) 글로빈 유전자 (HBB), 감마 ( $\delta$ ) 글로빈 유전자 (HBB1), B-세포 림프종/백혈병 11A (BCL11A) 유전자, 크루펠-유사 인자 1 (KLF1) 유전자, CCR5 유전자, CXCR4 유전자, PPP1R12C (AAVS1) 유전자, 히포크산틴 포스포리보실트랜스페라제 (HPRT) 유전자, 알부민 유전자, 인자 VIII 유전자, 인자 IX 유전자, 류신-풍부 반복 키나제 2 (LRRK2) 유전자, 헌팅틴 (Htt) 유전자, 로돕신 (RHO) 유전자, 낭포성 섬유증 막횡단 전도 조절인자 (CFTR) 유전자, 계면활성제 단백질 B 유전자 (SFTPB), T-세포 수용체 알파 (TRAC) 유전자, T-세포 수용체 베타 (TRBC) 유전자, 프로그래밍된 세포 사멸 1 (PD1) 유전자, 세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA-4) 유전자, 인간 백혈구 항원 (HLA) A 유전자, HLA B 유전자, HLA C 유전자, HLA-DPA 유전자, HLA-DQ 유전자, HLA-DRA 유전자, LMP7 유전자, 항원 프로세싱 (TAP) 1 유전자와 연관된 트랜스포터, TAP2 유전자, 타파신 유전자 (TAPBP), 클래스 II 구조적적합성 복합체 트랜스활성인자 (CIITA) 유전자, 디스트로핀 유전자 (DMD), 글루코코르티코이드 수용체 유전자 (GR), CISH 유전자, Rag-1 유전자, RFX5 유전자, FAD2 유전자, FAD3 유전자, ZP15 유전자, KASII 유전자, MDH 유전자, 및/또는 EPSPS 유전자를 포함한다. 일부 측면에서, 뉴클레아제(들)는 체크 포인트 억제제 유전자, 예를 들어 PD-1, CTLA4, 억제 리간드의 B7 패밀리에 대한 수용체에 결합하고/거나 이를 절단하거나, LAG3, 2B4, BTLA, TIM3, A2aR을 통한 신호전달에 관여하는 수용체 또는 리간드 유전자, 및 살해 억제제 수용체 (KIR 및 C-유형 렉틴 수용체) (문헌 [Pardoll (2012) Nat Rev Cancer 12(4):252] 참조), HLA 복합체 유전자 (클래스 I: HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, HLA-G, B2M; 클래스 II: HLA-DMA, HLA-DOA, HLA-DPA1, HLA-DQA, HLA-DRA, HLA-DMB, HLA-DOB, HLA-DPB1, HLA-DQB, HLA-DRB) 또는 TCR; 및/또는 펩티드 로딩 프로세스 및 HLA 복합체를 위한 항원 프로세싱에 관여하는 생성물을 코딩하는 유전자 (예를 들어, TAP, 타파신, 칼라티쿨린, 칼넥신, LMP2, LMP7 또는 Erp57)를 절단한다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,956,828 및 8,945,868을 참조한다.
- [0186] 공여자
- [0187] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 세포의 게놈으로의 외인성 서열 (예를 들어, 치료 단백질을 코딩하는 트랜스진)의 뉴클레아제-매개 표적화된 통합에 관한 것이다. 상기 언급된 바와 같이, 예를 들어 특정된 영역의 결실 및/또는 돌연변이 유전자의 보정 또는 야생형 유전자의 증가된 발현을 위한 외인성 서열 ("공여자 서열" 또는 "공여자" 또는 "트랜스진"이라고도 함)의 삽입. 공여자 서열은 전형적으로 그것이 위치한 게놈 서열과 동일하지 않다는 것이 쉽게 명백할 것이다. 공여자 서열은 관심있는 위치에서 효율적인 HDR을 허용하도록 상동성의 2개의 영역에 의해 플랭킹된 비상동성 서열 (예를 들어, 트랜스진)을 함유할 수 있거나, 비상동성 지정 복구 메커니즘을 통해 통합될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 9,045,763; 9,005,973; 및 7,888,121을 참조한다. 추가로, 공여자 서열은 세포 염색질에 관심있는 영역과 상동성이 아닌 서열을 함유하는 벡터 분자를 포함할 수 있다. 공여자 분자는 세포 DNA와 상동성인 여러 불연속 영역을 함유할 수 있다. 추가로, 관심있는 영역에 정상적으로 존재하지 않는 서열의 표적화된 삽입을 위해, 상기 서열은 공여자 핵산 분자에 존재하고, 관심있는 영역의 서열과 상동성인 영역에 의해 플랭킹될 수 있다.
- [0188] 뉴클레아제와 마찬가지로, 공여자는 임의의 형태로 도입될 수 있다. 특정 실시양태에서, 공여자는 관련 기술분야에 공지된 방법에 의해 DNA 및/또는 바이러스 벡터를 사용하여 도입될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 9,005,973; 8,936,936; 및 8,703,489를 참조한다. 공여자는 이중- 또는 단일-가닥 형태로 세포에 도입될 수 있다. 공여자는 원형 또는 선형 형태로 세포에 도입될 수 있다. 선형 형태로 도입되는 경우, 공여자 서열의 말단은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법에 의해 보호될 수 있다 (예를 들어, 외핵산용해적 분해로부터). 예를 들어, 하나 이상의 디데옥시뉴클레오티드 잔기는 선형 분자의 3' 말단에 첨가되고/거나, 자기-상보적 올리고뉴클레오티드는 하나 또는 양쪽 말단에 라이게이션된다. 예를 들어, 문헌 [Chang, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963]; [Nehls, et al. (1996) Science 272:886-889]을 참조한다. 외인성 폴리뉴클레오티드를 분해로부터 보호하기 위한 추가 방법은 말단 아미노기(들)의 첨가 및 변형된 뉴클레오티

드간 연결, 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포르아미데이트, 및 0-메틸 리보스 또는 테옥시리보스 잔기의 사용을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0189] 특정 실시양태에서, 공여자는 길이가 1 kb 초과, 예를 들어 2 내지 200 kb, 2 내지 10 kb (또는 그 사이의 임의의 값)인 서열 (예를 들어, 코딩 서열, 트랜스진이라고도 지칭됨)을 포함한다. 공여자는 또한 적어도 하나의 뉴클레아제 표적 부위를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 공여자는 예를 들어 ZFN, TALEN, TtAgo 또는 CRISPR/Cas 뉴클레아제의 쌍에 대해 적어도 2개의 표적 부위를 포함한다. 전형적으로, 뉴클레아제 표적 부위는 트랜스진 서열의 외부, 예를 들어 트랜스진의 절단을 위해 트랜스진 서열에 대해 5' 및/또는 3'에 있다. 뉴클레아제 절단 부위(들)는 임의의 뉴클레아제(들)를 위한 것일 수 있다. 특정 실시양태에서, 이중-가닥 공여자에 함유된 뉴클레아제 표적 부위(들)는 절단된 공여자가 상동성-독립적인 방법을 통해 통합된 내인성 표적을 절단하는데 사용되는 동일한 뉴클레아제(들)를 위한 것이다.

[0190] 공여자는 그의 발현이 통합 부위에 내인성 프로모터, 즉 공여자가 삽입된 내인성 유전자의 발현을 구동하는 프로모터에 의해 구동되도록 삽입될 수 있다. 그러나, 공여자는 프로모터 및/또는 인핸서, 예를 들어 구성적 프로모터 또는 유도성 또는 조직 특이적 프로모터를 포함할 수 있음이 명백할 것이다.

[0191] 공여자 분자는 내인성 유전자의 전부 또는 일부가 발현되거나 전혀 발현되지 않도록 내인성 유전자에 삽입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 돌연변이체 버전을 보정하기 위해 CISH 유전자의 내인성 유전자좌로 통합되며 (예를 들어, CISH 유전자의 기능적 버전이 결여된 또는 결핍된 환자로부터의 세포에서), 예를 들어 트랜스진은 내인성 CISH 유전자, 예를 들어 CISH 유전자의 엑손 (예를 들어, 엑손 2 또는 엑손 3)으로 통합된다. 다른 실시양태에서, 트랜스진은 기능적 단백질이 발현되도록 CISH 유전자의 내인성 유전자좌로 통합된다. 그러므로, 공여자는 CAR, 조작된 또는 외인성 TCR (미국 특허 번호 8,956,828 참조) 및/또는 ACTR (미국 특허 공개 번호 2017/0281682) 및 이들의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 기능적 단백질을 생성하는 임의의 단백질-코딩 서열을 포함할 수 있다.

[0192] 또한, 발현에 필요하지는 않지만, 외인성 서열은 또한 전사 또는 번역 조절 또는 다른 서열, 예를 들어 프로모터, 인핸서, 인슐레이터, 내부 리보솜 진입 부위, 2A 펩티드 및/또는 폴리아데닐화 신호를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 추가로, 스플라이스 수용자 서열이 포함될 수 있다.

[0193] 본원에 기재된 공여자 서열 상에 운반된 트랜스진은 관련 기술분야에 공지된 표준 기술, 예컨대 PCR을 사용하여 플라스미드, 세포 또는 다른 공급원으로부터 단리될 수 있다. 사용하기 위한 공여자는 원형 수퍼코일, 원형 이완, 선형 등을 포함하는 다양한 유형의 토포로지를 포함할 수 있다. 대안적으로, 이들은 표준 올리고뉴클레오타이드 합성 기술을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 또한, 공여자는 메틸화될 수 있거나 메틸화가 결여될 수 있다. 공여자는 박테리아 또는 효모 인공 염색체 (BAC 또는 YAC)의 형태일 수 있다.

[0194] 본원에 기재된 공여자 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 비자연 염기 및/또는 백본을 포함할 수 있다. 특히, 메틸화된 시토신을 갖는 공여자 분자의 삽입은 관심있는 영역에서 전사 활동정지 상태를 달성하기 위한 본원에 기재된 방법을 사용하여 수행될 수 있다.

[0195] 외인성 (공여자) 폴리뉴클레오타이드는 임의의 관심있는 서열 (외인성 서열)을 포함할 수 있다. 예시적인 외인성 서열은 임의의 폴리펩티드 코딩 서열 (예를 들어, cDNA), 프로모터 서열, 인핸서 서열, 에피토프 태그, 마커 유전자, 절단 효소 인식 부위 및 다양한 유형의 발현 구축물을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 마커 유전자는 항생제 내성 (예를 들어, 암피실린 내성, 네오마이신 내성, G418 내성, 퓨로마이신 내성)을 매개하는 단백질을 코딩하는 서열, 착색 또는 형광 또는 발광 단백질 (예를 들어, 녹색 형광 단백질, 향상된 녹색 형광 단백질, 적색 형광 단백질, 루시페라제) 및 향상된 세포 성장 및/또는 유전자 증폭을 매개하는 단백질 (예를 들어, 디히드로폴레이트 리덕타제)을 코딩하는 서열을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 에피토프 태그는 예를 들어, FLAG, His, myc, Tap, HA 또는 임의의 검출가능한 아미노산 서열의 하나 이상의 카피를 포함한다.

[0196] 일부 실시양태에서, 공여자는 항체, 항원, 효소, 수용체 (세포 표면 또는 핵 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)), 호르몬, 림포카인, 시토카인, 리포터 폴리펩티드, 성장 인자, 및 상기 중 임의의 기능적 단백을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 세포에서의 발현이 바람직한 임의의 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함한다. 코딩 서열은 예를 들어, cDNA일 수 있다.

[0197] 특정 실시양태에서, 외인성 서열은 표적화된 통합을 겪은 세포의 선택을 허용하는 마커 유전자 (상기 기재됨), 및 추가 기능성을 코딩하는 연결된 서열을 포함할 수 있다. 마커 유전자의 비제한적인 예는 GFP, 약물 선택 마커(들) 등을 포함한다.



- [0198] 특정 실시양태에서, 트랜스진은 예를 들어, 돌연변이된 내인성 서열을 대체하기 위한 야생형 유전자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 야생형 (또는 다른 기능적) CISH 유전자 서열은 유전자의 내인성 카피가 돌연변이된 줄기 세포의 게놈에 삽입될 수 있다. 트랜스진은 내인성 유전자좌에 삽입될 수 있거나, 대안적으로 세이프 하버 유전자좌에 표적화될 수 있다.
- [0199] 본 명세서의 교시에 따른 이러한 발현 카세트의 구축은 분자 생물학 분야에 널리 공지된 방법을 사용한다 (예를 들어, 문헌 [Ausubel or Maniatis] 참조). 트랜스제닉 동물을 생성하기 위해 발현 카세트를 사용하기 전에, 선택된 제어 요소와 연관된 스트레스-유도자에 대한 발현 카세트의 반응성은 발현 카세트를 적합한 세포주 (예를 들어, 일차 세포, 형질전환된 세포, 또는 불멸화된 세포주)에 도입함으로써 시험될 수 있다.
- [0200] 또한, 발현에 필요하지는 않지만, 외인성 서열은 또한 전사 또는 번역 조절 서열, 예를 들어 프로모터, 인핸서, 인슐레이터, 내부 리보솜 진입 부위, 2A 펩티드 및/또는 폴리아데닐화 신호를 코딩하는 서열일 수 있다. 추가로, 관심있는 유전자의 제어 요소는 리포터 유전자에 작동가능하게 연결되어 키메라 유전자 (예를 들어, 리포터 발현 카세트)를 생성할 수 있다.
- [0201] 비코딩 핵산 서열의 표적화된 삽입이 또한 달성될 수 있다. 안티센스 RNA, RNAi, shRNA 및 micro RNA (miRNA)를 코딩하는 서열이 또한 표적화된 삽입을 위해 사용될 수 있다.
- [0202] 추가 실시양태에서, 공여자 핵산은 추가 뉴클레아제 설계를 위한 특정 표적 부위인 비코딩 서열을 포함할 수 있다. 후속적으로, 원래의 공여자 분자가 관심있는 또 다른 공여자 분자의 삽입에 의해 절단되고 변형되도록, 추가 뉴클레아제가 세포에서 발현될 수 있다. 이러한 방식으로, 관심있는 특정 유전자좌 또는 세이프 하버 유전자좌에서 형질 스테킹이 가능하도록 공여자 분자의 반복적 통합이 생성될 수 있다.
- [0203] 세포
- [0204] 그러므로, 유전자 변형된 CISH 유전자를 포함하는 유전자 변형된 세포가 본원에 제공된다. 유전자 변형된 세포는 비코딩 또는 코딩 영역을 포함하는 CISH 유전자 내에 어디든, 예를 들어 CISH 유전자의 엑손 2 및/또는 엑손 3 내에서 변형될 수 있다. 특정 실시양태에서, 변형은 본원에 기재된 방법에 의해 생성된 세포 (예를 들어, T-세포 또는 줄기 세포)를 포함하는 세포에서 기능적 단백질을 발현하는 트랜스진의 통합을 포함한다. 트랜스진은 하나 이상의 뉴클레아제를 사용하여 세포의 게놈으로 표적화된 방식으로 통합된다. 특정 실시양태에서, 트랜스진은 예를 들어 암 환자 또는 염증성 질환을 갖는 환자에서 CISH 유전자로 통합된다. 트랜스진은 CISH의 임의의 인트론 및/또는 엑손 영역, 예를 들어 엑손 2 또는 엑손 3으로 통합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 트랜스진은 표 2에 나타난 바와 같은 적어도 9개의 염기 쌍의 표적 부위의 어느 한 쪽의 5-10개 뉴클레오티드로 또는 그 내로 통합된다. 그러므로, CISH 유전자의 엑손 2 또는 3에 통합된 트랜스진 (기능적 단백질을 발현함)을 포함하는 유전자 변형된 세포, 뿐만 아니라 유전자 변형을 포함하는 이들 세포로부터 유래된 세포가 본원에 제공된다.
- [0205] 무작위 통합과 달리, 표적화된 통합은 트랜스진이 특정된 유전자로 통합되는 것을 보장한다. 트랜스진은 표적 유전자에서 어디에서든 통합될 수 있다. 특정 실시양태에서, 트랜스진은 뉴클레아제 절단 부위에서 또는 그 근처에서, 예를 들어 절단 부위의 상류 또는 하류의 1-300개 (또는 그 사이의 임의의 값) 염기 쌍 내에, 보다 바람직하게는 절단 부위의 어느 한 쪽의 1-100개 염기 쌍 (또는 그 사이의 임의의 값) 내에, 보다 더 바람직하게는 절단 부위의 어느 한 쪽의 1 내지 50개 염기 쌍 (또는 그 사이의 임의의 값) 내에 통합된다. 특정 실시양태에서, 트랜스진을 포함하는 통합된 서열은 임의의 벡터 서열 (예를 들어, 바이러스 벡터 서열)을 포함하지 않는다.
- [0206] 세포 및 세포주를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 세포 유형은 트랜스진을 포함하도록 본원에 기재된 바와 같이 유전자 변형될 수 있다. 본원에 기재된 바와 같은 트랜스진을 함유하는 세포의 다른 비제한적인 예는 T-세포 (예를 들어, CD4+, CD3+, CD8+ 등); 수지상 세포; B-세포; 자가유래 (예를 들어, 환자-유래) 또는 이중만능성, 전능성 또는 다능성 줄기 세포 (예를 들어, CD34+ 세포, 유도된 만능성 줄기 세포 (iPSC), 배아 줄기 세포 등)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 세포는 환자로부터 유래된 CD34+ 세포이다. 세포는 배양에서 유전자 변형될 수 있거나, 대안적으로, 본원에 기재된 바와 같은 뉴클레아제 및/또는 공여자를 대상체에게 제공함으로써 생체내에서 유전자 변형될 수 있다.
- [0207] 본원에 기재된 바와 같은 세포는 예를 들어, 생체의 요법에 의해 장애를 갖는 대상체에서 암 또는 염증성 질환을 치료 및/또는 예방하는데 유용하다. 뉴클레아제-변형된 세포는 증식된 후, 표준 기술을 사용하여 환자로 재도입될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Tebas, et al. (2014) New Eng J Med 370(10):901]을 참조한다. 줄기 세

포의 경우, 대상체로의 주입 후, 기능적 CISH 단백질을 발현하는 세포로의 이들 전구체의 생체내 분화가 또한 발생한다. 본원에 기재된 바와 같은 세포를 포함하는 제약 조성물이 또한 제공된다. 또한, 세포는 환자에게 투여하기 전에 동결보존될 수 있다.

[0208] 본원에 기재된 바와 같은 세포 및 생체의 방법은 대상체 (예를 들어, 포유동물 대상체)에서 장애 (예를 들어, 암 또는 염증성 질환)의 치료 및/또는 예방을 제공하고, 지속적인 예방적 제약 투여 또는 위험한 절차, 예컨대 동종이계 골수 이식 또는 감마 레트로바이러스 전달에 대한 필요성을 제거한다. 이와 같이, 본원에 기재된 본 발명은 암, 염증성 질환 및 면역 조절이 바람직한 다른 상태의 치료 및/또는 예방의 더 안전하고 비용-효과적이고 시간 효율적인 방법을 제공한다.

[0209] 전달

[0210] 뉴클레아제, 이들 뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 공여자 폴리뉴클레오티드, 및 본원에 기재된 단백질 및/또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물은 임의의 적합한 수단에 의해 전달될 수 있다. 특정 실시양태에서, 뉴클레아제 및/또는 공여자는 생체내에서 전달된다. 다른 실시양태에서, 뉴클레아제 및/또는 공여자는 환자로의 생체외 전달에 유용한 변형된 세포를 제공하기 위해 단리된 세포 (예를 들어, 자가유래 또는 이종 줄기 세포)로 전달된다 (세포 요법).

[0211] 본원에 기재된 바와 같은 뉴클레아제를 전달하는 방법은 예를 들어, 미국 특허 번호 6,453,242; 6,503,717; 6,534,261; 6,599,692; 6,607,882; 6,689,558; 6,824,978; 6,933,113; 6,979,539; 7,013,219; 및 7,163,824에 기재되어 있으며, 이들 모두의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0212] 본원에 기재된 바와 같은 뉴클레아제 및/또는 공여자 구축물은 또한 네이키드 DNA 및/또는 RNA (예를 들어, mRNA) 및 하나 이상의 구성성분을 코딩하는 서열을 함유하는 벡터를 포함하는 임의의 핵산 전달 메커니즘을 사용하여 전달될 수 있다. 플라스미드 벡터, DNA 미니서클, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터; 헤르페스바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터 등 및 이들의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 벡터 시스템이 사용될 수 있다. 또한, 미국 특허 번호 6,534,261; 6,607,882; 6,824,978; 6,933,113; 6,979,539; 7,013,219; 및 7,163,824; 및 미국 특허 공개 번호 2014/0335063을 참조하며, 이들은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. 또한, 이들 시스템 중 임의의 시스템은 치료에 필요한 서열 중 하나 이상을 포함할 수 있음이 명백할 것이다. 그러므로, 하나 이상의 뉴클레아제 및 공여자 구축물이 세포에 도입되는 경우, 뉴클레아제 및/또는 공여자 폴리뉴클레오티드는 동일한 전달 시스템 또는 상이한 전달 메커니즘으로 운반될 수 있다. 다수의 시스템이 사용되는 경우, 각각의 전달 메커니즘은 하나 또는 다수의 뉴클레아제 및/또는 공여자 구축물을 코딩하는 서열 (예를 들어, 하나 이상의 뉴클레아제를 코딩하는 mRNA 및/또는 하나 이상의 공여자 구축물을 운반하는 mRNA 또는 AAV)을 포함할 수 있다.

[0213] 통상적인 바이러스 및 비-바이러스 기반 유전자 전이 방법은 세포 (예를 들어, 포유동물 세포) 및 표적 조직에 뉴클레아제 및 공여자 구축물을 코딩하는 핵산을 도입하는데 사용될 수 있다. 비-바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 플라스미드, DNA 미니서클, 네이키드 핵산, 및 전달 비히클, 예컨대 리포솜 또는 폴록사머와 복합체를 형성하는 핵산을 포함한다. 바이러스 벡터 전달 시스템은 세포로 전달된 후 에피솜 또는 통합된 게놈을 갖는 DNA 및 RNA 바이러스를 포함한다. 유전자 요법 절차의 검토를 위해, 문헌 [Anderson (1992) Science 256:808-813]; [Nabel & Felgner (1993) TIBTECH 11:211-217]; [Mitani & Caskey (1993) TIBTECH 11:162-166]; [Dillon (1993) TIBTECH 11:167-175]; [Miller (1992) Nature 357:455-460]; [Van Brunt (1988) Biotechnology 6(10):1149-1154]; [Vigne (1995) Restorative Neurology and Neuroscience 8:35-36]; [Kremer & Perricaudet (1995) British Medical Bulletin 51(1):31-44]; [Haddada, et al., in Current Topics in Microbiology and Immunology Doerfler and Bohm (eds.) (1995)]; 및 [Yu, et al. (1994) Gene Therapy 1:13-26]을 참조한다.

[0214] 핵산의 비-바이러스 전달 방법은 전기천공, 리포펙션, 미세주사, 유전자총법, 비로솜, 리포솜, 이뮤노리포솜, 고분자 양이온 또는 지질:핵산 접합체, 지질 나노입자 (LNP), 네이키드 DNA, 네이키드 RNA, 캡핑된 RNA, 인공 비리온, 및 DNA의 작용제-향상된 흡수를 포함한다. 예를 들어, 소니트론(Sonitron) 2000 시스템 (Rich-Mar)을 사용하는 초음파천공법이 또한 핵산 전달을 위해 사용될 수 있다.

[0215] 추가 예시적인 핵산 전달 시스템은 아마사 바이오시스템스(Amaxa Biosystems)(독일 쾰른), 맥스사이트, 인크.(Maxcyte, Inc.)(미국 메릴랜드주 록빌), BTX 분자물리 딜리버리 시스템스(BTX Molecular Delivery Systems)(미국 매사추세츠주 홀리스톤) 및 코페르니쿠스 세라퓨틱스 인크.(Copernicus Therapeutics Inc.)(예

를 들어, 미국 특허 번호 6,008,336 참조)에 의해 제공되는 것을 포함한다. 리포펙션은 예를 들어, 미국 특허 번호 5,049,386; 4,946,787; 및 4,897,355에 기재되어 있으며, 리포펙션 시약은 상업적으로 판매된다 (예를 들어, 트랜스펙탐(Transfectam)<sup>TM</sup> 및 리포펙틴(Lipofectin)<sup>TM</sup>). 폴리뉴클레오티드의 효율적인 수용체-인식 리포펙션에 적합한 양이온성 및 중성 지질은 펠그너(Felgner)의 국제 특허 공개 번호 WO 91/17424, WO 91/16024의 것을 포함한다. 일부 측면에서, 뉴클레아제는 mRNA로서 전달되고, 트랜스진은 다른 양식, 예컨대 바이러스 벡터, 미니서클 DNA, 플라스미드 DNA, 단일-가닥 DNA, 선형 DNA, 리포솜, 나노입자 등을 통해 전달된다.

[0216] 표적화된 리포솜, 예컨대 면역지질 복합체를 포함하는 지질:핵산 복합체의 제조는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Crystal (1995) Science 270:404-410]; [Blaese, et al. (1995) Cancer Gene Ther. 2:291-297]; [Behr, et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:382-389]; [Remy, et al. (1994) Bioconjugate Chem. 5:647-654]; [Gao, et al. (1995) Gene Therapy 2:710-722]; [Ahmad, et al. (1992) Cancer Res. 52:4817-4820]; 미국 특허 번호 4,186,183; 4,217,344; 4,235,871; 4,261,975; 4,485,054; 4,501,728; 4,774,085; 4,837,028; 및 4,946,787 참조).

[0217] 추가 전달 방법은 엔진아이씨(EnGeneIC) 전달 비히클 (EDV)로 전달될 핵산의 패키징의 사용을 포함한다. 이들 EDV는 이중특이적 항체를 사용하여 표적 조직으로 특이적으로 전달되며, 여기서 항체의 한쪽 아암은 표적 조직에 특이성을 갖고, 다른 하나는 EDV에 특이성을 갖는다. 항체가 EDV를 표적 세포 표면으로 가져온 후, EDV는 엔도사이토시스에 의해 세포로 들어간다. 세포에 들어가면, 내용물이 방출된다 (문헌 [MacDiarmid et al. (2009) Nature Biotechnology 27(7):643] 참조).

[0218] 조작된 CRISPR/Cas 시스템을 코딩하는 핵산의 전달을 위한 RNA 또는 DNA 바이러스 기반 시스템의 사용은 바이러스를 신체의 특정 세포로 표적화하고 바이러스 페이로드를 핵으로 트래피킹하기 위한 고도로 진화된 프로세스를 이용한다. 바이러스 벡터는 대상체에게 직접적으로 투여될 수 있거나 (생체내), 시험관내에서 세포를 처리하는 데 사용될 수 있고, 변형된 세포는 대상체에게 투여된다 (생체외). CRISPR/Cas 시스템의 전달을 위한 통상적인 바이러스 기반 시스템은 유전자 전이를 위한 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관, 백시니아 및 단순 포진 바이러스 벡터를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 숙주 게놈에서의 통합은 레트로바이러스, 렌티바이러스, 및 아데노-연관 바이러스 유전자 전이 방법으로 가능하며, 종종 삽입된 트랜스진의 장기간 발현을 초래한다. 추가로, 높은 형질도입 효율이 많은 상이한 세포 유형 및 표적 조직에서 관찰되었다.

[0219] 레트로바이러스의 트로피즘은 외래 외피 단백질을 혼입하여 표적 세포의 잠재적 표적 집단을 증식시킴으로써 변경될 수 있다. 렌티바이러스 벡터는 비분열 세포를 형질도입하거나 감염시키고 전형적으로 높은 바이러스 역가를 생성할 수 있는 레트로바이러스 벡터이다. 레트로바이러스 유전자 전이 시스템의 선택은 표적 조직에 의존한다. 레트로바이러스 벡터는 최대 6-10 kb의 외래 서열에 대한 패키징 용량을 갖는 시스-작용 긴 말단 반복부로 구성된다. 최소 시스-작용 LTR은 벡터의 복제 및 패키징에 충분하며, 그 후 치료 유전자를 표적 세포로 통합하여 영구 트랜스진 발현을 제공하는데 사용된다. 널리 사용되는 레트로바이러스 벡터는 뮐린 백혈병 바이러스 (MuLV), 긴팔원숭이 백혈병 바이러스 (GaLV), 원숭이 면역결핍 바이러스 (SIV), 인간 면역결핍 바이러스 (HIV), 및 이들의 조합에 기초한 것들을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Buchscher, et al. (1992) J. Virol. 66:2731-2739]; [Johann, et al. (1992) J. Virol. 66:1635-1640]; [Sommerfelt, et al. (1990) Virol. 176:58-59]; [Wilson, et al. (1989) J. Virol. 63:2374-2378]; [Miller, et al. (1991) J. Virol. 65:2220-2224]; 국제 특허 공개 번호 WO 1994/026877 참조).

[0220] 일시적 발현이 바람직한 적용에서, 아데노바이러스 기반 시스템이 사용될 수 있다. 아데노바이러스 기반 벡터는 많은 세포 유형에서 매우 높은 형질도입 효율을 가질 수 있고, 세포 분열을 필요로 하지 않는다. 이러한 벡터로, 높은 역가 및 높은 수준의 발현이 수득되었다. 이 벡터는 상대적으로 간단한 시스템에서 대량으로 생성될 수 있다. 아데노-연관 바이러스 ("AAV") 벡터는 또한 예를 들어, 핵산 및 펩티드의 시험관내 생성에서 및 생체내 및 생체외 유전자 요법 절차를 위해 표적 핵산으로 세포를 형질도입하는데 사용된다 (예를 들어, 문헌 [West, et al. (1987) Virology 160:38-47]; 미국 특허 번호 4,797,368; 국제 특허 공개 번호 WO 93/24641; [Kotin (1994) Human Gene Therapy 5:793-801]; [Muzyczka (1994) J. Clin. Invest. 94:1351] 참조). 재조합 AAV 벡터의 구축은 미국 특허 번호 5,173,414; 문헌 [Tratschin, et al. (1985) Mol. Cell. Biol. 5:3251-3260]; [Tratschin, et al. (1984) Mol. Cell. Biol. 4:2072-2081]; [Hermonat & Muzyczka (1984) PNAS 81:6466-6470]; 및 [Samulski, et al. (1989) J. Virol. 63:03822-3828]을 포함하는 수많은 간행물에 기재되어 있다. AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6 및 AAV8, AAV 8.2, AAV9, 및 AAV rh10을 포함하는 임의의 AAV 혈청형 및 유사형화된 AAV, 예컨대 AAV2/8, AAV2/5 및 AAV2/6이 사용될 수 있다.

- [0221] 적어도 6개의 바이러스 벡터 접근법이 임상 시험에서 유전자 전이를 위해 현재 이용가능하며, 이는 형질도입제를 생성하기 위해 헬퍼 세포주에 삽입된 유전자에 의한 결함 벡터의 상보성을 수반하는 접근법을 사용한다.
- [0222] pLASN 및 MFG-S는 임상 시험에 사용된 레트로바이러스 벡터의 예이다 (Dunbar, et al. (1995) Blood 85:3048-305; Kohn, et al. (1995) Nat. Med. 1:1017-102; Malech, et al. (1997) PNAS 94:22 12133-12138). PA317/pLASN은 유전자 요법 시험에 사용된 최초의 치료 벡터이다 (Blaese, et al. (1995) Science 270:475-480 (1995)). 50% 이상의 형질도입 효율이 MFG-S 패키징된 벡터에 대해 관찰되었다 (Ellem, et al. (1997) Immunol Immunother. 44(1):10-20; Dranoff et al. (1997) Hum. Gene Ther. 1:111-2).
- [0223] 재조합 아데노-연관 바이러스 벡터 (rAAV)는 결함 및 비병원성 파르보바이러스 아데노-연관 유형 2 바이러스에 기초한 유망한 대안적인 유전자 전달 시스템이다. 모든 벡터는 트랜스진 발현 카세트를 플랭킹하는 AAV 145 염기 쌍 (bp) 반전된 말단 반복부만을 보유하는 플라스미드로부터 유래된다. 형질도입된 세포의 계놈으로의 통합으로 인한 효율적인 유전자 전이 및 안정한 트랜스진 전달은 이 벡터 시스템의 주요 특징이다 (Wagner, et al. (1998) Lancet 351:9117 1702-3; Kearns, et al. (1996) Gene Ther. 9:748-55). AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV8, AAV9 및 AAVrh10을 포함하는 다른 AAV 혈청형, 및 그의 모든 변이체가 또한 본 발명에 따라 사용될 수 있다.
- [0224] 복제-결핍 재조합 아데노바이러스 벡터 (Ad)는 높은 역가로 생성될 수 있고, 수많은 상이한 세포 유형을 쉽게 감염시킬 수 있다. 대부분의 아데노바이러스 벡터는 트랜스진이 Ad E1a, E1b, 및/또는 E3 유전자를 대체하고; 후속적으로 복제 결함 벡터가 트랜스에서 결실된 유전자 기능을 공급하는 인간 293 세포에서 증식되도록 조작된다. Ad 벡터는 비분열 분화된 세포, 예컨대 간, 신장 및 근육에서 발견되는 것을 포함하여 생체내에서 다수의 유형의 조직을 형질도입할 수 있다. 통상적인 Ad 벡터는 큰 운반 용량을 갖는다. 임상 시험에서 Ad 벡터의 사용의 예는 근육내 주사에 의한 항종양 면역화를 위한 폴리뉴클레오티드 요법을 수반하였다 (Stermann, et al. (1998) Hum. Gene Ther. 7:1083-9). 임상 시험에서 유전자 전이를 위한 아데노바이러스 벡터의 사용의 추가 예는 문헌 [Rosenecker, et al. (1996) Infection 24:1 5-10]; [Stermann, et al. (1998) Hum. Gene Ther. 9(7):1083-1089]; [Welsh, et al. (1995) Hum. Gene Ther. 2:205-18]; [Alvarez, et al. (1997) Hum. Gene Ther. 5:597-613]; [Topf, et al. (1998) Gene Ther. 5:507-513]; [Stermann, et al. (1998) Hum. Gene Ther. 7:1083-1089]을 포함한다.
- [0225] 패키징 세포는 숙주 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성하는데 사용된다. 이러한 세포는 아데노바이러스를 패키징하는 293 세포, 및 레트로바이러스를 패키징하는  $\psi$ 2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 요법에 사용되는 바이러스 벡터는 통상적으로 핵산 벡터를 바이러스 입자로 패키징하는 생산자 세포주에 의해 생성된다. 벡터는 전형적으로 패키징 및 숙주로의 후속적 통합 (적용가능한 경우)에 필요한 최소 바이러스 서열을 함유하며, 다른 바이러스 서열은 발현될 단백질을 코딩하는 발현 카세트에 의해 대체된다. 손실 바이러스 기능은 패키징 세포주에 의해 트랜스로 공급된다. 예를 들어, 유전자 요법에 사용되는 AAV 벡터는 전형적으로 숙주 계놈으로의 패키징 및 통합에 필요한 AAV 계놈으로부터의 반전된 말단 반복 (ITR) 서열만을 보유한다. 바이러스 DNA는 다른 AAV 유전자를 코딩하는 헬퍼 플라스미드, 즉 rep 및 cap을 보유하나 ITR 서열이 결여된 세포주에 패키징된다. 세포주는 또한 헬퍼로서 아데노바이러스로 감염된다. 헬퍼 바이러스는 헬퍼 플라스미드로부터 AAV 벡터의 복제 및 AAV 유전자의 발현을 촉진한다. 헬퍼 플라스미드는 ITR 서열의 결여로 인해 상당한 양으로 패키징되지 않는다. 아데노바이러스에 의한 오염은 예를 들어, 아데노바이러스가 AAV보다 더 민감한 열 처리에 의해 감소될 수 있다.
- [0226] 많은 유전자 요법 적용에서, 유전자 요법 벡터는 특정 조직 유형에 대한 높은 정도의 특이성으로 전달되는 것이 바람직하다. 따라서, 바이러스 벡터는 바이러스의 외부 표면 상의 바이러스 코트 단백질을 갖는 융합 단백질로서 리간드를 발현함으로써 주어진 세포 유형에 대해 특이성을 갖도록 변형될 수 있다. 리간드는 관심있는 세포 유형에 존재하는 것으로 공지된 수용체에 대한 친화도를 갖도록 선택된다. 예를 들어, 문헌 [Han, et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:9747-9751]에는 폴로니 뮤린 백혈병 바이러스가 gp70에 융합된 인간 헤레굴린을 발현하도록 변형될 수 있고, 재조합 바이러스가 인간 상피 성장 인자 수용체를 발현하는 특정 인간 유방암 세포를 감염시키는 것으로 보고되어 있다. 이 원리는 다른 바이러스-표적 세포 쌍으로 연장될 수 있으며, 여기서 표적 세포는 수용체를 발현하고, 바이러스는 세포-표면 수용체에 대한 리간드를 포함하는 융합 단백질을 발현한다. 예를 들어, 필라멘트상 파지는 사실상 임의의 선택된 세포 수용체에 대한 특이적 결합 친화도를 갖는 항체 단편 (예를 들어, FAB 또는 Fv)을 디스플레이하도록 조작될 수 있다. 상기 설명은 주로 바이러스 벡터에 적용되지만, 동일한 원리가 비바이러스 벡터에 적용될 수 있다. 이러한 벡터는 특이적 표적 세포에 의한 흡



수를 선호하는 특이적 흡수 서열을 함유하도록 조작될 수 있다.

- [0227] 유전자 요법 벡터는 전형적으로 전신 투여 (예를 들어, 정맥내, 복강내, 근육내, 피하, 설하 또는 두개내 주입), 하기 기재된 바와 같은 국소 적용에 의해, 또는 폐 흡입을 통해 개별 대상체에게 투여함으로써 생체내에서 전달될 수 있다. 대안적으로, 벡터는 생체외에서 세포로 전달될 수 있으며, 예컨대 개별 환자 (예를 들어, 림프구, 골수 흡인물, 조직 생검)로부터 외식된 세포, 또는 보편적인 공여자 조혈 줄기 세포로 전달될 수 있으며, 이어서 통상적으로 벡터를 혼입한 세포에 대한 선택 후 세포를 환자로 재이식한다.
- [0228] 뉴클레아제 및/또는 공여자 구축물을 함유하는 벡터 (예를 들어, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 리포솜 등)는 또한 생체내에서 세포의 형질도입을 위해 유기체에 직접적으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 네이키드 DNA가 투여될 수 있다. 투여는 주사, 주입, 국소 적용, 흡입 및 전기천공을 포함하나 이에 제한되지는 않는 혈액 또는 조직 세포와의 궁극적인 접촉으로 분자를 도입하기 위해 정상적으로 사용되는 임의의 경로에 의해 이루어진다. 이러한 핵산을 투여하는 적합한 방법은 이용가능하고, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있으며, 하나 초과와 경로의 특정 조성물을 투여하는데 사용될 수 있지만, 특정 경로는 종종 또 다른 경로보다 더 즉각적이고 효과적인 반응을 제공할 수 있다.
- [0229] 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 도입에 적합한 벡터는 비-통합 렌티바이러스 벡터 (IDLV)를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Ory, et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11382-11388]; [Dull, et al. (1998) J. Virol. 72:8463-8471]; [Zuffery, et al. (1998) J. Virol. 72:9873-9880]; [Follenzi, et al. (2000) Nature Genetics 25:217-222]; 미국 특허 번호 8,936,936을 참조한다.
- [0230] 제약상 허용가능한 담체는 투여될 특정 조성물, 뿐만 아니라 조성물을 투여하는데 사용되는 특정 방법에 의해 부분적으로 결정된다. 따라서, 하기 기재된 바와 같이 이용가능한 제약 조성물의 다양한 적합한 제형이 있다 (예를 들어, 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1989] 참조).
- [0231] 뉴클레아제-코딩 서열 및 공여자 구축물은 동일한 또는 상이한 시스템을 사용하여 전달될 수 있음이 명백할 것이다. 예를 들어, 공여자 폴리뉴클레오티드는 AAV에 의해 운반될 수 있는 반면, 하나 이상의 뉴클레아제는 mRNA에 의해 운반될 수 있다. 또한, 상이한 시스템은 동일한 또는 상이한 경로 (근육내 주사, 꼬리 정맥 주사, 다른 정맥내 주사, 복강내 투여 및/또는 근육내 주사)에 의해 투여될 수 있다. 다수의 벡터는 동시에 또는 임의의 순차적 순서로 전달될 수 있다.
- [0232] 생체외 및 생체내 투여 둘 모두를 위한 제형은 액체 중 현탁액 또는 유화된 액체를 포함한다. 활성 성분은 종종 제약상 허용가능하고 활성 성분과 상용성인 부형제와 혼합된다. 적합한 부형제는 예를 들어, 물, 염수, 텍스트로스, 글리세롤, 에탄올 등 및 이들의 조합을 포함한다. 또한, 조성물은 소량의 보조 물질, 예컨대, 습윤제 또는 유화제, pH 완충제, 안정화제 또는 제약 조성물의 효과를 향상시키는 다른 시약을 함유할 수 있다.
- [0233] 적용
- [0234] 본원에 개시된 방법 및 조성물은 예를 들어 T-세포 반응성을 조정하는 단백질의 제공을 통해 암, 염증성 장애 및 다른 질환을 위한 요법을 제공하기 위한 것이다. 세포는 생체내에서 변형될 수 있거나, 생체외에서 변형된 후 대상체에게 투여될 수 있다. 그러므로, 방법 및 조성물은 장애의 치료 및/또는 예방을 제공한다.
- [0235] 트랜스진 (예를 들어, CAR 트랜스진, HLA 유전자, 조작된 또는 외인성 TCR 유전자 또는 ACTR)의 표적화된 통합은 비정상적인 CISH-관련된 유전자를 보정하거나, 야생형 유전자 (예를 들어, 치료 단백질)를 삽입하거나, 내인성 유전자의 발현을 변화시키는데 사용될 수 있다. 예를 들어, CAR을 코딩하는 트랜스진은 기능적 CAR 단백질을 생성하는 세포를 제공하기 위해 세포로 통합될 수 있다. 게놈 편집은 또한 결점이 있는 내인성 유전자에서의 돌연변이 (예를 들어, 점 돌연변이)의 보정을 포함하며, 이에 의해 유전자의 발현을 재분류하고 장애를 치료할 수 있다.
- [0236] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 CAR은 CISH 유전자에 통합된다. CAR 트랜스진은 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 공동자극 도메인 및 활성화 도메인을 포함하여 세포내 신호전달 부분으로 연결된 특정 항원에 특이성을 갖는 세포외 단일쇄 가변 단편 (scFv)을 포함한다. 공동자극 도메인은 예를 들어, CD28로부터 유래될 수 있고, 활성화 도메인은 예를 들어, CD3-제타로부터 유래될 수 있다. CAR 트랜스진은 2, 3, 4개 이상의 공동자극 도메인을 포함할 수 있다. CAR scFv는 예를 들어, CD19를 표적화하도록 설계될 수 있으며, 이는 NHL, CLL, 및 비-T 세포 ALL을 포함하나 이에 제한되지는 않는 모든 정상 B 세포 및 B 세포 악성종양을 포함하는 B 세포 계통의 세포에 의해 발현된 막형단 단백질이다. 예를 들어, 미국 특허 번호 9,855,298을 참조한다. CAR 트랜스진(들) 이외에 또는 대신에, 하나 이상의 HLA, B2M 및/또는 다른 면역조절 단백질은 2018년 8월 8일에 출원된

미국 특허 출원 번호 16/058,307에 기재된 바와 같이 B2M 및 HLA-G 및/또는 HLA-E의 융합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 CISH 유전자로 통합될 수 있다.

[0237] 비제한적인 예로서, 본원에 기재된 방법 및 조성물은 암, 예컨대 B 세포 백혈병 및/또는 염증성 질환, 예컨대 결장염의 치료 및/또는 예방을 위해 사용될 수 있다.

[0238] 하기 실시예는 뉴클레아제가 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN)를 포함하는 본 개시내용의 예시적인 실시양태에 관한 것이다. 이는 단지 예시의 목적을 위한 것이며, 다른 뉴클레아제, 예를 들어 TALEN, TtAgo 및 CRISPR/Cas 시스템, 조작된 DNA-결합 도메인을 갖는 귀소 엔도뉴클레아제 (메가뉴클레아제) 및/또는 조작된 귀소 엔도뉴클레아제 (메가뉴클레아제) DNA-결합 도메인 및 이중 절단 도메인의 자연 발생의 융합체 및/또는 메가뉴클레아제 및 TALE 단백질의 융합체가 사용될 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 추가 뉴클레아제는 본원에 개시된 서열 (예를 들어, 표 2)의 9 내지 12개의 인접 뉴클레오티드를 포함하는 서열에 결합하도록 설계될 수 있다.

[0239] <실시예>

[0240] 실시예 1: CISH로 표적화된 아연 핑거 단백질 뉴클레아제 (ZFN)

[0241] 본질적으로 문헌 [Urnov, et al. (2005) Nature 435(7042):646-651], [Perez, et al. (2008) Nature Biotechnology 26(7):808-816]에 기재된 바와 같이 및 미국 특허 번호 6,534,261에 기재된 바와 같이, CISH로 표적화된 아연 핑거 단백질을 설계하고 mRNA, 플라스미드, AAV 또는 아데노바이러스 벡터에 혼입하였다. 표 1은 예시적인 CISH ZFP DNA-결합 도메인의 DNA 결합 도메인 내의 인식 나선 및 이들 ZFP에 대한 표적 부위를 나타낸다 (DNA 표적 부위는 대문자로 표시되고; 비접촉 뉴클레오티드는 소문자로 표시됨). ZFP 인식 나선에 의해 접촉된 표적 부위의 뉴클레오티드는 대문자로 표시되고; 비접촉 뉴클레오티드는 소문자로 표시된다. TALEN 및/또는 sgRNA는 또한 관련 기술분야에 공지된 방법에 따라 표 2에 나타난 CISH 서열 (예를 들어, 표 2에 나타난 표적 부위의 9 내지 20개 이상 (9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21개 이상)의 뉴클레오티드 (인접 또는 비인접)를 포함하는 표적 부위)로 설계하였다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,586,526 (TALEN을 위한 정규 또는 비정규 RVD 사용) 및 미국 특허 공개 번호 2015/0056705를 참조한다.

[0242] <표 1>

표 1: CISH 아연 핑거 단백질 인식 나선 설계

SBS #		설계					
	링커	F1	F2	F3	F4	F5	F6
59488	L0	RSDHLSQ (SEQ ID NO:2)	QNATRTK (SEQ ID NO:3)	RSDNLSE (SEQ ID NO:4)	KRCNLRC (SEQ ID NO:5)	DRSTRTK (SEQ ID NO:6)	RRDNLHS (SEQ ID NO:7)
59489	L0	GHTSLKR (SEQ ID NO:8)	TSGHLSR (SEQ ID NO:9)	RSDNLAR (SEQ ID NO:10)	QNVSRPR (SEQ ID NO:11)	TSGHLSR (SEQ ID NO:9)	QSGHLSR (SEQ ID NO:12)
59440	L0	RWQYLPT (SEQ ID NO:13)	DRSALAR (SEQ ID NO:14)	RSDNLAR (SEQ ID NO:10)	DRSNLTR (SEQ ID NO:15)	QSGNLAR (SEQ ID NO:16)	ATCCLAH (SEQ ID NO:17)
59441	L0	RSDDLTR (SEQ ID NO:18)	QAATLSR (SEQ ID NO:19)	RSDHLSA (SEQ ID NO:20)	DRSDLR (SEQ ID NO:21)	RSDDLTR (SEQ ID NO:18)	DRSHLAR (SEQ ID NO:22)
59558	N6a	QSGDLTR (SEQ ID NO:23)	QSGNLHV (SEQ ID NO:24)	QSGHLAR (SEQ ID NO:25)	NRDYLMT (SEQ ID NO:26)	RSDSLR (SEQ ID NO:27)	CREYRGK (SEQ ID NO:28)
59557	L0	QSSHLTR (SEQ ID NO:29)	QSSDLTR (SEQ ID NO:30)	QSGNLAR (SEQ ID NO:16)	RLDILQQ (SEQ ID NO:31)	RSDNLST (SEQ ID NO:32)	DNSYLPR (SEQ ID NO:33)
59581	N7a	DRSNLSR (SEQ ID NO:34)	LRQDLKR (SEQ ID NO:35)	RSDNLST (SEQ ID NO:32)	DNSNRIN (SEQ ID NO:36)	QSSDLR (SEQ ID NO:37)	WKWNLRA (SEQ ID NO:38)
59580	L0	RSDSLR (SEQ ID NO:27)	CREYRGK (SEQ ID NO:28)	QSGHLAR (SEQ ID NO:25)	QKGTLGE (SEQ ID NO:39)	RSDNLST (SEQ ID NO:32)	QSGHLSR (SEQ ID NO:12)

[0243]

[0244] <표 2>

표 2: 아연 핑거 단백질의 표적 부위

SBS #	표적 부위
59488	5' ggAAGGCCcCAGCAGGCAAGGgctgcat (SEQ ID NO:40)
59489	5' gaGGAGGTgGCAGAGGGTACcagccc (SEQ ID NO:41)
59440	5' ccAGCAAAGGACGAGGTCTAGaaggcag (SEQ ID NO:42)
59441	5' gtGGAGCGGACTGGGCAGCGgcccctgt (SEQ ID NO:43)
59558	5' gaTGCCTGgCCTGGACAAGCAgttgag (SEQ ID NO:44)
59557	5' gaGTCCAGACGGAAGCTGGAgtcggcat (SEQ ID NO:45)
59581	5' atAGTGCTgCACAAGGCTGACcacatcc (SEQ ID NO:46)
59580	5' ccGGAAAGgCCAGGATGCGTGgcctgga (SEQ ID NO:47)

[0245]

[0246]

모든 ZFN 쌍별 조합을 절단 활성화에 대해 시험하였다. 활성화된 T 세포를 일정 범위의 mRNA (100 uL의 형질감염 반응물 중 3E6 T 세포 당 0.5 µg 내지 6 µg)에 걸쳐 ZFN을 표적화하는 CISH를 코딩하는 mRNA로 전기천공하였다. 형질감염 후 3-4일 동안 T 세포를 증식시키고, 게놈 DNA를 수확하고, CISH 편집 효율을 심층 서열분석에 의해 평가하였다. 모든 쌍은 표 3에 나타난 바와 같이 활성인 것으로 밝혀졌다 (여기서, 절단 백분율은 표시된 투여량에서 표시된 쌍으로 나타내며, 예를 들어 6 µg의 mRNA를 사용하는 쌍 59488/59489를 사용하여 CISH 유전자의 89% 절단).

[0247]

<표 3>

표 3: 뉴클레아제-매개 절단

	ZFN 쌍		6 µg	2 µg	0.5 µg
엑손 2	59488	59489	89	84	60
	59440	59441	84	82	59
엑손 3	59558	59557	84	80	55
	59581	59580	82	83	72

[0248]

[0249]

이들 설계는 미국 특허 번호 9,394,531에 기재된 바와 같이 정규 또는 비정규 링커 (핑거 사이) 및/또는 ZFP 및 절단 도메인 사이의 링커를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 임의의 핑거 모듈 사이 및/또는 ZFP 및 절단 도메인 사이의 임의의 링커를 포함할 수 있음이 명백할 것이다. 또한, 미국 특허 번호 8,772,453 및 미국 특허 공개 번호 2015/0064789를 참조한다.

[0250]

또한, 임의의 뉴클레아제 (ZFN, CRISPR/Cas 시스템 및 TALEN)는 조작된 절단 도메인, 예를 들어 미국 특허 번호 8,623,618에 개시된 이중이량체 (예를 들어, ELD 및 KKR 조작된 절단 도메인) 및/또는 미국 특허 공개 번호 2018/0087072에 기재된 바와 같은 위치 416, 422, 447, 448 및/또는 525에 하나 이상의 돌연변이를 갖는 절단 도메인을 포함할 수 있다. ZFN은 또한 미국 특허 공개 번호 2018/0087072에 기재된 바와 같은 ZFP의 백본 잔기에 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 이들 돌연변이체를 본원에 기재된 예시적인 DNA-결합 도메인과 함께 사용하였다.

[0251]

실시예 2: 표적화된 CISH 공여자 삽입

[0252]

CISH 유전자좌로의 표적화된 통합을 또한 AAV GFP 공여자를 사용하여 수행하였다. 먼저, CISH 절단 부위로 상동성 아암 5' 및 3'에 의해 플랭킹된 GFP 발현 카세트를 코딩하도록 AAV GFP 공여자를 구축하였다. 세포를 CISH 표적화된 ZFN으로 처리하고 AAV 공여자와 공동-투여한 경우, 플랭킹 상동성 아암은 상동성 지정 복구 경로를 통해 CISH 절단 부위의 GFP 발현 카세트의 표적화된 삽입을 매개하기 위해 필요하다. 이 실험에서, 활성화된 T 세포를 CISH mRNA로 전기천공하고, AAV GFP 공여자와 공동-투여하였다. %GFP 양성 세포의 FACS 분석에 의해 7일 후 표적화된 통합 효율을 평가하였다.

[0253]

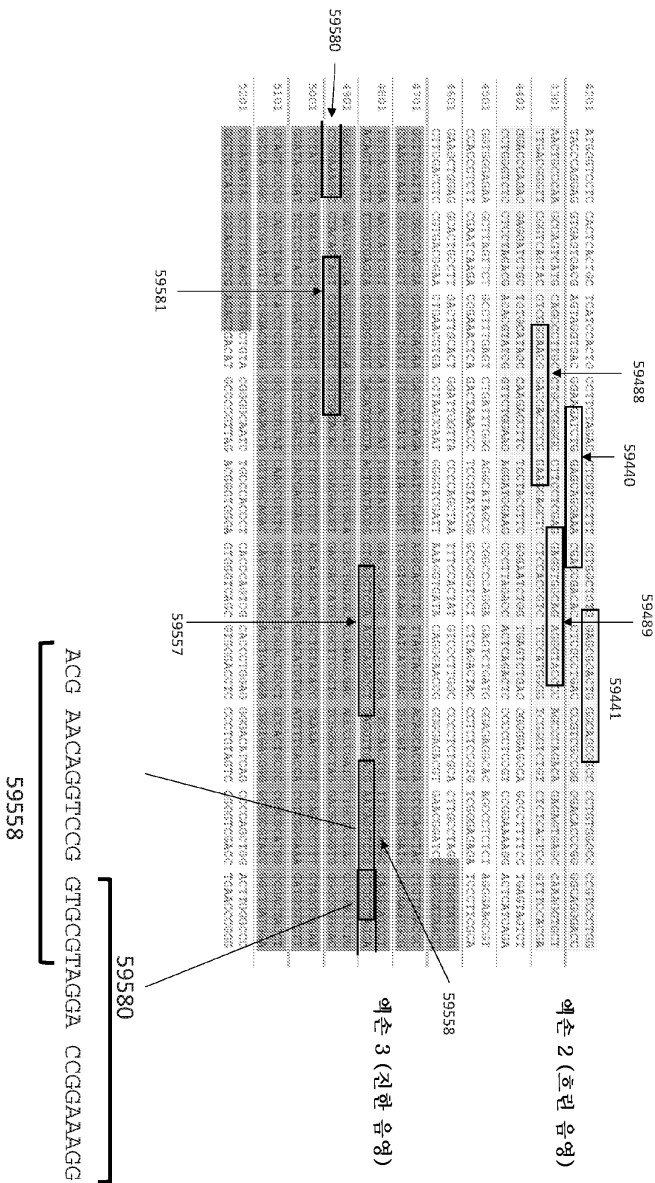
도 2 및 3에 나타난 바와 같이, GFP 발현에 대한 FACS 분석은 공여자 (GFP) 삽입의 적어도 70% 효율이 본원에 기재된 바와 같은 CISH 표적화된 뉴클레아제 및 공여자 둘 모두를 받는 세포에서 얻어졌음을 나타낸다.

- [0254] 실시예 3: AAVS1 세이프 하버 유전자좌와 비교하여 CISH에 공여자 삽입 후 향상된 면역자극 활성화
- [0255] AAV GFP 공여자를 사용하여 CISH 또는 AAVS1 유전자좌로의 표적화된 통합을 또한 수행하였다. 먼저, CISH 또는 AAVS1 절단 부위로 상동성 아암 5' 및 3'에 의해 플랭킹된 GFP 발현 카세트를 코딩하도록 AAV GFP 공여자를 구축하였다. 세포를 CISH 또는 AAVS1 표적화된 ZFN (CISH-특이적 ZFN: SB59440/SB59441 (상기 표 1에 나타난 바와 같이); AAVS1-특이적 ZFN (미국 특허 번호 9,957,526에 기재된 바와 같이 SB30054 및 SB30035라고 지칭되는 ZFP를 포함함)으로 처리하고 상응하는 AAV 공여자와 공동-투여한 경우, 플랭킹 상동성 아암은 상동성 지정 복구 경로를 통해 CISH 또는 AAVS1 절단 부위의 GFP 발현 카세트의 표적화된 삽입을 매개하기 위해 필요하다. 이 실험에서, 활성화된 이펙터 T 세포를 CISH 또는 AAVS1 ZFN mRNA로 전기천공하고, 상응하는 AAV GFP 공여자와 공동-투여하였다. Miseq 분석에 의해 7일 후 계능 변형 효율을 평가하였다.
- [0256] 도 5에 나타난 바와 같이, 본원에 기재된 바와 같은 CISH 또는 AAVS1 표적화된 뉴클레아제 및 AAV GFP 공여자들 모두를 받은 세포에서 높은 수준의 계능 변형 효율을 얻었다. 도 6은 CISH에서 GFP 공여자의 표적화된 통합이 아마도 시토카인 신호전달 저해제 (SOCS) 패밀리의 구성원인 CISH 발현의 녹아웃으로 인해 TCR-매개 활성화 시 이펙터 T 세포 면역자극 기능을 향상시킨다는 것을 나타낸다.
- [0257] 실시예 4: 생체의 방법
- [0258] CISH 유전자에 통합된 트랜스진 (예를 들어, CAR 및/또는 다른 치료 트랜스진)을 포함하는 본원에 기재된 바와 같은 유전자 변형된 세포 (예를 들어, T-세포 또는 조혈 줄기 세포)를 암 또는 염증성 장애를 갖는 환자에게 투여하였다. 세포의 투여 (단일 또는 다중 투여)는 세포 요법에 공지된 임의의 방법이다. 질환 또는 장애 (또는 그의 증상)는 투여 후 호전되었다.
- [0259] 본원에 언급된 모든 특허, 특허 출원 및 간행물은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0260] 개시내용은 이해를 명확하게 하기 위해 예시 및 예를 통해 일부 상세히 제공되었지만, 본 개시내용의 취지 또는 범위를 벗어나지 않고 다양한 변화 및 변형이 실시될 수 있음이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 따라서, 상기 설명 및 예는 제한으로 해석되어서는 안된다.

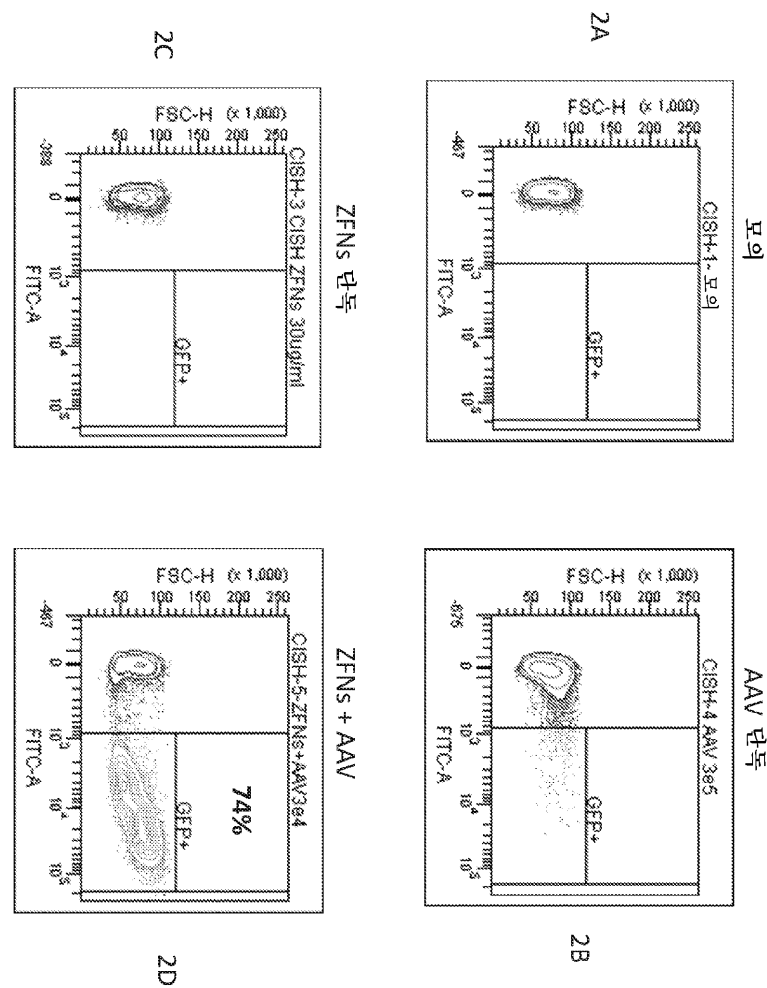


도면

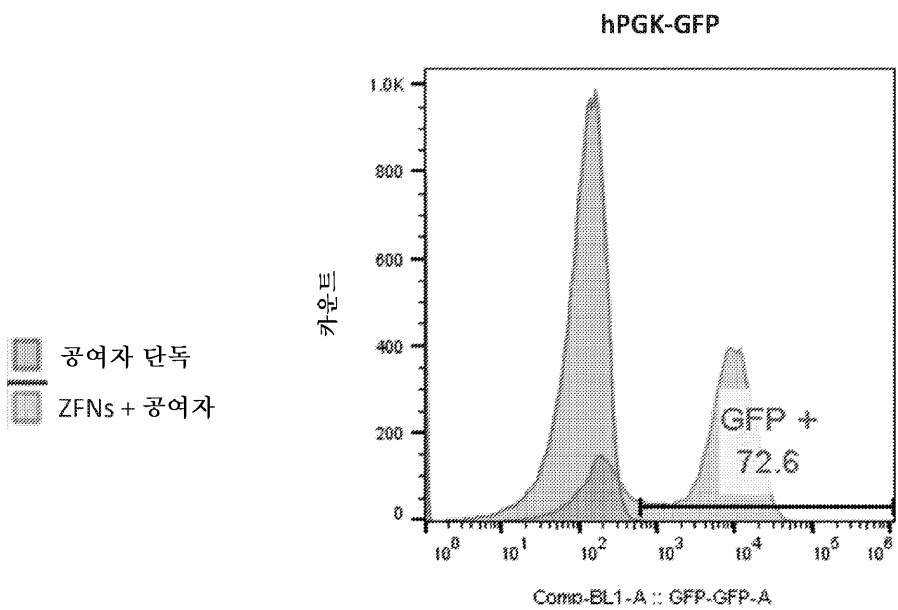
도면1



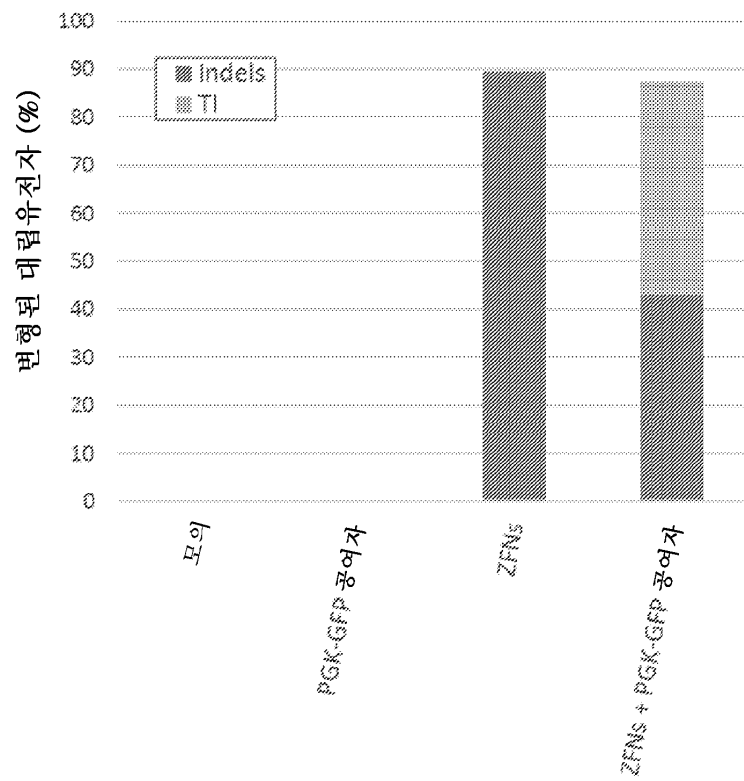
도면2



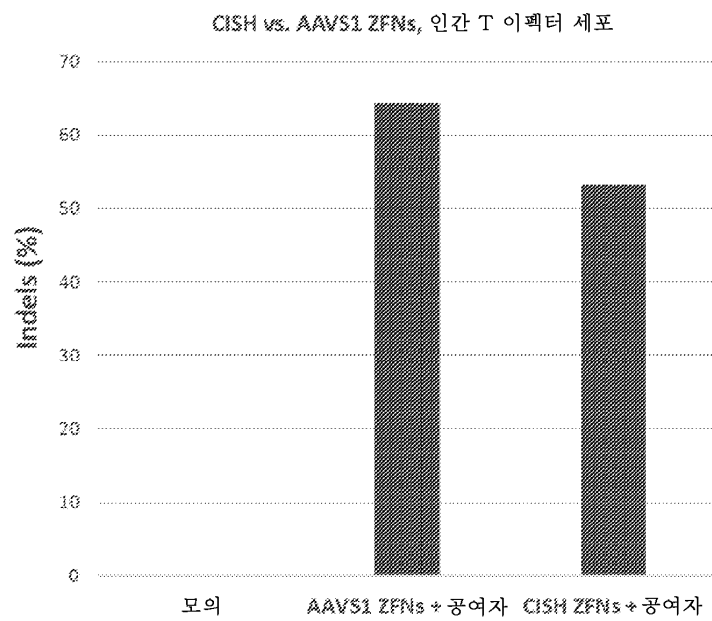
도면3



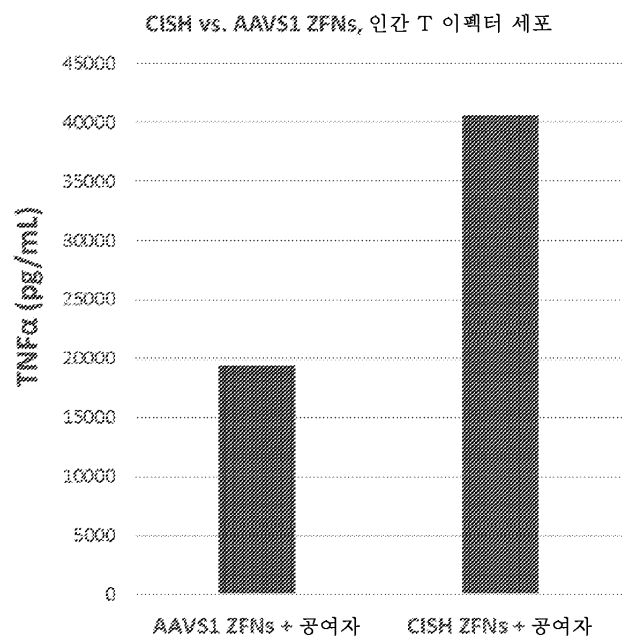
도면4



도면5



도면6



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> SANGAMO THERAPEUTICS, INC.

<120> GENETIC MODIFICATION OF CYTOKINE INDUCIBLE SH2-CONTAINING PROTEIN  
(CISH) GENE

<130> 8325-0167.40

<140> PCT/US2018/060038

<141> 2018-11-09

<150> 62/716,002

<151> 2018-08-08

<150> 62/583,724

<151> 2017-11-09

<160> 50

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 196

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:



FokI cleavage half domain sequence

<400> 1

Gln Leu Val Lys Ser Glu Leu Glu Glu Lys Lys Ser Glu Leu Arg His

1                      5                      10                      15  
Lys Leu Lys Tyr Val Pro His Glu Tyr Ile Glu Leu Ile Glu Ile Ala  
20                      25                      30  
Arg Asn Ser Thr Gln Asp Arg Ile Leu Glu Met Lys Val Met Glu Phe  
35                      40                      45  
Phe Met Lys Val Tyr Gly Tyr Arg Gly Lys His Leu Gly Gly Ser Arg  
50                      55                      60  
Lys Pro Asp Gly Ala Ile Tyr Thr Val Gly Ser Pro Ile Asp Tyr Gly

65                      70                      75                      80  
Val Ile Val Asp Thr Lys Ala Tyr Ser Gly Gly Tyr Asn Leu Pro Ile  
85                      90                      95  
Gly Gln Ala Asp Glu Met Gln Arg Tyr Val Glu Glu Asn Gln Thr Arg  
100                      105                      110  
Asn Lys His Ile Asn Pro Asn Glu Trp Trp Lys Val Tyr Pro Ser Ser  
115                      120                      125  
Val Thr Glu Phe Lys Phe Leu Phe Val Ser Gly His Phe Lys Gly Asn

130                      135                      140  
Tyr Lys Ala Gln Leu Thr Arg Leu Asn His Ile Thr Asn Cys Asn Gly  
145                      150                      155                      160  
Ala Val Leu Ser Val Glu Glu Leu Leu Ile Gly Gly Glu Met Ile Lys  
165                      170                      175  
Ala Gly Thr Leu Thr Leu Glu Glu Val Arg Arg Lys Phe Asn Asn Gly  
180                      185                      190  
Glu Ile Asn Phe

195

<210> 2

<

211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide

<400> 2

Arg Ser Asp His Leu Ser Gln

1 5

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
 peptide

<400> 3

Gln Asn Ala Thr Arg Thr Lys

1 5

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 4

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Glu

1 5

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 5

Lys Arg Cys Asn Leu Arg Cys

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 6

Asp Arg Ser Thr Arg Thr Lys

1 5

<210> 7

<211>

> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 7

Arg Arg Asp Asn Leu His Ser

1 5

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 8

Gly His Thr Ser Leu Lys Arg

1 5

<210> 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 9

Thr Ser Gly His Leu Ser Arg

1 5

<210> 10

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 10

Arg Ser Asp Asn Leu Ala Arg

1 5

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 11

Gln Asn Val Ser Arg Pro Arg

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 12

Gln Ser Gly His Leu Ser Arg

1 5

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic



peptide

<400> 13

Arg Trp Gln Tyr Leu Pro Thr

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 14

Asp Arg Ser Ala Leu Ala Arg

1 5

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 15

Asp Arg Ser Asn Leu Thr Arg

1 5

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 16

Gln Ser Gly Asn Leu Ala Arg

1 5

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 17

Ala Thr Cys Cys Leu Ala His

1 5

<210> 18

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 18

Arg Ser Asp Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 19

Gln Ala Ala Thr Leu Ser Arg

1 5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 20

Arg Ser Asp His Leu Ser Ala

1 5

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 21

Asp Arg Ser Asp Leu Ser Arg

1 5

<210> 22

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 22

Asp Arg Ser His Leu Ala Arg

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 23

Gln Ser Gly Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 24

Gln Ser Gly Asn Leu His Val

1 5

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 25

Gln Ser Gly His Leu Ala Arg

1 5

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 26

Asn Arg Tyr Asp Leu Met Thr

1 5

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
peptide

<400> 27

Arg Ser Asp Ser Leu Leu Arg

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 28

Cys Arg Glu Tyr Arg Gly Lys

1 5

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 29

Gln Ser Ser His Leu Thr Arg

1 5

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 30

Gln Ser Ser Asp Leu Thr Arg

1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 31

Arg Leu Asp Ile Leu Gln Gln

1 5

<210> 32



<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 32

Arg Ser Asp Asn Leu Ser Thr

1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 33

Asp Asn Ser Tyr Leu Pro Arg

1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 34

Asp Arg Ser Asn Leu Ser Arg

1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide

<400> 35

Leu Arg Gln Asp Leu Lys Arg

1                      5

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 36

Asp Asn Ser Asn Arg Ile Asn

1                      5

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 37

Gln Ser Ser Asp Leu Ser Arg

1                      5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 38

Trp Lys Trp Asn Leu Arg Ala

1                      5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 39

Gln Lys Gly Thr Leu Gly Glu

1                      5

<210> 40

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

CISH target site sequence

<400> 40

ggaaggcccc agcaggcaag ggctgcat                      28

<210> 41

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

CISH target site sequence

<400> 41

gaggaggtgg cagaggttac cccagccc                      28

<210> 42

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

CISH target site sequence

<400> 42

ccagcaaagg acgaggtcta gaaggcag                      28

<210> 43

<211> 28

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

CISH target site sequence

<400> 43  
gtggagcgga ctgggcagcg gccctgt 28

<210> 44  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Unknown  
<220><223> Description of Unknown:  
CISH target site sequence

<400> 44  
gatgcgtggc ctggacaagc agttggag 28

<210> 45  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Unknown  
<220><223> Description of Unknown:  
CISH target site sequence

<400> 45  
gagtcagac ggaagctgga gtcggcat 28

<210> 46  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Unknown  
<220><223> Description of Unknown:  
CISH target site sequence

<400> 46  
atagtctgc acaaggctga ccacatcc 28

<210> 47  
  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Unknown  
<220><223> Description of Unknown:  
CISH target site sequence

<400> 47

ccggaaggc caggatgcgt ggcctgga 28

<210> 48

<211> 1100

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

CISH sequence

<400> 48

atgggtcctc cactcaactgc tcatccactg ccttctagac ctctctctt gctggctgtg 60

gagcggactg ggcagcggcc cctgtgggcc ccgtccctgg aactgccca gccagtcag 120

cagcccttgc ctgtggggc cttcctcgag gaggtggcag agggtaaccc agcccagaca 180

gagagtgagc caaaggctgt ggaccagag gaggatctgc tgtgcatagc caagaccttc 240

tcctaccttc gggaatctgg tgagtctgag gggggaggca ggccttttcc tgagtagtct 300

ggtgggagaa gcttagttct gcctttgagt ctgatttggg aggcatagcc cggcccagga 360

gagtctgatg ggagaggcac agccctctct agggaagcgt gaagctggag gcactgcctt 420

gacttgact ggattggta cccagctaa ttccactat gtccttggc cccctctgca 480

cttgctagg ctggtattgg ggttcatta cgccagcga ggcccagaa cacctgcaga 540

agatgccaga aggcacgttc ttagtacgtg acagcacgca cccagctac ctgttcacgc 600

tgtcagtga aaccactcgt ggccccacca atgtacgcat tgagtatgcc gactccagct 660

tccgtctgga ctccaactgc ttgtccaggc cagcatcct ggcctttccg gatgtggtca 720

gccttctgca gcactatgtg gcctctgca ctgctgata ccgaagcgac agccccgatc 780

ctgtccac cccggccctg cctatgcta aggaggatgc gcctagtac ccagcactgc 840

ctgtcctcc accagccact gctgtacac taaaactgg gcagccctt gtacgcagaa 900

gcagtcccc cagcctgcaa cactgtgcc gccttgcac caaccgtctg gtggccgacg 960

tggactgcct gccactgccc cggcgcatgg ccgactacct ccgacgtac cccttcagc 1020

tctgactgta cggggcaatc tgcccacct caccagtcg caccctggag gggacatcag 1080

ccccagctgg acttgggccc 1100

<210> 49

<211> 9

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:



'LAGLIDADG' family peptide motif sequence

<400> 49

Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly

1 5

<210> 50

<211> 32

<212> DNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

CISH sequence

<400> 50

ggaaaggcca ggatgcgtgg cctggacaag ca

32