



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0016353
(43) 공개일자 2021년02월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 C12N 15/90 (2006.01) A61K 35/17 (2014.01)
 A61K 48/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
 C07K 14/715 (2006.01) C12N 15/10 (2017.01)
 C12N 15/113 (2010.01) C12N 5/0783 (2010.01)
 C12N 9/22 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
 C12N 15/90 (2013.01)
 A61K 35/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7033789
- (22) 출원일자(국제) 2019년04월25일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2020년11월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2019/029118
- (87) 국제공개번호 WO 2019/210057
 국제공개일자 2019년10월31일
- (30) 우선권주장
 62/663,562 2018년04월27일 미국(US)

- (71) 출원인
 시애틀 칠드런즈 호스피탈 디/비/에이 시애틀 칠드런즈 리서치 인스티튜트
 미국 98105 워싱턴 시애틀 4800 샌드 포인트 웨이 노스이스트
- (72) 발명자
 샤렌버그, 앤드류 엠.
 미국 98101 워싱턴주 시애틀 나인스 애브뉴 1900 시애틀 칠드런즈 호스피탈 (디비에이 시애틀 칠드런즈 리서치 인스티튜트) 내
 롤링스, 데이비드 제이.
 미국 98101 워싱턴주 시애틀 나인스 애브뉴 1900 시애틀 칠드런즈 호스피탈 (디비에이 시애틀 칠드런즈 리서치 인스티튜트) 내
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 양영준, 김영

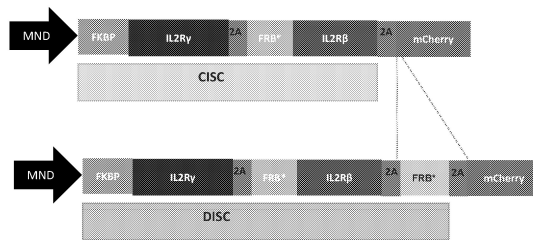
전체 청구항 수 : 총 51 항

(54) 발명의 명칭 **라파마이신 내성 세포**

(57) 요약

본 출원은 특히 라파마이신에 대해 내성이 되도록 숙주 세포에서 발현시키기 위한 단백질을 포함하는 조성물에 관한 것이다. 본 출원은 추가로 세포 신호전달의 조절을 위해 및 세포의 선택적 확장을 위해 본원에 개시된 단백질, 세포 및 조성물을 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
C07K 14/4705 (2013.01)
C07K 14/7155 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 5/0636 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C07K 2319/02 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자

소머, 카렌

미국 98101 워싱턴주 시애틀 나인스 애브뉴 1900
시애틀 칠드런즈 호스피탈 (디비에이 시애틀 칠드
런즈 리서치 인스티튜트) 내

웨스트, 사무엘

미국 98101 워싱턴주 시애틀 나인스 애브뉴 1900
시애틀 칠드런즈 호스피탈 (디비에이 시애틀 칠드
런즈 리서치 인스티튜트) 내

호나케르, 유치 치앙

미국 98101 워싱턴주 시애틀 나인스 애브뉴 1900
시애틀 칠드런즈 호스피탈 (디비에이 시애틀 칠드
런즈 리서치 인스티튜트) 내

다케우치, 료

미국 98101 워싱턴주 시애틀 나인스 애브뉴 1900
시애틀 칠드런즈 호스피탈 (디비에이 시애틀 칠드
런즈 리서치 인스티튜트) 내

명세서

청구범위

청구항 1

데옥시리보핵산 (DNA) 엔도뉴클레아제, 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산;

세포에서 표적 게놈 유전자좌 내의 표적 서열에 상보적인 스페이서 서열을 포함하는 가이드 RNA (gRNA), 또는 gRNA를 코딩하는 핵산; 및

네이키드 FKBP-라파마이신 결합 (FRB) 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 공여자 카세트를 포함하는 공여자 주형

을 포함하며, 여기서 DNA 엔도뉴클레아제, gRNA, 및 공여자 주형은 DNA 엔도뉴클레아제와 gRNA의 회합에 의해 형성된 복합체가 세포에서 표적 게놈 유전자좌 내로의 공여자 카세트의 표적화된 통합을 촉진시켜 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 발현할 수 있는 유전자 변형된 세포를 생성할 수 있도록 구성되는 것인

시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, DNA 엔도뉴클레아제가 Cas9 엔도뉴클레아제인 시스템.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산이 유전자 변형된 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되고/거나;

gRNA를 코딩하는 핵산이 유전자 변형된 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되고/거나;

공여자 카세트에서 1개 이상의 코딩 서열이 유전자 변형된 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되는 것인 시스템.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 공여자 카세트가 상동성 지정 복구 (HDR)에 의해 표적 게놈 유전자좌 내로 통합될 수 있도록 공여자 주형이 구성되는 것인 시스템.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 공여자 카세트가 비-상동성 말단 연결 (NHEJ)에 의해 표적 게놈 유전자좌 내로 통합될 수 있도록 공여자 주형이 구성되는 것인 시스템.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, DNA 엔도뉴클레아제, 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산이 리포솜 또는 지질 나노입자 중에 제형화되는 것인 시스템.

청구항 7

제6항에 있어서, 리포솜 또는 지질 나노입자가 gRNA 또는 gRNA를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는 것인 시스템.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 리보핵단백질 (RNP) 복합체에서 gRNA와 회합된 DNA 엔도뉴클레아제를 포함하는 시스템.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 네이키드 FRB 폴리펩티드가 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함하는 것인 시스템.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 공여자 카세트가 이량체화 활성화가능한 화학적으로 유도된 신호전달 복합체 (CISC)의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 1개 이상의 핵산 서열을 추가로 포함하고, 여기서 CISC의 폴리펩티드 성분이

i) 제1 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하는 제1 CISC 성분; 및

ii) 제2 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하는 제2 CISC 성분

을 포함하고;

여기서 제1 CISC 성분 및 제2 CISC 성분은 세포에서 발현될 때 이들이 라파마이신 또는 라파로그의 존재하에 이량체화하여 신호전달-적격성 CISC를 생성할 수 있도록 구성되는 것인 시스템.

청구항 11

제10항에 있어서, 제1 또는 제2 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체가 FK506 결합 단백질 (FKBP) 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하고/거나, 다른 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체가 FRB 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하는 것인 시스템.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 제1 CISC 성분의 막횡단 도메인이 IL-2 수용체 막횡단 도메인을 포함하고/거나, 제2 CISC 성분의 막횡단 도메인이 IL-2 수용체 막횡단 도메인을 포함하는 것인 시스템.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 또는 제2 CISC 성분의 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체가 IL-2 수용체 서브유닛 감마 (IL2R γ) 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하고/거나, 다른 CISC 성분의 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체가 IL-2 수용체 서브유닛 베타 (IL2R β) 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하는 것인 시스템.

청구항 14

제13항에 있어서, IL2R β 도메인 폴리펩티드가 말단절단된 것인 시스템.

청구항 15

제13항에 있어서, IL2R β 도메인을 코딩하는 핵산이 서열식별번호: 4의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 시스템.

청구항 16

제13항에 있어서, IL2R β 도메인이 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 포함하는 것인 시스템.

청구항 17

제10항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 라파로그가 에베롤리무스, CCI-779, C20-메탈릴라파마이신, C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신, C16-iRap, AP21967, 나트륨 마이코페놀산, 베니디핀 히드로클로라이드, AP1903, 및 AP23573, 및 그의 대사물 및 유도체로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 시스템.

청구항 18

제10항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 네이키드 FRB 도메인을 코딩하는 핵산이 CISC의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 1개 이상의 핵산 서열의 하류에 있는 것인 시스템.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 공여자 카세트가 (i) CISC의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 1개 이상의 핵산 서열 각각의 사이에; 및/또는 (ii) 네이키드 FRB 도메인을 코딩하는 핵산과 CISC의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 인접한 핵산 서열 사이에 자가-절단 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 것인 시스템.

청구항 20

제19항에 있어서, 공여자 카세트에서 코딩된 각각의 자가-절단 폴리펩티드가 P2A, T2A, E2A 및 F2A로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 것인 시스템.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 공여자 카세트가 공여자 카세트에서 1개 이상의 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함하는 것인 시스템.

청구항 22

제21항에 있어서, 프로모터가 유도성 프로모터 또는 구성적 프로모터인 시스템.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 프로모터가 MND 프로모터인 시스템.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 공여자 카세트가 검출가능한 마커를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는 것인 시스템.

청구항 25

제24항에 있어서, 검출가능한 마커가 녹색 형광 단백질 (GFP) 폴리펩티드, mCherry 폴리펩티드, 또는 저친화도 신경 성장 인자 수용체 (LNGFR)인 시스템.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에 소포체 국소화 신호 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 결합된 것인 시스템.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 공여자 카세트가 서열식별번호: 3의 뉴클레오티드 서열로부터의 핵산 서열을 포함하는 것인 시스템.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 공여자 주형이 바이러스 벡터인 시스템.

청구항 29

제28항에 있어서, 바이러스 벡터가 렌티바이러스, 아데노바이러스, 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터인 시스템.

청구항 30

세포에게

데옥시리보핵산 (DNA) 엔도뉴클레아제, 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산;

세포에서 표적 게놈 유전자좌 내의 표적 서열에 상보적인 스페이서 서열을 포함하는 가이드 RNA (gRNA), 또는 gRNA를 코딩하는 핵산; 및

네이키드 FKBP-라파마이신 결합 (FRB) 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 공여자 카세트를 포함하는 공여자 주형

을 제공하는 것을 포함하며,

여기서 DNA 엔도뉴클레아제, gRNA, 및 공여자 주형은 DNA 엔도뉴클레아제와 gRNA의 회합에 의해 형성된 복합체가 세포에서 표적 게놈 유전자좌로 공여자 카세트의 표적화된 통합을 촉진시켜 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 발현할 수 있는 유전자 변형된 세포를 생성할 수 있도록 구성되는 것인

세포 게놈을 편집하는 방법.

청구항 31

제30항의 방법에 따라 제조된 유전자 변형된 세포.

청구항 32

제31항에 있어서, 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드가 세포내에서 발현되도록 공여자 카세트가 구성되는 것인 세포.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 세포가 진핵생물 세포인 세포.

청구항 34

제33항에 있어서, 세포가 포유동물 세포인 세포.

청구항 35

제34항에 있어서, 세포가 조혈 줄기 세포인 세포.

청구항 36

제35항에 있어서, 세포가 림프구인 세포.

청구항 37

제36항에 있어서, 세포가 전구체 T 세포 또는 T 조절 (T_{reg}) 세포인 세포.

청구항 38

제36항 또는 제37항에 있어서, 세포가 CD34+, CD8+ 또는 CD4+ 세포인 세포.

청구항 39

제38항에 있어서, 세포가 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포, 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포인 세포.

청구항 40

제38항에 있어서, 세포가 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포인 세포.

청구항 41

제31항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 공여자 카세트에 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 결합된 상응하는 세포와 비교하여 라파마이신 또는 라파로그의 존재하에 세포가 더 많은 정도로 증식하는

것인 세포.

청구항 42

제41항에 있어서, 라파마이신 또는 라파로그가 0.1 nM 또는 약 0.1 nM 내지 100 nM 또는 약 100 nM의 농도로 존재하는 것인 세포.

청구항 43

제31항 내지 제42항 중 어느 한 항의 유전자 변형된 세포를 라파마이신 또는 라파로그와 접촉시키는 것을 포함하는, 상기 유전자 변형된 세포를 활성화시키는 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 라파로그가 에베롤리무스, CCI-779, C20-메탈릴라파마이신, C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신, C16-iRap, AP21967, 나트륨 마이크로페놀산, 베니디핀 히드로클로라이드, AP1903, 또는 AP23573, 또는 이들의 임의의 대사물, 유도체 및/또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, 세포와 접촉하는 라파마이신 또는 라파로그가 0.1 nM 또는 약 0.1 nM 내지 100 nM 또는 약 100 nM의 농도인 방법.

청구항 46

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 라파마이신 또는 라파로그와 접촉시킨 후에, CISC 성분을 발현하는 세포를 선택적으로 확장시키는 것인 방법.

청구항 47

혼합된 세포 집단을 라파마이신 또는 라파로그와 접촉시키는 것을 포함하는, 혼합된 세포 집단에 함유된 제31항 내지 제42항 중 어느 한 항에 따른 유전자 변형된 세포의 집단을 선택적으로 확장시키는 방법이며, 여기서 CISC 성분 및 네이키드 FRB 도메인을 발현하는 유전자 변형된 세포가 혼합된 세포 집단에 있는 다른 세포보다 더 큰 정도로 시험관내 또는 생체내에서 활성화되고 확장되는 것인 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 라파로그가 에베롤리무스, CCI-779, C20-메탈릴라파마이신, C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신, C16-iRap, AP21967, 나트륨 마이크로페놀산, 베니디핀 히드로클로라이드, AP1903, 또는 AP23573, 또는 이들의 임의의 대사물, 유도체 및/또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 49

제47항 또는 제48항에 있어서, 혼합된 세포 집단과 접촉하는 라파마이신 또는 라파로그가 0.1 nM 또는 약 0.1 nM 내지 100 nM 또는 약 100 nM의 농도인 방법.

청구항 50

제31항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 질환 또는 상태, 예컨대 자가면역 질환 (예를 들어, IPEX 증후군) 또는 장기 이식으로 인한 장애 (예를 들어, GVHD)를 억제하거나 또는 치료하는데 사용하기 위한 유전자 변형된 림프구 세포.

청구항 51

제31항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 의약으로서의 유전자 변형된 림프구 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참고**

[0002] 본 출원은 "라파마이신 내성 세포"를 발명의 명칭으로 하는, 2018년 4월 27일에 출원한 미국 가출원 번호 62/663,562를 우선권으로 주장하며, 이는 그의 전문이 본원에 명시적으로 참고로 포함된다.

[0003] **서열 목록에 대한 참고**

[0004] 본 출원은 전자 포맷의 서열 목록과 함께 제출되었다. 서열 목록은 파일명 SCRI186WOSEQLISTING를 갖는 파일로서 제공되었고, 이는 2019년 4월 25일에 생성되었으며, 대략 120 Kb의 크기를 갖는다. 서열 목록의 전자 포맷에 대한 정보는 그의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

[0005] **기술분야**

[0006] 라파마이신 또는 관련 화학적 화합물의 존재하에 두 성분이 결합하여, 세포내에서 발현된 나이키드 FKBP-라파마이신 결합 단백질과 함께 사용하기 위한 활성 신호전달 복합체를 생성함으로써, 숙주 세포에 대해 라파마이신 내성을 부여하는 화학적으로 유도된 신호전달 복합체가 본원에 제공된다.

배경 기술

[0007] 시롤리무스로도 공지된 라파마이신은 박테리움 스트렙토마이세스 히그로스코피쿠스(*Streptomyces hygroscopicus*)로부터 단리된 복잡한 마크롤리드 천연 생성물이며, 이는 1975년도에 이스터 섬 (라파 누이로도 공지됨)의 토양 샘플에서 발견되었다 (Huang, S. et al. (2003). *Cancer Biol. Ther.*, 2(3):222-232; Abraham, R. T. et al. (1996). *Ann. Rev. Immunol.*, 14:483-510; Pollock, R. et al. (2002). *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13(5):459-467; Bayle, J. H. et al. (2006). *Chem. Biol.*, 13(1):99-107). 라파마이신은 단백질 FKBP12 (FK506 결합 단백질 12) 및 FRB (FKBP12 라파마이신 결합 도메인)의 이중이량체화를 매개한다 (Huang, S. et al. (2003). *Cancer Biol. Ther.*, 2(3):222-232). 양호한 약동학적 파라미터, 예컨대 양호한 수준의 가용성 및 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 막 투과성, 뿐만 아니라 경구 생체이용률을 비롯한 라파마이신의 우수한 생리학적 성질 때문에 (Abraham, R. T. et al. (1996). *Ann. Rev. Immunol.*, 14:483-510), 이는 포유동물 세포 및 유기체에서 광범위한 적용을 위해 소분자 이량체화제로서 사용되었다 (예를 들어, Pollock, R. et al. (2002). *Curr. Opin. Biotechnol.*, 13(5):459-467).

[0008] CISC (화학적으로 유도된 신호전달 복합체)는 국제 특허 출원 번호 PCT/US2017/065746 (그의 개시내용은 전문이 본원에 참고로 포함됨)에 기재된 바와 같이 숙주 세포에서 2가지 키메라 단백질로서 공동-발현하도록 구성된 다중성분 합성 단백질 복합체이다. CISC의 각각의 키메라 단백질 성분은, 세포내 신호전달 복합체의 한 절반에 융합된, 세포외 도메인으로서 라파마이신 결합 복합체의 한 절반을 갖는다. CISC를 코딩하는 핵산의 숙주 세포로의 전달은 라파마이신 또는 라파마이신-관련 화학적 화합물의 존재에 의해 제어될 수 있는 세포에서의 세포내 신호전달을 허용한다.

[0009] 그러나, 라파마이신-유도된 CISC 이량체화는 세포내 신호전달을 촉발시킬 수 있는 반면에, 라파마이신의 존재는 또한 숙주 세포의 성장 및 생존율을 억제할 수 있으며, 이에 따라 치료 뿐만 아니라 연구 노력에서의 사용을 위한 그들의 유용성을 제한한다. 결과적으로, 라파마이신-매개된 CISC 세포내 신호전달의 이용을 허용하지만, 라파마이신 또는 라파마이신-관련 화합물이 숙주 세포의 성장 및 생존율에 대해 갖는 부정적인 효과를 해결하는 신규한 조성물 및 방법이 요구된다.

발명의 내용

[0010] 특히, 세포가 라파마이신에 대해 내성이 되도록 하는 조성물 및 방법이 본원에 제공된다.

[0011] 한 측면에서, (i) 테옥시리보핵산 (DNA) 엔도뉴클레아제, 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산; (ii) 세포에서 표적 게놈 유전자좌 내의 표적 서열에 상보적인 스페이서 서열을 포함하는 가이드 RNA (gRNA), 또는 gRNA를 코딩하는 핵산; 및 (iii) 나이키드 FKBP-라파마이신 결합 (FRB) 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 공여자 카세트 포함하는 공여자 주형을 포함하는 시스템이 본원에 기재되며, DNA 엔도뉴클레아제, gRNA, 및 공여자 주형은, DNA 엔도뉴클레아제와 gRNA의 회합에 의해 형성된 복합체가 세포에서 표적 게놈 유전자좌 내의 공여자 카세트의 표적화된 통합을 촉진시켜 나이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 발현할 수 있는 유전자 변형된 세포를 생성할 수 있도록 구성된다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제는 Cas9 엔도뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 유전자 변형된 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되고; gRNA를 코딩하는 핵산은 유전자 변형된 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화되고/거나; 공여자

카세트에서 1개 이상의 코딩 서열은 유전자 변형된 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 일부 실시양태에서, 공여자 주형은, 공여자 카세트가 상동성 지정 복구 (HDR)에 의해 표적 게놈 유전자좌 내로 통합될 수 있도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 공여자 주형은, 공여자 카세트가 비-상동성 말단 연결 (NHEJ)에 의해 표적 게놈 유전자좌 내로 통합될 수 있도록 구성된다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제, 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 리포솜 또는 지질 나노입자 중에 제형화된다. 일부 실시양태에서, 리포솜 또는 지질 나노입자는 gRNA 또는 gRNA를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 시스템은 리보핵단백질 (RNP) 복합체에서 gRNA와 회합된 DNA 엔도뉴클레아제를 추가로 포함한다.

- [0012] 일부 실시양태에서, 네이키드 FKBP-라파마이신 결합 (FRB) 도메인 폴리펩티드가 제공된다. 일부 실시양태에서, 네이키드 FRB 폴리펩티드는 서열식별번호 (SEQ ID NO): 1 또는 서열식별번호: 2의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 공여자 카세트는 이량체화 활성화가능한 화학적으로 유도된 신호전달 복합체 (CISC)의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 1개 이상의 핵산 서열을 추가로 포함하고, CISC의 폴리펩티드 성분은 (i) 제1 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하는 제1 CISC 성분; 및 (ii) 제2 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하는 제2 CISC 성분을 포함하고; 제1 CISC 성분 및 제2 CISC 성분은 세포에서 발현될 때, 이들이 라파마이신 또는 라파로그의 존재하에 이량체화하여 신호전달-적격성 CISC를 생성할 수 있도록 구성된다.
- [0014] 일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체는 FK506 결합 단백질 (FKBP) 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하고/거나, 다른 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체는 FRB 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 CISC 성분의 막횡단 도메인은 IL-2 수용체 막횡단 도메인을 포함하고/거나, 제2 CISC 성분의 막횡단 도메인은 IL-2 수용체 막횡단 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 또는 제2 CISC 성분의 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체는 IL-2 수용체 서브유닛 감마 (IL2R γ) 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하고/거나, 다른 CISC 성분의 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체는 IL-2 수용체 서브유닛 베타 (IL2R β) 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함한다. 일부 실시양태에서, IL2R β 도메인 폴리펩티드는 말단절단된다. 일부 실시양태에서, IL2R β 도메인을 코딩하는 핵산은 서열식별번호: 4의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL2R β 도메인은 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 포함한다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 라파로그는 에베롤리무스, CCI-779, C20-메탈릴라파마이신, C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신, C16-iRap, AP21967, 나트륨 마이코페놀산, 베니디핀 히드로클로라이드, AP1903, 및 AP23573, 및 그의 대사물 및 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0016] 일부 실시양태에서, 네이키드 FRB 도메인을 코딩하는 핵산은 CISC의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 1개 이상의 핵산 서열의 하류에 있다. 일부 실시양태에서, 공여자 카세트는 (i) CISC의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 1개 이상의 핵산 서열 각각의 사이에; 및/또는 (ii) 네이키드 FRB 도메인을 코딩하는 핵산과 CISC의 폴리펩티드 성분을 코딩하는 인접한 핵산 서열 사이에 자가-절단 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 추가로 포함한다.
- [0017] 일부 실시양태에서, 공여자 카세트에서 코딩된 각각의 자가-절단 폴리펩티드는 독립적으로 P2A, T2A, E2A 및 F2A로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 공여자 카세트는 공여자 카세트에서 1개 이상의 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 유도성 프로모터 또는 구성적 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 MND 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 공여자 카세트는 검출가능한 마커를 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 검출가능한 마커는 녹색 형광 단백질 (GFP) 폴리펩티드, mCherry 폴리펩티드, 또는 저친화도 신경 성장 인자 수용체 (LNGFR)이다. 일부 실시양태에서, 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산에는 소포체 국소화 신호 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 결합되어 있다. 일부 실시양태에서, 공여자 카세트는 서열식별번호: 3의 뉴클레오티드 서열로부터의 핵산 서열을 포함한다.
- [0018] 일부 실시양태에서, 공여자 주형은 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스, 아데노바이러스, 또는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터이다.
- [0019] 한 측면에서, 세포에게 (i) 테옥시리보핵산 (DNA) 엔도뉴클레아제, 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산; (ii) 세포에서 표적 게놈 유전자좌 내의 표적 서열에 상보성인 스페이서 서열을 포함하는 가이드 RNA (gRNA), 또는 gRNA를 코딩하는 핵산; 및 (iii) 네이키드 FKBP-라파마이신 결합 (FRB) 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵

산 서열을 포함하는 공여자 카세트를 포함하는 공여자 주형을 제공하는 것을 포함하는, 세포 계놈을 편집하는 방법이 본원에 기재되며, DNA 엔도뉴클레아제, gRNA, 및 공여자 주형은, DNA 엔도뉴클레아제와 gRNA의 회합에 의해 형성된 복합체가 세포에서 표적 계놈 유전자좌로 공여자 카세트의 표적화된 통합을 촉진시켜 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 발현할 수 있는 유전자 변형된 세포를 생성할 수 있도록 구성된다.

[0020] 한 측면에서, 세포에게 (i) 테옥시리보핵산 (DNA) 엔도뉴클레아제, 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산; (ii) 세포에서 표적 계놈 유전자좌 내의 표적 서열에 상보적인 스페이스 서열을 포함하는 가이드 RNA (gRNA), 또는 gRNA를 코딩하는 핵산; 및 (iii) 네이키드 FKBP-라파마이신 결합 (FRB) 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 공여자 카세트를 포함하는 공여자 주형을 제공하는 것을 포함하는, 본원에 기재된 바와 같이 세포 계놈을 편집하는 방법에 따라 제조된 유전자 변형된 세포가 본원에 제공되며, DNA 엔도뉴클레아제, gRNA, 및 공여자 주형은, DNA 엔도뉴클레아제와 gRNA의 회합에 의해 형성된 복합체가 세포에서 표적 계놈 유전자좌로 공여자 카세트의 표적화된 통합을 촉진시켜 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 발현할 수 있는 유전자 변형된 세포를 생성할 수 있도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 공여자 카세트는, 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드가 세포내에서 발현되도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 세포는 진핵생물 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포는 전구체 T 세포 또는 T 조절 (T_{reg}) 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD34+, CD8+ 또는 CD4+ 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포, 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 공여자 카세트에 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 결합된 상응하는 세포와 비교하여 라파마이신 또는 라파로그의 존재하에 더 많은 정도로 증식한다. 일부 실시양태에서, 라파마이신 또는 라파로그는 0.1 nM 또는 약 0.1 nM 내지 100 nM 또는 약 100 nM의 농도로 존재한다.

[0021] 또 다른 측면에서, 본원에 개시된 유전자 변형된 세포를 라파마이신 또는 라파로그와 접촉시키는 것을 포함하는, 상기 세포를 활성화시키는 방법이 본원에 기재된다. 일부 실시양태에서, 라파로그는 에베롤리무스, CCI-779, C20-메탈릴라파마이신, C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신, C16-iRap, AP21967, 나트륨 마이코페놀산, 베니디핀 히드로클로라이드, AP1903, 또는 AP23573, 또는 이들의 임의의 대사물, 유도체 및/또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 세포와 접촉하는 라파마이신 또는 라파로그는 0.1 nM 또는 약 0.1 nM 내지 100 nM 또는 약 100 nM의 농도이다. 일부 실시양태에서, 라파마이신 또는 라파로그와의 접촉 후에, CISC 성분을 발현하는 세포를 선택적으로 확장시킨다.

[0022] 여전시 또 다른 측면에서, 혼합된 세포 집단을 라파마이신 또는 라파로그와 접촉시키는 것을 포함하는, 혼합된 세포 집단에 함유된 본원에 기재된 유전자 변형된 세포의 집단을 선택적으로 확장시키는 방법이 본원에 기재되며, CISC 성분 및 네이키드 FRB 도메인을 발현하는 유전자 변형된 세포는 혼합된 세포 집단에 있는 다른 세포에 비해 더 큰 정도로 시험관내 또는 생체내에서 활성화되고 확장된다. 일부 실시양태에서, 라파로그는 에베롤리무스, CCI-779, C20-메탈릴라파마이신, C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신, C16-iRap, AP21967, 나트륨 마이코페놀산, 베니디핀 히드로클로라이드, AP1903, 또는 AP23573, 또는 이들의 임의의 대사물, 유도체 및/또는 조합물로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 혼합된 세포 집단과 접촉하는 라파마이신 또는 라파로그는 0.1 nM 또는 약 0.1 nM 내지 100 nM 또는 약 100 nM의 농도이다.

[0023] 본원에 기재된 각각의 측면 및 실시양태의 문맥으로부터 명시적으로 또는 명확하게 제외되지 않는다면 상기 실시양태 또는 측면은 함께 이용될 수 있다.

[0024] 본 명세서에 걸쳐, 다양한 특허, 특허 출원 및 다른 유형의 공보 (예를 들어, 저널 기사, 전자 데이터베이스 항목 등)가 참고된다. 본원에 인용된 모든 특허, 특허 출원 및 다른 공보의 개시내용은 모든 목적을 위해 그들의 전문이 본원에 참고로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 세포내 네이키드 "디코이" FRB (FKBP12 라파마이신 결합 도메인)를 발현하기 위한 렌티바이러스 구축물의 개략도이다. CISC와 함께 추가의 FRB* 도메인을 발현하는 구축물은 "디코이-CISC" 또는 "DISC"로 지정되었다. 도면에서 별표는 이 서열이 라파로그 AP21967 뿐만 아니라 라파마이신과 상호작용할 수 있게 만드는 점 돌연변이를 가짐을 나타낸다 (mTOR 아미노산 서열에 대해 T2098L; (Bayle, J. H. et al. (2006). *Chem. Biol.*,

13(1):99-107).

도 2는 T 세포에서 네이키드 FRB의 가정된 작용 메커니즘을 도시하는 개념도이다.

도 3은 라파마이신 또는 라파로그 AP21967의 존재하에 배양된 세포에서 CISC 대 DISC 구축물을 발현하는 T 세포의 확장을 비교하는 그래프를 도시한다. DISC 구축물은 시험된 라파마이신의 모든 용량에서 CISC-단독 구축물에 의해 형질도입된 세포와 비교하여 개선된 T 세포 확장을 촉진시킨다.

도 4는 시험된 CISC 구축물의 다양한 반복으로 도입된 유의한 아미노산 변화를 도시하는 개념도이다. PAAL 스페이스 아미노산 서열 및/또는 GGS 또는 GGSP 링커 아미노산 서열 중 하나 이상을 함유하는 FRB-IL2R β /FKBP-IL2R γ 수용체 단백질의 4가지 추가의 쌍 (V4-V7)을 생성하였다. 추가의 스페이스 및 링커 아미노산 서열은 세포의 FRB/FKBP와 IL2R β /IL2R γ 도메인 사이의 계면에 또는 IL2R β 도메인 내에 위치하였다.

도 5는 우측 범례에 도시된 지정된 배지 첨가제를 갖는 배양물에서 수주에 걸쳐 렌티바이러스-형질도입된 T 세포의 수치적 확장을 도시하는 그래프이다.

도 6은 라파마이신 (상단) 또는 라파로그 AP21967 (하단)을 갖는 배양물에서 시간에 걸쳐 렌티바이러스-형질도입된 T 세포의 풍부화 (mCherry⁺ 세포의 백분율로 판독)를 도시하는 2개의 그래프를 도시한다.

도 7은 라파마이신-유도된 T 세포 확장을 DISC 및 μ DISC 구축물 (원래의 CISC 구축물은 참고로 포함됨)과 직접적으로 비교하기 위해 사용된 렌티바이러스 구축물을 도시하는 개념도이다.

도 8은 지정된 농도의 라파마이신을 갖는 배양물에서 수일에 걸쳐 렌티바이러스-형질도입된 T 세포 (mCherry⁺)의 개수를 도시하는 그래프이다.

도 9는 다양한 용량의 라파마이신을 갖는 배양물에서 9 일 후에 렌티바이러스-형질도입된 T 세포의 풍부화 (mCherry⁺ 세포의 백분율로 판독)를 도시하는 그래프이다.

도 10은 다양한 용량의 라파마이신을 갖는 배양물에서 21 일 후에 렌티바이러스-형질도입된 (mCherry⁺) T 세포의 수치적 확장 배수를 도시하는 그래프이다. 증가 배수는 21 일째의 mCherry⁺ 세포의 개수를 0 일째의 mCherry⁺ 세포의 개수로 나눔으로써 계산되었다. x-축 상에 좌측에서 우측으로 1nM 라파마이신으로 처리된 세포 (처음 3개의 막대), 5 nM의 라파마이신으로 처리된 세포 (막대 4-6) 및 10 nM의 라파마이신으로 처리된 세포 (막대 7-9)가 도시된다.

도 11은 DISC 구축물을 내인성 *FOXP3* 유전자에 삽입하기 위해 유전자 편집 실험에서 이용된 실험 프로토콜의 개략도이다. AAV6 공여자 주형 (상단), 및 내인성 *FOXP3*의 상류에서 DISC 발현을 유도하는 이소성 프로모터를 도입시키기 위해 CRISPR/CAS9 RNP 및 AAV6 전달된 공여자 주형을 사용하는 유전자 편집 절차 (하단)가 도시된다. gRNA = 가이드 RNA; 5' 및 3' HA = 인간 *FOXP3* 상동체 아암.

도 12는 DISC 구축물을 T 조절 T 세포에서 내인성 *FOXP3* 유전자에 삽입하기 위해 유전자 편집 실험에서 이용된 실험 설계를 설명하는 개략도를 도시한다. MND 프로모터는 HA-태그 부착된 내인성 *FOXP3*의 상류에서 DISC/ μ DISC 발현을 유도한다. 양쪽 말단에서 5' 및 3' 상동체 아암은 인간 *FOXP3* 상동체이다.

도 13A는 DISC (edTreg)를 사용하여 성공적으로 편집된 CD4⁺ T 세포의 확장을 개선시키기 위해 설계된 2-단계 확장 프로토콜에서 사용된 AAV 구축물의 구조체를 도시하는 도면이며, MND 프로모터는 마이크로-DISC의 세포-표면 발현 및 HA-태그 부착된 *FOXP3*의 세포내 발현을 유도한다. **도 13B**는 본원에 기재된 2-단계 확장 실험의 결과를 요약하며, 확장 단계 1 세포 조건은 X 축을 따라 표시된다. 확장 단계 2 조건 또한 표시된다.

도 14A-14B는 편집후 10 일째 및 15 일째에 배양물에서 세포의 총 개수에 대한 μ DISC edTreg의 개수를 그래프로 요약한다. 확장 단계 0 배양 조건은 X 축을 따라 표시된다. 배양물에서 총 세포 개수는 흰색으로 표시되는 반면에, 성공적으로 편집된 개수 (HA+/ μ DISC+ 및 *FOXP3*+)는 검은색으로 표시된다. 이들 발견에 기반하여, μ DISC edTreg 생성을 위한 최적의 조건은 좌측으로부터 두번째 조건으로서 선택되었고, 이는 확장 단계 0 동안에 5ng/ml IL-2의 사용에 상응한다.

도 15A-15B는 NSG로 전달후 7 일째에 라파마이신 처리 대 비히클에서 μ DISC GFP edTreg의 확장을 설명하기 위해 수행된 유세포 분석 실험의 결과를 요약한다. 차트는 75 μ L 말초 혈액 샘플에서 % GFP+ (**도 15A**) 또는 GFP+ 세포 개수 (**도 15B**)의 평균 \pm s.d.이다. IR = 방사선 조사; Rapa = 라파마이신, 실험 내내 2 일마다 0.1

mg/kg i.p. P 값은 스튜던츠 T 검사(Student's T test)를 이용하여 획득하였다. 각각의 도면에서, 2개의 좌측 막대는 방사선을 조사한 샘플을 나타내고, 2개의 오른쪽 막대는 방사선을 조사하지 않은 샘플을 나타낸다.

도 16A-16B는 NSG로 전달후 14 일째에 라파마이신 처리 대 비히클에서 μ DISC GFP edTreg의 확장을 설명하기 위해 수행된 실험의 결과를 요약한다. 유세포 분석 플롯은 각각의 코호트로부터의 대표적인 마우스에 대해 **도 16A**에서 생존율 염료 (라이브/데드(Live/Dead)) 또는 전방향 세포 스캐터 (FCS)에 대한 인간 CD45 또는 GFP를 도시한다. 차트는 **도 16A**의 우측으로 각각의 코호트에 대한 결과를 요약한다. **도 16B**는 75 μ L 말초 혈액 샘플에서 GFP+ 세포 개수의 평균 \pm s.d.를 도시한다. IR = 방사선 조사; Rapa = 라파마이신, 실험 내내 2 일마다 0.1 mg/kg i.p. P 값은 스튜던츠 T 검사를 이용하여 획득되었다.

도 17은 라파마이신으로 처리되거나 처리되지 않은 동물에서 시간에 걸쳐 생체내에서 수용자 마우스의 말초 혈액에 존재하는 μ DISC GFP edTreg 세포의 백분율 (%) 및 개수를 요약한다. 플롯은 유세포 분석 데이터를 요약하며; 각각의 기호는 개별 마우스를 나타내고, 평균 \pm s.d.는 막대에 의해 도시된다. CD45+CD4+ 게이트에서 % GFP는 상단에 플롯되고; 말초 혈액 샘플에서 GFP+ 세포의 개수는 하단에 플롯된다.

도 18은 생체내 면역억제 모델의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 생존 곡선을 도시한다. Teff = T 이펙터 단독 그룹. 이들 실험에서, 모든 그룹은 T 이펙터 세포를 제공받았다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 특히, 예를 들어 조작된 숙주 세포가 라파마이신 또는 라파마이신-관련 화학적 화합물 (예컨대, 라파로그)에 의한 성장 억제에 대해 내성이 되도록 함으로써, 숙주 세포에 대한 라파마이신의 효과와 관련하여 수반된 세포독성이 없이, 조작된 숙주 세포에서 CISC를 통해 라파마이신-매개된 세포내 신호전달을 일으키기 위해, 화학적으로 유도된 신호전달 복합체 (CISC) 폴리펩티드와 함께 사용하기 위한 조성물 및 방법이 본원에 기재된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조성물 및 방법은 숙주 세포에서 2가지 키메라 단백질로서 공동-발현하도록 구성된 다중성분 합성 단백질 복합체인 CISC 폴리펩티드와 함께 사용하기 위해 의도된다. 국제 특허 출원 번호 PCT/US2017/065746 (본원에 참고로 포함됨)에 기재된 CISC 신호전달 시스템은 다양한 치료 및 연구 적용에서 사용되는 마크롤리드 화합물인 라파마이신에 대한 반응으로 세포내 신호전달을 유도하도록 조작될 수 있다. CISC의 각각의 키메라 단백질 성분은, 세포내 신호전달 복합체의 한 절반에 융합된, 세포의 도메인으로서 라파마이신 결합 복합체의 한 절반 (각각 FK506 결합 단백질 (FKPB) 도메인 또는 FKBP 라파마이신 결합 (FRB) 도메인)을 가질 수 있다. 라파마이신과 CISC의 세포의 도메인의 결합은 키메라 폴리펩티드의 세포내 신호전달 복합체 부분을 통한 CISC 이중이량체의 형성 및 후속적인 세포내 신호전달을 유도한다.

[0027] 라파마이신에 노출된 CISC-발현 세포는 유용하지만, 라파로그 AP21967을 사용하여 달성된 증식의 양과 비교하여 더 적게 증식하는 것으로 관찰되었다. FK506-결합 단백질 12-라파마이신-연관된 단백질 1 (FRAP1)로도 공지된 라파마이신의 포유동물 표적 (mTOR)은 인간에서 *MTOR* 유전자에 의해 코딩되는 키나제이다. mTOR은 단백질 키나제의 포스포타일리노시톨 3-키나제-관련 키나제 패밀리의 구성원이다. 이 단백질은 동화 과정, 예컨대 지질 합성 및 mRNA 번역을 지배할 뿐만 아니라, 이화 과정, 예컨대 자가포식을 지연시키는 인산화 기질에 의한 세포 성장을 자극하는 성장 조절인자이다.

[0028] 본 출원인은 증식 억제의 문제를 극복하기 위한 구축물 및 방법을 고안하였다. **도 2**에 도시된 바와 같이, FKBP 도메인-함유 단백질은 세포의 세포질에서 자연적으로 발현되는 반면에, mTOR은 FRB 도메인을 함유한다. 이론에 구애되지 않고, 라파마이신/FKBP 복합체와 mTOR의 FRB 도메인의 결합이 mTOR-매개된 세포내 신호전달을 차단하거나 또는 감소시켜 mRNA 번역 및 세포 성장을 감소시키는 것으로 믿어진다. 따라서, 다시 이론에 구애되지 않고, 본 출원의 발명자들은 (mTOR로부터 연결되지 않은) 네이키드 FRB 단백질 도메인의 세포내 발현을 이용하여 세포내 라파마이신/FKBP 복합체에 결합할 수 있고, 이에 따라 CISC-발현 세포의 성장에 대한 라파마이신의 부정적인 효과를 약화시키는 것으로 가정하였다. 이전의 보고는, mTOR의 네이키드 FRB 도메인의 세포내 발현이 포유동물 세포에 대해 독성이고, 따라서 인간 세포에서 mTOR의 FRB 도메인과의 라파마이신-FKBP 상호작용을 세포내에서 완충시키기 적합한 수단이 아닐 것임을 나타내었다 ([Vilella-Bach, M. et al. (1999). *J. Biol. Chem.*, 274(7):4266-4272] 참고). 또한, FRB 도메인에서 T2098L 돌연변이 (mTOR 아미노산 서열에 대한 서열 넘버링)는 야생형 단백질에 비해 그를 불안정하게 하여, 세포에서 더 빨리 분해되게 만든다. 그러나, 돌연변이성 단백질은 라파마이신과의 결합에 의해 안정화된다 (Stankunas, K. et al. (2003). *Mol. Cell.*, 12(6):1615-1624).

[0029] 이들 이전의 보고와는 대조적으로, 본원에 추가로 기재된 바와 같이, 본 출원의 발명자들은 놀랍게도 CISC-발현

숙주 세포에서 네이키드 "디코이" FRB (FRB*) 도메인의 세포내 발현이 라파마이신의 성장 억제 효과를 효과적으로 약화시킬 수 있음을 발견하였다. CISC와 함께 추가의 FRB* 도메인을 발현하는 구축물은 "디코이-CISC" 또는 "DISC"로 지칭되었다. 따라서, 세포내 발현된 네이키드 FRB 도메인에 의해 부여된 라파마이신 내성은 치료적 적용 뿐만 아니라 세포내 신호전달 경로 연구 등 다를 위한 라파마이신 반응성 CISC-발현 세포의 유용성을 증가시킨다.

[0030] **정의**

[0031] 달리 정의되지 않는다면, 본원에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시내용이 속하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 인용된 모든 특허, 출원, 공개 출원 및 다른 공보는 달리 명시되지 않는다면 명백히 그들의 전문이 본원에 참고로 포함된다. 본원에서 하나의 용어에 대해 여러 가지 정의가 있는 경우에는, 달리 명시되지 않는다면 이 섹션에 있는 정의가 우선하다.

[0032] 본원에서 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 명백하게 달리 해석되지 않는다면 복수 형태를 포함한다.

[0033] "약"은 본 명세서에 비추어 읽었을 때 그의 평범하고 일반적인 의미를 가지며, 예를 들어 측정가능한 값을 지칭할 때 이용될 수 있고, 명시된 값으로부터 $\pm 20\%$, 또는 $\pm 10\%$, 또는 $\pm 5\%$, 또는 $\pm 1\%$, 또는 $\pm 0.1\%$ 의 변동을 포괄하는 것으로 의도될 수 있다.

[0034] 본원에서 사용된 바와 같이, "단백질 서열"은 단백질의 일차 구조인 아미노산의 폴리펩티드 서열을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이 "상류"는 폴리뉴클레오티드 상의 소정 자리의 5' 위치, 및 폴리펩티드 상의 소정 자리의 N-말단을 향하는 위치를 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이 "하류"는 뉴클레오티드 상의 소정 자리의 3' 위치, 및 폴리펩티드 상의 소정 자리의 C-말단을 향하는 위치를 지칭한다. 따라서, 용어 "N-말단"은 폴리펩티드 상의 소정 자리의 N-말단을 향하는 폴리뉴클레오티드 상의 소정 요소 또는 자리의 위치를 지칭한다.

[0035] "핵산" 또는 "핵산 분자"는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 데옥시리보핵산 (DNA) 또는 리보핵산 (RNA), 올리고뉴클레오티드, 폴리머라제 쉐 반응 (PCR)에 의해 생성된 단편, 및 임의의 라이게이션, 절단, 엔도뉴클레아제 작용, 및 엑소뉴클레아제 작용에 의해 생성된 단편을 지칭한다. 핵산 분자는 천연 발생 뉴클레오티드 (예컨대 DNA 및 RNA), 또는 천연 발생 뉴클레오티드의 유사체 (예를 들어, 천연 발생 뉴클레오티드의 거울상 이성질체 형태), 또는 이들 둘의 조합물인 단량체로 구성될 수 있다. 용어 "핵산 분자"는 또한 소위 "펩티드 핵산"을 포함하며, 이는 폴리아미드 백본에 부착된 천연 발생 또는 변형된 핵산 염기를 포함한다. 핵산은 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 제공된다. 일부 실시양태에서, 핵산은 RNA 또는 DNA이다.

[0036] "을 코딩하는" 또는 "코딩하는"이 본원에서 사용되며, 다른 거대분자, 예컨대 아미노산의 정의된 서열의 합성을 위한 주형으로서 작용하기 위해 유전자, cDNA 또는 mRNA와 같은 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드의 특정한 서열의 특성을 지칭한다. 따라서, 소정의 유전자에 상응하는 mRNA의 전사 및 번역이 세포 또는 다른 생물학적 시스템에서 단백질을 생성하는 경우, 해당 유전자는 단백질을 코딩한다.

[0037] "폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열"은 서로의 축퇴 버전이고 동일한 아미노산 서열을 코딩하는 모든 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산이 제공되며, 핵산은 융합 단백질을 코딩한다.

[0038] "벡터", "발현 벡터" 또는 "구축물"은 세포에서 이중성 핵산의 발현을 제공하기 위해 조절 요소를 갖는 세포에 이중성 핵산을 도입시키기 위해 사용되는 핵산이다. 벡터에는 플라스미드, 미니서클, 효모 및 바이러스 게놈이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 벡터는 플라스미드, 미니서클, 효모, 또는 바이러스 게놈이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 (예컨대, 비제한적으로, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 또는 AAV11)이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 박테리아 시스템, 예컨대 이. 콜라이(*E. coli*)에서 단백질 발현을 위한 것이다.

[0039] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "발현" 또는 "단백질 발현"은 전사된 RNA 분자를 단백질 분자로 번역하는 것을 지칭한다. 단백질 발현은 그의 시간적, 공간적, 발달적 또는 형태학적 특성에 의해서 뿐만 아니라 정량적 또는 정성적 지표에 의해 특징분석될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단백질이 리간드의 존재하에 이량체화를 위해 구성되도록, 예를 들어 위치하도록 단백질 또는 단백질들이 발현된다.

[0040] 본원에서 사용된 바와 같이, "융합 단백질" 또는 "키메라 단백질"은 원래 별도의 단백질 또는 단백질의 일부분

을 코딩하는 2개 이상의 유전자의 결합을 통해 생성된 단백질이다. 융합 단백질은 또한 2개 이상의 별도의 단백질로부터의 특정한 단백질 도메인으로 구성될 수 있다. 이 융합 유전자의 번역은 원래의 단백질 각각으로부터 유래된 기능적 성질을 갖는 단일 또는 다중 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 재조합 융합 단백질은 생물학적 연구 또는 치료에서 사용하기 위해 재조합 DNA 기술에 의해 인공적으로 생성될 수 있다. 융합 단백질을 생성하기 위한 이러한 방법은 관련 기술분야의 기술자에게 공지되어 있다. 일부 융합 단백질은 전체 펩티드를 조합하고, 따라서 원래의 단백질의 모든 도메인, 특히 기능적 도메인을 함유할 수 있다. 그러나, 다른 융합 단백질, 특히 비-천연 발생인 것들은 코딩 서열의 일부만을 조합하며, 따라서 그를 형성한 모 유전자의 원래의 기능을 유지하지 않는다.

[0041] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "조절 요소"는 유전자 조절 활성을 갖는 DNA 분자, 예를 들어 작동가능하게 연결된 전사가능한 DNA 분자의 전사 및/또는 번역에 영향을 미치는 능력을 갖는 것을 지칭한다. 조절 요소, 예컨대 프로모터 (예를 들어 MND 프로모터, 예컨대 비제한적으로, 서열식별번호: 33의 핵산 서열을 포함하는 MND 프로모터), 리더, 인트론, 및 전사 종결 영역은 유전자 조절 활성을 갖고 살아있는 세포에서 유전자의 전반적인 발현에 필수적인 역할을 하는 DNA 분자이다. 따라서, 식물에서 기능하는 단리된 조절 요소, 예컨대 프로모터는 유전자 조작 방법을 통해 식물 표현형을 변형시키는데 유용하다.

[0042] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "작동가능하게 연결된"은 제2 분자에 연결된 제1 분자를 지칭하며, 상기 분자들은 제1 분자가 제2 분자의 기능에 영향을 미치도록 배열된다. 두 분자는 단일 연속 분자의 일부일 수 있고, 인접할 수 있다. 예를 들어, 프로모터가 세포에서 전사가능한 관심 DNA 분자의 전사를 조절하는 경우, 프로모터는 전사가능한 DNA 분자에 작동가능하게 연결된 것이다.

[0043] 본원에서 사용된 바와 같이, "이량체성의 화학적으로 유도된 신호전달 복합체", "이량체성 CISC" 또는 "이량체"는 함께 연결된 융합 단백질 복합체일 수 있거나 또는 아닐 수 있는 CISC의 두 성분을 지칭한다. "이량체화"는 예를 들어 단일 개체와 리간드 (예를 들어, 라파마이신)의 결합에 대한 반응으로 2개의 별도의 개체가 단일 개체로 함께 결합하는 과정을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 리간드 또는 작용제는 이량체화를 자극한다. 일부 실시양태에서, 이량체화는 동종이량체화, 또는 2개의 동일한 개체, 예컨대 2개의 동일한 CISC 성분의 연결을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 이량체화는 이종이량체화, 2개의 상이한 개체, 예컨대 2개의 상이한 별개의 CISC 성분의 연결을 지칭한다. 일부 실시양태에서, CISC 성분의 이량체화는 세포 신호전달 경로를 생성한다. 일부 실시양태에서, CISC 성분의 이량체화는 세포 또는 세포 집단의 선택적 확장을 가능하게 한다. 추가의 CISC 시스템에는 CISC 지베렐린 CISC 이량체화 시스템, 또는 SLF-TMP CISC 이량체화 시스템이 포함될 수 있다. 다른 화학적 유도성 이량체화 (CID) 시스템 및 구성 부분이 이용될 수 있다.

[0044] 본원에서 사용된 바와 같이, "화학적으로 유도된 신호전달 복합체" 또는 "CISC"는 리간드-유도된 이량체화의 직접적인 결과로서 세포 내부로의 신호를 개시하는 조작된 복합체를 지칭한다. CISC는 동종이량체 (2개의 동일한 성분의 이량체화) 또는 이종이량체 (2개의 별개의 성분의 이량체화)일 수 있다. 따라서, 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "동종이량체"는 동일한 아미노산 서열을 갖는 본원에 기재된 2개의 단백질 성분의 이량체를 지칭한다. 용어 "이종이량체"는 동일하지 않은 아미노산 서열을 갖는 본원에 기재된 2개의 단백질 성분의 이량체를 지칭한다.

[0045] CISC는 본원에서 더욱 상세하게 기재된 바와 같이 합성 복합체일 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "합성"은 천연이 아니거나 또는 천연에서 발견되지 않는 본원에 기재된 복합체, 단백질, 이량체 또는 조성물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, IL2R-CISC는 인터류킨-2 수용체 성분을 수반하는 신호전달 복합체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, IL2/15-CISC는 인터류킨-2 (IL2) 및 인터류킨-15 (IL15)에 의해 공유되는 수용체 신호전달 서브유닛을 수반하는 신호전달 복합체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, IL7-CISC는 인터류킨-7 수용체 성분을 수반하는 신호전달 복합체를 지칭한다. 따라서, CISC는 주어진 CISC의 성분을 구성하는 구성 부분들에 따라 명명될 수 있다. 관련 기술분야의 기술자는 화학적으로 유도된 신호전달 복합체의 구성 부분들이 CISC로의 통합에 유용한 천연 또는 합성 성분으로 구성될 수 있음을 인지할 것이다. 따라서, 본원에 제공된 예는 제한적인 것으로 의도되지 않는다.

[0046] 본원에서 사용된 바와 같이, "시토카인 수용체"는 시토카인을 인식하고 그에 결합하는 수용체 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 시토카인 수용체는 변형된 시토카인 수용체 분자 (예를 들어, "변이체 시토카인 수용체"), 예컨대 시토카인 수용체 아미노산 및/또는 핵산 서열에 대해 치환, 결실 및/또는 부가를 갖는 것들을 포괄한다. 따라서, 상기 용어가 야생형 뿐만 아니라, 재조합, 합성에 의해 생성된 및 변이체 시토카인 수용체를 포괄하는 것으로 의도된다. 일부 실시양태에서, 시토카인 수용체는 융합 단백질, 예컨대 세포의 결합 도메인, 힌지 도메

인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인이다. 일부 실시양태에서, 수용체의 성분 (즉, 수용체의 도메인)은 천연 또는 합성이다. 일부 실시양태에서, 도메인은 인간 유래된 도메인이다.

[0047] 본원에서 사용된 바와 같이, "FKBP"는 FK506 결합 단백질 도메인이다. FKBP는 프롤린 아이소머라제 활성을 갖고 아미노산 서열은 아니지만 기능적으로 시클로필린과 관련이 있는 단백질의 패밀리를 지칭한다. FKBP는 효모에서 인간에 이르는 여러 진핵생물에서 확인되었고, 프롤린 잔기를 함유하는 단백질에 대한 단백질 폴딩 샤프론으로서 기능한다. 시클로필린과 함께, FKBP는 이뮤노필린 패밀리에 속한다. 용어 FKBP에는 예를 들어 FKBP12 뿐만 아니라, 유전자 AIP; AIPL1; FKBP1A; FKBP1B; FKBP2; FKBP3; FKBP5; FKBP6; FKBP7; FKBP8; FKBP9; FKBP9L; FKBP10; FKBP11; FKBP14; FKBP15; FKBP52; 및/또는 LOC541473에 의해 코딩된 단백질; 예컨대 그의 동족체 및 그의 기능적 단백질 단편이 포함된다.

[0048] 본원에서 사용된 바와 같이, "FRB"는 FKBP 라파마이신 결합 도메인이다. FRB 도메인은 FKBP 단백질 및 라파마이신 또는 그의 라파로그와의 삼원 복합체를 형성하도록 구성된 폴리펩티드 영역 (단백질 "도메인")이다. FRB 도메인은 인간 및 다른 종으로부터의 수많은 천연 발생 단백질, 예컨대 mTOR 단백질 (문헌에서는 FRAP, RAPT 1 또는 RAFT로도 지칭됨); 효모 단백질, 예컨대 Tor1 및/또는 Tor2; 및 칸디다(Candida) FRAP 동족체에 존재한다. FKBP 및 FRB 둘 다 라파마이신 (mTOR) 신호전달의 포유동물 표적에 있는 주요 구성성분이다.

[0049] "네이키드 FKBP 라파마이신 결합 도메인 폴리펩티드" 또는 "네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드" ("FKBP 라파마이신 결합 도메인 폴리펩티드" 또는 "FRB 도메인 폴리펩티드"로도 지칭될 수 있음)는 FRB 도메인의 아미노산으로 이루어진 폴리펩티드를 지칭하거나, 또는 단백질의 아미노산 중 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%가 FRB 도메인의 아미노산인 단백질을 지칭한다. 일반적으로, 이러한 단백질은 라파로그 AP21967 뿐만 아니라 라파마이신과 결합하여 상호작용하는 능력을 갖는다. FRB 도메인은 12 kDa의 가용성 단백질로서 발현될 수 있다 (Chen, J. et al. (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 92(11):4947-4951). FRB 도메인은 구형 단백질의 일반적인 구조 모티프인 4개의 나선 번들을 형성한다. 그의 전체 치수는 30 Å x 45 Å x 30 Å이며, 4개의 나선 모두 시토크롬 b562 폴드와 유사한 짧은 언더핸드 연결을 갖는다 (Choi, J. et al. (1996). *Science*, 273(5272):239-242). 일부 실시양태에서, 네이키드 FRB 도메인은 서열식별번호: 1 (MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRRISK) 또는 서열식별번호: 2 (MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISK)의 아미노산을 포함한다.

[0050] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포외 결합 도메인"은 세포의 외부에 있는 복합체의 도메인을 지칭하며, 특정한 원자 또는 분자에 결합하도록 구성된다. 일부 실시양태에서, CISC의 세포외 결합 도메인은 FKBP 도메인 또는 그의 기능적 유도체이다. 일부 실시양태에서, 세포외 결합 도메인은 FRB 도메인 또는 그의 기능적 유도체이다. 일부 실시양태에서, 세포외 결합 도메인은 리간드 또는 작용제에 결합하도록 구성되며, 이에 따라 2개의 CISC 성분의 이량체화를 자극한다. 일부 실시양태에서, 세포외 결합 도메인은 시토키인 수용체 조절인자에 결합하도록 구성된다.

[0051] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "시토키인 수용체 조절인자"는 시토키인 수용체의 하류 표적의 인산화, 시토키인 수용체와 연관된 신호 형질도입 경로의 활성화, 및/또는 특정한 단백질, 예컨대 시토키인의 발현을 조절하는 작용제를 지칭한다. 이러한 작용제는 시토키인 수용체의 하류 표적의 인산화, 시토키인 수용체와 연관된 신호 형질도입 경로의 활성화, 및/또는 특정한 단백질, 예컨대 시토키인의 발현을 직접적으로 또는 간접적으로 조절할 수 있다. 따라서, 시토키인 수용체 조절인자의 예에는 시토키인 수용체 또는 그의 단편에 면역-특이적으로 결합하는 시토키인, 시토키인의 단편, 융합 단백질 및/또는 항체 또는 그의 결합 부분이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 추가로, 시토키인 수용체 조절인자의 예에는 시토키인 수용체 또는 그의 단편에 면역-특이적으로 결합하는 펩티드, 폴리펩티드 (예를 들어, 가용성 시토키인 수용체), 융합 단백질 및/또는 항체 또는 그의 결합 부분이 포함되나 이로 제한되지 않는다.

[0052] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "활성화시키다"는 관심 단백질의 적어도 1가지 생물학적 활성에서의 증가를 지칭한다. 유사하게, 용어 "활성화"는 증가된 활성 상태로 있는 관심 단백질의 상태를 지칭한다. 용어 "활성화가능한"은 관심 단백질이 신호, 작용제, 리간드, 화합물 또는 자극인자의 존재하에 활성화되기 시작하는 능력을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같이, 이량체는 신호, 작용제, 리간드, 화합물 또는 자극인자의 존재하에 활성화되고, 신호전달-적격성 이량체가 된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "신호전달-적격성"은 하류 신호전달 경로를 개시하거나 또는 지속시킬 수 있도록 하는 이량체의 능력 또는 형태를 지칭한

다.

- [0053] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "힌지 도메인"은 세포의 결합 도메인을 막횡단 도메인에 연결시키는 도메인을 지칭하며, 세포의 결합 도메인에 대해 가요성을 부여할 수 있다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 항체 또는 그의 결합 단편에 의한 인식에 대한 잠재성을 최소화하기 위해 원형질 막에 가까운 세포의 도메인에 위치한다. 일부 실시양태에서, 세포의 결합 도메인은 힌지 도메인에 대해 N-말단에 위치한다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 천연 또는 합성일 수 있다.
- [0054] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "막횡단 도메인" 또는 "TM 도메인"은 막에서, 예컨대 세포 막에서 안정한 도메인을 지칭한다. 용어 "막횡단 스패", "내재성 단백질", 및 "내재성 도메인" 또한 본원에서 사용된다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인 및 세포의 도메인은 막횡단 도메인에 대해 N-말단에 위치한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 천연 또는 합성 도메인이다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 IL-2 막횡단 도메인이다.
- [0055] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "신호전달 도메인"은 세포, 예컨대 포유동물 세포 내의 신호전달 캐스케이드에 수반되는 용합 단백질 또는 CISC 성분의 도메인을 지칭한다. 신호전달 도메인은 예를 들어 TCR/CD3 복합체의 CD3 제타 쇄에 의해 제공된 일차 신호 외에도, 세포 반응, 예컨대 T-세포 반응, 예컨대 비제한적으로 활성화, 증식, 분화, 및/또는 시토카인 분비를 매개하는 신호를 세포, 예컨대 T-세포에 제공하는 신호전달 모이 어터를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 막횡단 도메인, 힌지 도메인 및 세포의 도메인에 대해 N-말단에 있다. 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 합성 또는 천연 도메인이다. 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 연결된 세포질 신호전달 도메인이다. 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 시토카인 신호전달 도메인이다. 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 항원 신호전달 도메인이다. 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 인터류킨-2 수용체 서브유닛 감마 (IL2R γ 또는 IL2Rg) 도메인이다. 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 인터류킨-2 수용체 서브유닛 베타 (IL2R β 또는 IL2Rb) 도메인 또는 말단절단된 IL2R β 도메인 (예컨대, 서열식별번호: 5의 아미노산 서열을 비롯한 말단절단된 IL2R β 도메인)이다. 일부 실시양태에서, 작용제 또는 리간드와 세포의 결합 도메인의 결합은 CISC 성분의 이량체화의 결과로서 신호전달 경로의 활성화에 의해 신호전달 도메인을 통한 신호 형질도입을 일으킨다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "신호 형질도입"은 세포의 도메인에 결합하는 리간드 또는 작용제에 의한 신호전달 경로의 활성화를 지칭한다. 신호의 활성화는 세포의 도메인과 리간드 또는 작용제의 결합의 결과이며, CISC 이량체화를 일으킨다.
- [0056] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "IL2Rb" 또는 "IL2R β "는 인터류킨-2 수용체 서브유닛 베타를 지칭한다. 유사하게, 용어 "IL2Rg" 또는 IL2R γ "는 인터류킨-2 수용체 서브유닛 감마를 지칭하고, 용어 "IL2Ra" 또는 "IL2R α "는 인터류킨-2 수용체 서브유닛 알파를 지칭한다. IL-2 수용체는 3가지 형태 또는 쇄, 알파, 베타 및 감마를 가지며, 이는 또한 다른 시토카인에 대한 수용체를 위한 서브유닛이다. IL2R β 및 IL2R γ 는 유형 I 시토카인 수용체 패밀리의 구성원이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "IL2R"은 인터류킨-2 수용체를 지칭하며, T 세포-매개된 면역 반응에 수반된다. IL2R은 수용체-매개된 엔도시토시스, 및 인터류킨 2로부터 유사분열촉진 신호의 형질도입에 수반된다. 유사하게, 용어 "IL-2/15R"은 IL-2 및 IL-15에 의해 공유된 수용체 신호전달 서브유닛을 지칭하며, 서브유닛 알파 (IL2/15Ra 또는 IL2/15R α), 베타 (IL2/15Rb 또는 IL2/15R β), 또는 감마 (IL2/15Rg 또는 IL2/15R γ)를 포함할 수 있다.
- [0057] 일부 실시양태에서, 화학적으로 유도된 신호전달 복합체는 2개의 성분을 포함하는 이중이량체화 활성화된 신호전달 복합체이다. 일부 실시양태에서, 제1 성분은 이중이량체화 쌍의 한 부분인 세포의 결합 도메인, 임의적인 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 1개 이상의 연결된 세포질 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 성분은 이중이량체화 쌍의 다른 부분인 세포의 결합 도메인, 임의적인 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 1개 이상의 연결된 세포질 신호전달 도메인을 포함한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 2가지 별개의 변형 사건이 있다. 일부 실시양태에서, 2개의 CISC 성분이 세포, 예컨대 포유동물 세포에서 발현된다. 일부 실시양태에서, 세포, 예컨대 포유동물 세포, 또는 세포 집단, 예컨대 포유동물 세포 집단을 이중이량체화를 일으키는 리간드 또는 작용제와 접촉시키고, 이에 따라 신호를 개시한다. 일부 실시양태에서, 동종이량체화 쌍은 이량체하고, 이에 따라 단일 CISC 성분이 세포, 예컨대 포유동물 세포에서 발현되고, CISC 성분이 동종이량체화하여 신호를 개시한다.
- [0058] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "리간드" 또는 "작용제"는 원하는 생물학적 효과를 갖는 분자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 리간드는 세포의 결합 도메인에 의해 인식되고 그에 결합하여, 리간드 및 2개의 결합 CISC 성분을 포함하는 삼원 복합체를 형성한다. 리간드에는 단백질질 분자, 예컨대 비제한적으로, 펩티드, 폴리펩티드, 단백질, 번역후 변형된 단백질, 항체, 그의 결합 부분; 소분자 (1000 달톤 미만), 무기 또는 유기 화합물;

및 핵산 분자, 예컨대 비제한적으로, 이중-가닥 또는 단일-가닥 DNA, 또는 이중-가닥 또는 단일-가닥 RNA (예를 들어, 안티센스, RNAi 등), 압타머, 뿐만 아니라 삼중 나선 핵산 분자가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 리간드는 임의의 공지된 유기체 (예컨대 비제한적으로, 동물 (예를 들어, 포유동물 (인간 및 비-인간 포유동물)), 식물, 박테리아, 진균 및 원생생물, 또는 바이러스)로부터 또는 합성 분자의 라이브러리로부터 유래되거나 또는 획득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 리간드는 단백질, 항체 또는 그의 기능적 유도체, 소분자, 또는 약물이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 라파마이신 또는 라파마이신 유사체 (라파로그)이다. 일부 실시양태에서, 라파로그에는 라파마이신에 대해 하기 변형 중 하나 이상을 갖는 라파마이신의 변이체가 포함된다: C7, C42 및/또는 C29에서 메톡시의 탈메틸화, 제거 또는 대체; C13, C43 및/또는 C28에서 히드록시의 제거, 유도체화 또는 대체; C14, C24 및/또는 C30에서 케톤의 환원, 제거 또는 유도체화; 6원 피페콜레이트 고리를 5원 프롤린 고리로 대체; 및 시클로헥실 고리 상에서 대안적인 치환 또는 시클로헥실 고리를 치환된 시클로펜틸 고리로 대체. 따라서, 일부 실시양태에서, 라파로그는 에베롤리무스, 메틸리무스, 노볼리무스, 피메크롤리무스, 리다포롤리무스, 타크롤리무스, 템시롤리무스, 우미롤리무스, 조타롤리무스, CCI-779, C20-메탈릴라파마이신, C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신, C16-iRap, AP21967, 나트륨 마이코페놀산, 베니디핀 히드로클로라이드, AP23573, 또는 AP1903, 또는 이들의 임의의 대사물, 유도체 및/또는 조합물이다. 일부 실시양태에서, 리간드는 IMiD-부류 약물 (예를 들어 탈리도미드, 포말리도미드, 레날리도미드 또는 관련된 유사체)이다.

[0059] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "동시 결합"은 CISC 성분 및 리간드 성분을 포함하는 다중성분 복합체를 형성하여 후속적인 신호 활성화를 생성하기 위해 동시에 또는 일부 경우에 실질적으로 동시에 2개 이상의 CISC 성분 에 의해 리간드가 결합하는 것을 지칭한다. 동시 결합은, CISC 성분들이 단일 리간드에 결합하도록 공간적으로 구성되고, 또한 두 CISC 성분 모두가 동일한 리간드, 예컨대 동일한 리간드 상의 상이한 모이어티에 결합하도록 구성되는 것을 필요로 한다.

[0060] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "선택적 확장"은 원하는 세포, 예컨대 포유동물 세포, 또는 원하는 세포 집단, 예컨대 포유동물 세포 집단을 확장시키는 능력을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 선택적 확장은 2가지 유전자 변형 사건을 겪은 세포, 예컨대 포유동물 세포의 순수한 집단의 생성 또는 확장을 지칭한다. 이량체화 CISC의 한 성분은 한 변형의 부분이고, 다른 성분은 다른 변형의 부분이다. 따라서, 이종이량체화 CISC의 한 성분은 각각의 유전자 변형과 연관이 있다. 리간드에 대한 세포의 노출은 2가지 원하는 변형 모두를 갖는 세포, 예컨대 포유동물 세포만의 선택적 확장을 가능하게 한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 리간드와의 접촉에 대해 반응할 수 있는 세포, 예컨대 포유동물 세포만이 이종이량체화 CISC의 두 성분 모두를 발현하는 것이다.

[0061] 본원에서 사용된 바와 같이, "숙주 세포"는 핵산 구축물 또는 벡터를 갖는, 형질전환, 형질감염 또는 형질도입에 민감한 임의의 세포 유형, 예컨대 포유동물 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포, 예컨대 포유동물 세포는 T 세포 또는 T 조절 세포 (T_{reg})이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "T-세포" 또는 "T 림프구"는 임의의 포유동물, 예를 들어, 영장류, 종, 예컨대 원숭이, 개 및 인간으로부터의 것일 수 있다. 일부 실시양태에서, T-세포는 수용자 대상체로서 동종이계 (동일한 종이지만 상이한 공여자로부터)이고; 일부 실시양태에서 T-세포는 자가유래 (공여자 및 수용자가 동일함)이고; 일부 실시양태에서 T-세포는 공통 유전자 (공여자 및 수용자가 상이하지만 일관성 쌍둥이임)이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포, 예컨대 포유동물 세포는 조절 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 CD34+, CD8+ 또는 CD4+ 세포이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포, 및 벌크 CD8+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 및 벌크 CD4+ T 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "세포 집단"은 1개 초과인 세포를 포함하는 세포, 예컨대 포유동물 세포의 그룹을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 세포, 예컨대 포유동물 세포가 제조되고, 세포는 본원에 기재된 단백질 서열 또는 본원에 기재된 단백질 서열을 코딩하는 발현 벡터를 포함한다.

[0062] 본원에서 사용된 바와 같이, "세포독성 T 림프구" (CTL)는 그의 표면 상에서 CD8을 발현하는 T 림프구 (예를 들어, CD8+ T-세포)를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 이러한 세포는 예를 들어 항원 경험이 있는 "기억" T-세포 (TM 세포)이다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질 분비를 위한 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포는 세포독성 T 림프구이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "중심 기억" T-세포 (또는 "TCM")는 그의 표면 상에서 CD62L, CCR-7 및/또는 CD45RO를 발현하는 항원 경험이 있는 CTL을 지칭하며, 나이브 세포와 비교하여 CD45RA를 발현하지 않거나 또는 감소된 발현을 갖는다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질 분비를 위한 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포는 중심 기억 T-세포 (TCM)이다. 일부 실시양태에서, 중심 기억 세포는 CD62L, CCR7,

CD28, CD127, CD45RO 및/또는 CD95의 발현에 대해 양성이고, 나이브 세포와 비교하여 CD54RA의 감소된 발현을 가질 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "이펙터 기억" T-세포 (또는 "TEM")는 중심 기억 세포와 비교하여 그의 표면 상에서 CD62L을 발현하지 않거나 또는 감소된 발현을 갖는, 항원 경험이 있는 T-세포를 지칭하며, 나이브 세포와 비교하여 CD45RA를 발현하지 않거나 또는 감소된 발현을 갖는다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질 분비를 위한 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포는 이펙터 기억 T-세포이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 기억 세포는 나이브 세포 또는 중심 기억 세포와 비교하여 CD62L 및/또는 CCR7의 발현에 대해 음성이며, CD28 및/또는 CD45RA의 가변적인 발현을 가질 수 있다.

[0063] 본원에서 사용된 바와 같이, "나이브 T-세포"는 CD62L 및/또는 CD45RA를 발현하는, 항원 경험이 없는 T 림프구를 지칭하고, 중심 또는 이펙터 기억 세포와 비교하여 CD45RO-를 발현하지 않는다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질 분비를 위한 세포, 예컨대 포유동물 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포, 예컨대 포유동물 세포는 나이브 T-세포이다. 일부 실시양태에서, 나이브 CD8+ T 림프구는 CD62L, CCR7, CD28, CD127 및/또는 CD45RA를 비롯한 나이브 T-세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 한다.

[0064] 본원에서 사용된 바와 같이, "이펙터" T-세포는 중심 기억 또는 나이브 T-세포와 비교하여 CD62L, CCR7 및/또는 CD28을 발현하지 않거나 또는 감소된 발현을 갖고 그랜자임 B 및/또는 퍼포린에 대해 양성인 항원 경험이 있는 세포독성 T 림프구 세포를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질 분비를 위한 세포, 예컨대 포유동물 세포가 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포, 예컨대 포유동물 세포는 이펙터 T-세포이다. 일부 실시양태에서, 세포, 예컨대 포유동물 세포는 중심 기억 또는 나이브 T-세포와 비교하여 CD62L, CCR7 및/또는 CD28을 발현하지 않거나 또는 감소된 발현을 갖고 그랜자임 B 및/또는 퍼포린에 대해 양성이다.

[0065] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "형질전환된" 또는 "형질감염된"은 외래 폴리뉴클레오티드 분자, 예컨대 구축물이 도입된 세포, 예컨대 포유동물 세포, 조직, 장기 또는 유기체를 지칭한다. 도입된 폴리뉴클레오티드 분자는 수용자 세포, 예컨대 포유동물 세포, 조직, 장기 또는 유기체의 게놈 DNA에 통합되어, 도입된 폴리뉴클레오티드 분자가 후손에 의해 유전될 수 있다. "트랜스제닉" 또는 "형질감염된" 세포, 예컨대 포유동물 세포, 또는 유기체는 또한 세포 또는 유기체의 자손, 및 교배에서 부모로서 이러한 트랜스제닉 유기체를 사용하는 번식 프로그램으로부터 생성되고 외래 폴리뉴클레오티드 분자의 존재하에 생성되는 변경된 표현형을 나타내는 자손을 포함한다. 용어 "트랜스제닉"은 하나 이상의 이종성 핵산 분자를 함유하는 박테리아, 진균 또는 식물을 지칭한다.

[0066] 본원에서 사용된 바와 같이, "형질도입"은 세포, 예컨대 포유동물 세포로 바이러스-매개된 (예를 들어 렌티바이러스 또는 아데노-연관 바이러스) 유전자 전달을 지칭한다.

[0067] 본원에서 사용된 바와 같이, "대상체" 또는 "개체"는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 동물을 지칭한다. "동물"에는 냉혈 및 온혈 척추동물 및 무척추동물, 예컨대 어류, 갑각류, 파충류, 특히 포유동물이 포함된다. "포유동물"에는 비제한적으로, 마우스, 래트, 토끼, 기니 피그, 개, 고양이, 양, 염소, 소, 말, 영장류, 예컨대 원숭이, 침팬지 및 유인원, 특히 인간이 포함된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0068] 본원에 기재된 바와 같이, "마커 서열"은 단백질 또는 세포, 예컨대 관심 단백질을 갖는 포유동물 세포를 선택하거나 또는 추적하기 위해 사용되는 단백질을 코딩한다. 본원에 기재된 실시양태에서, 제공된 융합 단백질은 실험, 예컨대 유세포 분석에서 선택될 수 있는 마커 서열을 포함할 수 있다.

[0069] 본원에서 확인된 CISC 서열 또는 다른 폴리펩티드 서열 (예를 들어, 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드 서열)과 관련하여 "퍼센트 (%) 아미노산 서열 동일성"은, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환은 고려하지 않고, 최대 % 서열 동일성을 달성하기 위해 서열을 정렬시키고, 필요한 경우 갭을 도입시킨 후에, 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 및/또는 신호전달 도메인 각각에 대한 기준 서열에서의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열에서의 아미노산 잔기의 백분율로서 정의된다. % 아미노산 서열 동일성을 결정하기 위한 정렬은 관련 기술분야의 기술 내에 있는 다양한 방법에 의해, 예를 들어 공개적으로 입수가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 또는 메그얼라인(Megalain) (디엔에이스타(DNASTAR)) 소프트웨어를 사용하여 달성될 수 있다. 관련 기술분야의 기술자는 비교할 서열의 전장에 걸쳐 최대 정렬을 달성하기 위해 필요한 임의의 알고리즘을 비롯하여 정렬을 측정하는데 적절한 파라미터를 결정할 수 있다. 예를 들어, WU-BLAST-2 컴퓨터 프로그램을 사용하여 생성된 % 아미노산 서열 동일성 값 (Altschul, S. F. et al. (1996). *Methods in Enzymol.*, 266:460-480)은 몇몇 검색 파라미터를 사용하고, 이 중 대부분은 디폴트 값으로 설정된다. 디폴트 값으로 설정되지 않는 것들 (예를 들어, 조정가능한 파라미터)은 하기 값으로 설정된다: 중첩 스펠=1, 중첩 분율=0.125, 워드 역치 (T) =11 및 평점 매트릭스=BLOSUM62. CISC의 일부 실시양태에서,

CISC는 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인을 포함하고, 각각의 도메인은 천연, 합성, 또는 본래의 도메인으로부터 돌연변이된 또는 말단절단된 형태를 포함한다. 일부 실시양태에서, 임의의 주어진 도메인의 돌연변이된 또는 말단절단된 형태는 100%, 95%, 90%, 85% 서열 동일성, 또는 본원에 제공된 서열에 제시된 서열에 대해 상기 언급된 임의의 두 백분율에 의해 정의되는 범위 내에 있는 % 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0070] 본원에서 사용된 바와 같이, "CISC 변이성 폴리펩티드 서열" 또는 "CISC 변이성 아미노산 서열"은 본원에 제공된 단백질 서열, 또는 특이적으로 유래된 그의 단편, 예컨대 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 및/또는 신호전달 도메인에 대한 단백질 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 아미노산 서열 동일성 (또는 상기 언급된 임의의 두 백분율에 의해 정의되는 범위 내에 있는 아미노산 서열 동일성 백분율)을 갖는 하기 정의된 바와 같은 단백질 서열을 지칭한다. 일반적으로, CISC 변이성 폴리펩티드 또는 그의 단편은 아미노산 서열 또는 그의 유래된 단편과 적어도 또는 적어도 약 80% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 81% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 82% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 83% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 84% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 85% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 86% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 87% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 88% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 89% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 90% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 91% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 92% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 93% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 94% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 95% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 96% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 97% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 98% 아미노산 서열 동일성, 및 적어도 또는 적어도 약 99% 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 변이체는 본래의 단백질 서열을 포함하지 않는다.

[0071] 본원에서 사용된 바와 같이, "네이키드 FRB 도메인 변이성 폴리펩티드 서열" 또는 "네이키드 FRB 도메인 변이성 아미노산 서열"은 본원에 제공된 단백질 서열 (예를 들어, 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2) 또는 특이적으로 유래된 그의 단편, 예컨대 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 및/또는 신호전달 도메인에 대한 단백질 서열과 적어도 또는 적어도 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 98% 또는 약 99% 아미노산 서열 동일성 (또는 상기 언급된 임의의 두 백분율에 의해 정의되는 범위 내에 있는 아미노산 서열 동일성 백분율)을 갖는 하기 정의된 바와 같은 단백질 서열을 지칭한다. 일반적으로, 네이키드 FRB 도메인 변이성 폴리펩티드 또는 그의 단편은 아미노산 서열 또는 그의 유래된 단편과 적어도 또는 적어도 약 80% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 81% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 82% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 83% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 84% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 85% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 86% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 87% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 88% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 89% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 90% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 91% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 92% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 93% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 94% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 95% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 96% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 97% 아미노산 서열 동일성, 적어도 또는 적어도 약 98% 아미노산 서열 동일성 및 yet 적어도 또는 적어도 약 99% 아미노산 서열 동일성을 가질 것이다. 변이체는 본래의 단백질 서열을 포함하지 않는다.

[0072] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 과도적인 문구에서 또는 청구항의 본문에서 사용되건 간에, 용어 "포함하다" 및 "포함하는"은 개방형 의미를 갖는 것으로 해석되어야 한다. 즉, 상기 용어는 문구 "적어도 갖는" 또는 "적어도 포함하는"과 동의어로 해석되어야 한다. 과정의 문맥에서 사용될 때, 용어 "포함하는"은 상기 과정이 인용된 단계를 적어도 포함하지만, 추가의 단계를 포함할 수 있음을 의미한다. 화합물, 조성물 또는 기기의 문맥에서 사용될 때, 용어 "포함하는"은 화합물, 조성물 또는 기기가 인용된 특징 또는 성분을 적어도 포함하지만, 추가의 특징 또는 성분 또한 포함할 수 있음을 의미한다.

[0073] **CISC**

[0074] 하나 이상의 단백질 서열은 제1 및 제2 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 서열은 제1 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함할 수 있는 제1 CISC 성분을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 제2 서열은 제2 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 그의 일부분을 포함할 수 있는 제2

CISC 성분을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 CISC 성분은 발현될 때 그들이 리간드의 존재하에 이량체화하도록 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 CISC 성분은 발현될 때 그들이 리간드의 존재하에 동시에 이량체화하도록 위치할 수 있다.

[0075] 일부 실시양태에서, 이중이량체성의 2 성분 CISC에 대한 단백질 서열 또는 서열이 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 CISC 성분은 IL2R γ -CISC 복합체이다. 일부 실시양태에서, IL2R γ -CISC는 서열식별번호: 9에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 9의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL2R γ -CISC는 서열식별번호: 10에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 10의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL2R γ -CISC는 서열식별번호: 11에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 11의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL2R γ -CISC는 서열식별번호: 12에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 12의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0076] 일부 실시양태에서, 제1 CISC 성분에 대한 단백질 서열은 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 단백질 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CISC 성분의 단백질 서열은 서열식별번호: 9, 10, 11 또는 12에 제시된 서열과 100%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85% 또는 80% (이들 백분율 내에 속하는 모든 값 및 범위 포함) 서열 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0077] 일부 실시양태에서, 제2 CISC 성분은 IL2R β 복합체이다. 일부 실시양태에서, IL2R β -CISC는 서열식별번호: 13에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 13의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL2R β -CISC는 서열식별번호: 14에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 14의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL2R β -CISC는 서열식별번호: 15에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 15의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, IL2R β -CISC는 서열식별번호: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 24의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 CISC 성분은 IL7R α 복합체이다. 일부 실시양태에서, IL7R α -CISC는 서열식별번호: 16, 17 또는 26에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 16, 17 또는 26의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0078] 다른 실시양태에서, IL2R β -CISC는 말단절단된 세포내 IL2R β 도메인, 또는 말단절단된 세포내 IL2R β 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 말단절단된 IL2R β 도메인은 IL2R γ -CISC 단백질 서열과 이중이량체화시에 하류 IL2 신호전달을 활성화시키는 능력을 보유한다. 일부 실시양태에서, 말단절단된 IL2R β 는 서열식별번호: 5에

제시된	아미노산	서열
-----	------	----

(PAALGKDTIPWLGHLVLVLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKVKLCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLQKDKVPEPASLSLNTDAYLSLQELQ; 서열식별번호: 5)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 5의 말단절단된 IL2R β 도메인에는 임의의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 N-말단 아미노산이 결여되어 있다. 다른 실시양태에서, 말단절단된 세포내 IL2R β 도메인을 갖는 FRB-CISC는 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열

(MALPVTALLPLALLLHAARPIIWHHEWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRI SKPAALGKDTIPWLGHLVLVLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKVKLCNTPDPSKFFSQLSSEHGGDVQKWLSSP*WORFPSSSPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLQKDKVPEPASLSLNTDAYLSLQELQ; 서열식별번호: 7)을 포함한다.

[0079] 일부 실시양태에서, 제2 CISC 성분에 대한 단백질 서열은 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 단백질 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 제2 CISC 성분의 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및/또는 신호전달 도메인 (일부 실시양태에서 말단절단된 IL2R β 신호전달 도메인 포함)을 포함하는 제2 CISC 성분의 단백질 서열은 서열식별번호: 5, 8, 13, 14, 15, 16 또는 17에 제시된 서열과 100%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 서열 동일성 (이들 백분율 내에 속하는 모든 값 및 범위 포함)을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0080] 일부 실시양태에서, 단백질 서열은 링커를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산, 예컨대 글리신, 또는 상기 언급된 임의의 두 수에 의해 정의되는 범위 내의 수많은

아미노산, 예컨대 글리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 글리신 스페이서는 적어도 3개의 글리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 글리신 스페이서는 서열식별번호: 18 (GGGS; 서열식별번호: 18), 서열식별번호: 19 (GGGSGGG; 서열식별번호: 19), 서열식별번호: 20 (GGG; 서열식별번호: 20), 서열식별번호: 21 (GGG; 서열식별번호: 21), 서열식별번호: 22 (GGSP; 서열식별번호: 22), 또는 서열식별번호: 31 (PAAL; 서열식별번호: 31)에 제시된 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 18-22 및 31을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 신호전달 도메인에 대해 N-말단에 위치하고, 힌지 도메인은 막횡단 도메인에 대해 N-말단에 위치하고, 링커는 힌지 도메인에 대해 N-말단에 위치하고, 세포외 결합 도메인은 링커에 대해 N-말단에 위치한다.

[0081] 일부 실시양태에서, 동종이량체성의 2 성분 CISC에 대한 단백질 서열 또는 서열들이 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 CISC 성분은 IL2R γ -CISC 복합체이다. 일부 실시양태에서, IL2R γ -CISC는 서열식별번호: 23에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 23의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0082] 일부 실시양태에서, 제1 CISC 성분에 대한 단백질 서열은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 포함하는 단백질 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CISC 성분의 단백질 서열은 서열식별번호: 23에 제시된 서열과 100%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85% 또는 80% (이들 백분율 내에 속하는 모든 값 및 범위 포함) 서열 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0083] 일부 실시양태에서, 제2 CISC 성분은 IL2R β 복합체 또는 IL2R α 복합체이다. 일부 실시양태에서, IL2R β -CISC는 서열식별번호: 24에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 24의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0084] 일부 실시양태에서, IL2R α -CISC는 서열식별번호: 25에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 25의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0085] 일부 실시양태에서, 제2 CISC 성분에 대한 단백질 서열은 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 포함하는 단백질 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 제2 CISC 성분의 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 세포외 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CISC 성분의 단백질 서열은 서열식별번호: 24 또는 서열식별번호: 25에 제시된 서열과 100%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85% 또는 80% (이들 백분율 내에 속하는 모든 값 및 범위 포함) 서열 동일성을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0086] 일부 실시양태에서, 단백질 서열은 링커를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산, 예컨대 글리신, 또는 상기 언급된 임의의 두 수에 의해 정의되는 범위 내의 수많은 아미노산, 예컨대 글리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 글리신 스페이서는 적어도 3개의 글리신을 포함한다. 일부 실시양태에서, 글리신 스페이서는 서열식별번호: 18 (GGGS; 서열식별번호: 18), 서열식별번호: 19 (GGGSGGG; 서열식별번호: 19), 서열식별번호: 20 (GGG; 서열식별번호: 20), 서열식별번호: 21 (GGG; 서열식별번호: 21), 서열식별번호: 22 (GGSP; 서열식별번호: 22), 또는 서열식별번호: 31 (PAAL; 서열식별번호: 31)에 제시된 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 18-22 및 31을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 신호전달 도메인에 대해 N-말단에 위치하고, 힌지 도메인은 막횡단 도메인에 대해 N-말단에 위치하고, 링커는 힌지 도메인에 대해 N-말단에 위치하고, 세포외 결합 도메인은 링커에 대해 N-말단에 위치한다.

[0087] 일부 실시양태에서, 동종이량체화 2 성분 CISC에 대한 서열은 리간드 AP1903과의 동종이량체화를 위해 FKBP F36V 도메인을 포함한다.

[0088] 일부 실시양태에서, 단일 성분 동종이량체화 CISC에 대한 단백질 서열 또는 서열들이 제공된다. 일부 실시양태에서, 단일 성분 CISC는 IL7R α -CISC 복합체이다. 일부 실시양태에서, IL7R α -CISC는 서열식별번호: 26에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 26의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0089] 일부 실시양태에서, 단일 성분 CISC는 MPL-CISC 복합체이다. 일부 실시양태에서, MPL-CISC는 서열식별번호: 27

에 제시된 아미노산 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 서열식별번호: 27의 단백질 서열을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0090] 일부 실시양태에서, 단일 성분 CISC에 대한 단백질 서열은 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 단백질 서열을 포함한다. 실시양태는 또한 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 또는 신호전달 도메인을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및/또는 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CISC 성분의 단백질 서열은 서열식별번호: 26 또는 서열식별번호: 27에 제시된 서열과 100%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 서열 동일성을 포함하거나 또는 상기 언급된 임의의 두 백분율에 의해 정의되는 범위 내의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0091] 일부 실시양태에서, 동종이량체화 단일 성분 CISC에 대한 서열은 리간드 AP1903과의 동종이량체화를 위해 FKBP F36V 도메인을 포함한다.

[0092] **백터**

[0093] 효율적인 형질도입 및 트랜스진 발현을 제공하도록 다양한 백터 조합물을 구축할 수 있다. 일부 실시양태에서, 백터는 바이러스 백터이다. 다른 실시양태에서, 백터에는 바이러스 백터 및 플라스미드 백터의 조합물을 포함할 수 있다. 다른 바이러스 백터는 포말상 바이러스, 아데노바이러스 백터, 아데노-연관 바이러스 (AAV) 백터, 레트로바이러스 백터, 및/또는 렌티바이러스 백터가 포함된다. 일부 실시양태에서, 백터는 렌티바이러스 백터이다. 일부 실시양태에서, 백터는 포말상 바이러스 백터, 아데노바이러스 백터, 레트로바이러스 백터 또는 렌티바이러스 백터이다. 일부 실시양태에서, 백터는 박테리아 시스템, 예컨대 이. 콜라이에서 단백질 발현을 위한 것이다. 다른 실시양태에서, 제1 백터는 제1 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하는 제1 CISC 성분을 코딩할 수 있는 반면에, 제2 백터는 제2 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 그의 일부분을 포함하는 제2 CISC 성분을 코딩할 수 있다.

[0094] 백터는 백터에서 DNA 서열 (예를 들어, 네이키드 FRB 도메인 또는 CISC의 성분을 코딩하는 DNA 서열)의 발현을 유도하기 위한 1개 이상의 프로모터를 가질 수 있다. "프로모터"는 특정한 유전자의 전사를 개시하는 DNA의 영역이다. 프로모터는 동일한 가닥 상에서 및 DNA의 상류에서 (센스 가닥의 5' 영역) 유전자의 전사 개시 부위 근처에 위치할 수 있다. 프로모터는 조건부, 유도성 또는 구성적 프로모터일 수 있다. 프로모터는 박테리아, 포유동물 또는 곤충 세포 단백질 발현에 대해 특이적이다. 일부 실시양태에서, 융합 단백질을 코딩하는 핵산이 제공되며, 핵산은 프로모터 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 박테리아, 포유동물 또는 곤충 세포 단백질 발현에 대해 특이적이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 조건부, 유도성 또는 구성적 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 MND 프로모터 (척수증식성 육종 바이러스 인핸서와 함께 변형된 MoMuLV LTR의 U3 영역을 함유하는 합성 프로모터)이다. 일부 실시양태에서, MND 프로모터는 서열식별번호: 33의 핵산 서열을 포함한다.

[0095] 본원에서 사용된 바와 같이, "조건부" 또는 "유도성"은 유도인자의 존재하에 유전자 발현을 제공하고, 유도인자의 부재하에서는 유전자 발현을 실질적으로 제공하지 않는 프로모터를 포함하는 핵산 구축물을 지칭한다.

[0096] 본원에서 사용된 바와 같이, "구성적"은 구성적인 프로모터를 포함하고, 이에 따라 연속적으로 생성되는 폴리펩티드의 발현을 제공하는 핵산 구축물을 지칭한다.

[0097] 일부 실시양태에서, 유도성 프로모터는 낮은 수준의 기저 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 렌티바이러스 백터가 사용되고, 유도되지 않은 세포에서 기저 활성의 수준은, 세포가 유전자를 발현하도록 유도될 때와 비교하여, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만 (그러나 0은 아님) 또는 상기 언급된 임의의 두 값에 의해 정의되는 범위 내이다. 기저 활성의 수준은 유세포 분석을 이용하여 유도인자 (예를 들어 약물)의 부재하에 트랜스진 (예를 들어 마커 유전자)의 발현의 양을 측정함으로써 결정될 수 있다. 본원에 기재된 일부 실시양태에서, 마커 단백질 (예컨대 mCherry)은 발현의 결정을 위해 사용된다.

[0098] 일부 실시양태에서, 유도성 프로모터는 유도되지 않은 또는 기저 활성과 비교하여 높은 수준의 유도된 활성을 제공한다. 일부 실시양태에서, 유도된 상태에서의 활성 수준은 유도되지 않은 상태에서의 활성 수준보다 2, 4, 6, 8, 9 또는 10배 또는 그 초과이거나, 또는 상기 언급된 임의의 두 값에 의해 정의되는 범위 내이다. 일부 실시양태에서, 유도성 프로모터의 제어하에서의 트랜스진 발현은 트랜스 작용인자의 부재하에 10, 8, 6, 4, 2 또는 1 일 미만 (0 일 제외) 또는 상기 언급된 임의의 두 기간에 의해 정의되는 범위 내에서 해제된다.

- [0099] 일부 실시양태에서, 유도성 프로모터는 낮은 수준의 기저 활성, 높은 수준의 유도성, 및/또는 가역성을 위한 짧은 시간을 제공하도록 설계되고/거나 변형된다.
- [0100] 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 서열식별번호: 1, 2, 5, 7, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17 중 하나 이상의 단백질 서열을 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 서열식별번호: 28에 제시된 핵산 서열을 포함한다. 서열식별번호: 28은 서열식별번호: 12 및 16에 제시된 단백질 서열을 코딩한다.
- [0101] 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 서열식별번호: 29에 제시된 서열식별번호: 28의 변이체이다. 서열식별번호: 29는 서열식별번호: 10 및 14에 제시된 단백질 서열을 코딩한다.
- [0102] 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 서열식별번호: 30에 제시된 서열식별번호: 28의 변이체이다. 서열식별번호: 30은 서열식별번호: 11 및 15에 제시된 단백질 서열을 코딩한다.
- [0103] 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 본원에 제공된 뉴클레오티드 서열, 또는 특이적으로 유래된 그의 단편과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 핵산 서열 동일성 (또는 상기 언급된 임의의 두 백분율에 의해 정의되는 범위 내의 핵산 서열 동일성 백분율)을 갖는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 융합 단백질을 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 RNA 또는 DNA이다.
- [0104] **네이키드 FRB 도메인**
- [0105] 세포내 발현을 위한 네이키드 FKBP-라파마이신 결합 (FRB) 도메인 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 일부 비제한적인 실시양태에서, 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드는 본원에서 더욱 자세하게 기재된 제1 및 제2 CISC 성분의 하나 이상의 단백질 서열과 공동-발현된다. 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드는 서열식별번호: 1 또는 2에 제시된 서열과 100%, 99%, 98%, 95%, 90%, 85% 또는 80% 서열 동일성 (이들 백분율 내에 속하는 모든 값 및 범위 포함)을 공유하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다.
- [0106] **게놈 편집을 위한 시스템**
- [0107] 본원에 기재된 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 발현하기 위해, 임의적으로 본원에 기재된 CISC를 추가로 발현하기 위해, 예컨대 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 코딩하고 임의적으로 CISC를 추가로 코딩하는 핵산을 세포의 게놈에 표적화 통합시킴으로써, 세포에서 게놈 편집을 위한 시스템이 본원에 제공된다. 본 개시내용은 또한 특히 유전자 변형된 세포 집단을 선택적으로 활성화 및/또는 확장시키기 위한, 예컨대 유전자 변형된 세포에 대해 선택적으로 풍부화된 세포 집단을 제조하기 위한 시스템을 제공한다.
- [0108] 일부 실시양태에서, i) 테옥시리보핵산 (DNA) 엔도뉴클레아제, 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산; ii) 세포에서 표적 게놈 유전자좌 내의 표적 서열에 상보적인 스페이서 서열을 포함하는 가이드 RNA (gRNA), 또는 gRNA를 코딩하는 핵산; 및 iii) 네이키드 FKBP-라파마이신 결합 (FRB) 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 공여자 카세트를 포함하는 공여자 주형을 포함하는 시스템이 본원에 제공되며, DNA 엔도뉴클레아제, gRNA, 및 공여자 주형은, DNA 엔도뉴클레아제와 gRNA의 회합에 의해 형성된 복합체가 세포에서 표적 게놈 유전자좌 내의 공여자 카세트의 표적화된 통합을 촉진시켜 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 발현할 수 있는 유전자 변형된 세포를 생성할 수 있도록 구성된다.
- [0109] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 시스템에 따라, gRNA는 세포에서 FOXP3 유전자좌, AAVS1 유전자좌, 또는 TCRa (TRAC) 유전자좌 내의 서열에 상보적인 스페이서 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 서열식별번호: 40-57 중 어느 하나로부터의 스페이서 서열, 또는 서열식별번호: 40-57 중 어느 하나와 비교하여 3개 이하의 미스매치를 갖는 그의 변이체를 포함한다.
- [0110] 본원에서 사용된 바와 같이, "Cas 엔도뉴클레아제" 또는 "Cas 뉴클레아제"에는 예를 들어 CRISPR (일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복부) 적응성 면역계와 관련이 있는 RNA-유도된 DNA 엔도뉴클레아제 효소가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 본원에서, "Cas 엔도뉴클레아제"는 천연 발생 및 재조합 Cas 엔도뉴클레아제 둘 다를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 시스템에 따라, Cas DNA 엔도뉴클레아제는 Cas9 엔도뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, Cas9 엔도뉴클레아제는 스트렙토코커스 피오게네스 (*Streptococcus pyogenes*) (spCas9)로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, Cas9는 스태필로코커스 루그두넨시스 (*Staphylococcus lugdunensis*) (SluCas9)로부터의 것이다.
- [0111] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 시스템에 따라, 시스템은 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산을 포함한다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 숙주 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화

된다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 인간 세포에서의 발현을 위해 코돈-최적화된다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 DNA, 예컨대 DNA 플라스미드이다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 RNA, 예컨대 mRNA이다.

[0112] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 시스템에 따라, 공여자 주형은, 공여자 카세트가 상동성 지정 복구 (HDR)에 의해 시스템에서 gRNA에 의해 표적화된 게놈 유전자좌에 통합될 수 있도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 공여자 카세트는 표적화된 게놈 유전자좌에서의 서열에 상응하는 상동체 아암에 의해 양측에서 플랭킹된다. 일부 실시양태에서, 상동체 아암은 적어도 0.2 kb 또는 약 0.2 kb (예컨대 적어도 임의의 0.3 kb, 0.4 kb, 0.5 kb, 0.6 kb, 0.7 kb, 0.8 kb, 0.9 kb, 1 kb, 또는 그 초과 또는 약 임의의 0.3 kb, 0.4 kb, 0.5 kb, 0.6 kb, 0.7 kb, 0.8 kb, 0.9 kb, 1 kb, 또는 그 초과) 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 상동체 아암은 적어도 0.4 kb, 예를 들어, 0.45 kb, 0.6 kb 또는 0.8 kb 또는 약 0.4 kb, 예를 들어, 0.45 kb, 0.6 kb 또는 0.8 kb 길이를 갖는다. 예시적인 상동체 아암은 서열식별번호: 32의 서열을 갖는 공여자 주형으로부터의 상동체 아암을 추가로 포함한다. 예시적인 공여자 주형은 서열식별번호: 3-4, 8, 28-30, 32 및 37-39의 서열을 갖는 공여자 주형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공여자 주형은 아데노 관련 바이러스 (AAV) 벡터에서 코딩된다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV2, AAV5 또는 AAV6 벡터이다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV6 벡터이다.

[0113] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 시스템에 따라, 공여자 주형은, 공여자 카세트가 비-상동성 말단 연결 (NHEJ)에 의해 시스템에서 gRNA에 의해 표적화된 게놈 유전자좌에 통합될 수 있도록 구성된다. 일부 실시양태에서, 공여자 카세트는 gRNA 표적 부위에 의해 한측에서 또는 양측에서 플랭킹된다. 일부 실시양태에서, 공여자 카세트는 gRNA 표적 부위에 의해 양측에서 플랭킹된다. 일부 실시양태에서, gRNA 표적 부위는 시스템에서 gRNA에 대한 표적 부위이다. 일부 실시양태에서, 공여자 주형의 gRNA 표적 부위는 시스템에서 gRNA에 대한 세포 게놈 gRNA 표적 부위의 역상보체이다. 일부 실시양태에서, 공여자 주형은 아데노 관련 바이러스 (AAV) 벡터에 코딩된다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV2, AAV5, 또는 AAV6 벡터이다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV6 벡터이다.

[0114] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 시스템에 따라, DNA 엔도뉴클레아제, 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 리포솜 또는 지질 나노입자 중에 제형화된다. 일부 실시양태에서, 리포솜 또는 지질 나노입자는 또한 gRNA를 포함한다. 일부 실시양태에서, 리포솜 또는 지질 나노입자는 지질 나노입자이다. 일부 실시양태에서, 시스템은 DNA 엔도뉴클레아제 및 gRNA를 코딩하는 핵산을 포함하는 지질 나노입자를 포함한다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 mRNA이다.

[0115] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 시스템에 따라, DNA 엔도뉴클레아제는 리보핵단백질 (RNP) 복합체에서 gRNA와 회합된다.

[0116] **게놈 편집**

[0117] 유전자 편집을 통해 본원에 개시된 임의의 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드 및 임의적으로 본원에 개시된 화학적으로 유도된 신호전달 복합체 폴리펩티드를 발현하도록 숙주 세포 또는 유기체를 유전자 변형시키는 방법이 본원에 제공된다. 일부 측면에서, 유전자 편집은 CRISPR/Cas 시스템을 이용하여 수행된다.

[0118] **CRISPR 엔도뉴클레아제 시스템**

[0119] CRISPR (일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복부) 게놈 유전자좌는 여러 원핵생물 (예를 들어, 박테리아 및 고세균)의 게놈에서 발견될 수 있다. 원핵생물에서, CRISPR 유전자좌는 외래 침입자, 예컨대 바이러스 및 파지에 대한 원핵생물의 방어를 돕기 위해 면역계의 유형으로서 기능하는 생성물을 코딩한다. 3가지 단계의 CRISPR 유전자좌 기능이 있다: 새로운 서열을 CRISPR 유전자좌에 통합, CRISPR RNA (crRNA)의 발현, 및 외래 침입자 핵산의 침묵. 5가지 유형의 CRISPR 시스템 (예를 들어, 유형 I, 유형 II, 유형 III, 유형 U, 및 유형 V)이 확인되었다.

[0120] CRISPR 유전자좌는 "반복부"로 지칭되는 수많은 짧은 반복 서열을 포함한다. 발현될 때, 반복부는 이차 헤어핀 구조 (예를 들어, 헤어핀)를 형성할 수 있고/거나 구조화되지 않은 단일-가닥 서열을 가질 수 있다. 반복부는 일반적으로 클러스터로 발견되고, 종 사이에서 빈번하게 분기된다. 반복부는 "스페이스"로 지칭되는 고유의 개재 서열에 의해 규칙적으로 이격되어, 반복부-스페이스-반복부 유전자좌 기하구조를 생성한다. 스페이스는 공지된 외래 침입자 서열과 동일하거나 또는 그에 대해 높은 상동성을 갖는다. 스페이스-반복부 단위는 crisprRNA (crRNA)를 코딩하고, 이는 스페이스-반복부 단위의 성숙한 형태로 가공된다. crRNA는 표적 핵산을 표적화하는데 관여하는 "시드" 또는 스페이스 서열을 갖는다 (원핵생물의 천연 발생 형태에서, 스페이스 서열은

외래 침입자 핵산을 표적화함). 스페이서 서열은 crRNA의 5' 또는 3' 말단에 위치한다.

[0121] CRISPR 유전자좌는 또한 CRISPR-연관된 (Cas) 유전자를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는다. Cas 유전자는 원핵생물에서 crRNA 기능의 생물발생 및 간접 단계에 관여하는 엔도뉴클레아제를 코딩한다. 일부 Cas 유전자는 상동성 이차 및/또는 삼차 구조를 갖는다.

[0122] 게놈-표적화 핵산은 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어 핵산-유도된 뉴클레아제, 예컨대 Cas9)와 상호작용하여, 복합체를 형성한다. 게놈-표적화 핵산 (예를 들어 gRNA)은 부위-지정 폴리펩티드를 표적 핵산으로 안내한다.

[0123] 이전에 명시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드 및 게놈-표적화 핵산 각각을 세포 또는 대상체에 별도로 투여할 수 있다. 다른 한편으로, 일부 다른 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드를 하나 이상의 가이드 RNA와, 또는 tracrRNA와 함께 하나 이상의 crRNA와 사전 복합체화시킬 수 있다. 이어서, 사전 복합체화된 물질을 세포 또는 대상체에게 투여할 수 있다. 이러한 사전 복합체화된 물질은 리보핵단백질 입자 (RNP)로 공지되어 있다.

[0124] 유형 II CRISPR 시스템

[0125] 유형 II CRISPR 시스템에서 crRNA 생물발생은 본질적으로 트랜스-활성화 CRISPR RNA (tracrRNA)를 필요로 한다. tracrRNA는 내인성 RNase III에 의해 변형된 다음, 프리-crRNA 어레이에서 crRNA 반복부와 혼성화한다. 내인성 RNase III는 프리-crRNA를 절단하기 위해 동원된다. 절단된 crRNA는 엑소리보뉴클레아제 트리밍에 적용되어 성숙한 crRNA 형태 (예를 들어, 5' 트리밍)를 생성한다. tracrRNA는 crRNA에 혼성화된 채로 유지되고, tracrRNA 및 crRNA는 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, Cas9)와 회합한다. crRNA-tracrRNA-Cas9 복합체의 crRNA는 상기 복합체를 crRNA가 혼성화할 수 있는 표적 핵산으로 안내한다. crRNA와 표적 핵산의 혼성화는 표적화된 핵산 절단을 위해 Cas9를 활성화시킨다. 유형 II CRISPR 시스템에서 표적 핵산은 프로토스페이서 인접한 모티프 (PAM)로 지칭된다. 본질적으로, PAM은 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, Cas9)와 표적 핵산의 결합을 용이하게 하는데 필수적이다. 유형 II 시스템 (Nmeni 또는 CASS4로도 지칭됨)은 유형 II-A (CASS4) 및 II-B (CASS4a)로 추가로 세분된다. [Jinek, M. et al. (2012). *Science*, 337(6096):816-821]은 CRISPR/Cas9 시스템이 RNA-프로그래밍가능한 게놈 편집에 유용함을 보여주며, 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2013/176772는 부위-특이적 유전자 편집을 위한 CRISPR/Cas 엔도뉴클레아제 시스템의 수많은 예 및 적용을 제공한다.

[0126] 유형 V CRISPR 시스템

[0127] 유형 V CRISPR 시스템은 유형 II 시스템과는 몇몇 중요한 차이점이 있다. 예를 들어, Cpf1은 유형 II 시스템과는 대조적으로 tracrRNA가 결여된 단일 RNA-유도된 엔도뉴클레아제이다. 실제로, Cpf1-회합된 CRISPR 어레이는 추가의 트랜스-활성화 tracrRNA를 필요로 하지 않고 성숙한 crRNAs로 가공된다. 유형 V CRISPR 어레이는 42-44 개 뉴클레오티드 길이의 짧은 성숙한 crRNA로 가공되고, 각각의 성숙한 crRNA는 직접 반복부의 19개 뉴클레오티드로 시작하여 스페이서 서열의 23-25개 뉴클레오티드로 이어진다. 대조적으로, 유형 II 시스템에서 성숙한 crRNA는 스페이서 서열의 20-24개 뉴클레오티드로 시작하여 직접 반복부의 22개 또는 약 22개 뉴클레오티드로 이어진다. 또한, Cpf1은 Cpf1-crRNA 복합체가 짧은 T-풍부 PAM 뒤에 있는 표적 DNA를 효율적으로 절단하도록 (대조적으로 유형 II 시스템의 경우에는 G-풍부 PAM 뒤에 표적 DNA가 있음) T-풍부 프로토스페이서-인접한 모티프를 이용한다. 따라서, 유형 V 시스템은 PAM으로부터 멀리 있는 지점을 절단하는 반면에, 유형 II 시스템은 PAM에 인접한 지점을 절단한다. 추가로, 유형 II 시스템과는 대조적으로, Cpf1은 4 또는 5개 뉴클레오티드 5' 오버행을 갖는 엇갈린 DNA 이중-가닥 절단을 통해 DNA를 절단한다. 유형 II 시스템은 평활말단 이중-가닥 절단을 통해 절단한다. 유형 II 시스템과 유사하게, Cpf1은 예상된 RuvC-유사 엔도뉴클레아제 도메인을 함유하지만, 유형 II 시스템과는 대조적으로 제2 HNH 엔도뉴클레아제 도메인이 결여되어 있다.

[0128] 부위-지정 폴리펩티드 또는 DNA 엔도뉴클레아제

[0129] NHEJ 및/또는 HDR로 인한 표적 DNA의 변형은 예를 들어 돌연변이, 결실, 변경, 통합, 유전자 수정, 유전자 대체, 유전자 태그 부착, 트랜스진 삽입, 뉴클레오티드 결실, 유전자 파괴, 전좌 및/또는 유전자 돌연변이로 이어질 수 있다. 비-천연 핵산을 게놈 DNA에 통합시키는 과정은 게놈 편집의 예이다.

[0130] 부위-지정 폴리펩티드는 DNA를 절단하기 위해 게놈 편집에서 사용되는 뉴클레아제이다. 부위-지정 폴리펩티드는 하나 이상의 폴리펩티드, 또는 상기 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 mRNA로서 세포 또는 대상체에게 투여될 수 있다.

[0131] CRISPR/Cas 또는 CRISPR/Cpf1 시스템의 맥락에서, 부위-지정 폴리펩티드는 가이드 RNA에 결합할 수 있고, 이는

다시 폴리펩티드가 지정되는 표적 DNA에 있는 부위를 특정한다. 본원의 CRISPR/Cas 또는 CRISPR/Cpf1 시스템의 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 엔도뉴클레아제, 예컨대 DNA 엔도뉴클레아제이다. 본원에서 사용된 바와 같이, "Cas 엔도뉴클레아제" 또는 "Cas 뉴클레아제"에는 예를 들어 CRISPR (일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복부) 적응성 면역계와 관련이 있는 RNA-유도된 DNA 엔도뉴클레아제 효소가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 본원에서, "Cas 엔도뉴클레아제"는 천연 발생 및 재조합 Cas 엔도뉴클레아제 둘 다를 지칭한다.

[0132] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 다수개의 핵산-절단 (예를 들어, 뉴클레아제) 도메인을 갖는다. 2개 이상의 핵산-절단 도메인이 링커를 통해 함께 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 가요성 링커를 갖는다. 링커는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40개 또는 그 초과인 아미노산 길이를 갖는다.

[0133] 천연 발생 야생형 Cas9 효소는 2개의 뉴클레아제 도메인, HNH 뉴클레아제 도메인 및 RuvC 도메인을 갖는다. 본원에서, "Cas9"는 천연 발생 및 재조합 Cas9 둘 다를 지칭한다. 본원에서 고려되는 Cas9 효소는 HNH 또는 HNH-유사 뉴클레아제 도메인, 및/또는 RuvC 또는 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인을 갖는다.

[0134] HNH 또는 HNH-유사 도메인은 McrA-유사 폴드를 갖는다. HNH 또는 HNH-유사 도메인은 2개의 역평행 β -가닥 및 α -나선을 갖는다. HNH 또는 HNH-유사 도메인은 금속 결합 부위 (예를 들어, 2가 양이온 결합 부위)를 갖는다. HNH 또는 HNH-유사 도메인은 표적 핵산의 한 가닥 (예를 들어, crRNA 표적화된 가닥의 상보성 가닥)을 절단할 수 있다.

[0135] RuvC 또는 RuvC-유사 도메인은 RNaseH 또는 RNaseH-유사 폴드를 갖는다. RuvC/RNaseH 도메인은 RNA 및 DNA 둘다에 대해 작용하는 것을 비롯하여 다양한 핵산-기반 기능에 관여한다. RNaseH 도메인은 다수개의 α -나선에 의해 둘러싸인 5개의 β -가닥을 갖는다. RuvC/RNaseH 또는 RuvC/RNaseH-유사 도메인은 금속 결합 부위 (예를 들어, 2가 양이온 결합 부위)를 갖는다. RuvC/RNaseH 또는 RuvC/RNaseH-유사 도메인은 표적 핵산의 한 가닥 (예를 들어, 이중-가닥 표적 DNA의 비-상보성 가닥)을 절단할 수 있다.

[0136] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 야생형의 예시적인 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, 에스. 피오게네스(*S. pyogenes*)로부터의 Cas9, US 2014/0068797 서열식별번호 8 또는 [Sapranaukas, R. et al. (2011). *Nucl. Acids Res.*, 39(21):9275-9282], 및 다양한 다른 부위-지정 폴리펩티드)와 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0137] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 야생형의 예시적인 부위-지정 폴리펩티드의 뉴클레아제 도메인 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 Cas9, 상기 참고)과 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖는다.

[0138] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 10개 연속의 아미노산에 걸쳐 야생형 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 Cas9, 상기 참고)와 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 또는 100% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 10개 연속의 아미노산에 걸쳐 야생형 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 Cas9, 상기 참고)와 최대 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 또는 100% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 부위-지정 폴리펩티드의 HNH 뉴클레아제 도메인에서 10개 연속의 아미노산에 걸쳐 야생형 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 Cas9, 상기 참고)와 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 또는 100% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 부위-지정 폴리펩티드의 HNH 뉴클레아제 도메인에서 10개 연속의 아미노산에 걸쳐 야생형 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 Cas9, 상기 참고)와 최대 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 또는 100% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 부위-지정 폴리펩티드의 RuvC 뉴클레아제 도메인에서 10개 연속의 아미노산에 걸쳐 야생형 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 Cas9, 상기 참고)와 적어도 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 또는 100% 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 부위-지정 폴리펩티드의 RuvC 뉴클레아제 도메인에서 10개 연속의 아미노산에 걸쳐 야생형 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 Cas9, 상기 참고)와 최대 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 99 또는 100% 동일성을 갖는다.

[0139] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 야생형의 예시적인 부위-지정 폴리펩티드의 변형된 형태를 갖는다.

야생형의 예시적인 부위-지정 폴리펩티드의 변형된 형태는 부위-지정 폴리펩티드의 핵산-절단 활성을 감소시키는 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 야생형의 예시적인 부위-지정 폴리펩티드의 변형된 형태는 야생형의 예시적인 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 Cas9, 상기 참고)의 핵산-절단 활성의 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만을 갖는다. 부위-지정 폴리펩티드의 변형된 형태는 실질적인 핵산-절단 활성을 갖지 않을 수 있다. 부위-지정 폴리펩티드가 실질적인 핵산-절단 활성을 갖지 않는 변형된 형태인 경우, 이는 본원에서 "효소적으로 비활성"인 것으로 지칭된다.

[0140] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드의 변형된 형태는 표적 핵산 상에서 단일-가닥 절단 (SSB)을 유도할 수 있도록 하는 (예를 들어, 이중-가닥 표적 핵산의 당-포스페이트 백본 중 하나만을 절단함으로써) 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 야생형 부위 지정 폴리펩티드 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 Cas9, 상기 참고)의 다수개의 핵산-절단 도메인 중 하나 이상에서의 핵산-절단 활성의 90% 미만, 80% 미만, 70% 미만, 60% 미만, 50% 미만, 40% 미만, 30% 미만, 20% 미만, 10% 미만, 5% 미만, 또는 1% 미만을 생성한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 표적 핵산의 상보성 가닥을 절단하는 능력을 보유하지만 표적 핵산의 비-상보성 가닥을 절단하는 능력은 감소된 다수개의 핵산-절단 도메인 중 하나 이상을 생성한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 표적 핵산의 비-상보성 가닥을 절단하는 능력을 보유하지만 표적 핵산의 상보성 가닥을 절단하는 능력은 감소된 다수개의 핵산-절단 도메인 중 하나 이상을 생성한다. 예를 들어, 야생형의 예시적인 에스. 피오게네스 Cas9 폴리펩티드의 잔기, 예컨대 Asp10, His840, Asn854 및 Asn856은 다수개의 핵산-절단 도메인 (예를 들어, 뉴클레아제 도메인) 중 하나 이상을 불활성화시키도록 돌연변이된다. 일부 실시양태에서, 돌연변이되는 잔기는 야생형의 예시적인 에스. 피오게네스 Cas9 폴리펩티드에서 잔기 Asp10, His840, Asn854 및 Asn856에 상응한다 (예를 들어, 서열 및/또는 구조 정렬에 의해 결정되는 바와 같이). 돌연변이의 비제한적인 예에는 D10A, H840A, N854A 또는 N856A가 포함된다. 관련 기술분야의 기술자는 알라닌 치환 이외의 돌연변이가 적합하다는 것을 인식할 것이다.

[0141] 일부 실시양태에서, D10A 돌연변이는 DNA 절단 활성이 실질적으로 결여된 부위-지정 폴리펩티드를 생성하도록 H840A, N854A 또는 N856A 돌연변이 중 하나 이상과 조합된다. 일부 실시양태에서, H840A 돌연변이는 DNA 절단 활성이 실질적으로 결여된 부위-지정 폴리펩티드를 생성하도록 D10A, N854A 또는 N856A 돌연변이 중 하나 이상과 조합된다. 일부 실시양태에서, N854A 돌연변이는 DNA 절단 활성이 실질적으로 결여된 부위-지정 폴리펩티드를 생성하도록 H840A, D10A 또는 N856A 돌연변이 중 하나 이상과 조합된다. 일부 실시양태에서, N856A 돌연변이는 DNA 절단 활성이 실질적으로 결여된 부위-지정 폴리펩티드를 생성하도록 H840A, N854A 또는 D10A 돌연변이 중 하나 이상과 조합된다. 1개의 실질적으로 비활성인 뉴클레아제 도메인을 갖는 부위-지정 폴리펩티드는 "닉카제"로 지칭된다.

[0142] 일부 실시양태에서, RNA-유도된 엔도뉴클레아제, 예를 들어 Cas9의 변이체는 CRISPR-매개된 게놈 편집의 특이성을 증가시키기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 야생형 Cas9는 일반적으로 표적 서열 (예컨대 내인성 게놈 유전자좌)에서 지정된 ~20개 뉴클레오티드 서열과 혼성화하도록 설계된 단일 가이드 RNA에 의해 안내된다. 그러나, 몇몇 미스매치는 가이드 RNA와 표적 유전자좌 사이에서 허용될 수 있고, 이는 표적 부위에서 필요한 상동성의 길이를 예를 들어 최소한 13 nt의 상동성으로 효과적으로 감소시키고, 이에 따라 표적 게놈의 다른 곳에서 CRISPR/Cas9 복합체에 의한 결합 및 이중-가닥 핵산 절단에 대한 잠재성을 증가시킨다 (오프-타겟 절단으로도 공지됨). Cas9의 닉카제 변이체 각각이 1개의 가닥만을 절단하기 때문에, 이중-가닥 절단을 생성하기 위해서는, 한 쌍의 닉카제가 표적 핵산의 반대쪽 가닥 상에서 근접하게 결합하여 한 쌍의 닉을 생성하는 것이 필요하며, 이는 이중-가닥 절단과 동등하다. 이는 2개의 별도의 가이드 RNA (각각의 닉카제에 대해 1개)가 표적 핵산의 반대쪽 가닥 상에서 근접하게 결합해야 하는 것을 필요로 한다. 이러한 요건은 이중-가닥 절단이 발생하기 위해 필요한 최소 상동성 길이를 본질적으로 배가시키며, 이에 따라 이중-가닥 절단 사건이 게놈의 다른 곳에서 발생할 가능성이 감소되고, 2개의 가이드 RNA 부위 (이들이 존재하는 경우)가 이중-가닥 절단을 형성하기에 서로 충분히 가깝게 있지 않을 것이다. 관련 기술분야에 기재된 바와 같이, 닉카제는 또한 NHEJ에 비해 HDR을 촉진시키기 위해 사용될 수 있다. HDR은 원하는 변화를 효과적으로 매개하는 특이적인 공여자 서열의 사용을 통해 선택된 변화를 게놈의 표적 부위로 도입시키기 위해 이용될 수 있다. 유전자 편집에서 사용하기 위한 다양한 CRISPR/Cas 시스템의 설명은 예를 들어 국제 특허 출원 공개 번호 WO 2013/176772, 및 [Sander J. D. et al. (2014). *Nat. Biotechnol.*, 32(4):347-355], 및 그에 인용된 참고문헌에서 확인할 수 있다.

[0143] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, 변이성, 돌연변이된, 효소적으로 비활성인 및/또는 조건부로 효소적으로 비활성인 부위-지정 폴리펩티드)는 핵산을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴

리펩티드 (예를 들어, 변이성, 돌연변이된, 효소적으로 비활성인 및/또는 조건부로 효소적으로 비활성인 엔도리보뉴클레아제)는 DNA를 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, 변이성, 돌연변이된, 효소적으로 비활성인 및/또는 조건부로 효소적으로 비활성인 엔도리보뉴클레아제)는 RNA를 표적으로 한다.

- [0144] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 하나 이상의 비천연 서열을 갖는다 (예를 들어, 부위-지정 폴리펩티드는 융합 단백질임).
- [0145] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 박테리움 (예를 들어, 에스. 피오게네스)으로부터의 Cas9와 적어도 15% 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열, 핵산 결합 도메인, 및 2개의 핵산 절단 도메인 (예컨대, HNH 도메인 및 RuvC 도메인)을 갖는다.
- [0146] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 박테리움 (예를 들어, 에스. 피오게네스)으로부터의 Cas9와 적어도 15% 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 2개의 핵산 절단 도메인 (예컨대, HNH 도메인 및 RuvC 도메인)을 갖는다.
- [0147] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 박테리움 (예를 들어, 에스. 피오게네스)으로부터의 Cas9와 적어도 15% 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 2개의 핵산 절단 도메인을 갖고, 핵산 절단 도메인 중 하나 또는 둘 다는 박테리움 (예를 들어, 에스. 피오게네스)으로부터의 Cas9로부터의 뉴클레아제 도메인과 적어도 50% 아미노산 동일성을 갖는다.
- [0148] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 박테리움 (예를 들어, 에스. 피오게네스)으로부터의 Cas9와 적어도 15% 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열, 2개의 핵산 절단 도메인 (예컨대, HNH 도메인 및 RuvC 도메인), 및 비천연 서열 (예를 들어, 핵 국소화 신호) 또는 부위-지정 폴리펩티드를 비천연 서열에 연결하는 링커를 갖는다.
- [0149] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 박테리움 (예를 들어, 에스. 피오게네스)으로부터의 Cas9와 적어도 15% 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열, 2개의 핵산 절단 도메인 (예컨대, HNH 도메인 및 RuvC 도메인)을 갖고, 부위-지정 폴리펩티드는 뉴클레아제 도메인의 절단 활성을 적어도 50%만큼 감소시키는 핵산 절단 도메인 중 하나 또는 둘 다에서의 돌연변이를 갖는다.
- [0150] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드는 박테리움 (예를 들어, 에스. 피오게네스)으로부터의 Cas9와 적어도 15% 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열, 및 2개의 핵산 절단 도메인 (예컨대, HNH 도메인 및 RuvC 도메인)을 갖고, 뉴클레아제 도메인 중 하나는 아스파르트산 10의 돌연변이를 갖고/거나, 뉴클레아제 도메인 중 하나는 히스티딘 840의 돌연변이를 갖고, 돌연변이는 뉴클레아제 도메인(들)의 절단 활성을 적어도 50%만큼 감소시킨다.
- [0151] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 부위-지정 폴리펩티드, 예를 들어 DNA 엔도뉴클레아제는 게놈의 특정한 유전자좌에서 하나의 이중-가닥 절단에 대해 함께 영향을 미치는 2개의 니카제, 또는 게놈의 특정한 유전자좌에서 2개의 이중-가닥 절단에 대해 함께 영향을 미치는 4개의 니카제를 포함한다. 대안적으로, 하나의 부위-지정 폴리펩티드, 예를 들어 DNA 엔도뉴클레아제는 게놈의 특정한 유전자좌에서 하나의 이중-가닥 절단에 영향을 미친다.
- [0152] 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 사용하여 게놈을 편집할 수 있다. 이러한 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 관심 표적 DNA를 함유하는 세포에서의 발현을 위해 관련 기술분야의 표준 방법에 따라 코돈-최적화된다. 예를 들어, 의도된 표적 핵산이 인간 세포에 있는 경우, Cas9를 코딩하는 인간 코돈-최적화된 폴리뉴클레오티드가 Cas9 폴리펩티드를 생성하는데 사용하기 위해 고려된다.
- [0153] Cas 유전자/폴리펩티드 및 프로토스페이서 인접한 모티프
- [0154] 예시적인 CRISPR/Cas 폴리펩티드에는 [Fonfara I. et al. (2014). *Nucl. Acids Res.*, 42(4):2577-2590] (본문에 참고로 포함됨)의 도 1에 있는 Cas9 폴리펩티드가 포함된다. CRISPR/Cas 유전자 명명 시스템은 Cas 유전자가 발견된 이래로 광범위하게 제작성되었다. [Fonfara, et al. (2014)]의 도 5는 다양한 종으로부터의 Cas9 폴리펩티드에 대한 PAM 서열을 제공한다.
- [0155] **핵산**
- [0156] 게놈-표적화 핵산 또는 가이드 RNA

[0157] 본 개시내용은 회합된 폴리펩티드 (예를 들어, 부위-지정 폴리펩티드 또는 DNA 엔도뉴클레아제)의 활성을 표적 핵산 내의 특이적인 표적 서열 (예를 들어, 관심 유전자)에 대해 지정할 수 있는 게놈-표적화 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, 게놈-표적화 핵산은 RNA이다. 게놈-표적화 RNA는 본원에서 "가이드 RNA" 또는 "gRNA"로 지칭된다. 가이드 RNA는 적어도 관심 표적 핵산 서열 및 CRISPR 반복 서열에 혼성화하는 스페이서 서열을 갖는다. 유형 II 시스템에서, gRNA는 또한 tracrRNA 서열로 불리는 제2 RNA를 갖는다. 유형 II 가이드 RNA (gRNA)에서, CRISPR 반복 서열 및 tracrRNA 서열은 서로 혼성화하여 듀플렉스를 형성한다. 유형 V 가이드 RNA (gRNA)에서, CRISPR 반복부 RNA (crRNA)는 듀플렉스를 형성한다. 두 시스템 모두에서, 듀플렉스는 가이드 RNA 및 부위-지정 폴리펩티드가 복합체를 형성하도록 부위-지정 폴리펩티드에 결합한다. 게놈-표적화 핵산은 부위-지정 폴리펩티드와의 회합으로 인해 복합체에 대한 표적 특이성을 제공한다. 따라서, 게놈-표적화 핵산은 부위-지정 폴리펩티드의 활성을 지정한다.

[0158] 일부 실시양태에서, 게놈-표적화 핵산은 이중-분자 가이드 RNA이다. 일부 실시양태에서, 게놈-표적화 핵산은 단일-분자 가이드 RNA이다. 이중-분자 가이드 RNA는 RNA의 2개의 가닥을 갖는다. 제1 가닥은 5'에서 3' 방향으로, 임의적인 스페이서 연장 서열, 스페이서 서열 및 최소 CRISPR 반복 서열을 갖는다. 제2 가닥은 최소 tracrRNA 서열 (최소 CRISPR 반복 서열에 대해 상보성), 3' tracrRNA 서열 및 임의적인 tracrRNA 연장 서열을 갖는다. 유형 II 시스템에서 단일-분자 가이드 RNA (sgRNA)는 5'에서 3' 방향으로, 임의적인 스페이서 연장 서열, 스페이서 서열, 최소 CRISPR 반복 서열, 단일-분자 가이드 링커, 최소 tracrRNA 서열, 3' tracrRNA 서열 및 임의적인 tracrRNA 연장 서열을 갖는다. 임의적인 tracrRNA 연장은 가이드 RNA에 추가의 기능성 (예를 들어, 안정성)을 부여하는 요소를 가질 수 있다. 단일-분자 가이드 링커는 최소 CRISPR 반복부 및 최소 tracrRNA 서열을 연결하여 헤어핀 구조를 형성한다. 임의적인 tracrRNA 연장은 하나 이상의 헤어핀을 갖는다. 유형 V 시스템에서 단일-분자 가이드 RNA (sgRNA)는 5'에서 3' 방향으로 최소 CRISPR 반복 서열 및 스페이서 서열을 갖는다.

[0159] 예시적으로, CRISPR/Cas/Cpf1 시스템에서 사용된 가이드 RNA, 또는 다른 더 작은 RNA는 하기 설명되고 관련 기술분야에 기재된 화학적 수단에 의해 용이하게 합성될 수 있다. 화학적 합성 절차가 지속적으로 확장되고 있지만, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, PAGE와 같은 겔의 사용을 포함)와 같은 절차에 의한 이러한 RNA의 정제는 폴리뉴클레오티드 길이가 100개 정도인 뉴클레오티드를 넘어서 상당히 증가함에 따라 더욱 어려워지는 경향이 있다. 더 긴 길이의 RNA를 생성하기 위해 이용되는 한 접근법은 함께 라이게이션되는 2개 이상의 분자를 생성하기 위한 것이다. 훨씬 더 긴 RNA, 예컨대 Cas9 또는 Cpf1 엔도뉴클레아제를 코딩하는 것은 효소적으로 더욱 용이하게 생성된다. 다양한 유형의 RNA 변형, 예를 들어 관련 기술분야에 기재된 바와 같이 안정성을 증강시키고, 선천성 면역 반응의 가능성 또는 정도를 감소시키고/거나, 다른 속성을 증강시키는 변형이 RNA의 화학적 합성 및/또는 효소적 생성 동안에 또는 이후에 도입될 수 있다.

[0160] 스페이서 연장 서열

[0161] 게놈-표적화 핵산의 일부 실시양태에서, 스페이서 연장 서열은 게놈-표적화 핵산의 활성을 변형시키고, 안정성을 제공하고/거나, 그의 변형을 위한 위치를 제공할 수 있다. 스페이서 연장 서열은 온- 또는 오프-타겟 활성 또는 특이성을 변형시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 스페이서 연장 서열이 제공된다. 스페이서 연장 서열은 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 또는 7000개 또는 그 초과보다 많은 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 스페이서 연장 서열은 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 또는 7000개 또는 그 초과, 또는 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 또는 7000개 또는 그 초과, 또는 그 초과, 또는 약 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000개 또는 그 초과보다 적은 뉴클레오티드 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 스페이서 연장 서열은 10개 뉴클레오티드 길이 미만이다. 일부 실시양태에서, 스페이서 연장 서열은 10-30개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 스페이서 연장 서열은 30-70개 뉴클레오티드 길이이다.

[0162] 일부 실시양태에서, 스페이서 연장 서열은 또 다른 모이어티 (예를 들어, 안정성 조절 서열, 엔도리보뉴클레아제 결합 서열, 리보자임)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 모이어티는 핵산 표적화 핵산의 안정성을 감소시키거나 또는 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 모이어티는 전사 종결인자 세그먼트 (예를 들어, 전사 종결 서열)이

다. 일부 실시양태에서, 모이어티는 진핵생물 세포에서 기능한다. 일부 실시양태에서, 모이어티는 원핵생물 세포에서 기능한다. 일부 실시양태에서, 모이어티는 진핵생물 및 원핵생물 세포 둘 다에서 기능한다. 적합한 모이어티의 비제한적인 예에는 5' 캡 (예를 들어, 7-메틸гу아닐레이트 캡 (m7 G)), 리보스위치 서열 (예를 들어, 단백질 및 단백질 복합체에 의한 조절된 안정성 및/또는 조절된 접근성을 가능하게 함), dsRNA 듀플렉스 (예를 들어, 헤어핀)을 형성하는 서열, RNA를 세포화 위치 (예를 들어, 핵, 미토콘드리아, 엽록체 등)로 표적화하는 서열, 추적 (예를 들어, 형광 분자와의 직접적인 접합, 형광 검출을 용이하게 하는 모이어티와의 접합, 형광 검출을 가능하게 하는 서열 등)을 제공하는 변형 또는 서열, 및/또는 단백질 (예를 들어, DNA에 대해 작용하는 단백질, 예컨대 전사 활성화제, 전사 억제제, DNA 메틸트랜스퍼라제, DNA 데메틸라제, 히스톤 아세틸트랜스퍼라제, 히스톤 데아세틸라제 등)에 대한 결합 부위를 제공하는 변형 또는 서열이 포함된다.

[0163] 스페이서 서열

[0164] 스페이서 서열은 관심 표적 핵산의 서열과 혼성화한다. 게놈-표적화 핵산의 스페이서는 혼성화 (예를 들어, 염기쌍 형성)를 통해 서열-특이적인 방식으로 표적 핵산과 상호작용한다. 따라서, 스페이서의 뉴클레오티드 서열은 관심 표적 핵산의 서열에 따라 달라진다.

[0165] 본원의 CRISPR/Cas 시스템에서, 스페이서 서열은 시스템에서 사용되는 Cas 효소 (예를 들어, Cas9 효소)의 PAM의 5'에 위치하는 표적 핵산에 혼성화하도록 설계된다. 스페이서는 표적 서열과 완벽하게 매칭될 수 있거나 또는 미스매치를 가질 수 있다. 각각의 Cas 효소는 표적 DNA에서 그가 인식하는 특정한 PAM 서열을 갖는다. 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9는 표적 핵산에서 서열 5'-NRG-3' (여기서, R은 A 또는 G를 갖고, N은 임의의 뉴클레오티드이고, N은 스페이서 서열에 의해 표적화된 표적 핵산 서열의 바로 3'에 있음)을 갖는 PAM을 인식한다.

[0166] 일부 실시양태에서, 표적 핵산 서열은 20개 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 20개 미만의 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 20개 초과 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 적어도 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30개 또는 그 초과 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산은 최대 5, 10, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30개 또는 그 초과 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산 서열은 PAM의 제1 뉴클레오티드의 바로 5'에 있는 20개 염기를 갖는다. 예를 들어, 5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3'을 갖는 서열에서, 표적 핵산은 상기 N에 상응하는 서열을 갖고, N은 임의의 뉴클레오티드이고, 밑줄친 NRG 서열 (R은 G 또는 A 임)은 에스. 피오게네스 Cas9 PAM이다. 일부 실시양태에서, S.p. Cas 9에 의해 인식되는 서열로서 본 개시내용의 조성물 및 방법에서 사용되는 PAM 서열은 NGG이다.

[0167] 일부 실시양태에서, 표적 핵산과 혼성화하는 스페이서 서열은 적어도 또는 적어도 약 6개 뉴클레오티드 (nt) 길이 갖는다. 스페이서 서열은 적어도 또는 적어도 약 6 nt, 약 10 nt, 약 15 nt, 약 18 nt, 약 19 nt, 약 20 nt, 약 25 nt, 약 30 nt, 약 35 nt 또는 약 40 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 약 80 nt 또는 약 80 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 45 nt 또는 약 45 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 35 nt 또는 약 35 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 20 nt 또는 약 20 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 19 nt 또는 약 19 nt, 10 nt 또는 약 10 nt 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 10 nt 또는 약 10 nt 내지 45 nt 또는 약 45 nt, 10 nt 또는 약 10 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 10 nt 또는 약 10 nt 내지 35 nt 또는 약 35 nt, 10 nt 또는 약 10 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 10 nt 또는 약 10 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt, 10 nt 또는 약 10 nt 내지 20 nt 또는 약 20 nt, 10 nt 또는 약 10 nt 내지 19 nt 또는 약 19 nt, 19 nt 또는 약 19 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt, 19 nt 또는 약 19 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 19 nt 또는 약 19 nt 내지 35 nt 또는 약 35 nt, 19 nt 또는 약 19 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 19 nt 또는 약 19 nt 내지 45 nt 또는 약 45 nt, 19 nt 또는 약 19 nt 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 19 nt 또는 약 19 nt 내지 60 nt 또는 약 60 nt, 20 nt 또는 약 20 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt, 20 nt 또는 약 20 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 20 nt 또는 약 20 nt 내지 35 nt 또는 약 35 nt, 20 nt 또는 약 20 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 20 nt 또는 약 20 nt 내지 45 nt 또는 약 45 nt, 20 nt 또는 약 20 nt 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 또는 20 nt 또는 약 20 nt 내지 60 nt 또는 약 60 nt이다. 일부 실시양태에서, 스페이서 서열은 20개 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 19개 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 18개 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 17개 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 16개 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 15개 뉴클레오티드를 갖는다.

- [0168] 일부 실시양태에서, 스페이서 서열과 표적 핵산 사이의 % 상보성은 적어도 또는 적어도 약 30%, 적어도 또는 적어도 약 40%, 적어도 또는 적어도 약 50%, 적어도 또는 적어도 약 60%, 적어도 또는 적어도 약 65%, 적어도 또는 적어도 약 70%, 적어도 또는 적어도 약 75%, 적어도 또는 적어도 약 80%, 적어도 또는 적어도 약 85%, 적어도 또는 적어도 약 90%, 적어도 또는 적어도 약 95%, 적어도 또는 적어도 약 97%, 적어도 또는 적어도 약 98%, 적어도 또는 적어도 약 99% 또는 100%이다. 일부 실시양태에서, 스페이서 서열과 표적 핵산 사이의 % 상보성은 최대 또는 최대 약 30%, 최대 또는 최대 약 40%, 최대 또는 최대 약 50%, 최대 또는 최대 약 60%, 최대 또는 최대 약 65%, 최대 또는 최대 약 70%, 최대 또는 최대 약 75%, 최대 또는 최대 약 80%, 최대 또는 최대 약 85%, 최대 또는 최대 약 90%, 최대 또는 최대 약 95%, 최대 또는 최대 약 97%, 최대 또는 최대 약 98%, 최대 또는 최대 약 99%, 또는 약 100%이다. 일부 실시양태에서, 스페이서 서열과 표적 핵산 사이의 % 상보성은 표적 핵산의 상보성 가닥의 표적 서열의 6개 연속의 5'에 가장 가까운 뉴클레오티드에 걸쳐 100%이다. 일부 실시양태에서, 스페이서 서열과 표적 핵산 사이의 % 상보성은 20개 또는 약 20개 연속 뉴클레오티드에 걸쳐 적어도 60%이다. 일부 실시양태에서, 스페이서 서열 및 표적 핵산의 길이는 1 내지 6개 뉴클레오티드만큼 차이가 날 수 있으며, 이는 벌지(bulge) 또는 벌지들로 생각될 수 있다.
- [0169] 일부 실시양태에서, 스페이서 서열은 컴퓨터 프로그램을 이용하여 설계되거나 또는 선택된다. 컴퓨터 프로그램은 예측된 용융 온도, 이차 구조 형성, 예측된 어닐링 온도, 서열 동일성, 게놈 문맥, 염색질 접근성, % GC, 게놈 발생 빈도 (예를 들어, 동일하거나 유사하지만 미스매치, 삽입 또는 결실의 결과로서 하나 이상의 지점에서 달라진 서열), 메틸화 상태, SNP의 존재 등과 같은 변수를 이용할 수 있다.
- [0170] 최소 CRISPR 반복 서열
- [0171] 일부 실시양태에서, 최소 CRISPR 반복 서열은 기준 CRISPR 반복 서열 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 crRNA)과 적어도 또는 적어도 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 서열이다.
- [0172] 일부 실시양태에서, 최소 CRISPR 반복 서열은 세포에서 최소 tracrRNA 서열과 혼성화할 수 있는 뉴클레오티드를 갖는다. 최소 CRISPR 반복 서열 및 최소 tracrRNA 서열은 듀플렉스, 예를 들어 염기쌍-형성 이중-가닥 구조를 형성한다. 함께, 최소 CRISPR 반복 서열 및 최소 tracrRNA 서열은 부위-지정 폴리펩티드에 결합한다. 최소 CRISPR 반복 서열의 적어도 일부분은 최소 tracrRNA 서열과 혼성화한다. 일부 실시양태에서, 최소 CRISPR 반복 서열의 적어도 일부분은 최소 tracrRNA 서열에 대해 적어도 또는 적어도 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 100% 상보성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 최소 CRISPR 반복 서열의 적어도 일부분은 최소 tracrRNA 서열에 대해 최대 또는 최대 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 100% 상보성을 갖는다.
- [0173] 최소 CRISPR 반복 서열은 7개 또는 약 7개 뉴클레오티드 내지 100개 또는 약 100개 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 최소 CRISPR 반복 서열의 길이는 7개 또는 약 7개 뉴클레오티드 (nt) 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 7 nt 또는 약 7 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 7 nt 또는 약 7 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 7 nt 또는 약 7 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt, 7 nt 또는 약 7 nt 내지 20 nt 또는 약 20 nt, 7 nt 또는 약 7 nt 내지 15 nt 또는 약 15 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 20 nt 또는 약 20 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 15 nt 또는 약 15 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 100 nt 또는 약 100 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 80 nt 또는 약 80 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 또는 15 nt 또는 약 15 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt이다. 일부 실시양태에서, 최소 CRISPR 반복 서열은 대략 9개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 최소 CRISPR 반복 서열은 대략 12개 뉴클레오티드 길이이다.
- [0174] 일부 실시양태에서, 최소 CRISPR 반복 서열은 적어도 6, 7 또는 8개 연속 뉴클레오티드의 스트레치에 걸쳐 기준 최소 CRISPR 반복 서열 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 야생형 crRNA)과 적어도 또는 적어도 약 60% 동일성을 갖는다. 예를 들어, 최소 CRISPR 반복 서열은 적어도 6, 7 또는 8개 연속 뉴클레오티드의 스트레치에 걸쳐 기준 최소 CRISPR 반복 서열과 적어도 또는 적어도 약 65% 동일성, 적어도 또는 적어도 약 70% 동일성, 적어도 또는 적어도 약 75% 동일성, 적어도 또는 적어도 약 80% 동일성, 적어도 또는 적어도 약 85% 동일성, 적어도 또는 적어도 약 90% 동일성, 적어도 또는 적어도 약 95% 동일성, 적어도 또는 적어도 약 98% 동일성, 적어도 또는 적어도 약 99% 동일성, 또는 100% 동일성을 갖는다.

- [0175] 최소 tracrRNA 서열
- [0176] 일부 실시양태에서, 최소 tracrRNA 서열은 기준 tracrRNA 서열 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 야생형 tracrRNA)과 적어도 또는 적어도 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 서열이다.
- [0177] 일부 실시양태에서, 최소 tracrRNA 서열은 세포에서 최소 CRISPR 반복 서열과 혼성화하는 뉴클레오티드를 갖는다. 최소 tracrRNA 서열 및 최소 CRISPR 반복 서열은 듀플렉스, 예를 들어 염기쌍-형성 이중-가닥 구조를 형성한다. 함께, 최소 tracrRNA 서열 및 최소 CRISPR 반복부는 부위-지정 폴리펩티드에 결합한다. 최소 tracrRNA 서열의 적어도 일부는 최소 CRISPR 반복 서열과 혼성화할 수 있다. 일부 실시양태에서, 최소 tracrRNA 서열은 최소 CRISPR 반복 서열에 대해 적어도 또는 적어도 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 100% 상보성이다.
- [0178] 최소 tracrRNA 서열은 7개 또는 약 7개 뉴클레오티드 내지 100개 또는 약 100개 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 예를 들어, 최소 tracrRNA 서열은 7개 또는 약 7개 뉴클레오티드 (nt) 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 7 nt 또는 약 7 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 7 nt 또는 약 7 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 7 nt 또는 약 7 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt, 7 nt 또는 약 7 nt 내지 20 nt 또는 약 20 nt, 7 nt 또는 약 7 nt 내지 15 nt 또는 약 15 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 20 nt 또는 약 20 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 15 nt 또는 약 15 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 100 nt 또는 약 100 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 80 nt 또는 약 80 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt 또는 15 nt 또는 약 15 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt 길이이다. 일부 실시양태에서, 최소 tracrRNA 서열은 대략 9개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 최소 tracrRNA 서열은 대략 12개 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 최소 tracrRNA는 [Jinek M. et al. (2012). *Science*, 337(6096):816-821]에 기재된 tracrRNA nt 23-48로 이루어진다.
- [0179] 일부 실시양태에서, 최소 tracrRNA 서열은 적어도 6, 7 또는 8개 연속 뉴클레오티드의 스트레치에 걸쳐 기준 최소 tracrRNA (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 야생형 tracrRNA) 서열과 적어도 또는 적어도 약 60% 동일성을 갖는다. 예를 들어, 최소 tracrRNA 서열은 적어도 6, 7 또는 8개 연속 뉴클레오티드의 스트레치에 걸쳐 기준 최소 tracrRNA 서열과 적어도 또는 적어도 약 65% 동일성, 약 70% 동일성, 약 75% 동일성, 약 80% 동일성, 약 85% 동일성, 약 90% 동일성, 약 95% 동일성, 약 98% 동일성, 약 99% 동일성 또는 100% 동일성을 갖는다.
- [0180] 일부 실시양태에서, 최소 CRISPR RNA와 최소 tracrRNA 사이의 듀플렉스는 이중 나선을 갖는다. 일부 실시양태에서, 최소 CRISPR RNA와 최소 tracrRNA 사이의 듀플렉스는 적어도 또는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 또는 그 초과 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 최소 CRISPR RNA와 최소 tracrRNA 사이의 듀플렉스는 최대 또는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 또는 그 초과 뉴클레오티드를 갖는다.
- [0181] 일부 실시양태에서, 듀플렉스는 미스매치를 갖는다 (예를 들어, 듀플렉스의 두 가닥은 100% 상보성이 아님). 일부 실시양태에서, 듀플렉스는 적어도 또는 적어도 약 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 미스매치를 갖는다. 일부 실시양태에서, 듀플렉스는 최대 또는 최대 약 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 미스매치를 갖는다. 일부 실시양태에서, 듀플렉스는 2개 이하의 미스매치를 갖는다.
- [0182] 3' tracrRNA 서열
- [0183] 일부 실시양태에서, 3' tracrRNA 서열은 기준 tracrRNA 서열 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 tracrRNA)과 적어도 또는 적어도 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 서열을 갖는다.
- [0184] 일부 실시양태에서, 3' tracrRNA 서열은 6개 또는 약 6개 뉴클레오티드 내지 100개 또는 약 100개 뉴클레오티드 길이를 갖는다. 예를 들어, 3' tracrRNA 서열은 6개 또는 약 6개 뉴클레오티드 (nt) 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 20 nt 또는 약 20 nt, 6 nt 또는 약 6 nt 내지 15 nt 또는 약 15 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 20 nt 또는 약 20 nt, 8 nt 또는 약 8 nt 내지 15 nt 또는 약 15 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 100 nt 또는 약 100 nt, 15 nt 또는 약 15 nt

내지 80 nt 또는 약 80 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 또는 15 nt 또는 약 15 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 3' tracrRNA 서열은 대략 14개 뉴클레오티드 길이를 갖는다.

[0185] 일부 실시양태에서, 3' tracrRNA 서열은 적어도 6, 7 또는 8개 연속 뉴클레오티드의 스트레치에 걸쳐 기준 3' tracrRNA 서열 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 야생형 3' tracrRNA 서열)과 적어도 또는 적어도 약 60% 동일성을 갖는다. 예를 들어, 3' tracrRNA 서열은 적어도 6, 7 또는 8개 연속 뉴클레오티드의 스트레치에 걸쳐 기준 3' tracrRNA 서열 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 야생형 3' tracrRNA 서열)과 적어도 또는 적어도 약 60% 동일성, 약 65% 동일성, 약 70% 동일성, 약 75% 동일성, 약 80% 동일성, 약 85% 동일성, 약 90% 동일성, 약 95% 동일성, 약 98% 동일성, 약 99% 동일성 또는 100% 동일성을 갖는다.

[0186] 일부 실시양태에서, 3' tracrRNA 서열은 1개 초과인 듀플렉스 영역 (예를 들어, 헤어핀, 혼성화된 영역)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 3' tracrRNA 서열은 2개의 듀플렉스 영역을 갖는다.

[0187] 일부 실시양태에서, 3' tracrRNA 서열은 줄기 루프 구조를 갖는다. 일부 실시양태에서, 3' tracrRNA에서 줄기 루프 구조는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 또는 20개 또는 그 초과인 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 3' tracrRNA에서 줄기 루프 구조는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 또는 그 초과인 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 줄기 루프 구조는 기능적 모이어티를 갖는다. 예를 들어, 줄기 루프 구조는 압타머, 리보자임, 단백질-상호작용 헤어핀, CRISPR 어레이, 인트론 또는 엑손을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 줄기 루프 구조는 적어도 또는 적어도 약 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 초과인 기능적 모이어티를 갖는다. 일부 실시양태에서, 줄기 루프 구조는 최대 또는 최대 약 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 초과인 기능적 모이어티를 갖는다.

[0188] 일부 실시양태에서, 3' tracrRNA 서열에서 헤어핀은 P-도메인을 갖는다. 일부 실시양태에서, P-도메인은 헤어핀에서 이중-가닥 영역을 갖는다.

[0189] tracrRNA 연장 서열

[0190] 일부 실시양태에서, tracrRNA가 단일-분자 가이드 또는 이중-분자 가이드 문맥인지 여부에 관계없이 tracrRNA 연장 서열이 제공될 수 있다. 일부 실시양태에서, tracrRNA 연장 서열은 1개 또는 약 1개 뉴클레오티드 내지 400개 또는 약 400개 뉴클레오티드 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, tracrRNA 연장 서열은 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380 또는 400개 초과인 뉴클레오티드 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, tracrRNA 연장 서열은 20개 또는 약 20개 내지 5000개 또는 약 5000개 또는 그 초과인 뉴클레오티드 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, tracrRNA 연장 서열은 1000개 초과인 뉴클레오티드 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, tracrRNA 연장 서열은 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 220, 240, 260, 280, 300, 320, 340, 360, 380, 400개 또는 그 초과인 뉴클레오티드보다 적은 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, tracrRNA 연장 서열은 1000개 미만의 뉴클레오티드 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, tracrRNA 연장 서열은 10개 미만의 뉴클레오티드 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, tracrRNA 연장 서열은 10-30개 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, tracrRNA 연장 서열은 30-70개 뉴클레오티드 길이이다.

[0191] 일부 실시양태에서, tracrRNA 연장 서열은 기능적 모이어티 (예를 들어, 안정성 조절 서열, 리보자임, 엔도리보 뉴클레아제 결합 서열)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 기능적 모이어티는 전사 종결인자 세그먼트 (예컨대, 전사 종결 서열)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 기능적 모이어티는 10개 또는 약 10개 뉴클레오티드 (nt) 내지 100개 또는 약 100개 뉴클레오티드, 10 nt 또는 약 10 nt 내지 20 nt 또는 약 20 nt, 20 nt 또는 약 20 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 30 nt 또는 약 30 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 40 nt 또는 약 40 nt 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 50 nt 또는 약 50 nt 내지 60 nt 또는 약 60 nt, 60 nt 또는 약 60 nt 내지 70 nt 또는 약 70 nt, 70 nt 또는 약 70 nt 내지 80 nt 또는 약 80 nt, 80 nt 또는 약 80 nt 내지 90 nt 또는 약 90 nt, 또는 90 nt 또는 약 90 nt 내지 100 nt 또는 약 100 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 80 nt 또는 약 80 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 또는 15 nt 또는 약 15 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt의 총 길이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 기능적 모이어티는 진핵생물 세포에서 기능한다. 일부 실시양태에서, 기능적 모이어티는 원핵생물 세포에서 기능한다. 일부 실시양태에서, 기능적 모이어티는 진핵생물 및 원핵생물 세포 둘 다에서 기능한다.

[0192] 적합한 tracrRNA 연장 기능적 모이어티의 비제한적인 예에는 3' 폴리-아데닐화 꼬리, 리보스위치 서열 (예를 들어

어, 단백질 및 단백질 복합체에 의한 조절된 안정성 및/또는 조절된 접근성을 가능하게 함), dsRNA 듀플렉스 (예를 들어, 헤어핀)를 형성하는 서열, RNA를 세포화 위치 (예를 들어, 핵, 미토콘드리아, 엽록체 등)로 표적화 하는 서열, 추적 (예를 들어, 형광 분자와의 직접적인 접합, 형광 검출을 용이하게 하는 모이어티와의 접합, 형광 검출을 가능하게 하는 서열 등)을 제공하는 변형 또는 서열, 및/또는 단백질 (예를 들어 DNA에 대해 작용하는 단백질, 예컨대 전사 활성화제, 전사 억제제, DNA 메틸트랜스퍼라제, DNA 데메틸라제, 히스톤 아세틸트랜스퍼라제, 히스톤 데아세틸라제 등)을 위한 결합 부위를 제공하는 변형 또는 서열이 포함된다. 일부 실시양태에서, tracrRNA 연장 서열은 프라이머 결합 부위 또는 분자 인덱스 (예를 들어, 바코드 서열)를 갖는다. 일부 실시양태에서, tracrRNA 연장 서열은 1개 이상의 친화도 태그를 갖는다.

[0193] 별지

[0194] 일부 실시양태에서, 최소 CRISPR RNA와 최소 tracrRNA 사이의 듀플렉스에 "별지"가 있다. 별지는 듀플렉스 내에서 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드 영역이다. 일부 실시양태에서, 별지는 듀플렉스와 부위-지정 폴리펩티드의 결합에 기여한다. 별지는 듀플렉스의 한 쪽에 쌍을 형성하지 않은 5'-XXX-3' (여기서, X는 임의의 퓨린이고, Y는 반대쪽 가닥 상의 뉴클레오티드와 동요(wobble) 쌍을 형성할 수 있는 뉴클레오티드를 가짐), 및 듀플렉스의 다른 쪽 상에 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드 영역을 갖는다. 듀플렉스의 양측에서 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드 개수는 상이할 수 있다.

[0195] 한 예로, 별지는 별지의 최소 CRISPR 반복부 가닥 상에 쌍을 형성하지 않은 퓨린 (예를 들어, 아데닌)을 갖는다. 일부 실시양태에서, 별지는 별지의 최소 tracrRNA 서열 가닥의 쌍을 형성하지 않은 5'-AAGY-3'을 갖고, 여기서 Y는 최소 CRISPR 반복부 가닥 상의 뉴클레오티드와 동요 쌍을 형성할 수 있는 뉴클레오티드를 갖는다.

[0196] 일부 실시양태에서, 듀플렉스의 최소 CRISPR 반복부 측 상의 별지는 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 초과 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 듀플렉스의 최소 CRISPR 반복부 측 상의 별지는 최대 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 초과 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 듀플렉스의 최소 CRISPR 반복부 측 상의 별지는 1개의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드를 갖는다.

[0197] 일부 실시양태에서, 듀플렉스의 최소 tracrRNA 서열 측 상의 별지는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 또는 그 초과 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 듀플렉스의 최소 tracrRNA 서열 측 상의 별지는 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 또는 그 초과 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 듀플렉스의 제2 측 (예를 들어, 듀플렉스의 최소 tracrRNA 서열 측) 상의 별지는 4개의 쌍을 형성하지 않은 뉴클레오티드를 갖는다.

[0198] 일부 실시양태에서, 별지는 적어도 1개의 동요 쌍을 갖는다. 일부 실시양태에서, 별지는 최대 1개의 동요 쌍을 갖는다. 일부 실시양태에서, 별지는 적어도 1개의 퓨린 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 별지는 적어도 3개의 퓨린 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 별지 서열은 적어도 5개의 퓨린 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 별지 서열은 적어도 1개의 구아닌 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 별지 서열은 적어도 1개의 아데닌 뉴클레오티드를 갖는다.

[0199] 헤어핀

[0200] 다양한 실시양태에서, 1개 이상의 헤어핀은 3' tracrRNA 서열에서 최소 tracrRNA에 대해 3'에 위치한다.

[0201] 일부 실시양태에서, 헤어핀은 최소 CRISPR 반복부 및 최소 tracrRNA 서열 듀플렉스에서 마지막의 쌍을 형성한 뉴클레오티드로부터 적어도 또는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 또는 20개 또는 그 초과 뉴클레오티드 3'에서 시작한다. 일부 실시양태에서, 헤어핀은 최소 CRISPR 반복부 및 최소 tracrRNA 서열 듀플렉스에서 마지막의 쌍을 형성한 뉴클레오티드로부터 최대 또는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 또는 그 초과 뉴클레오티드 3'에서 시작할 수 있다.

[0202] 일부 실시양태에서, 헤어핀은 적어도 또는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 또는 20개 또는 그 초과 연속 뉴클레오티드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 헤어핀은 최대 또는 최대 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15개 또는 그 초과 연속 뉴클레오티드를 갖는다.

[0203] 일부 실시양태에서, 헤어핀은 CC 디뉴클레오티드 (예컨대 2개의 연속 시토신 뉴클레오티드)를 갖는다.

[0204] 일부 실시양태에서, 헤어핀은 듀플렉스 뉴클레오티드 (예를 들어, 함께 혼성화된 헤어핀에서의 뉴클레오티드)를 갖는다. 예를 들어, 헤어핀은 3' tracrRNA 서열의 헤어핀 듀플렉스에서 GG 디뉴클레오티드와 혼성화하는 CC 디

뉴클레오티드를 갖는다.

- [0205] 헤어핀 중 1개 이상은 부위-지정 폴리펩티드의 가이드 RNA-상호작용 영역과 상호작용할 수 있다.
- [0206] 일부 실시양태에서 2개 이상의 헤어핀이 있고, 일부 실시양태에서 3개 이상의 헤어핀이 있다.
- [0207] 단일-분자 가이드 링커 서열
- [0208] 일부 실시양태에서, 단일-분자 가이드 핵산의 링커 서열은 3개 또는 약 3개 뉴클레오티드 내지 100개 또는 약 100개 뉴클레오티드 길이를 갖는다. 예를 들어, [Jinek, M. et al. (2012). *Science*, 337(6096):816-821]에서 간단한 4개 뉴클레오티드 "테트라루프" (-GAAA-)가 사용되었다. 예시적인 링커는 3개 또는 약 3개 뉴클레오티드 (nt) 내지 90 nt 또는 약 90 nt, 3 nt 또는 약 3 nt 내지 80 nt 또는 약 80 nt, 3 nt 또는 약 3 nt 내지 70 nt 또는 약 70 nt, 3 nt 또는 약 3 nt 내지 60 nt 또는 약 60 nt, 3 nt 또는 약 3 nt 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 3 nt 또는 약 3 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 3 nt 또는 약 3 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 3 nt 또는 약 3 nt 내지 20 nt 또는 약 20 nt, 3 nt 또는 약 3 nt 내지 10 nt 또는 약 10 nt의 길이를 갖는다. 예를 들어, 링커는 3 nt 또는 약 3 nt 내지 5 nt 또는 약 5 nt, 5 nt 또는 약 5 nt 내지 10 nt 또는 약 10 nt, 10 nt 또는 약 10 nt 내지 15 nt 또는 약 15 nt, 15 nt 또는 약 15 nt 내지 20 nt 또는 약 20 nt, 20 nt 또는 약 20 nt 내지 25 nt 또는 약 25 nt, 25 nt 또는 약 25 nt 내지 30 nt 또는 약 30 nt, 30 nt 또는 약 30 nt 내지 35 nt 또는 약 35 nt, 35 nt 또는 약 35 nt 내지 40 nt 또는 약 40 nt, 40 nt 또는 약 40 nt 내지 50 nt 또는 약 50 nt, 50 nt 또는 약 50 nt 내지 60 nt 또는 약 60 nt, 60 nt 또는 약 60 nt 내지 70 nt 또는 약 70 nt, 70 nt 또는 약 70 nt 내지 80 nt 또는 약 80 nt, 80 nt 또는 약 80 nt 내지 90 nt 또는 약 90 nt, 또는 90 nt 또는 약 90 nt 내지 100 nt 또는 약 100 nt의 길이를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 단일-분자 가이드 핵산의 링커는 4 내지 40개 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 링커는 적어도 또는 적어도 약 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500 또는 7000개 또는 그 초과 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 링커는 최대 또는 최대 약 100, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 5500, 6000, 6500 또는 7000개 또는 그 초과 뉴클레오티드이다.
- [0209] 링커는 임의의 다양한 서열을 가질 수 있지만, 일부 실시양태에서, 링커는 가이드의 다른 기능적 영역을 방해할 수 있는 분자내 결합을 초래할 수 있는 가이드 RNA의 다른 부분과 상동성인 광범위한 영역을 가진 서열을 갖지 않을 것이다. [Jinek et al. (2012). *Science*, 337(6096):816-821]에서, 간단한 4개 뉴클레오티드 서열 -GAAA-가 사용되었지만, 더 긴 서열을 비롯하여 수많은 다른 서열이 마찬가지로 사용될 수 있다.
- [0210] 일부 실시양태에서, 링커 서열은 기능적 모이어티를 갖는다. 예를 들어, 링커 서열은 하나 이상의 특징부, 예컨대 압타머, 리보자임, 단백질-상호작용 헤어핀, 단백질 결합 부위, CRISPR 어레이, 인트론, 또는 엑손을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커 서열은 적어도 또는 적어도 약 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 초과 기능적 모이어티를 갖는다. 일부 실시양태에서, 링커 서열은 최대 또는 최대 약 1, 2, 3, 4 또는 5개 또는 그 초과 기능적 모이어티를 갖는다.
- [0211] 공여자 DNA 또는 공여자 주형
- [0212] 부위-지정 폴리펩티드, 예컨대 DNA 엔도뉴클레아제는 핵산, 예를 들어 게놈 DNA에서 이중-가닥 절단 또는 단일-가닥 절단을 도입시킬 수 있다. 이중-가닥 절단은 세포의 내인성 DNA-복구 경로 (예를 들어, 상동성-의존성 복구 (HDR) 또는 비-상동성 말단 연결 또는 대안적인 비-상동성 말단 연결 (A-NHEJ) 또는 미세상동성-매개된 말단 결합 (MMEJ)을 자극할 수 있다. NHEJ는 상동성 주형이 없이도 절단된 표적 핵산을 복구할 수 있다. 이는 때때로 절단 부위에서 표적 핵산의 작은 결실 또는 삽입 (indel)을 생성할 수 있고, 유전자 발현의 붕괴 또는 변형을 초래할 수 있다. 상동성 재조합 (HR)으로도 공지된 HDR은 상동성 복구 주형 또는 공여자가 이용가능할 때 발생할 수 있다.
- [0213] 상동성 공여자 주형은 표적 핵산 절단 부위를 플랭킹하는 서열과 상동성인 서열을 갖는다. 자매 염색분체는 일반적으로 복구 주형으로서 세포에 의해 사용된다. 그러나, 게놈 편집의 목적을 위해, 복구 주형은 종종 외인성 핵산, 예컨대 플라스미드, 듀플렉스 올리고뉴클레오티드, 단일-가닥 올리고뉴클레오티드, 이중-가닥 올리고뉴클레오티드, 또는 바이러스 핵산으로서 공급된다. 외인성 공여자 주형을 사용하여, 상동체의 플랭킹 영역 사이에 추가의 핵산 서열 (예컨대, 트랜스진) 또는 변형 (예컨대, 단일 또는 다중 염기 변화 또는 결실)을 도입시켜, 추가의 또는 변경된 핵산 서열이 또한 표적 유전자좌에 통합되도록 하는 것이 일반적이다. MMEJ는 작은 결실 및 삽입이 절단 부위에서 발생할 수 있다는 점에서 NHEJ와 유사한 유전적 결과를 생성한다. MMEJ는 선호된 말단-결합 DNA 복구 결과를 유도하기 위해 절단 부위를 플랭킹하는 몇몇 염기 쌍의 상동성 서열을 사용한다. 일

부 예에서, 뉴클레아제 표적 영역에서 잠재적인 미세상동성의 분석을 기반으로 하여 가능한 복구 결과를 예측할 수 있다.

[0214] 따라서, 일부 경우에, 상동성 재조합을 이용하여 외인성 폴리뉴클레오티드 서열을 표적 핵산 절단 부위에 삽입한다. 외인성 폴리뉴클레오티드 서열은 본원에서 공여자 폴리뉴클레오티드 (또는 공여자 또는 공여자 서열 또는 공여자 주형)로 명명된다. 일부 실시양태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드, 공여자 폴리뉴클레오티드의 일부분, 공여자 폴리뉴클레오티드의 카피, 또는 공여자 폴리뉴클레오티드의 카피의 일부분이 표적 핵산 절단 부위에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드는 외인성 폴리뉴클레오티드 서열, 예를 들어 표적 핵산 절단 부위에서 천연 발생하지 않는 서열이다.

[0215] 외인성 DNA 분자가 이중 가닥 절단이 발생하는 세포의 핵 내에서 충분한 농도로 공급되는 경우, NHEJ 복구 과정 동안에 외인성 DNA가 이중 가닥 절단에 삽입될 수 있고, 이에 따라 게놈에서 안정하게 유지될 수 있고, 예를 들어 게놈에 영구적으로 부가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이들 외인성 DNA 분자는 공여자 주형으로 지칭된다. 공여자 주형이 임의적으로 관련된 조절 서열, 예컨대 프로모터, 인핸서, 폴리A 서열 및/또는 스플라이스 수용자 서열과 함께 관심 유전자 또는 관심 게놈 부위에 대한 코딩 서열을 함유하는 경우, 관심 유전자는 게놈에서 통합된 카피로부터 발현되어 세포의 수명 동안에 영구적인 발현을 일으킬 수 있다. 또한, 공여자 DNA 주형의 통합된 카피는 세포가 분열할 때 딸 세포에 전달될 수 있다.

[0216] 이중 가닥 절단의 한 쪽에 DNA 서열에 대해 상동성인 플랭킹 DNA 서열 (상동체 아암으로 지칭됨)을 함유하는 충분한 농도의 공여자 DNA 주형의 존재하에, 공여자 DNA 주형은 HDR 경로를 통해 통합될 수 있다. 상동체 아암은 공여자 주형과 이중 가닥 절단의 한쪽 서열 사이에서 상동성 재조합을 위한 기질로서 작용한다. 이는 공여자 주형의 오류 없는 삽입을 일으킬 수 있고, 여기서 이중 가닥 절단의 한쪽 서열은 변형되지 않은 게놈에서의 것으로부터 변경되지 않는다.

[0217] HDR에 의한 편집을 위해 공급된 공여자는 매우 현저하게 그러나 일반적으로 게놈 DNA에 어닐링될 수 있도록 작은 또는 큰 플랭킹 상동체 아암이 있는 의도된 서열을 함유한다. 도입된 유전자 변화를 플랭킹하는 상동성 영역은 30 bp 이하이거나, 또는 프로모터, cDNA 등을 함유할 수 있는 수 킬로염기 카세트만큼 클 수 있다. 단일-가닥 및 이중-가닥 올리고뉴클레오티드 공여자 둘 다 사용될 수 있다. 이들 올리고뉴클레오티드는 100 nt 미만에서부터 수 kb 초과에 이르는 범위의 크기이지만, 더 긴 ssDNA 또한 생성되고 사용될 수 있다. PCR 앰플리콘, 플라스미드, 및 미니-서클을 비롯하여 이중-가닥 공여자가 종종 사용된다. 일반적으로, 개별 공여자에 대한 패키징 한계가 <5 kb이지만, AAV 벡터 (본원에 개시된 유전자 편집 방법이 이렇게 제한되지는 않지만)가 공여자 주형 전달의 매우 효과적인 수단인 것으로 확인되었다. 공여자의 활성 전사는 HDR을 3배 증가시켰고, 이는 프로모터의 포함이 전환을 증가시킬 수 있음을 나타낸다. 반대로, 공여자의 CpG 메틸화는 유전자 발현 및 HDR을 감소시킬 수 있다.

[0218] 일부 실시양태에서, 공여자 DNA는 다양한 상이한 방법에 의해, 예를 들어 형질감염, 나노입자, 미세-주사, 또는 바이러스 형질도입에 의해 뉴클레아제와 함께 또는 독립적으로 공급될 수 있다. 일부 실시양태에서, HDR에 대한 공여자의 이용가능성을 증가시키기 위해 다양한 테더링 옵션이 이용될 수 있다. 예로는 공여자를 뉴클레아제에 부착하거나, 근처에 결합하는 DNA 결합 단백질에 부착하거나, 또는 DNA 말단 결합 또는 복구에 관여하는 단백질에 부착하는 것이 포함된다.

[0219] NHEJ 또는 HDR에 의한 게놈 편집 외에도, NHEJ 경로 및 HR 둘 다를 이용하는 부위-특이적인 유전자 삽입이 수행될 수 있다. 조합 접근법은 가능하게는 인트론/엑손 경계를 비롯하여 특정 상황에서 적용가능할 수 있다. NHEJ는 인트론에서 라이게이션에 효과적인 것으로 입증될 수 있지만, 오류가 없는 HDR이 코딩 영역에 더 적합할 수 있다.

[0220] 부위-지정 폴리펩티드 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산

[0221] 따라서, 일부 실시양태에서, 게놈 편집 방법 및 조성물은 부위-지정 폴리펩티드 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산 서열 (또는 올리고뉴클레오티드)을 사용할 수 있다. 부위-지정 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 부위-지정 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열이 RNA인 경우, 이는 gRNA 서열에 공유 연결될 수 있거나 또는 별도의 서열로서 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드 또는 DNA 엔도뉴클레아제의 펩티드 서열이 그의 핵산 서열 대신에 삽입될 수 있다.

[0222] 유전자 편집 벡터

[0223] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 게놈-표적화 핵산, 본 개시내용의 부위-지정 폴리펩티드, 및/

또는 본 개시내용의 방법의 실시양태를 수행하는데 필요한 임의의 핵산 또는 단백질성 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, 이러한 핵산은 벡터 (예를 들어, 재조합 발현 벡터)이다.

[0224] 고려되는 발현 벡터에는 우두 바이러스, 폴리오바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, SV40, 단순 포진 바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 레트로바이러스를 기반으로 하는 바이러스 벡터 (예를 들어, 뮤린 백혈병 바이러스, 비장 괴사 바이러스, 및 레트로바이러스, 예컨대 라우스 육종 바이러스, 하비 육종 바이러스, 조류 백혈증 바이러스, 렌티바이러스, 인간 면역결핍 바이러스, 척수증식성 육종 바이러스, 및 유방 종양 바이러스로부터 유래된 벡터) 및 다른 재조합 벡터가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 진핵생물 표적 세포를 위해 고려되는 다른 벡터에는 벡터 pXT1, pSG5, pSVK3, pBPV, pMSG, 및 pSVLSV40 (파마시아(Pharmacia))이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 진핵생물 표적 세포를 위해 고려되는 추가의 벡터에는 벡터 pCTx-1, pCTx-2 및 pCTx-3이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 숙주 세포와 상용성이라면 다른 벡터가 사용될 수 있다.

[0225] 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 전사 및/또는 번역 조절 요소를 갖는다. 사용되는 숙주/벡터 시스템에 따라, 임의의 수많은 적합한 전사 및 번역 조절 요소, 예컨대 구성적 및 유도성 프로모터, 전사 인핸서 요소, 전사 종결인자 등이 발현 벡터에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 바이러스 서열, 또는 CRISPR 기구 또는 다른 요소의 성분을 불활성화시키는 자가-불활성화 벡터이다.

[0226] 적합한 진핵생물 프로모터 (예를 들어, 진핵생물 세포에서 기능적인 프로모터)의 비제한적인 예에는 시토메갈로 바이러스 (CMV) 극초기로부터의 것들, 단순 포진 바이러스 (HSV) 티미딘 키나제, 초기 및 후기 SV40, 레트로바이러스로부터의 긴 말단 반복부 (LTR), 인간 신장 인자-1 프로모터 (EF1), 닭 베타-액틴 프로모터 (CAG)에 융합된 시토메갈로바이러스 (CMV) 인핸서를 갖는 혼성체 구축물, 뮤린 줄기 세포 바이러스 프로모터 (MSCV), 포스포 글리세레이트 키나제-1 유전자좌 프로모터 (PGK), 및 마우스 메탈로티오네인-I이 포함된다. 추가의 실시양태에서, 프로모터는 MND 프로모터 (예를 들어, 서열식별번호: 33의 핵산 서열을 포함하는 MND 프로모터)이다.

[0227] Cas 엔도뉴클레아제와 관련하여 사용되는 가이드 RNA를 비롯한 작은 RNA를 발현시키기 위해, 다양한 프로모터, 예컨대 RNA 폴리머라제 III 프로모터, 예를 들어 U6 및 H1이 유리할 수 있다. 이러한 프로모터의 사용을 향상시키는 설명 및 파라미터는 관련 기술분야에 공지되어 있고, 추가의 정보 및 접근법은 정기적으로 기재된다 (예를 들어 [Ma, H. et al. (2014). *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 3:e161, doi:10.1038/mtna.2014.12] 참고).

[0228] 발현 벡터는 또한 번역 개시 및 전사 종결인자를 위한 리보솜 결합 부위를 함유할 수 있다. 발현 벡터는 또한 발현을 증폭시키기 위한 적절한 서열을 포함할 수 있다. 발현 벡터는 또한 부위-지정 폴리펩티드에 융합되어 융합 단백질을 생성하는 비천연 태그 (예를 들어, 히스티딘 태그, 헤마글루티닌 태그, 녹색 형광 단백질 등)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0229] 일부 실시양태에서, 프로모터는 유도성 프로모터 (예를 들어, 열 충격 프로모터, 테트라시클린-조절된 프로모터, 스테로이드-조절된 프로모터, 금속-조절된 프로모터, 에스트로젠 수용체-조절된 프로모터 등)이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 구성적 프로모터 (예를 들어, CMV 프로모터, UBC 프로모터)이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 공간적으로 제한된 및/또는 일시적으로 제한된 프로모터 (예를 들어, 조직 특이적인 프로모터, 세포 유형 특이적인 프로모터 등)이다. 일부 실시양태에서, 유전자가 계놈에 삽입된 후에 계놈에 존재하는 내인성 프로모터하에 발현될 경우에, 벡터는 숙주 세포에서 발현될 적어도 하나의 유전자에 대한 프로모터를 갖지 않는다.

[0230] 일부 실시양태에서, 벡터는 CISC (예컨대 본원에 개시된 임의의 CISC 폴리펩티드, 예컨대 말단절단된 ILR2β 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 CISC 폴리펩티드)의 하나 이상의 성분을 코딩하는 1개 이상의 핵산 서열을 함유한다. 본원에 개시된 유전자 편집 벡터는 또한 본원에 개시된 임의의 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 서열식별번호: 3의 핵산 서열을 포함한다. 추가의 실시양태에서, 벡터는 서열식별번호: 8의 핵산 서열을 포함한다.

[0231] **계놈-표적화 핵산 및 부위-지정 폴리펩티드의 복합체**

[0232] 계놈-표적화 핵산은 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어 핵산-유도된 뉴클레아제, 예컨대 Cas9)와 상호작용하여 복합체를 형성한다. 계놈-표적화 핵산 (예를 들어, gRNA)은 부위-지정 폴리펩티드를 표적 핵산으로 안내한다.

[0233] 이전에 명시된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드 및 계놈-표적화 핵산 각각을 세포 또는 대상체에게 별도로 투여할 수 있다. 다른 한편으로, 일부 다른 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드를 하나 이상의 가이드 RNA와, 또는 tracrRNA와 함께 하나 이상의 crRNA와 사전 복합체화시킬 수 있다. 이어서, 사전 복합

체화된 물질을 세포 또는 대상체에게 투여할 수 있다. 이러한 사전 복합체화된 물질은 리보핵단백질 입자 (RNP)로 공지되어 있다.

[0234] **네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드 및/또는 CISC 성분을 발현하는 세포를 제조하는 방법**

[0235] 본원에 기재된 일부 실시양태에서, 라파마이신-조절된 시토카인 신호전달을 위해 및/또는 이량체성 CISC 성분 및 세포내에서 발현된 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 발현하는 세포의 선택적 확장을 위해 사용되도록 단백질 서열 또는 발현 벡터를 숙주 세포, 예컨대 포유동물 세포, 예를 들어 림프구에 도입시키는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 이량체성 CISC는 리간드와 접촉시 세포, 예컨대 포유동물 세포의 내부에 신호를 전달하기 위해 도입된 CISC 성분을 갖는 세포에서 시토카인 신호전달을 가능하게 하는 반면에, 세포내에서 발현된 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드는 라파마이신의 불리한 효과에 대한 내성을 세포에게 부여한다. 또한, 세포, 예컨대 포유동물 세포의 선택적 확장은 본원에 기재된 2가지 특이적인 유전자 변형 사건 (예컨대, CRISPR/Cas 시스템에 의해 매개되는 유전자 변형 사건)을 겪은 세포만을 선택하도록 제어될 수 있다. 이들 세포의 제조는 본 개시내용을 기반으로 하는 기술분야의 기술자에게 자명한 공지된 기술에 따라 수행될 수 있다.

[0236] 일부 실시양태에서, CISC-보유 세포, 예컨대 포유동물 세포를 제조하는 방법이 제공되며, 세포는 이량체성 CISC 및 세포내에서 발현된 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 발현한다. 상기 방법은 세포, 예컨대 포유동물 세포에게 본원에 기재된 실시양태 또는 실시양태들 중 어느 하나의 단백질 서열, 또는 본원에 기재된 실시양태 또는 실시양태들의 발현 벡터를 전달하고, 세포, 예컨대 포유동물 세포에게 전달하는 것을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단백질 서열은 제1 및 제2 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, 단백질 서열은 제1, 제2, 제3 및 제4 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 서열은 제1 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 특정한 길이의 링커 (길이는 최적화됨), 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인을 포함하는 제1 CISC 성분을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 제2 서열은 제2 세포의 결합 도메인, 힌지 도메인, 특정한 길이의 링커 (길이는 최적화됨), 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인을 포함하는 제2 CISC 성분을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 또는 15개 아미노산 길이, 또는 상기 언급된 임의의 두 길이에 의해 정의되는 범위 내의 길이이다. 일부 실시양태에서, 신호전달 도메인은 인터류킨-2 신호전달 도메인, 예컨대 IL2R β (예컨대, 말단절단된 IL2R β) 또는 IL2R γ 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포의 결합 도메인은 라파마이신 또는 라파로그, 예컨대 FKBP 또는 FRB 또는 그의 기능적 유도체에 결합하는 결합 도메인이다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD8+ 또는 CD4+ 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 나이브 CD8+ T-세포, 중심 기억 CD8+ T-세포, 이펙터 기억 CD8+ T-세포 및 벌크 CD8+ T-세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 나이브 CD4+ T-세포, 중심 기억 CD4+ T-세포, 이펙터 기억 CD4+ T-세포, 및 벌크 CD4+ T-세포로 이루어진 군으로부터 선택된 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 전구체 T-세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 조혈 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 B 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 신경 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 NK 세포이다.

[0237] **유전자 변형된 세포 및 세포 집단**

[0238] 한 측면에서, 본 개시내용은 세포에서 게놈을 편집하여 유전자 변형된 세포를 생성하는 방법을 제공한다. 일부 측면에서, 유전자 변형된 세포의 집단이 제공된다. 따라서, 유전자 변형된 세포에는 게놈 편집에 의해 (예를 들어, CRISPR/Cas 시스템에 의해) 도입된 적어도 하나의 유전자 변형을 갖는 세포가 포함된다. 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 세포는 유전자 변형된 림프구 세포, 예를 들어 T 세포, 예컨대 인간 CD4+ T 세포이다. 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 코딩하고 임의적으로 CISC를 추가로 코딩하는 통합된 핵산을 갖는 유전자 변형된 세포가 본원에서 고려된다.

[0239] 본원에 기재된 조성물은 본원에 제시되고 기재된 단백질 서열 또는 발현 벡터를 포함하는 유전자 변형된 숙주 세포, 예컨대 포유동물 세포를 제공한다. 따라서, 이량체성 CISC 발현 뿐만 아니라 세포내에서 발현된 네이키드 FRB 도메인 발현을 위한 세포, 예컨대 포유동물 세포가 본원에서 제공되며, 세포는 본원에 기재된 실시양태 중 어느 하나의 단백질 서열 또는 본원에 기재된 실시양태 중 어느 하나의 발현 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 박테리아 세포 또는 포유동물 세포, 예컨대 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포는 이. 콜라이이다. 일부 실시양태에서, 세포는 단백질 발현을 허용하는 곤충 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 림프구이다.

[0240] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 전구체 T 세포 또는 T 조절 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 줄기 세포, 예컨대 조혈 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 NK 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD34+,

CD8+ 및/또는 CD4+ T 림프구이다. 일부 실시양태에서, 세포는 B 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 신경 줄기 세포이다.

- [0241] 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 CD8+ T 세포독성 림프구 세포이며, 나이브 CD8+ T 세포, 중심 기억 CD8+ T 세포, 이펙터 기억 CD8+ T 세포, 또는 벌크 CD8+ T 세포가 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD4+ T 헬퍼 림프구 세포이며, 나이브 CD4+ T 세포, 중심 기억 CD4+ T 세포, 이펙터 기억 CD4+ T 세포, 또는 벌크 CD4+ T 세포가 포함될 수 있다.
- [0242] 림프구 (T 림프구)는 공지된 기술에 따라 수집될 수 있고, 공지된 기술, 예컨대 항체와의 친화도 결합, 예컨대 유세포 분석 및/또는 면역자기성 선택에 의해 풍부화 또는 고갈될 수 있다. 풍부화 및/또는 고갈 단계 이후에, 원하는 T 림프구의 시험관내 확장을 관련 기술분야의 기술자에게 자명한 공지된 기술 또는 그의 변형에 따라 수행할 수 있다. 일부 실시양태에서, T 세포는 대상체로부터 획득된 자가유래 T 세포이다.
- [0243] 예를 들어, 초기 T 림프구 집단을 시험관내에서 배양 배지에 첨가한 다음, 배양 배지 피더 세포, 예컨대 비-분열 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)에 첨가하고 (예를 들어, 생성된 세포 집단은 확장될 초기 집단에서 각각의 T 림프구에 대해 적어도 5, 10, 20 또는 40개 또는 그 초과 PBMC 피더 세포를 함유하도록 함); 배양물을 인큐베이션하여 (예를 들어, T 세포의 수를 확장시키기 위해 충분한 시간 동안), 원하는 T 세포 집단 또는 하위 집단을 확장시킬 수 있다. 비-분열 피더 세포는 감마-조사된 PBMC 피더 세포를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 분열을 방지하기 위해 PBMC에 3000 내지 3600 rad 범위의 감마선을 조사한다. 일부 실시양태에서, 세포 분열을 방지하기 위해 PBMC에 3000, 3100, 3200, 3300, 3400, 3500 또는 3600 rad 또는 상기 열거된 임의의 값의 임의의 두 종점 사이의 임의의 rad 값의 감마선을 조사한다. 배양 배지에 T 세포 및 피더 세포의 첨가 순서는 원하는 경우 역전될 수 있다. 배양물은 일반적으로 T 림프구의 성장에 적합한 온도 등의 조건하에 인큐베이션할 수 있다. 인간 T 림프구의 성장을 위해, 예를 들어 온도는 일반적으로 적어도 또는 적어도 약 25°C, 적어도 또는 적어도 약 30°C, 적어도 또는 적어도 약 37°C일 것이다. 일부 실시양태에서, 인간 T 림프구의 성장을 위한 온도는 약 22, 약 24, 약 26, 약 28, 약 30, 약 32, 약 34, 약 36, 약 37°C, 또는 상기 열거된 임의의 값의 임의의 두 종점 사이의 임의의 다른 온도이다.
- [0244] T 림프구를 단리한 후에, 세포독성 및 헬퍼 T 림프구 둘 다 확장 이전에 또는 이후에 나이브, 기억 및 이펙터 T 세포 하위 집단으로 분류될 수 있다.
- [0245] CD8+ 세포는 표준 방법을 이용하여 획득될 수 있다. 일부 실시양태에서, CD8+ 세포는 이러한 각각의 유형의 CD8+ 세포와 회합된 세포 표면 항원을 확인함으로써 나이브, 중심 기억 및 이펙터 기억 세포로 추가로 분류된다. 일부 실시양태에서, 기억 T 세포는 CD8+ 말초 혈액 림프구의 CD62L+ 및 CD62L- 하위 세트 둘 다에 존재한다. PBMC는 항-CD8 및 항-CD62L 항체로 염색한 후에 CD62L-CD8+ 및 CD62L+CD8+ 분획으로 분류된다. 일부 실시양태에서, 중심 기억 T_{CM}의 표현형 마커의 발현은 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및/또는 CD127을 포함하고, 그랜자임 B에 대해 음성이거나 낮다. 일부 실시양태에서, 중심 기억 T 세포는 CD45RO+, CD62L+ 및/또는 CD8+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 T_E는 CD62L, CCR7, CD28 및/또는 CD127에 대해 음성이고, 그랜자임 B 및/또는 퍼포린에 대해 양성이다. 일부 실시양태에서, 나이브 CD8+ T 림프구는 CD62L, CCR7, CD28, CD3, CD127 및/또는 CD45RA를 비롯한 나이브 T 세포의 표현형 마커의 발현을 특징으로 한다.
- [0246] CD4+ T 헬퍼 세포는 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단을 확인함으로써 나이브, 중심 기억 및 이펙터 세포로 분류된다. CD4+ 림프구는 표준 방법에 의해 획득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 나이브 CD4+ T 림프구는 CD45RO-, CD45RA+, CD62L+ 및/또는 CD4+ T 세포이다. 일부 실시양태에서, 중심 기억 CD4+ 세포는 CD62L+ 및/또는 CD45RO+이다. 일부 실시양태에서, 이펙터 CD4+ 세포는 CD62L- 및/또는 CD45RO-이다.
- [0247] 세포, 예컨대 포유동물 세포, 또는 세포 집단, 예컨대 포유동물 세포 집단이 확장을 위해 선택되는지 여부는 세포 또는 세포 집단이 2가지 별개의 유전자 변형 사건을 겪었는지 여부에 따라 좌우된다. 일부 실시양태에서, 유전자 변형 사건은 CRISPR/Cas 시스템에 의해 매개된다. 일부 실시양태에서, 유전자 변형 사건은 CRISPR/Cas9 시스템에 의해 매개된다. 세포, 예컨대 포유동물 세포, 또는 세포 집단, 예컨대 포유동물 세포 집단이 1가지 이하의 유전자 변형 사건을 겪은 경우에는, 리간드의 첨가에 의해 이량체화가 일어나지 않을 것이다. 그러나, 세포, 예컨대 포유동물 세포, 또는 세포 집단, 예컨대 포유동물 세포 집단이 2가지 유전자 변형 사건을 겪은 경우에는, 리간드의 첨가에 의해 CISC 성분의 이량체화, 및 후속적인 신호전달 캐스캐이드가 일어날 것이다. 따라서, 세포, 예컨대 포유동물 세포, 또는 세포 집단, 예컨대 포유동물 세포 집단은 리간드와의 접촉에 대한 그의 반응을 기반으로 하여 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 리간드는 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05,

0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 nM의 양 또는 상기 언급된 임의의 두 값에 의해 정의되는 범위 내의 농도로 첨가될 수 있다.

[0248] 일부 실시양태에서, 세포, 예컨대 포유동물 세포, 또는 세포 집단, 예컨대 포유동물 세포 집단은 신호전달 경로의 결과로서 마커의 발현을 기반으로 하여 이량체성 CISC 뿐만 아니라, 세포내에서 발현된 내이키드 FRB 도메인 폴리펩티드에 대해 양성일 수 있다. 따라서, 이량체성 CISC에 대해 양성인 세포 집단은 표면 마커에 대해 특이적인 항체 및 이소타입 매칭된 대조군 항체로의 염색을 이용하여 유세포 분석에 의해 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 마커는 형광 또는 발광 단백질, 예컨대 GFP 또는 mCherry이다. 일부 실시양태에서, 마커는 저친화도 신경 성장 인자 수용체 (LNGFR)이다.

[0249] 일부 실시양태에서, 세포는 배아 세포가 아니다.

[0250] **세포의 내부에서 신호를 활성화시키는 방법**

[0251] 일부 실시양태에서, 세포, 예컨대 포유동물 세포의 내부에서 신호를 활성화시키는 방법이 제공된다. 상기 방법은 본원에 기재된 세포, 예컨대 포유동물 세포를 제공할 수 있고, 세포는 본원에 제시된 단백질 서열 또는 본원에 제시된 발현 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 이량체성 CISC를 코딩하는 단백질 서열을 발현시키거나, 또는 본원에 기재된 벡터를 발현시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포, 예컨대 포유동물 세포를 리간드와 접촉시키는 것을 포함하고, 이는 제1 및 제2 CISC 성분을 이량체화시키고, 신호를 세포의 내부로 전달한다. 일부 실시양태에서, 리간드는 라파마이신 또는 라파로그이다. 일부 실시양태에서, 이량체화를 유도하기 위한 리간드의 유효량은 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 nM의 양 또는 상기 언급된 임의의 두 값에 의해 정의되는 범위 내의 농도로 제공된다.

[0252] 일부 실시양태에서, 신호전달 복합체의 화학적 유도를 위해 본원에 기재된 접근법에서 사용되는 리간드 또는 작용제에는 다음이 포함될 수 있다: 라파마이신 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함). 라파마이신에는 시롤리무스 (라파문(Rapamune)®), (3S,6R,7E,9R,10R,12R,14S,15E,17E,19E,21S,23S,26R,27R,34aS)-9,10,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,32,33,34,34a-헥사테카히드로-9,27-디히드록시-3-[(1R)-2-[(1S,3R,4R)-4-히드록시-3-메톡시시클로헥실]-1-메틸에틸]-10,21-디메톡시-6,8,12,14,20,26-헥사메틸-23,27-에폭시-3H-피리도[2,1-c][1,4] 옥사아자시클로헥트리아콘틴-1,5,11,28,29 (4H,6H,31H)-펜톤); 에베롤리무스 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함). 에베롤리무스에는 RAD001, 조르트레스, 세르티칸, 아피니토르, 보투비아, 42-0-(2-히드록시에틸)라파마이신, (1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-1,18-디히드록시-12-[(2R)-1-[(1S,3R,4R)-4-(2-히드록시에톡시)-3-메톡시시클로헥실]프로판-2-일]-19,30-디메톡시-15,17,21,23,29,35-헥사메틸-11,36-디옥사-4-아자트리시클로[30.3.1.0^{4,9}]헥사트리아콘타-16,24,26,28-테트라엔-2,3,10,14,20-펜톤이 포함될 수 있음); 메틸리무스 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함). 메틸리무스에는 SAR943, 42-0-(테트라히드로푸란-3-일)라파마이신 (메틸리무스-1); 42-0-(옥세탄-3-일)라파마이신 (메틸리무스-2), 42-0-(테트라히드로피란-3-일)라파마이신 (메틸리무스-3), 42-0-(4-메틸, 테트라히드로푸란-3-일)라파마이신, 42-0-(2,5,5-트리메틸, 테트라히드로푸란-3-일) 라파마이신, 42-0-(2,5-디에틸-2-메틸, 테트라히드로푸란-3-일)라파마이신, 42-0-(2H-피란-3-일, 테트라히드로-6-메톡시-2-메틸)라파마이신, 또는 42-0-(2H-피란-3-일, 테트라히드로-2,2-디메틸-6-페닐)라파마이신이 포함될 수 있음); 노볼리무스 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함). 노볼리무스에는 16-0-테메틸 라파마이신이 포함될 수 있음); 피메크롤리무스 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함). 피메크롤리무스에는 엘리델(Elidel)®, (3S,4R,5S,8R,9E,12S,14S,15R,16S,18R,19R,26aS)-3-((E)-2-((1R,3R,4S)-4-클로로-3 메톡시시클로헥실)-1-메틸비닐)-8-에틸 5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,26,26a헥사테카히드로-5,19-에폭시-3H-피리도(2,1-c)(1,4)옥사아자시클로트리코신-1,17,20,21(4H,23H)-테트론 33-에피-클로로-33-테스옥시아스코미신이 포함될 수 있음); 리다포롤리무스 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함). 리다포롤리무스에는 AP23573, MK-8669, 데프롤리무스, (1R,9S,12S,15R,16E,18R,19R,21R,23S,24E,26E,28E,30S,32S,35R)-12-((1R)-2-((1S,3R,4R)-4-((디메틸포스포노일)옥시)-3-메톡시시클로헥실)-1-메틸에틸)-1,18-디히드록시-19,30-디메톡시15,17,21,23,29,35-헥사메틸-11,36-디옥사-4-아자트리시클로(30.3.1.0^{4,9})헥사트리아콘타-16,24,26,28-테트라엔-

2,3,10,14,20-펜톤이 포함될 수 있음); 타크롤리무스 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함. 타크롤리무스에는 FK-506, 푸지미신, 프로그래프(Prograf)®, 아드바그라프(Advagraf)®, 프로토픽, 3S-[3R*[E(1S*,3S*,4S*)], 4S*,5R*,8S*,9E,12R*,14R*,15S*,16R*,18S*,19S*,26aR*5,6,8,11,12,13,14,15,16,17,18,19,24,25,26,26a-헥사데카히드로-5,19-디히드록시-3-[2-(4-히드록시-3-메톡시시클로헥실)-1-메틸에테닐]-14,16-디메톡시-4,10,12,18-테트라메틸-8-(2-프로페닐)-15,19-에폭시-3H-피리도[2,1-c] [1,4] 옥사자자시클로트리코신-1,7,20,21(4H,23H)-테트론, 일수화물이 포함될 수 있음); 템시롤리무스 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함. 템시롤리무스에는 CCI-779, CCL-779, 토리셀(Torisel)®, (1R,2R,4S)-4-((2R)-2-[(3S,6R,7E,9R,10R,12R,14S,15E,17E,19E,21S,23S,26R,27R,34aS)-9,27-디히드록시-10,21-디메톡시-6,8,12,14,20,26-헥사메틸-1,5,11,28,29-펜타옥소-1,4,5,6,9,10,11,12,13,14,21,22,23,24,25,26,27,28,29,31,32,33,34,34a-테트라코사히드로-3H-23,27-에폭시피리도[2,1-c][1,4]옥사자자시클로헥트리아콘틴-3-일]프로필)-2-메톡시시클로헥실 3-히드록시-2-(히드록시메틸)-2-메틸프로파노에이트가 포함될 수 있음); 우미롤리무스 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함. 우미롤리무스에는 바이오리무스, 바이오리무스 A9, BA9, TRM-986, 42-0-(2-에톡시에틸)라파마이신이 포함될 수 있음); 조타롤리무스 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함. 조타롤리무스에는 ABT-578, (42S)-42-데옥시-42-(1H-테트라졸-1-일)-라파마이신이 포함될 수 있음); C20-메탈릴라파마이신 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함. C20-메탈릴라파마이신에는 C20-Marap가 포함될 수 있음); C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함. C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신에는 C16-iRap가 포함될 수 있음); AP21967 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함. AP21967에는 C-16-(S)-7-메틸인돌라파마이신이 포함될 수 있음); 나트륨 마이코페놀산 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함. 나트륨 마이코페놀산에는 셀셉트(CellCept)®, 미포르틱, (4E)-6-(4-히드록시-6-메톡시-7-메틸-3-옥소-1,3-디히드로-2-벤조푸란-5-일)-4-메틸헥스-4-엔산이 포함될 수 있음); 베니디핀 히드로클로라이드 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함. 베니디핀 히드로클로라이드에는 코니엘이 포함될 수 있음); 또는 AP1903 (그의 유사체, 유도체 및 제약상 허용가능한 염 포함. AP1903에는 리미두시드, [(1R)-3-(3,4-디메톡시페닐)-1-[3-[2-[2-[[2-3-[(1R)-3-(3,4-디메톡시페닐)-1-[(2S)-1-[(2S)-2-(3,4,5-트리메톡시페닐)부타노일]피페리딘-2-카르보닐]옥시프로필]페녹시]아세틸]아미노]에틸아미노]-2-옥소에톡시]페닐]프로필] (2S)-1-[(2S)-2-(3,4,5-트리메톡시페닐)부타노일]피페리딘-2-카르복실레이트가 포함될 수 있음); 또는 이들의 임의의 조합물이 포함될 수 있다.

[0253] 일부 실시양태에서, 이들 접근법에서 사용되는 리간드는 라파마이신 또는 라파로그, 예를 들어, 에베롤리무스, CCI-779, C20-메탈릴라파마이신, C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신, C16-iRap, AP21967, 나트륨 마이코페놀산, 베니디핀 히드로클로라이드, AP23573, 또는 AP1903, 또는 이들의 임의의 대사물, 유도체 및/또는 조합물이다. 추가의 유용한 라파로그에는 예를 들어 라파마이신에 대해 하기 변형 중 하나 이상을 갖는 라파마이신의 변이체가 포함될 수 있다: C7, C42 및/또는 C29에서 메톡시의 탈메틸화, 제거 또는 대체; C13, C43 및/또는 C28에서 히드록시의 제거, 유도체화 또는 대체; C14, C24 및/또는 C30에서 케톤의 환원, 제거 또는 유도체화; 6원 피페콜레이트 고리를 5원 프롤린 고리로 대체; 및/또는 시클로헥실 고리 상에서의 대안적인 치환 또는 시클로헥실 고리를 치환된 시클로헥틸 고리로 대체. 추가의 유용한 라파로그에는 노볼리무스, 피메크롤리무스, 리다포롤리무스, 타크롤리무스, 템시롤리무스, 우미롤리무스, 또는 조타롤리무스, 또는 이들의 임의의 대사물, 유도체 및/또는 조합물이 포함될 수 있다. 일부 실시양태에서, 리간드는 IMID-부류 약물 (예를 들어 탈리도미드, 포말리도미드, 레날리도미드 또는 관련된 유사체)이다.

[0254] 일부 실시양태에서, 세포, 예컨대 포유동물 세포의 내부에서 신호를 검출하는 것은 신호전달 경로의 결과인 마커를 검출하는 방법에 의해 달성될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 신호는 웨스턴 블롯, 유세포 분석, 또는 다른 단백질 검출 및 정량화 방법의 과정을 통해 세포, 예컨대 포유동물 세포에서 Akt 또는 다른 신호전달 마커의 수준을 결정함으로써 검출될 수 있다. 검출을 위한 마커에는 예를 들어, JAK, Akt, STAT, NF-κ, MAPK, PI3K, JNK, ERK, 또는 Ras, 또는 세포 신호전달 사건의 지표인 다른 세포 신호전달 마커가 포함될 수 있다.

[0255] 일부 실시양태에서, 신호의 형질도입은 시토카인 신호전달에 영향을 미친다. 일부 실시양태에서, 신호의 형질도입은 IL2R 신호전달에 영향을 미친다. 일부 실시양태에서, 신호의 형질도입은 시토카인 수용체의 하류 표적의 인산화에 영향을 미친다. 일부 실시양태에서, 신호를 활성화시키는 방법은 CISC-발현 세포, 예컨대 포유동물 세포에서 증식, 및 비-CISC 발현 세포에서 수반되는 항-증식을 유도한다.

[0256] 세포 신호전달이 일어나게 하기 위해서는, 시토카인 수용체가 이량체화 또는 이중이량체화해야 할 뿐만 아니라,

이들이 형태 변화가 일어나기에 적절한 구성을 가져야 한다 (Kim, M. J. et al. (2007). *J. Biol. Chem.*, 282(19):14253-14261). 따라서, 수용체 이량체화 또는 이중이량체화 단독으로는 수용체 활성화를 유도하기에 충분하지 않기 때문에, 신호전달 도메인의 정확한 형태적 위치 조정과 함께 이량체화는 적절한 신호전달을 위한 바람직한 과정이다. 본원에 기재된 화학적으로 유도된 신호전달 복합체는 일반적으로 하류 신호전달 사건이 발생하도록 정확한 배향을 갖는다.

[0257] **세포 집단의 선택적 확장 방법**

[0258] 일부 실시양태에서, 세포 집단, 예컨대 포유동물 세포를 선택적으로 확장시키는 방법이 본원에서 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 세포, 예컨대 포유동물 세포를 제공하는 것을 포함하며, 세포는 본원에 제시된 단백질 서열 또는 본원에 제시된 발현 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 본원에 기재된 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드 및/또는 이량체성 CISC를 코딩하는 단백질 서열을 발현시키거나, 또는 본원에 기재된 벡터를 발현시키는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 세포, 예컨대 포유동물 세포를 리간드와 접촉시키는 것을 포함하고, 이는 제1 및 제2 CISC 성분을 이량체화시키고, 신호를 세포의 내부로 전달한다. 일부 실시양태에서, 리간드는 라파마이신 또는 라파로그 (예컨대 본원에 개시된 임의의 라파마이신 또는 라파로그 화합물)이다. 일부 실시양태에서 이량체화를 유도하기 위해 제공된 리간드의 유효량은 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100 nM의 양 또는 상기 언급된 임의의 두 값에 의해 정의되는 범위 내의 농도이다.

[0259] 일부 실시양태에서, 사용되는 리간드는 라파마이신 또는 라파로그, 예를 들어, 에베롤리무스, CCI-779, C20-메탈릴라파마이신, C16-(S)-3-메틸인돌라파마이신, C16-iRap, AP21967, 나트륨 마이코페놀산, 베니디핀 히드로클로라이드, 또는 AP23573, AP1903, 또는 이들의 임의의 대사물, 유도체 및/또는 조합물이다. 추가의 유용한 라파로그에는 예를 들어 라파마이신에 대해 하기 변형 중 하나 이상을 갖는 라파마이신의 변이체가 포함될 수 있다: C7, C42 및/또는 C29에서 메톡시의 탈메틸화, 제거 또는 대체; C13, C43 및/또는 C28에서 히드록시의 제거, 유도체화 또는 대체; C14, C24 및/또는 C30에서 케톤의 환원, 제거 또는 유도체화; 6원 피페콜레이트 고리를 5원 프롤릴 고리로 대체; 및/또는 시클로헥실 고리 상에서의 대안적인 치환 또는 시클로헥실 고리를 치환된 시클로펜틸 고리로 대체. 추가의 유용한 라파로그에는 노볼리무스, 피메크롤리무스, 리다포롤리무스, 타크롤리무스, 템시롤리무스, 우미롤리무스, 또는 조타롤리무스, 또는 이들의 임의의 대사물, 유도체 및/또는 조합물이 포함될 수 있다.

[0260] 일부 실시양태에서, 세포 집단, 예컨대 포유동물 세포의 선택적 확장은 2가지 별개의 유전자 변형 사건 (예컨대, CRISPR/Cas9 시스템에 의해 매개되는 유전자 변형)이 발생했을 때에만 일어난다. 1가지 유전자 변형 사건은 이량체성의 화학적으로 유도된 신호전달 복합체의 한 성분이고, 다른 유전자 변형 사건은 이량체성의 화학적으로 유도된 신호전달 복합체의 다른 성분이다. 두 사건 모두가 세포 집단, 예컨대 포유동물 세포 집단에서 발생하는 경우, 화학적으로 유도된 신호전달 복합체 성분은 리간드의 존재하에 이량체하여, 활성인 화학적으로 유도된 신호전달 복합체를 생성하고, 세포의 내부로 신호를 발생한다.

[0261] **게놈 편집을 위한 방법**

[0262] 일부 실시양태에서, 세포에서 게놈을 편집하는 방법, 특히 i) 세포의 세포질 내에서 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드의 발현, 및 임의적으로 ii) 하나 이상의 이량체화 활성화가능한 화학적으로 유도된 신호전달 복합체 (CISC)의 폴리펩티드 성분의 발현을 가능하게 하도록 세포 게놈을 편집하는 방법이 본원에 제공되며, 신호전달-적격성 CISC는 세포의 생존 및/또는 증식을 촉진시키는 신호전달 경로에서 자극 신호를 생성할 수 있다.

[0263] 한 측면에서, 세포에게 i) 데옥시리보핵산 (DNA) 엔도뉴클레아제, 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산; ii) 세포에서 표적 게놈 유전자좌 내의 표적 서열에 상보성인 스페이서 서열을 포함하는 가이드 RNA (gRNA), 또는 gRNA를 코딩하는 핵산; 및 iii) 네이키드 FKBP-라파마이신 결합 (FRB) 도메인 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 공여자 카세트를 포함하는 공여자 주형을 제공하는 것을 포함하는, 세포의 게놈을 편집하는 방법이 본원에 제공되며, DNA 엔도뉴클레아제, gRNA, 및 공여자 주형은, DNA 엔도뉴클레아제와 gRNA의 회합에 의해 형성된 복합체가 세포에서 표적 게놈 유전자좌 내의 공여자 카세트의 표적화된 통합을 촉진시켜 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드를 발현할 수 있는 유전자 변형된 세포를 생성할 수 있도록 구성된다.

[0264] 한 측면에서, 세포에게 a) 관심 유전자 또는 게놈 서열에 대해 지정된 gRNA, b) 본원에 기재된 임의의 실시양태

에 따른 RGEN 또는 RGEN을 코딩하는 핵산, c) 네이키드 FRB 도메인을 코딩하는 핵산, 및 d) i) 제1 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체 또는 그의 기능적 유도체를 포함하는 제1 CISC 성분; 및 i) 제2 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하는 제2 CISC 성분을 코딩하는 핵산을 포함하는 하나 이상의 공여자 주형을 제공하는 것을 포함하는, 세포의 게놈을 편집하는 방법에 본원에 제공되며, 제1 CISC 성분 및 제2 CISC 성분은 T 세포에 의해 발현될 때 리간드 (예를 들어, 라파마이신)의 존재하에 이량체하여 하류 신호 (예컨대, 생존 신호 또는 증식 신호)를 생성할 수 있는 신호전달-적격성 CISC를 생성하도록 구성되고, 예를 들어 위치한다. 일부 실시양태에서, CISC 성분 중 하나는 말단절단된 IL2R β 세포 내 신호전달 도메인을 포함한다.

[0265] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포의 게놈을 편집하는 임의의 방법에 따라, 제1 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체 또는 그의 기능적 유도체를 포함하는 제1 CISC 성분; 및 i) 제2 세포의 결합 도메인 또는 그의 기능적 유도체, 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 및 신호전달 도메인 또는 그의 기능적 유도체를 포함하는 제2 CISC 성분을 코딩하는 하나 이상의 핵산, 제1 CISC 성분 및 제2 CISC 성분을 코딩하는 하나 이상의 핵산은 하나 이상의 벡터에서 발현된다. 세포의 결합 도메인은 또한 단백질을 세포의 공간에 대해 표적화하기 위해 소포체 신호 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 서열식별번호: 3, 8, 28, 29 및 30 중 하나 이상에 따른 핵산 서열을 포함한다.

[0266] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 세포의 게놈을 편집하는 임의의 방법에 따라, RGEN은 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (also 공지된 as Csn1 및 Csx12), Cas100, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, 및 Cpf1 엔도뉴클레아제, 또는 그의 기능적 유도체로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, RGEN은 Cas 9이다. 일부 실시양태에서, RGEN을 코딩하는 핵산은 리보핵산 (RNA) 서열이다. 일부 실시양태에서, RGEN을 코딩하는 RNA 서열은 공유 결합을 통해 제1 gRNA 또는 제2 gRNA에 연결된다. 일부 실시양태에서, RGEN은 제1 gRNA 및/또는 제2 gRNA와 사전 복합체화되어, 세포에 제공되기 전에 RNP 복합체를 형성한다. 일부 실시양태에서, 각각 1:1 내지 20:1의 gRNA 대 RGEN의 몰비로 RGEN은 제1 gRNA 및/또는 제2 gRNA와 사전 복합체화된다.

[0267] **표적화된 통합**

[0268] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법은 숙주 게놈의 특정한 위치에서 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드 또는 그의 기능적 유도체를 코딩하는 서열의 통합을 가능하게 하며, 이러한 과정은 "표적화된 통합"으로 지칭된다. 일부 실시양태에서, 표적화된 통합은 서열-특이적인 뉴클레아제, 예컨대 부위-지정 폴리펩티드, 예를 들어 DNA 엔도뉴클레아제 (예를 들어 핵산-유도된 뉴클레아제, 예컨대 Cas9)를 사용함으로써 게놈 DNA에서 이중-가닥 절단을 생성하는 것을 가능하게 한다.

[0269] 일부 실시양태에서 사용된 CRISPR-Cas 시스템은 많은 개수의 게놈 표적을 신속하게 스크리닝하여 최적의 CRISPR-Cas 설계를 확인할 수 있다는 이점을 갖는다. CRISPR-Cas 시스템은 관련된 Cas 뉴클레아제 (예를 들어, Cas9 뉴클레아제)를 DNA의 특이적인 서열에 표적화시키는 단일 가이드 RNA (sgRNA)로서 지칭되는 RNA 분자를 사용한다. 이러한 표적화는 sgRNA의 대략 20 bp 표적화 서열 내에서 sgRNA와 게놈 서열 사이의 왓슨-크릭 (Watson-Crick) 기반 쌍형성에 의해 발생한다. 표적 부위에 결합하면, Cas 뉴클레아제는 게놈 DNA의 두 가닥 모두를 절단하여 이중-가닥 절단을 생성한다. 특이적인 DNA 서열을 표적화하도록 sgRNA를 설계하기 위한 유일한 요건은, 표적 서열이 게놈 서열에 대해 상보성인 sgRNA 서열의 3' 말단에서 프로토스페이서 인접한 모티프 (PAM) 서열을 함유해야 한다는 것이다. Cas9 뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 NRG (R은 A 또는 G이고, N은 임의의 염기임), 또는 더욱 제한된 PAM 서열 NGG이다. 따라서, 게놈의 임의의 영역을 표적화하는 sgRNA 분자는 모든 PAM 모티프에 인접하게 20 bp 서열을 위치시킴으로써 인실리코(*in silico*)에 의해 설계될 수 있다. PAM 모티프는 진핵생물의 게놈에서 평균 15 bp에서 발생한다. 그러나, 인실리코 방법에 의해 설계된 sgRNA는 상이한 효율성으로 세포에서 이중-가닥 절단을 생성할 것이고, 인실리코 방법을 이용하여 일련의 sgRNA 분자의 절단 효율을 예측하는 것은 불가능하다. sgRNA는 시험관내에서 신속하게 합성될 수 있기 때문에, 이는 가장 효율적인 절단을 일으키는 sgRNA를 확인하기 위해 주어진 게놈 영역에서 모든 잠재적인 sgRNA 서열의 신속한 스크리닝을 가능하게 한다. 일반적으로, 주어진 게놈 영역 내에서 일련의 sgRNA를 세포에서 시험할 때, 0 내지 90%의 절단 효율 범위가 관찰된다. 인실리코 알고리즘 뿐만 아니라 실험실 실험 또한 임의의 주어진 sgRNA의 오프-타겟 잠재성을 결정하기 위해 이용될 수 있다. sgRNA의 20 bp 인식 서열에 대한 완벽한 매칭은 대부분의 진핵생물 게놈에서 주로 한번만 발생하는 반면에, sgRNA에 대한 1개 이상의 염기 쌍 미스매치를 갖는 게놈에서는 수많은 추

가의 부위가 있을 것이다. 이들 부위는 미스매치의 개수 및 위치를 기반으로 하여 종종 예측 불가능한 가변 빈도로 절단될 수 있다. 인실리코 분석에 의해 확인되지 않은 추가의 오프-타겟 부위에서의 절단 또한 발생할 수 있다. 따라서, 가장 유리한 오프-타겟 프로파일을 갖는 sgRNA를 확인하기 위해 관련 세포 유형에서 수많은 sgRNA를 스크리닝한 것은 치료적 용도에서 최적의 sgRNA를 선택하는데 결정적인 구성요소이다. 유리한 오프-타겟 프로파일은 실제 오프-타겟 부위의 개수 및 이들 부위에서 절단의 빈도 뿐만 아니라, 이들 부위의 게놈에서의 위치를 고려한다. 예를 들어, 기능적으로 중요한 유전자, 특히 종양 유전자 또는 항종양 유전자 근처에 또는 내에 있는 오프-타겟 부위는 알려진 기능이 없는 유전자간 영역의 부위에 비해 덜 유리한 것으로 고려된다. 따라서, 최적의 sgRNA의 확인이 유기체의 게놈 서열의 인실리코 분석에 의해 간단하게 예측될 수는 없으며, 실험 시험을 필요로 한다. 인실리코 분석이 시험하기 위한 가이드의 개수를 좁히는데 도움이 될 수 있지만, 이는 높은 온-타겟 절단을 갖는 가이드를 예측할 수 없거나 또는 낮은 바람직한 오프-타겟 절단을 갖는 가이드를 예측할 수 없다. 실험 데이터는, 관심 영역 (예컨대, 피브리노겐- α 인트론 1)의 게놈에 대해 완벽한 매칭을 갖는 각각의 sgRNA의 절단 효율이 절단 없음 내지 >90% 절단으로 달라지고, 임의의 공지된 알고리즘에 의해 예측될 수 없음을 나타낸다. 주어진 sgRNA가 Cas 효소에 의한 절단을 촉진시키는 능력은 해당 영역에서 염색질 구조에 의해 결정될 수 있는 게놈 DNA의 특이적인 해당 부위의 접근성과 관련이 있을 수 있다. 휴지의 분화된 세포에서 대부분의 게놈 DNA는 고도로 응축된 이질염색질에 존재할 수 있지만, 능동적으로 전사된 영역은 큰 분자, 예컨대 Cas 단백질과 같은 단백질에 대해 더욱 접근하기 쉬운 것으로 공지된 더욱 개방된 염색질 상태로 존재한다. 심지어 능동적으로 전사된 유전자 내에서, DNA의 일부 특이적인 영역은 결합된 전사 인자 또는 다른 조절 단백질의 존재 또는 부재로 인해 다른 것들에 비해 더욱 접근하기 쉽다. 게놈에서 또는 게놈 유전자좌의 특이적인 게놈 유전자좌 또는 영역 내에서 부위를 예측하는 것은 불가능하며, 따라서 관련 세포 유형에서 실험에 의해 결정될 것이다. 일부 부위가 삽입을 위한 잠재적인 부위로서 선택되면, 예를 들어 실험 시험을 하거나 하지 않고 몇몇 뉴클레오티드를 선택된 부위로부터 상류 또는 하류로 이동시킴으로써, 이러한 부위에 대해 일부 변형을 추가할 수 있다.

[0270] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있는 gRNA는 세포에서 FOXP3 유전자좌, AAVS1 유전자좌, 또는 TCR α (TRAC) 유전자좌 내의 서열에 대해 상보적인 스페이스 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법에서 사용될 수 있는 gRNA는 서열식별번호: 40-57 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열, 또는 서열식별번호: 40-57 중 어느 하나의 뉴클레오티드 서열과 적어도 또는 적어도 약 85% 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 그의 임의의 유도체로부터의 하나 이상의 스페이스 서열을 포함한다.

[0271] **핵산 변형**

[0272] 일부 실시양태에서, 세포에 도입된 폴리뉴클레오티드는 본원에 추가로 기재되고 관련 기술분야에 공지된 바와 같이 예를 들어 활성, 안정성 또는 특이성을 증강시키기 위해, 전달을 변경시키기 위해, 숙주 세포에서 선천성 면역 반응을 감소시키기 위해, 또는 다른 개선을 위해 개별적으로 또는 조합되어 사용될 수 있는 하나 이상의 변형을 갖는다.

[0273] 특정 실시양태에서, 변형된 폴리뉴클레오티드는 CRISPR/Cas9/Cpf1 시스템에서 사용되며, 이 경우 가이드 RNA (단일-분자 가이드 또는 이중-분자 가이드) 및/또는 세포에 도입된 Cas 또는 Cpf1 엔도뉴클레아제를 코딩하는 DNA 또는 RNA는 하기에 기재되고 설명된 바와 같이 변형될 수 있다. 이러한 변형된 폴리뉴클레오티드는 임의의 하나 이상의 게놈 유전자좌를 편집하기 위해 CRISPR/Cas9/Cpf1 시스템에서 사용될 수 있다.

[0274] 이러한 용도의 비제한적인 예시의 목적을 위해 CRISPR/Cas9/Cpf1 시스템을 사용하면, 가이드 RNA의 변형을 이용하여 단일-분자 가이드 또는 이중-분자일 수 있는 가이드 RNA, 및 Cas 또는 Cpf1 엔도뉴클레아제를 갖는 CRISPR/Cas9/Cpf1 게놈 편집 복합체의 형성 또는 안정성을 증강시킬 수 있다. 가이드 RNA의 변형은 또한 또는 대안적으로 게놈 편집 복합체와 게놈의 표적 서열 사이의 상호작용의 개시, 안정성 또는 동역학을 증강시키기 위해 이용될 수 있으며, 이는 예를 들어 온-타겟 활성을 증강시키기 위해 이용될 수 있다. 가이드 RNA의 변형은 또한 또는 대안적으로 다른 (오프-타겟) 부위에서의 효과와 비교하여 온-타겟 부위에서의 특이성, 예를 들어 게놈 편집의 상대적인 비율을 증강시킬 수 있다.

[0275] 또한 또는 대안적으로 변형을 이용하여, 예를 들어 세포에 존재하는 리보뉴클레아제 (RNases)에 의한 분해에 대한 그의 내성을 증가시킴으로써, 가이드 RNA의 안정성을 증가시켜서, 세포에서 그의 반감기를 증가시킬 수 있다. 엔도뉴클레아제를 코딩하는 RNA와 동시에 도입된 가이드 RNA의 반감기의 증가를 이용하여 가이드 RNA 및 코딩된 Cas 또는 Cpf1 엔도뉴클레아제가 세포에서 공존하는 시간을 증가시킬 수 있기 때문에, 엔도뉴클레아제를 생성하기 위해 번역되어야 하는 RNA를 통해 Cas 또는 Cpf1 엔도뉴클레아제를 편집될 세포에 도입시키는 실시양

태에서 가이드 RNA 반감기를 증가시키는 변형이 특히 유용할 수 있다.

- [0276] 또한 또는 대안적으로 변형을 이용하여, 세포에 도입된 RNA가 선천성 면역 반응을 유도하는 가능성 또는 정도를 감소시킬 수 있다. 하기에 및 관련 기술분야에 기재된 바와 같이 RNA 간섭 (RNAi), 예컨대 소형-간섭 RNA (siRNA)의 맥락에서 널리 특징분석된 이러한 반응은 RNA의 감소된 반감기 및/또는 면역 반응과 연관된 시토키인 또는 다른 인자의 유도와 연관이 있는 경향이 있다.
- [0277] 또한, 세포에 도입된 엔도뉴클레아제를 코딩하는 RNA에 대해 1가지 이상의 유형의 변형, 예컨대 비제한적으로, RNA의 안정성을 증가시키는 변형 (예컨대, 세포에 존재하는 RNase에 의한 그의 분해를 증가시킴으로써), 생성된 생성물 (예컨대, 엔도뉴클레아제)의 번역을 증가시키는 변형, 및/또는 세포에 도입된 RNA가 선천성 면역 반응을 유도하는 가능성 또는 정도를 감소시키는 변형이 이루어질 수 있다.
- [0278] 상기 및 하기와 같은 변형의 조합이 마찬가지로 이용될 수 있다. CRISPR/Cas9/Cpf1의 경우, 예를 들어, 1가지 이상의 유형의 변형이 가이드 RNA에 대해 이루어질 수 있고/거나 (상기 예시된 것들 포함), 1가지 이상의 유형의 변형이 Cas 엔도뉴클레아제를 코딩하는 RNA에 대해 이루어질 수 있다 (상기 예시된 것들 포함).
- [0279] 예시적으로, CRISPR/Cas9/Cpf1 시스템에서 사용된 가이드 RNA, 또는 다른 더 작은 RNA는 하기 설명되고 관련 기술분야에 기재된 바와 같이 화학적 수단에 의해 용이하게 합성되어 용이하게 혼입될 다수의 변형을 가능하게 할 수 있다. 화학적 합성 절차가 지속적으로 확장되고 있지만, 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC, PAGE와 같은 겔의 사용을 포함)와 같은 절차에 의한 이러한 RNA의 정제는 폴리뉴클레오티드 길이가 100개 정도인 뉴클레오티드를 넘어서 상당히 증가함에 따라 더욱 어려워지는 경향이 있다. 더 긴 길이의 화학적으로 변형된 RNA를 생성하기 위해 이용되는 한 접근법은 함께 라이게이션되는 2개 이상의 분자를 생성하는 것이다. 훨씬 더 긴 RNA, 예컨대 Cas9 엔도뉴클레아제를 코딩하는 것은 효소적으로 더욱 용이하게 생성된다. 더 적은 유형의 변형이 일반적으로 효소적으로 생성된 RNA에서 이용되지만, 하기 추가로 기재된 바와 같이 예를 들어 안정성을 증가시키고, 선천성 면역 반응의 가능성 또는 정도를 감소시키고/거나, 다른 속성을 증가시키기 위해 사용될 수 있는 변형이 여전히 있으며, 새로운 유형의 변형이 정기적으로 개발되고 있다.
- [0280] 다양한 유형의 변형, 특히 더 작은 화학적으로 합성된 RNA와 함께 빈번하게 사용되는 것들의 예로서, 변형은 당의 2' 위치에서 변형된 1개 이상이 뉴클레오티드, 일부 실시양태에서 2'-O-알킬, 2'-O-알킬-O-알킬, 또는 2'-플루오로-변형된 뉴클레오티드를 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, RNA 변형에는 피리미딘의 리보스, 무염기 잔기, 또는 RNA의 3' 말단의 역전된 염기 상에서 2'-플루오로, 2'-아미노 또는 2' O-메틸 변형이 포함된다. 이러한 변형은 올리고뉴클레오티드에 통상적으로 통합되고, 이들 올리고뉴클레오티드는 주어진 표적에 대해 2'-데옥시올리고뉴클레오티드에 비해 보다 높은 Tm (예컨대, 보다 높은 표적 결합 친화도)을 갖는 것으로 확인되었다.
- [0281] 수많은 뉴클레오티드 및 뉴클레오시드 변형은 이들이 통합되는 올리고뉴클레오티드가 본래의 올리고뉴클레오티드에 비해 뉴클레아제 소화에 대해 더욱 내성 있게 만드는 것으로 확인되었고; 이들 변형된 올리고는 변형되지 않은 올리고뉴클레오티드에 비해 더 오랜 시간 동안 손상되지 않고 생존한다. 변형된 올리고뉴클레오티드의 구체적인 예에는 변형된 백본, 예를 들어 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 당간 연결 또는 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로시클릭 당간 연결을 갖는 것들이 포함된다. 일부 올리고뉴클레오티드는 포스포로티오에이트 백본을 갖는 올리고뉴클레오티드 및 헤테로원자 백본, 특히 CH₂-NH-O-CH₂, CH₂-N(CH₃)-O-CH₂ (메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI 백본으로 공지됨), CH₂-O-N(CH₃)-CH₂, CH₂-N(CH₃)-N(CH₃)-CH₂ 및 O-N(CH₃)-CH₂-CH₂ 백본을 갖는 것들이며, 본래의 포스포디에스테르 백본은 O-P-O-CH₂); 아미드 백본 ([De Mesmaeker, A. et al. (1995). *Acc. Chem. Res.*, 28:366-374] 참고); 모르폴리노 백본 구조 (Summerton 및 Weller, 미국 특허 번호 5,034,506); 펩티드 핵산 (PNA) 백본 (올리고뉴클레오티드의 포스포디에스테르 백본이 폴리아미드 백본으로 교체되고, 뉴클레오티드는 폴리아미드 백본의 아자 니트로 원자에 직접적으로 또는 간접적으로 결합되며, [Nielsen, P. E. et al. (1991). *Science*, 254(5037):1497-1500]을 참고함)로 표현된다. 인-함유 연결에는 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 3' 알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 갖는 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 포스포네이트, 3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트를 갖는 포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 일반적인 3'-5' 연결을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결된 유사체, 및 뉴클레오시드 단위의 인접한 쌍이 이 3'-5'에서 5'-3' 또는 2'-5'에서 5'-2' 연결된 역전된 극성을 갖는 것들이 포함되나 이로 제한되지 않으며; 미국 특허 번호 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233;

5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 및 5,625,050을 참고한다.

[0282] 모르폴리노-기반 올리고머 화합물은 [Braasch, D. A. et al. (2002). *Biochemistry*, 41(14):4503-4510; Genesis, Volume 30, Issue 3, (2001); Heasman, J. (2002). *Dev. Biol.*, 243(2):209-214; Nasevicius, A. et al. (2000). *Nat. Genet.*, 26(2):216-220; Lacerra, G. et al. (2000). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97(17):9591-9596]; 및 미국 특허 번호 5,034,506 (1991년 7월 23일에 허여됨)]에 기재되어 있다.

[0283] 시클로헥세닐 핵산 올리고뉴클레오티드 모방체는 [Wang, J. et al. (2000). *J. Am. Chem. Soc.*, 122(36):8595-8602]에 기재되어 있다.

[0284] 인 원자를 포함하지 않는 변형된 올리고뉴클레오티드 백본은 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오시드간 연결, 혼합된 헤테로원자 및 알킬 또는 시클로알킬 뉴클레오시드간 연결, 또는 하나 이상의 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로시클릭 뉴클레오시드간 연결에 의해 형성된 백본을 갖는다. 이들은 모르폴리노 연결 (뉴클레오시드의 당 부분으로부터 부분적으로 형성됨); 실록산 백본; 숄피드, 숄폭시드 및 숄폰 백본; 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 메틸렌 포름아세틸 및 티오포름아세틸 백본; 알켄 함유 백본; 숄파메이트 백본; 메틸렌아미노 및 메틸렌히드라지노 백본; 숄포네이트 및 숄폰아미드 백본; 아미드 백본을 갖는 것들; 및 혼합된 N, O, S 및 CH₂ 성분 부분을 갖는 것들을 가지며; 미국 특허 번호 5,034,506; 5,166,315; 5,185,444; 5,214,134; 5,216,141; 5,235,033; 5,264,562; 5,264,564; 5,405,938; 5,434,257; 5,466,677; 5,470,967; 5,489,677; 5,541,307; 5,561,225; 5,596,086; 5,602,240; 5,610,289; 5,602,240; 5,608,046; 5,610,289; 5,618,704; 5,623,070; 5,663,312; 5,633,360; 5,677,437; 및 5,677,439를 참고하며, 이들 각각은 본원에 참고로 포함된다.

[0285] 1개 이상의 치환된 당 모이어티는 또한 예를 들어 2' 위치에서 하기 중 하나에 포함될 수 있다: OH, SH, SCH₃, F, OCN, OCH₃, OCH₃ O(CH₂)_n CH₃, O(CH₂)_n NH₂, 또는 O(CH₂)_n CH₃ (여기서, n은 1 내지 또는 10 또는 약 10임); C1 내지 C10 저급 알킬, 알콕시알콕시, 치환된 저급 알킬, 알크아릴, 또는 아르알킬; Cl; Br; CN; CF₃; OCF₃; O-, S-, 또는 N-알킬; O-, S-, 또는 N-알케닐; SOCH₃; SO₂ CH₃; ONO₂; NO₂; N₃; NH₂; 헤테로시클로알킬; 헤테로시클로알코아릴; 아미노알킬아미노; 폴리알킬아미노; 치환된 실릴; RNA 절단 기; 리포터 기; 인터칼레이터; 올리고뉴클레오티드의 약동학적 성질을 개선시키기 위한 기; 또는 올리고뉴클레오티드의 약력학적 성질을 개선시키기 위한 기 및 유사한 성질을 갖는 다른 치환기. 일부 실시양태에서, 변형에는 2'-메톡시에톡시 (2'-O-CH₂CH₂OCH₃, 2'-O-(2-메톡시에틸)로도 공지됨)가 포함된다 (Martin, P. et al. (1995). *Helv. Chim. Acta*, 78(2):486-504). 다른 변형에는 2'-메톡시 (2'-O-CH₃), 2'-프로폭시 (2'-OCH₂ CH₂CH₃) 및 2'-플루오로 (2'-F)가 포함된다. 유사한 변형이 올리고뉴클레오티드 상의 다른 위치, 특히 3' 말단 뉴클레오티드의 당의 3' 위치, 및 5' 말단 뉴클레오티드의 5' 위치에서 일어날 수 있다. 올리고뉴클레오티드는 또한 펩티도라노실 기 대신에 당 모방체, 예컨대 시클로부틸을 가질 수 있다.

[0286] 일부 실시양태에서, 뉴클레오티드 단위의 당 및 뉴클레오시드간 연결, 예컨대 백본 둘 다 신규한 기로 교체된다. 염기 단위는 적절한 핵산 표적 화합물과의 혼성화를 위해 유지된다. 우수한 혼성화 성질을 갖는 것으로 확인된 이러한 한 올리고머 화합물인 올리고뉴클레오티드 모방체는 펩티드 핵산 (PNA)으로 지칭된다. PNA 화합물에서, 올리고뉴클레오티드의 당-백본은 아미드 함유 백본, 예를 들어 아미노에틸글리신 백본으로 교체된다. 핵염기는 보유되고, 백본의 아미드 부분의 아자 질소 원자에 직접적으로 또는 간접적으로 결합된다. PNA 화합물의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허에는 미국 특허 번호 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262가 있으나 이로 제한되지 않는다. PNA 화합물에 대한 추가의 교시내용은 [Nielsen, P. E. et al. (1991). *Science*, 254(5037):1497-1500]에서 확인할 수 있다.

[0287] 일부 실시양태에서, 가이드 RNA는 또한 추가로 또는 대안적으로 핵염기 (관련 기술분야에서는 종종 간단하게 "염기"로 지칭됨) 변형 또는 치환을 포함할 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "변형되지 않은" 또는 "천연" 핵염기에는 아데닌 (A), 구아닌 (G), 티민 (T), 시토신 (C), 및 우라실 (U)이 포함된다. 변형된 핵염기에는 천연 핵산에서 드물게 또는 일시적으로만 발견되는 핵염기, 예를 들어 히포크산틴, 6-메틸아데닌, 5-Me 피리미딘, 특히 5-메틸시토신 (5-메틸-2' 테옥시시토신으로도 지칭되고, 종종 관련 기술분야에서 5-Me-C로 지칭됨), 5-히드록시메틸시토신 (HMC), 글리코실 HMC 및 겐토비오실 HMC, 뿐만 아니라 합성 핵염기, 예를 들어 2-아미노아데닌, 2-(메틸아미노)아데닌, 2-(이미다졸릴알킬)아데닌, 2-(아미노알킬아미노)아데닌, 또는 다른 헤테로치환된 알킬아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-히드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-테아자구아닌, N6 (6-아미노핵실)아데닌, 및 2,6-디아미노퓨린이 포함된다. [Kornberg, A. et al. (1980).

DNA Replication (2nd ed., pp.75-77). San Francisco, CA: W. H. Freeman & Co.; Gebeyehu, G. et al. (1987). *Nucl Acids Res.*, 15(11):4513-4534]. 관련 기술분야에 공지된 "보편적인" 염기, 예를 들어 이노신 또한 포함될 수 있다. 5-Me-C 치환은 핵산 듀플렉스 안정성을 0.6-1.2°C만큼 증가시키는 것으로 확인되었고 (Sanghvi, Y. S. (1993). *Antisense Research and Applications*, (pp. 276-278). Crooke, S. T. and Lebleu, B., (Eds.), Boca Raton, FL: CRC Press), 염기 치환의 실시양태이다.

[0288] 일부 실시양태에서, 변형된 핵염기에는 다른 합성 및 천연 핵염기, 예컨대 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-히드록시 메틸 시토신, 크산틴, 히포크산틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 5-프로피닐 우라실 및 시토신, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (슈도-우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-히드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로, 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌, 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌이 포함된다.

[0289] 추가로, 핵염기에는 미국 특허 번호 3,687,808에 개시된 것들; [Kroschwitz, J. (1990). *Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering*, (pp. 858-859) New York, NY:Wiley]에 개시된 것들; [Englisch, U. et al. (1991). *Angewandte Chemie International Edition*, 30(6):613-722]에 개시된 것들; 및 [Sanghvi, Y. S. (1993). Chapter 15, *Antisense Research and Applications*, (pp. 289-302), Crooke, S. T. and Lebleu, B. (Eds), Boca Raton, FL: CRC Press]에 개시된 것들이 포함된다. 이들 특정한 핵염기는 본 개시내용의 올리고머 화합물의 결합 친화도를 증가시키는데 특히 유용하다. 이들에는 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 갖는 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 0-6 치환된 퓨린이 포함된다. 5-메틸시토신 치환은 핵산 듀플렉스 안정성을 0.6-1.2°C만큼 증가시키는 것으로 확인되었고 (Sanghvi, Y.S. (1993). *Antisense Research and Applications*, (pp. 276-278). Crooke, S. T. and Lebleu, B., (Eds.), Boca Raton, FL: CRC Press), 훨씬 더 특히 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합될 때 염기 치환의 실시양태이다. 변형된 핵염기는 미국 특허 번호 3,687,808, 뿐만 아니라 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,596,091; 5,614,617; 5,681,941; 5,750,692; 5,763,588; 5,830,653; 6,005,096; 및 미국 특허 출원 공보 2003/0158403에 기재되어 있다.

[0290] 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제를 코딩하는 가이드 RNA 및/또는 mRNA (또는 DNA)는 올리고뉴클레오티드의 활성, 세포 분포 또는 세포 흡수를 증가시키는 1개 이상의 모이어티 또는 접합체에 화학적으로 연결된다. 이러한 모이어티에는 지질 모이어티, 예컨대 콜레스테롤 모이어티 (Letsinger, R. L. et al. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86(17):6553-6556); 콜산 (Manoharan, M. et al. (1994). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 4(8):1053-1060); 티오에테르, 예를 들어, 핵실-S-트리틸티올 (Manoharan, M. et al. (1992). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 660(1):306-309; 및 Manoharan, M. et al. (1993). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 3(12):2765-2770); 티오콜레스테롤 (Oberhauser, B. et al. (1992). *Nucl. Acids Res.*, 20(3):533-538); 지방족 쇠, 예를 들어, 도데칸디올 또는 운데실 잔기 (Kabanov, A. V. et al. (1990). *FEBS Lett.*, 259(2):327-330 및 Svinarchuk, F. P. et al. (1993). *Biochimie*, 75(1-2):49-54); 인지질, 예를 들어, 디-핵사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸 암모늄 1,2-디-O-핵사데실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트 (Manoharan et al. (1995). *Tetrahedron Lett.*, 36(21):3651-3654 및 Shea, R. G. et al. (1990). *Nucl. Acids Res.*, 18(13):3777-3783); 폴리아민 또는 폴리 에틸렌 글리콜 쇠 (Manoharan, M. et al. (1995). *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 14(3-5): 969-973); 아다만탄 아세트산 (Manoharan, M. et al. (1995). *Tetrahedron Lett.*, 36(21):3651-3654); 팔미틸 모이어티 (Mishra, R. K. et al. (1995). *Biochim. Biophys. Acta*, 1264(2):229-237); 또는 옥타데실아민 또는 핵실아미노-카르보닐-t 옥시콜레스테롤 모이어티 (Crooke, S. T. et al. (1996). *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 277(2):923-937)가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 미국 특허 번호 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599, 928; 및 5,688,941 또한 참고한다.

- [0291] 일부 실시양태에서, 당 및 다른 모이어티를 이용하여 양이온성 폴리솜 및 리포솜과 같은 뉴클레오티드를 갖는 단백질 및 복합체를 특정한 부위로 표적화할 수 있다. 예를 들어, 간 세포 지정된 전달은 아시알로당단백질 수용체 (ASGPR)를 통해 매개될 수 있으며; 예를 들어, [Hu, J. et al. (2014). *Protein Pept. Lett.*, 21(10):1025-1030]을 참고한다. 관련 기술분야에 공지되고 정기적으로 개발된 다른 시스템을 이용하여 본 발명에서 사용되는 생체분자 및/또는 그의 복합체를 특정한 관심 표적 세포에 표적화할 수 있다.
- [0292] 일부 실시양태에서, 이들 표적화 모이어티 또는 접합체에는 관능기, 예컨대 1급 또는 2급 히드록실 기에 공유 결합된 접합체 그룹이 포함될 수 있다. 본 개시내용의 접합체 그룹에는 인터칼레이터, 리포터 분자, 폴리아민, 폴리아미드, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리에테르, 올리고머의 약력학 성질을 증강시키는 그룹, 및 올리고머의 약동학 성질을 증강시키는 그룹이 포함된다. 예시적인 접합체 그룹에는 콜레스테롤, 지질, 인지질, 비오틴, 페나진, 플레이트, 페난트리딘, 안트라퀴논, 아크리딘, 플루오레세인, 로다민, 코우마린 및 염료가 포함된다. 본 개시내용의 맥락에서 약력학 성질을 증강시키는 그룹에는 흡수를 개선시키고, 분해에 대한 내성을 증강시키고/거나, 표적 핵산과의 서열-특이적인 혼성화를 강화시키는 그룹이 포함된다. 본 개시내용의 맥락에서 약동학 성질을 증강시키는 그룹에는 본 개시내용의 화합물의 흡수, 분포, 대사 또는 배설을 개선시키는 그룹이 포함된다. 대표적인 접합체 그룹은 국제 특허 출원 번호 PCT/US92/09196 (1992년 10월 23일 출원), 및 미국 특허 번호 6,287,860에 기재되어 있으며, 이들은 본원에 참고로 포함된다. 접합체 모이어티에는 지질 모이어티, 예컨대 콜레스테롤 모이어티, 콜산, 티오에테르, 예를 들어, 핵실-5-트리틸티올, 티오콜레스테롤, 지방족 쇠, 예를 들어, 도데칸디올 또는 운데실 잔기, 인지질, 예를 들어, 디-헥사데실-rac-글리세롤 또는 트리에틸암모늄 1,2-디-O-헥사데실-rac-글리세로-3-H-포스포네이트, 폴리아민 또는 폴리에틸렌 글리콜 쇠, 또는 아다만탄 아세트산, 팔미틸 모이어티, 또는 옥타데실아민 또는 핵실아미노-카르보닐-옥시 콜레스테롤 모이어티가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 미국 특허 번호 4,828,979; 4,948,882; 5,218,105; 5,525,465; 5,541,313; 5,545,730; 5,552,538; 5,578,717; 5,580,731; 5,580,731; 5,591,584; 5,109,124; 5,118,802; 5,138,045; 5,414,077; 5,486,603; 5,512,439; 5,578,718; 5,608,046; 4,587,044; 4,605,735; 4,667,025; 4,762,779; 4,789,737; 4,824,941; 4,835,263; 4,876,335; 4,904,582; 4,958,013; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,082,830; 5,112,963; 5,214,136; 5,245,022; 5,254,469; 5,258,506; 5,262,536; 5,272,250; 5,292,873; 5,317,098; 5,371,241; 5,391,723; 5,416,203; 5,451,463; 5,510,475; 5,512,667; 5,514,785; 5,565,552; 5,567,810; 5,574,142; 5,585,481; 5,587,371; 5,595,726; 5,597,696; 5,599,923; 5,599,928 및 5,688,941을 참고한다.
- [0293] 화학적 합성이 쉽지 않고 일반적으로 효소적 합성에 의해 생성되는 보다 긴 폴리뉴클레오티드는 또한 다양한 수단에 의해 변형될 수 있다. 이러한 변형에는 예를 들어 중심 뉴클레오티드 유사체의 도입, 분자의 5' 또는 3' 말단에서 특정한 서열 또는 다른 모이어티의 통합, 및 다른 변형이 포함될 수 있다. 예시적으로, Cas9를 코딩하는 mRNA는 대략 4 kb 길이이고, 시험관내 전사에 의해 합성될 수 있다. mRNA에 대한 변형은 예를 들어 그의 번역 또는 안정성을 증가시키기 위해 (예컨대 세포에 의한 분해에 대한 그의 내성을 증가시킴으로써) 또는 외인성 RNA, 특히 Cas9를 코딩하는 더 긴 RNA의 도입 후에 세포에서 종종 관찰되는 선천성 면역 반응을 RNA가 유도하는 경향을 감소시키기 위해 적용될 수 있다.
- [0294] 이러한 수많은 변형, 예컨대 폴리A 꼬리, 5' 캡 유사체 (예를 들어, 안티 리버스 캡 유사체 (ARCA) 또는 m7G(5')ppp(5')G (mCAP)), 변형된 5' 또는 3' 비번역 영역 (UTR), 변형된 염기 (예컨대 슈도-UTP, 2-티오-UTP, 5-메틸시티딘-5'-트리포스페이트 (5-메틸-CTP) 또는 N6-메틸-ATP)의 사용, 또는 5' 말단 포스페이트의 제거를 위한 포스파타제 처리가 기재되어 있다. 이들 및 다른 변형은 관련 기술분야에 공지되어 있고, RNA의 새로운 변형은 정기적으로 개발되고 있다.
- [0295] 변형된 RNA의 수많은 상업적 공급업체, 예를 들어 트리링크 바이오텍(TriLink Biotech), 악소랩스(AxoLabs), 바이오-신테시스 인크.(Bio-Synthesis Inc.), 다마콘(Dharmacon) 등이 있다. 트리링크에 의해 기재된 바와 같이, 예를 들어, 5-메틸-CTP는 증가된 뉴클레아제 안정성, 증가된 번역, 또는 선천성 면역 수용체와 시험관내 전사된 RNA의 감소된 상호작용과 같은 바람직한 특징을 부여하기 위해 사용될 수 있다. 5-메틸시티딘-5'-트리포스페이트 (5-메틸-CTP), N6-메틸-ATP, 뿐만 아니라 슈도-UTP 및 2-티오-UTP는 또한 하기 언급된 [Kormann et al. (2011) 및 Warren et al. (2010)]에 의해 공보에서 설명된 바와 같이, 번역을 증강시키면서 배양물에서 및 생체내에서 선천성 면역 자극을 감소시키는 것으로 확인되었다.
- [0296] 생체내에서 전달된 화학적으로 변형된 mRNA를 사용하여 개선된 치료 효과를 달성할 수 있는 것으로 확인되었으며; 예를 들어, [Kormann, M. S. D. et al. (2011). *Nat. Biotechnol.*, 29:154-157]을 참고한다. 이러한 변형을 이용하여, 예를 들어 RNA 분자의 안정성을 증가시키고/거나, 그의 면역원성을 감소시킬 수 있다. 화학적 변

형, 예컨대 슈도-U, N6-메틸-A, 2-티오-U, 및 5-메틸-C를 이용하여, 우리딘 및 시티딘 잔기의 1/4만을 각각 2-티오-U 및 5-메틸-C로 감소시키면 마우스에서 mRNA의 톨-유사 수용체 (TLR) 매개된 인식이 일어나는 것으로 확인되었다. 선천성 면역계의 활성화를 감소시킴으로써, 이들 변형을 이용하여 생체내에서 mRNA의 안정성 및 수명을 효과적으로 증가시킬 수 있으며; 예를 들어 [Kormann et al. (2011)]을 참고한다.

[0297] 선천성 항-바이러스 반응을 우회하도록 설계된 변형을 도입한 합성 메신저 RNA의 반복된 투여는 분화된 인간 세포를 만능성으로 재프로그래밍할 수 있는 것 또한 확인되었다. 예를 들어, [Warren, L. et al. (2010). *Cell Stem Cell*, 7(5):618-630]을 참고한다. 일차 재프로그래밍 단백질로서 작용하는 이러한 변형된 mRNA는 재프로그래밍 다중 인간 세포 유형의 효율적인 수단일 수 있다. 이러한 세포는 유도된 만능성 줄기 세포 (iPSC)로 지칭되고, 5-메틸-CTP, 슈도-UTP 및 안티 리버스 캡 유사체 (ARCA)를 통합하여 효소적으로 합성된 RNA를 이용하여 세포의 항바이러스 반응을 효과적으로 회피할 수 있으며; 예를 들어, [Warren et al. (2010)]을 참고한다.

[0298] 관련 기술분야에 기재된 폴리뉴클레오티드의 다른 변형에는 예를 들어 폴리A 꼬리의 사용, 5' 캡 유사체 (예컨대 m7G(5')ppp(5')G (mCAP))의 추가, 5' 또는 3' 비번역 영역 (UTR)의 변형, 또는 5' 말단 포스페이트의 제거를 위한 포스파타제 처리가 포함되며, 새로운 접근법이 정기적으로 개발되고 있다.

[0299] 본원에서 사용하기 위한 변형된 RNA의 생성에 적용가능한 수많은 조성물 및 기술이 RNA 간섭 (RNAi), 예컨대 소형-간섭 RNA (siRNA)의 변형과 관련하여 개발되었다. siRNA는 mRNA 간섭을 통한 유전자 침묵에 대한 그의 효과가 일반적으로 일시적어서 반복 투여가 필요할 수 있기 때문에 생체내에서는 특별한 도전을 나타낸다. 추가로, siRNA는 이중-가닥 RNA (dsRNA)이고, 포유동물 세포는 종종 바이러스 감염의 부산물인 dsRNA를 검출하고 중화시키도록 진화된 면역 반응을 갖는다. 따라서, 포유동물 효소, 예컨대 PKR (dsRNA-반응성 키나제), 및 잠재적으로 dsRNA에 대한 세포 반응을 매개할 수 있는 레티노산-유도성 유전자 I (RIG-I), 뿐만 아니라 이러한 분자에 대한 반응으로 시토카인의 유도를 촉발시킬 수 있는 톨-유사 수용체 (예컨대 TLR3, TLR7, 및 TLR8)가 있으며; 예를 들어, [Angart, P. et al. (2013). *Pharmaceuticals*, 6(4):440-468; Kanasty, R. L. et al. (2012). *Mol. Ther.*, 20(3):513-524; Burnett, J. C. et al. (2011). *Biotechnol. J.*, 6(9):1130-1146; Judge, A. D. (2008). *Hum. Gene Ther.*, 19(2):111-124] 및 그에 인용된 참고문헌에 의한 검토를 참고한다.

[0300] 본원에 기재된 바와 같이 RNA 안정성을 증강시키고, 선천성 면역 반응을 감소시키고/거나, 폴리뉴클레오티드를 인간 세포에 도입하는 것과 관련하여 유용할 수 있는 다른 이익을 달성하기 위해 다양한 변형이 개발되고 적용되었으며; 예를 들어, [Whitehead, K. A. et al. (2011). *Ann. Rev.Chem. Biomolec. Eng.*, 2:77-96; Gaglione, M. et al. (2010). *Mini Rev. Med. Chem.*, 10(7):578-595; Chernolovskaya, E. L. et al. (2010). *Curr. Opin. Mol Ther.*, 12(2):158-167; Deleavey, G. G. et al. (2009). *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, 39(1):16.3.1-16.3.22; Behlke, M. A. (2008). *Oligonucleotides*, 18(4):305-319; Fucini, R. V. et al. (2012). *Nucleic Acid Ther.*, 22(3):205-210; Bremsen, J. B. et al. (2012). *Front. Genet.*, 3:154]에 의한 검토를 참고한다.

[0301] 상기 언급된 바와 같이, 변형된 RNA의 수많은 상업적 공급업체가 있으며, 이 중 다수는 siRNA의 효과를 개선시키도록 설계된 변형을 전문으로 한다. 다양한 접근법이 문헌에서 보고된 다양한 발견을 기반으로 하여 제공된다. 예를 들어, 다마콘은 비-가교 산소의 황 (포스포로티오에이트, PS)으로의 대체가 [Kole, R. (2012). *Nat. Rev. Drug Disc.*, 11(2):125-140]에 의해 보고된 바와 같이 siRNA의 뉴클레아제 내성을 개선시키기 위해 광범위하게 사용되었음을 나타낸다. 리보스의 2'-위치의 변형은 듀플렉스 안정성 (Tm)을 증가시키면서 뉴클레오티드간 포스페이트 결합의 뉴클레아제 내성을 개선시키는 것으로 보고되었으며, 이는 또한 면역 활성화로부터 보호를 제공하는 것으로 확인되었다. 중간 정도의 PS 백본 변형과 작은 잘 허용되는 2'-치환 (2'-O-메틸, 2'-플루오로, 2'-히드로)의 조합은 [Soutschek, J. et al. (2004). *Nature*, 432:173-178]에 의해 보고된 바와 같이 생체내 적용을 위해 매우 안정한 siRNA와 관련이 있고; 2'-O-메틸 변형은 [Volkov, A. A. et al. (2009). *Oligonucleotides*, 19:191-202]에 의해 보고된 바와 같이 안정성을 개선시키는데 효과적인 것으로 보고되었다. 선천성 면역 반응의 유도를 감소시키는 것과 관련하여, 특정한 서열을 2'-O-메틸, 2'-플루오로, 2'-히드로에 의해 변형시키는 것이 일반적으로 침묵 활성을 유지하면서 TLR7/TLR8 상호작용을 감소시키는 것으로 보고되었으며; 예를 들어, [Judge, A. D. et al. (2006). *Mol. Ther.*, 13:494-505; 및 Cekaite, L. et al. (2007). *J. Mol. Biol.*, 365(1):90-108]을 참고한다. 추가의 변형, 예컨대 2-티오우라실, 슈도우라실, 5-메틸 시토신, 5-메틸우라실, 및 N6-메틸아데노신은 또한 TLR3, TLR7 및 TLR8에 의해 매개된 면역 효과를 최소화시키는 것으로 확인되었으며; 예를 들어, [Kariko, K. et al. (2005). *Immunity*, 23(2):165-175]를 참고한다.

[0302] 관련 기술분야에 공지되고 상업적으로 입수가능한 바와 같이, 예를 들어 콜레스테롤, 토크페롤 및 염산, 지질,

펩티드, 중합체, 링커 및 압타머를 비롯하여 세포에 의한 그들의 전달 및/또는 흡수를 증강시킬 수 있는 수많은 접합체가 본원에서 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드, 예컨대 RNA에 적용될 수 있으며; 예를 들어, [Winkler, J. (2013). *Ther. Deliv.*, 4(7):791-809] 및 그에 인용된 문헌에 의한 검토를 참고한다.

[0303] **전달**

[0304] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 방법에서 사용된 임의의 핵산 분자, 예를 들어 본 개시내용의 게놈-표적화 핵산 및/또는 부위-지정 폴리펩티드를 코딩하는 핵산은 세포에 전달하기 위해 전달 비히클의 표면 내에 또는 상에서 패키징된다. 고려되는 전달 비히클에는 나노구, 리포솜, 양자점, 나노입자, 폴리에틸렌 글리콜 입자, 히드로겔, 및 미셀이 포함되나 이로 제한되지 않는다. 관련 기술분야에 기재된 바와 같이, 다양한 표적화 모이어티를 사용하여 이러한 비히클과 원하는 세포 유형 또는 위치의 우선적인 상호작용을 증강시킬 수 있다.

[0305] 본 개시내용의 복합체, 폴리펩티드 및 핵산의 세포로의 도입은 바이러스 또는 박테리오파지 감염, 형질감염, 접합, 원형질체 융합, 리포펙션, 전기천공, 뉴클레오펙션, 인산칼슘 침전, 폴리에틸렌이민 (PEI)-매개된 형질감염, DEAE-덱스트란 매개된 형질감염, 리포솜-매개된 형질감염, 입자 총 기술, 인산칼슘 침전, 직접적인 미세-주사, 나노입자-매개된 핵산 전달 등에 의해 발생할 수 있다.

[0306] 실시양태에서, 가이드 RNA 폴리뉴클레오티드 (RNA 또는 DNA) 및/또는 엔도뉴클레아제 폴리뉴클레오티드(들) (RNA 또는 DNA)은 관련 기술분야에 공지된 바이러스 또는 비-바이러스 전달 비히클에 의해 전달될 수 있다. 대안적으로, 엔도뉴클레아제 폴리펩티드(들)은 관련 기술분야에 공지된 바이러스 또는 비-바이러스 전달 비히클, 예컨대 전기천공 또는 지질 나노입자에 의해 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제는 하나 이상의 폴리펩티드로서 단독으로, 또는 하나 이상의 가이드 RNA와, 또는 tracrRNA와 함께 하나 이상의 crRNA와 사전 복합체화되어 전달될 수 있다.

[0307] 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 비-바이러스 전달 비히클, 예컨대 비제한적으로, 나노입자, 리포솜, 리보핵단백질, 양으로 하전된 펩티드, 소분자 RNA-접합체, 압타머-RNA 키메라, 및 RNA-융합 단백질 복합체에 의해 전달될 수 있다. 일부 예시적인 비-바이러스 전달 비히클은 [Peer, D. et al. (2011). *Gene Ther.*, 18:1127-1133]에 기재되어 있다 (다른 폴리뉴클레오티드의 전달에도 유용한 siRNA를 위한 비-바이러스 전달 비히클에 중점을 둠).

[0308] 실시양태에서, 엔도뉴클레아제를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 예컨대 가이드 RNA, sgRNA 및 mRNA는 지질 나노입자 (LNP)에 의해 세포 또는 대상체에게 전달될 수 있다.

[0309] 핵산을 위한 몇몇 비-바이러스 전달 방법은 동물 모델에서 및 인간에서 모두 시험되었지만, 가장 잘 개발된 시스템은 지질 나노입자이다. 지질 나노입자 (LNP)는 일반적으로 이온화가능한 양이온성 지질 및 3가지 초과 추가의 성분, 일반적으로 콜레스테롤, DOPE, 및 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 함유 지질로 구성된다. 양이온성 지질은 핵을 분해로부터 보호하는 고밀도 복합체를 형성하는 양으로 하전된 핵산에 결합할 수 있다. 마이크로유체 시스템을 통과하는 동안, 성분들이 자가 조립되어 50 내지 150 nm의 크기 범위를 갖는 입자를 형성하고, 핵산은 양이온성 지질과 함께 복합체화되고 지질 이중층과 같은 구조로 둘러싸인 코어에 캡슐화된다. 엔도시토시스 이후에, LNP가 엔도솜에 존재한다. 캡슐화된 핵산은 양이온성 지질의 이온화가능한 성질에 의해 매개되는 엔도솜 탈출 과정을 겪는다. 이는 핵산을 세포질로 전달하고, mRNA는 코딩된 단백질로 번역될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, Cas9를 코딩하는 gRNA 및 mRNA를 LNP에 캡슐화하여, IV 주사 이후에 두 성분 모두를 세포에 효율적으로 전달한다. 엔도솜 탈출 이후에, Cas9 mRNA는 Cas9 단백질로 번역되고, gRNA와 복합체를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵 국소화 신호를 Cas9 단백질 서열에 포함시키면 핵으로 Cas9 단백질/gRNA 복합체의 전파가 촉진된다. 대안적으로, 작은 gRNA는 핵 코어 복합체를 가로질러, 핵에서 Cas9 단백질과 복합체를 형성한다. 일단 핵에서 gRNA/Cas9 복합체가 상동성 표적 부위에 대한 게놈을 스캐닝하고, 게놈의 원하는 표적 부위에서 우세하게 이중-가닥 절단을 생성한다. RNA 분자의 생체내 반감기는 일반적으로 대략 수시간 내지 수일로 짧다. 유사하게, 단백질의 반감기는 대략 수시간 내지 수일로 짧은 경향이 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, LNP를 사용하는 gRNA 및 Cas9 mRNA의 전달은 gRNA/Cas9 복합체의 일시적인 발현 및 활성만을 일으킬 수 있다. 이는 오프-타겟 절단의 빈도를 감소시키는 이점을 제공할 수 있고, 따라서 일부 실시양태에서 유전자 독성의 위험을 최소화시킬 수 있다. LNP는 일반적으로 바이러스 입자에 비해 덜 면역원성이다. 여러 인간이 AAV에 대한 기존의 면역력을 갖고 있지만, LNP에 대한 기존의 면역력은 없다. LNP에 대한 추가의 및 적응성 면역 반응이 발생할 가능성은 낮으며, 이는 LNP의 반복 투여를 가능하게 한다.

[0310] 몇몇 상이한 이온화가능한 양이온성 지질은 LNP에서의 사용을 위해 개발되었다. 이들에는 특히 C12-200 (Love,

K. T. et al. (2010). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(5):1864-1869), MC3, LN16, MD1이 포함된다. LNP의 한 유형에서는, GalNac 모이어티가 LNP의 외부에 부착되고, 아시알릴로당단백질 수용체를 통한 흡수를 위해 리간드로서 작용한다. 임의의 이들 양이온성 지질은 gRNA 및 Cas9 mRNA를 세포에 전달하도록 LNP를 제형화하기 위해 사용된다.

- [0311] 일부 실시양태에서, LNP는 1000 nm, 500 nm, 250 nm, 200 nm, 150 nm, 100 nm, 75 nm, 50 nm 또는 25 nm 미만의 직경을 갖는 임의의 입자를 지칭한다. 대안적으로, 나노입자는 1-1000 nm, 1-500 nm, 1-250 nm, 25-200 nm, 25-100 nm, 35-75 nm, 또는 25-60 nm 크기의 범위일 수 있다.
- [0312] LNP는 양이온성, 음이온성 또는 중성 지질로부터 제조될 수 있다. 중성 지질, 예컨대 용해성 인지질 DOPE 또는 막 성분 콜레스테롤은 '헬퍼 지질'로서 LNP에 포함되어 형질감염 활성 및 나노입자 안정성을 증강시킬 수 있다. 양이온성 지질의 제한에는 불량한 안정성 및 급속한 클리어런스로 인한 낮은 효율, 뿐만 아니라 염증 또는 항-염증 반응의 생성이 포함된다. LNP는 또한 소수성 지질, 친수성 지질, 또는 소수성 및 친수성 지질 둘 다를 가질 수 있다.
- [0313] 관련 기술분야에 공지된 임의의 지질 또는 지질의 조합물을 이용하여 LNP를 생성할 수 있다. LNP를 생성하기 위해 사용되는 지질의 예는 다음과 같다: DOTMA, DOSPA, DOTAP, DMRIE, DC-콜레스테롤, DOTAP-콜레스테롤, GAP-DMORIE-DPyPE, 및 GL67A-DOPE-DMPE-폴리에틸렌 글리콜 (PEG). 양이온성 지질의 예는 다음과 같다: 98N12-5, C12-200, DLin-KC2-DMA (KC2), DLin-MC3-DMA (MC3), XTC, MD1, 및 7C1. 중성 지질의 예는 다음과 같다: DPSC, DPPC, POPC, DOPE, 및 SM. PEG-변형된 지질의 예는 다음과 같다: PEG-DMG, PEG-CerC14, 및 PEG-CerC20.
- [0314] 실시양태에서, 지질은 LNP를 생성하기 위해 임의의 수의 몰비로 조합될 수 있다. 추가로, 폴리뉴클레오티드(들)은 LNP를 생성하기 위해 광범위한 몰비로 지질(들)과 조합될 수 있다.
- [0315] 실시양태에서, 부위-지정 폴리펩티드 및 게놈-표적화 핵산 각각은 세포 또는 대상체에 별도로 투여될 수 있다. 한편, 부위-지정 폴리펩티드는 하나 이상의 가이드 RNA와, 또는 tracrRNA와 함께 하나 이상의 crRNA와 사전 복합체화될 수 있다. 이어서, 사전 복합체화된 물질을 세포 또는 대상체에 투여할 수 있다. 이러한 사전 복합체화된 물질은 리보핵단백질 입자 (RNP)로서 공지되어 있다.
- [0316] RNA는 RNA 또는 DNA와 특이적인 상호작용을 형성할 수 있다. 이러한 성질이 여러 생물학적 과정에서 활용되지만, 핵산-풍부 세포 환경에서 무차별적인 상호작용의 위험을 또한 안고 있다. 이 문제점을 해결하기 위한 한 해결책은 RNA가 엔도뉴클레아제와 사전 복합체화된 리보핵단백질 입자 (RNP)를 형성하는 것이다. RNP의 또 다른 이점은 RNA를 분해로부터 보호하는 것이다.
- [0317] 일부 실시양태에서, RNP에서 엔도뉴클레아제는 변형되거나 또는 변형되지 않을 수 있다. 마찬가지로, gRNA, crRNA, tracrRNA, 또는 sgRNA는 변형되거나 또는 변형되지 않을 수 있다. 수많은 변형이 관련 기술분야에 공지되어 있고 이용될 수 있다.
- [0318] 엔도뉴클레아제 및 sgRNA는 일반적으로 1:1 몰비로 조합될 수 있다. 대안적으로, 엔도뉴클레아제, crRNA, 및 tracrRNA는 일반적으로 1:1:1 몰비로 조합될 수 있다. 그러나, RNP를 생성하기 위해 광범위한 몰비가 이용될 수 있다.
- [0319] 유전자 편집 성분은 몇몇 메커니즘을 통해 세포의 핵으로 전달될 수 있다. 이들 메커니즘은 일반적으로 바이러스 및 비-바이러스 전달로 분류될 수 있다. 여러 적용을 위해, 바이러스 및 비-바이러스 전달의 조합이 이용될 수 있다.
- [0320] 일부 실시양태에서, 재조합 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터가 전달을 위해 이용될 수 있다. 전달된 폴리뉴클레오티드, rep, 및 캡 유전자를 포함하는 패키징될 AAV 게놈, 및 헬퍼 바이러스 기능을 세포에 제공하는 rAAV 입자의 제작에 적합한 전략, 기술 및 시스템이 관련 기술분야에 공지되어 있다. rAAV의 생성은 일반적으로 하기 성분이 단일 세포 (본원에서 패키징 세포로 지칭됨) 내에 존재하는 것을 필요로 한다: rAAV 게놈, AAV rep, 및 rAAV 게놈과 떨어져 있는 (예컨대 그 안에 있지 않은) 캡 유전자, 및 헬퍼 바이러스 기능. rAAV를 생성하기 위한 일반적인 접근법에는 일시적인 형질감염, 곤충-마쿨로바이러스 이중 감염, 및 곤충-마쿨로바이러스 단일 감염이 포함된다. 이와 관련된 추가의 정보는 예를 들어 [Ayuso, E. et al. (2010). *Curr. Gene Ther.*, 10(6):423-436; Mietzsch, M. et al. (2014). *Hum. Gene Ther.*, 25(3):212-222; Mietzsch, M. et al. (2015). *Hum. Gene Ther.*, 26(10):688-697; 및 Mietzsch, M. et al. (2017). *Hum. Gene Ther. Method*, 28(1):15-22]에서 확인할 수 있다.

[0321] 일반적으로, AAV rep 및 캡 유전자는 재조합 바이러스가 유래될 수 있는 임의의 AAV 혈청형으로부터의 것일 수 있고, rAAV 계놈 ITR과 상이한 AAV 혈청형, 예컨대 비제한적으로, AAV 혈청형 AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5, AAV-6, AAV-7, AAV-8, AAV-9, AAV-10, AAV-11, AAV-12, AAV-13, 및 AAV rh.74로부터의 것일 수 있다. 추가로, 바이러스의 상이한 천연 발생 및/또는 합성 혈청형을 이용하여 특이적인 조직 유형을 표적화할 수 있다. 위형(pseudotyped) rAAV의 생성은 예를 들어 국제 특허 출원 공개 번호 WO 01/83692에 게시되어 있다. 표 1A는 선택된 일부 AAV의 AAV 혈청형 및 진뱅크 수탁 번호를 열거한다.

[0322] 표 1A

AAV 혈청형	진뱅크 수탁 번호
AAV-1	NC_002077.1
AAV-2	NC_001401.2
AAV-3	NC_001729.1
AAV-3B	AF028705.1
AAV-4	NC_001829.1
AAV-5	NC_006152.1
AAV-6	AF028704.1
AAV-7	NC_006260.1
AAV-8	NC_006261.1
AAV-9	AX753250.1
AAV-10	AY631965.1
AAV-11	AY631966.1
AAV-12	DQ813647.1
AAV-13	EU285562.1

[0323] 일부 실시양태에서, 팩키징 세포를 생성하는 방법은 AAV 입자 생성을 위해 필요한 모든 성분을 안정하게 발현하는 세포주를 생성하는 것을 수반한다. 예를 들어, AAV rep 및 캡 유전자가 결합된 rAAV 계놈을 갖는 플라스미드 (또는 다중 플라스미드)에서, AAV rep 및 캡 유전자는 rAAV 계놈과 분리되어 있고, 선택가능한 마커, 예컨대 네오마이신 내성 유전자는 세포의 계놈에 통합된다. AAV 계놈은 GC 꼬리 형성 (Samulski, R. J. et al. (1982). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79(6):2077-2081), 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위를 함유하는 합성 링커의 추가 (Laughlin, C. A. et al. (1983). *Gene*, 23(1):65-73) 또는 직접적인 평활말단 라이게이션 (Senapathy, P. (1984). *J. Biol. Chem.*, 259:4661-4666)과 같은 절차에 의해 박테리아 플라스미드에 도입되었다. 이어서, 팩키징 세포주를 헬퍼 바이러스, 예컨대 아데노바이러스로 감염시킨다. 이 방법의 이점은 세포가 선택가능하고, rAAV의 대규모 생성에 적합하다는 것이다. 적합한 방법의 다른 예는 플라스미드가 아니라 아데노바이러스 또는 바쿨로바이러스를 사용하여 rAAV 계놈 및/또는 rep 및 캡 유전자를 팩키징 세포에 도입시키는 것이다.

[0325] rAAV 생성의 일반적인 원칙은 예를 들어 [Carter, B. J. (1992). *Curr. Opin. Biotechnol.*, 3(5):533-539; 및 Muzyczka, M. (1992). *Curr. Topics Microbiol. Immunol.*, 158:97-129]에 검토되어 있다. 다양한 접근법이 [Tratschin, J. D. et al. (1984). *Mol. Cell. Biol.*, 4(10):2072-2081; Hermonat, P. L. et al. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81(2):6466-6470; Tratschin, J. D. et al. (1985). *Mol. Cell. Biol.*, 5(11):3251-3260; McLaughlin, S. K. et al. (1988). *J. Virol.*, 62(6):1963-1973; 및 Lebkowski, J. S. et al. (1988). *Mol. Cell. Biol.*, 8(10):3988-3996. Samulski, R. J. et al. (1989). *J. Virol.*, 63(9):3822-3828]; 미국 특허 번호 5,173,414; WO 95/13365 및 상응하는 미국 특허 번호 5,658,776; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; [Perrin, P. et al. (1995) *Vaccine*, 13(13):1244-1250; Paul, R. W. et al. (1993). *Hum. Gene Ther.*, 4(5):609-615; Clark, K. R. et al. (1996) *Gene Ther.*, 3(12):1124-1132]; 미국 특허 번호 5,786,211; 미국 특허 번호 5,871,982; 및 미국 특허 번호 6,258,595에 기재되어 있다.

- [0326] AAV 벡터 혈청형은 세포 유형을 표적화하도록 매칭될 수 있다. 예를 들어, 하기 예시적인 세포 유형이 특히 지정된 AAV 혈청형에 의해 형질도입될 수 있다. 예를 들어, 간 조직/세포 유형에 대해 적합한 AAV 벡터의 혈청형에는 AAV3, AAV5, AAV8, 및 AAV9가 포함되나 이로 제한되지 않는다. 일부 경우에, AAV 혈청형은 시험될 집단 또는 개체에서 낮은 면역원성을 위해 선택된다.
- [0327] 아데노-연관 바이러스 벡터 외에도, 다른 바이러스 벡터가 사용될 수 있다. 이러한 바이러스 벡터에는 렌티바이러스, 알파바이러스, 엔테로바이러스, 페스티바이러스, 바쿠로바이러스, 헤르페스바이러스, 엡스타인 바르 바이러스, 파포바이러스, 수두 바이러스, 우두 바이러스, 및 단순 포진 바이러스가 포함되나 이로 제한되지 않는다.
- [0328] 일부 실시양태에서, Cas9 mRNA, 피브리노겐- α 유전자에서 1개 또는 2개의 유전자좌를 표적화하는 sgRNA, 및 공여자 DNA 각각은 지질 나노입자로 별도로 제형화되거나, 또는 모두 하나의 지질 나노입자로 공동 제형화되거나, 또는 2가지 이상의 지질 나노입자로 공동 제형화된다.
- [0329] 일부 실시양태에서, Cas9 mRNA는 지질 나노입자로 제형화되지만, sgRNA 및 공여자 DNA는 AAV 벡터로 전달된다. 일부 실시양태에서, Cas9 mRNA 및 sgRNA는 지질 나노입자로 공동 제형화되지만, 공여자 DNA는 AAV 벡터로 전달된다.
- [0330] DNA 플라스미드로서, mRNA로서 또는 단백질로서 Cas9 뉴클레아제를 전달하는 옵션이 이용가능하다. 가이드 RNA는 동일한 DNA로부터 발현될 수 있거나, 또는 RNA로서 전달될 수 있다. RNA는 그의 반감기를 변경시키거나 개선시키도록 및/또는 면역 반응의 가능성 또는 정도를 감소시키도록 화학적으로 변형될 수 있다. 엔도뉴클레아제 단백질은 전달 이전에 gRNA와 복합체화될 수 있다. 바이러스 벡터는 효율적인 전달을 가능하게 하고; Cas9의 분할 버전 및 Cas9의 더 작은 병렬상동체는 HDR에 대한 공여자와 마찬가지로 AAV에 패키징될 수 있다. 이들 성분 각각을 전달할 수 있는 광범위한 비-바이러스 전달 방법 또한 존재하거나, 또는 비-바이러스 및 바이러스 방법을 함께 이용할 수 있다. 예를 들어, 나노입자는 단백질 및 가이드 RNA를 전달하기 위해 이용될 수 있는 반면에, AAV는 공여자 DNA를 전달하기 위해 이용될 수 있다.
- [0331] 치료적 처치를 위해 게놈-편집 성분을 전달하는 것과 관련된 일부 실시양태에서, 적어도 2가지 성분, 예를 들어 림프구, 서열-특이적인 뉴클레아제 (예컨대 부위-지정 폴리펩티드, 예를 들어 DNA 엔도뉴클레아제, 예를 들어 핵산-유도된 뉴클레아제), 및 DNA 공여자 주형이 형질전환될 세포의 핵에 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 공여자 DNA 주형은 림프구에 대한 향성을 갖는 아데노 관련 바이러스 (AAV)에 패키징된다. 일부 실시양태에서, AAV는 혈청형 AAV8, AAV9, AAVrh10, AAV5, AAV6, 또는 AAV-DJ로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, AAV 패키징된 DNA 공여자 주형을 먼저 말초 IV 주사에 의해 대상체, 예를 들어 환자에게 투여한 후, 서열-특이적인 뉴클레아제 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제)를 투여한다. AAV 패키징된 공여자 DNA 주형의 전달의 이점은, 먼저 전달된 공여자 DNA 주형이 형질도입된 세포의 핵에서 안정하게 유지되어, 서열-특이적인 뉴클레아제 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제)의 후속적인 투여를 가능하게 하고, 이는 HDR 또는 NHEJ에 의한 DNA 공여자의 후속적인 통합에 의해 게놈에서 이중-가닥 절단을 생성할 것이라는 점이다. 일부 실시양태에서, 서열-특이적인 뉴클레아제 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제)가 원하는 치료 효과를 위한 충분한 수준에서 트랜스진의 표적화된 통합을 촉진시키는데 필요한 시간 동안만 표적 세포에서 활성으로 유지되는 것이 바람직하다. 서열-특이적인 뉴클레아제 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제)가 세포에서 연장된 시간 동안 활성을 유지하는 경우, 이는 오프-타겟 부위에서 이중-가닥 절단의 빈도를 증가시킬 것이다. 일반적으로, 오프-타겟 절단의 빈도는 오프-타겟 절단 효율에 뉴클레아제가 활성인 시간을 곱한 함수이다. mRNA 및 번역된 단백질은 세포에서 수명이 짧기 때문에, mRNA 형태의 서열-특이적인 뉴클레아제 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제)의 전달은 수시간 내지 수일 정도의 짧은 기간의 뉴클레아제 활성을 초래한다. 따라서, 공여자 주형을 이미 함유하는 세포에 서열-특이적인 뉴클레아제 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제)를 전달하는 것은 오프-타겟 통합에 대한 표적화된 통합의 비를 가능한 한 가장 높게 할 것으로 예상된다. 추가로, 말초 i.v. 주사 이후에 세포의 핵으로 공여자 DNA 주형의 AAV 매개된 전달은 일반적으로 대략 1 내지 14 일의 시간이 걸릴 것이고, 이는 바이러스가 세포를 감염시키고, 엔도솜으로부터 탈출하고, 핵으로 이동하여, 숙주 성분에 의해 단일-가닥 AAV 게놈을 이중-가닥 DNA 분자로 전환시켜야 하기 때문이다. 따라서, 적어도 일부 실시양태에서, 핵으로 공여자 DNA 주형의 전달은 CRISPR-Cas 성분을 전달하기 전에 완료되며, 이는 이들 뉴클레아제 성분이 일반적으로 활성 약 1 내지 3 일 동안 활성이기 때문이다.
- [0332] 일부 실시양태에서, 서열-특이적인 뉴클레아제 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제)는 Cas9 뉴클레아제와 함께 피브리노겐- α 유전자의 인트론 1 내에서 DNA 서열에 대해 지정된 sgRNA로 구성된 CRISPR-Cas9이다. 일부 실시양태에서, Cas9 뉴클레아제는 하나 이상의 핵 국소화 신호 (NLS)에 작동가능하게 융합된 Cas9 단백질을 코딩하는

mRNA로서 전달된다. 일부 실시양태에서, sgRNA 및 Cas9 mRNA는 지질 나노입자에 패키징함으로써 세포에 전달된다. 일부 실시양태에서, 지질 나노입자는 지질 C12-200을 함유한다 (Love, K. T. et al. (2010). *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 107(5):1864-1869). 일부 실시양태에서, LNP에 패키징된 sgRNA 대 Cas9 mRNA의 비는 1:1 (질량비)이어서, 마우스의 생체내에서 최대 DNA 절단을 일으킨다. 대안적인 실시양태에서, LNP에 패키징된 sgRNA 대 Cas9 mRNA의 상이한 질량비는 예를 들어 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 또는 2:1 또는 반대 비율로 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, Cas9 mRNA 및 sgRNA는 별도의 LNP 제형에 패키징되고, Cas9 mRNA를 함유하는 LNP는 sgRNA를 함유하는 LNP보다 약 1 내지 약 8 시간 전에 대상체에게 투여하여, sgRNA를 전달하기 전에 Cas9 mRNA가 번역되도록 최적의 시간을 허용한다.

[0333] 일부 실시양태에서, gRNA 및 Cas9 mRNA를 함유하는 LNP 제형 ("LNP-뉴클레아제 제형")은 AAV에 패키징된 DNA 공여자 주형이 이전에 투여된 대상체, 예를 들어 환자에게 투여된다. 일부 실시양태에서, LNP-뉴클레아제 제형은 AAV-공여자 DNA 주형을 투여한 후 1 일 내지 28 일 이내에 또는 7 일 내지 28 일 이내에 또는 7 일 내지 14 일 이내에 대상체에게 투여된다. AAV-공여자 DNA 주형과 비교하여 LNP-뉴클레아제 제형의 효과적인 전달 시기는 관련 기술분야에 공지된 기술, 예를 들어 마우스 및 원숭이를 비롯한 동물 모델에서 수행된 연구를 이용하여 결정될 수 있다.

[0334] 일부 실시양태에서, DNA-공여자 주형은 비-바이러스 전달 방법을 이용하여 대상체, 예를 들어 환자의 세포에게 투여된다. 일부 대상체 (일반적으로 30%)는 AAV에 의한 효율적인 유전자 전달을 방지하는 가장 흔히 사용되는 AAV 혈청형에 대해 지정된 기존의 중화 항체를 갖지만, 더 많은 대상체는 비-바이러스 전달 방법으로 치료할 수 있다. 몇몇 비-바이러스 전달 방법론은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 특히 지질 나노입자 (LNP)는 동물 및 인간에서 정맥내 주사 이후에 세포의 세포질로 그들의 캡슐화된 내용물을 효율적으로 전달하는 것으로 공지되어 있다. 이들 LNP는 수용체 매개된 엔도시토시스의 과정을 통해 세포에 의해 능동적으로 흡수된다.

[0335] 일부 실시양태에서, 공여자 주형의 핵 국소화를 촉진시키기 위해, 플라스미드의 핵 국소화를 촉진시킬 수 있는 DNA 서열, 예를 들어 유인원 바이러스 40 (SV40) 복제 기점 및 초기 프로모터의 366 bp 영역이 공여자 주형에 추가될 수 있다. 세포 단백질에 결합하는 다른 DNA 서열 또한 사용하여 DNA의 핵 진입을 개선시킬 수 있다.

[0336] 일부 실시양태에서, 도입된 POI (예를 들어, FVIII) 코딩 서열의 발현 또는 활성의 수준은, 예를 들어 AAV-공여자 DNA 주형 이후에 gRNA 및 Cas9 뉴클레아제 또는 Cas9 뉴클레아제를 코딩하는 mRNA를 함유하는 LNP-뉴클레아제 제형의 제1 투여 이후에, 대상체, 예를 들어 환자의 혈액에서 측정된다. POI 수준이 예를 들어 정상 수준의 적어도 5 내지 50%, 특히 5 내지 20%인 POI 수준으로 정의되는 바와 같이 질환을 치유하기에 충분하지 않은 경우에는, 피브리노겐- α 인트론 1 부위에 추가의 표적화된 통합을 촉진시키기 위해 LNP-뉴클레아제 제형의 제2 또는 제3 투여가 제공될 수 있다. POI의 원하는 치료 수준을 획득하기 위해 LNP-뉴클레아제 제형의 다중 용량을 사용하는 실행가능성은 관련 기술분야에 공지된 기술, 예를 들어 마우스 모델 및 원숭이 모델을 비롯한 동물 모델을 이용하는 시험을 이용하여 시험되고 최적화될 수 있다.

[0337] 일부 실시양태에서, i) 공여자 카세트를 포함하는 AAV-공여자 DNA 주형 및 ii) LNP-뉴클레아제 제형을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 본원에 기재된 임의의 방법에 따라, AAV-공여자 DNA 주형을 대상체에게 투여한 후 1 일 내지 28 일 이내에 LNP-뉴클레아제 제형의 초기 용량을 대상체에게 투여한다. 일부 실시양태에서, 공여자 DNA 주형을 표적 세포의 핵에 전달하기에 충분한 시간 후에, LNP-뉴클레아제 제형의 초기 용량을 대상체에게 투여한다. 일부 실시양태에서, 단일-가닥 AAV 게놈을 표적 세포의 핵에서 이중-가닥 DNA 분자로 전환시키기에 충분한 시간 후에, LNP-뉴클레아제 제형의 초기 용량을 대상체에게 투여한다. 일부 실시양태에서, 초기 용량을 투여한 후에, LNP-뉴클레아제 제형의 1회 이상의 (예컨대 2, 3, 4, 5회 또는 그 초과) 추가의 용량을 대상체에게 투여한다. 일부 실시양태에서, 공여자 카세트의 표적화된 통합의 목표 수준 및/또는 공여자 카세트의 발현의 목표 수준이 달성될 때까지, LNP-뉴클레아제 제형의 1회 이상의 용량을 대상체에게 투여한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 LNP-뉴클레아제 제형의 각각의 투여 이후에 공여자 카세트의 표적화된 통합의 수준 및/또는 공여자 카세트의 발현의 수준을 측정하고, 공여자 카세트의 표적화된 통합의 목표 수준 및/또는 공여자 카세트의 발현의 목표 수준이 달성되지 않은 경우에는 LNP-뉴클레아제 제형의 추가 용량을 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, LNP-뉴클레아제 제형의 1회 이상의 추가의 용량 중 적어도 하나의 양은 초기 용량과 동일하다. 일부 실시양태에서, LNP-뉴클레아제 제형의 1회 이상의 추가의 용량 중 적어도 하나의 양은 초기 용량보다 적다. 일부 실시양태에서, LNP-뉴클레아제 제형의 1회 이상의 추가의 용량 중 적어도 하나의 양은 초기 용량보다 많다.

[0338] **치료 접근법**

- [0339] 한 측면에서, 본원에 기재된 임의의 방법에 따라 편집된 세포에 의한 입양 세포 요법에 의해 대상체를 치료하기 위한 유전자 요법 접근법이 본원에 제공된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 장애 또는 건강 상태는 자가면역 질환 (예를 들어, IPEX 증후군) 또는 장기 이식으로 인한 장애 (예를 들어, GVHD)이며, 편집된 세포는 Treg 표현형을 갖는다. 일부 실시양태에서, 유전자 요법 접근법은 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드 및 CISC를 코딩하는 서열을 포함하는 핵산을 대상체에서 관련 세포 유형의 게놈에 통합시키고, 이에 따라 안정한 치료, 예를 들어 연장된 시간 동안 장애 또는 건강 상태의 하나 이상의 증상을 개선시키는 치료를 제공하고/거나, 장애 또는 건강 상태의 영구적인 치유 또는 개선을 제공한다. 일부 실시양태에서, 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드 및 CISC를 코딩하는 서열을 통합시키기 위한 유전자 요법 접근법에 적용되는 세포 유형은 림프구 세포, 예를 들어 CD4+ T 세포이다.
- [0340] 일부 실시양태에서, 생체의 세포-기반 요법은 대상체로부터 단리된 림프구 세포, 예를 들어 제대혈로부터 유래된 자가유래 CD4+ T 세포를 사용하여 수행된다. 다음으로, 이들 세포의 염색체 DNA를 본원에 기재된 시스템, 조성물 및 방법을 이용하여 편집한다. 마지막으로, 편집된 세포를 대상체에게 이식한다.
- [0341] 생체의 세포 요법 접근법의 1가지 이점은 투여하기 전에 치료제의 포괄적인 분석을 수행할 수 있다는 것이다. 모든 뉴클레아제-기반 치료제는 일정 수준의 오프-타겟 효과를 갖는다. 생체외에서 유전자 수정을 수행하는 것은 이식하기 전에 수정된 세포 집단을 완전히 특징분석하는 것을 가능하게 한다. 본 개시내용의 측면은 수정된 세포의 전체 게놈을 시퀀싱하는 것을 포함하여, 오프-타겟 절단 (있는 경우)이 대상체에 대한 최소의 위험과 관련된 게놈 위치에 있는 것을 보장한다. 추가로, 클로날 집단을 비롯하여 특이적인 세포 집단을 이식하기 전에 단리할 수 있다.
- [0342] 이러한 방법의 또 다른 실시양태는 생체내 기반 요법이다. 이 방법에서, 대상체에서 세포의 염색체 DNA는 본원에 기재된 시스템, 조성물 및 방법을 이용하여 수정된다. 일부 실시양태에서, 세포는 림프구 세포, 예를 들어 CD4+ 세포, 예컨대 T 세포이다.
- [0343] 생체내 유전자 요법의 이점은 치료제 제조 및 투여의 용이함이다. 동일한 치료 접근법 및 요법을 이용하여, 동일한 또는 유사한 유전자형 또는 대립유전자를 공유하는 하나 초과 대상체, 예를 들어 수많은 대상체를 치료할 수 있다. 대조적으로, 생체의 세포 요법은 일반적으로 대상체 자신의 세포를 사용하며, 이를 단리하고, 조작하고, 동일한 대상체에 다시 되돌린다.
- [0344] 더 많은 실시양태는 세포의 게놈이 FOXP3과 연관된 질환 또는 상태, 예컨대 염증성 질환 또는 자가면역 질환을 억제하거나 또는 치료하는데 사용하기 위해 본원에 기재된 방법 중 하나에 의해 편집된 것인 유전자 변형된 세포에 관한 것이다. 추가의 실시양태는 세포의 게놈이 본원의 방법 중 어느 하나에 의해 편집된 것인 유전자 변형된 세포를 의약으로서 사용하는 것에 관한 것이다.
- [0345] **대상체에 세포의 이식**
- [0346] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 생체의 방법은 이러한 방법을 필요로 하는 대상체에게 게놈-편집된 세포를 이식하는 것을 수반한다. 이러한 이식 단계는 관련 기술분야에 공지된 임의의 이식 방법을 이용하여 달성될 수 있다. 예를 들어, 유전자 변형된 세포를 대상체의 혈액에 직접 주사할 수 있거나 또는 달리 대상체에게 투여할 수 있다.
- [0347] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 방법은 원하는 효과(들)가 생성되도록 원하는 부위에서 도입된 세포를 적어도 부분적으로 국소화시키는 방법 또는 경로에 의해 유전자 변형된 치료 세포를 대상체에게 투여 ("도입" 및 "이식"과 상호교환적으로 사용될 수 있음)하는 것을 포함한다. 치료 세포 또는 그들의 분화된 자손은 대상체의 원하는 위치에 전달하는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있고, 이식된 세포 또는 세포 성분의 적어도 일부가 생존가능한 상태로 남아 있다. 대상체에게 투여후 세포의 생존 기간은 짧게는 수시간, 예를 들어 24 시간 내지 수일, 길게는 수년까지일 수 있거나, 또는 심지어 대상체의 수명, 예컨대 장기간 생착될 수 있다.
- [0348] 예방적으로 제공되는 경우, 본원에 기재된 치료 세포는 치료할 질환 또는 상태의 임의의 증상이 나타나기 전에 대상체에게 투여될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 유전자 변형된 줄기 세포 집단의 예방적 투여는 질환 또는 상태의 증상이 발생하는 것을 예방하는 역할을 한다.
- [0349] 일부 실시양태에서, 치료적으로 제공되는 경우, 유전자 변형된 줄기 세포는 질환 또는 상태의 증상 또는 징후의 발생시에 (또는 이후에), 예를 들어 질환 또는 상태의 발생시에 제공된다.
- [0350] 본원에 기재된 다양한 실시양태에서 사용하기 위해, 치료 세포, 예를 들어 게놈-편집된 줄기 세포의 유효량은

적어도 10^2 세포, 적어도 5×10^2 세포, 적어도 10^3 세포, 적어도 5×10^3 세포, 적어도 10^4 세포, 적어도 5×10^4 세포, 적어도 10^5 세포, 적어도 2×10^5 세포, 적어도 3×10^5 세포, 적어도 4×10^5 세포, 적어도 5×10^5 세포, 적어도 6×10^5 세포, 적어도 7×10^5 세포, 적어도 8×10^5 세포, 적어도 9×10^5 세포, 적어도 1×10^6 세포, 적어도 2×10^6 세포, 적어도 3×10^6 세포, 적어도 4×10^6 세포, 적어도 5×10^6 세포, 적어도 6×10^6 세포, 적어도 7×10^6 세포, 적어도 8×10^6 세포, 적어도 9×10^6 세포, 또는 이들의 배수일 수 있다. 치료 세포는 하나 이상의 공여자로부터 유래될 수 있거나 또는 자가유래 공급원으로부터 획득될 수 있다. 본원에 기재된 일부 실시양태에서, 치료 세포는 그를 필요로 하는 대상체에게 투여하기 전에 배양물에서 확장된다.

[0351] 실시양태에서, 방법 또는 경로에 의한 치료 세포 조성물 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 세포에 따라 다수개의 세포를 포함하는 조성물)의 대상체로의 전달은 원하는 부위에서 세포 조성물을 적어도 부분적으로 국소화시킨다. 세포 조성물은 대상체에서 효과적인 치료를 일으키는 임의의 적절한 경로에 의해 투여될 수 있으며, 예를 들어 투여는 대상체에서 원하는 위치로의 전달을 일으키고, 전달된 조성물의 적어도 일부분, 예를 들어 적어도 1×10^4 세포는 소정 시간 동안 원하는 부위에 전달된다. 투여 방식에는 주사, 주입, 점적, 또는 섭취가 포함된다. "주사"에는 비제한적으로 정맥내, 근육내, 동맥내, 경막내, 심실내, 피막내, 안와내, 심장내, 폐내, 복막내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 뇌척수내, 및 흉골내 주사 및 주입이 포함된다. 일부 실시양태에서, 경로는 정맥내이다. 세포의 전달을 위해, 주사 또는 주입에 의한 투여가 이루어질 수 있다.

[0352] 한 실시양태에서, 세포는 전신으로 투여되고, 달리 말하면 치료 세포 집단은 표적 부위, 조직 또는 장기로 직접적으로 투여되는 것이 아니라, 대신에 대상체의 순환계로 들어가서, 대사 및 다른 유사한 과정을 겪는다.

[0353] 질환 또는 상태의 치료를 위해 조성물을 갖는 치료의 효능은 임상적에 의해 결정될 수 있다. 그러나, 질환의 징후 또는 증상 또는 마커 중 어느 하나 또는 모두가 개선되거나 개량되는 경우에 치료는 효과적인 치료인 것으로 고려된다. 효능은 또한 입원 또는 의학적 개입의 필요에 의해 평가시 개체의 악화 실패에 의해 측정될 수 있다 (예를 들어, 질환의 진행이 멈추거나 또는 적어도 늦추어짐). 이들 지표를 측정하는 방법은 관련 기술분야의 기술자에게 공지되어 있고/거나 본원에 기재되어 있다. 치료에는 개체 또는 동물 (일부 비제한적인 예로 인간 또는 포유동물이 포함됨)에서 질환의 임의의 치료가 포함되고, (1) 질환의 억제, 예를 들어 증상 진행의 중지 또는 늦추어짐; 또는 (2) 질환의 완화, 예를 들어 증상의 퇴행 유발; 및 (3) 증상의 예방 또는 그의 진행가능성의 감소가 포함된다.

[0354] **조성물**

[0355] 한 측면에서, 본 개시내용은 본원에 개시된 방법을 수행하기 위한 조성물을 제공한다. 조성물은 다음 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 게놈-표적화 핵산 (예를 들어, gRNA); 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제), 또는 부위-지정 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열; 및 본원에 개시된 방법의 원하는 유전자 변형을 일으키기 위해 삽입될 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 공여자 주형).

[0356] 일부 실시양태에서, 조성물은 게놈-표적화 핵산 (예를 들어, gRNA)에 대한 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0357] 일부 실시양태에서, 조성물은 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제)를 갖는다. 일부 실시양태에서, 조성물은 부위-지정 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0358] 일부 실시양태에서, 조성물은 게놈에 삽입될 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 공여자 주형)를 갖는다.

[0359] 일부 실시양태에서, 조성물은 (i) 게놈-표적화 핵산 (예를 들어, gRNA)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (ii) 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제), 또는 부위-지정 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 갖는다.

[0360] 일부 실시양태에서, 조성물은 (i) 게놈-표적화 핵산 (예를 들어, gRNA)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (ii) 게놈에 삽입될 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 공여자 주형)를 갖는다.

[0361] 일부 실시양태에서, 조성물은 (i) 부위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제), 또는 부위-지정 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (ii) 게놈에 삽입될 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 공여자 주형)를 갖는다.

[0362] 일부 실시양태에서, 조성물은 (i) 게놈-표적화 핵산 (예를 들어, gRNA)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열, (ii) 부

위-지정 폴리펩티드 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제), 또는 부위-지정 폴리펩티드를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 (iii) 게놈에 삽입될 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 공여자 주형)를 갖는다.

- [0363] 상기 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 조성물은 단일-분자 가이드 게놈-표적화 핵산을 갖는다. 상기 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 조성물은 이중-분자 게놈-표적화 핵산을 갖는다. 상기 임의의 조성물의 일부 실시양태에서, 조성물은 2가지 이상의 이중-분자 가이드 또는 단일-분자 가이드를 갖는다. 일부 실시양태에서, 조성물은 핵산 표적화 핵산을 코딩하는 벡터를 갖는다. 일부 실시양태에서, 게놈-표적화 핵산은 DNA 엔도뉴클레아제, 특히 Cas9이다.
- [0364] 일부 실시양태에서, 조성물은 게놈-편집, 특히 세포의 게놈에 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드 및 CISC를 코딩하는 서열의 삽입을 위해 사용될 수 있는 하나 이상의 gRNA를 포함할 수 있다. 하나 이상의 gRNA는 내인성 FOXP3 유전자에서, 내에서 또는 근처에서 게놈 부위를 표적화할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 하나 이상의 gRNA는 FOXP3 유전자에서, 내에서 또는 근처에서 게놈 서열에 대해 상보성인 스페이서 서열을 가질 수 있다.
- [0365] 일부 실시양태에서, 조성물에 대한 gRNA는 서열식별번호: 40-57 중 어느 하나 중 어느 하나로부터 선택된 스페이서 서열, 및 서열식별번호: 40-57 중 어느 하나에 대해 적어도 또는 적어도 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90% 또는 약 95% 동일성 또는 상동성을 갖는 그의 변이체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 키트를 위한 gRNA의 변이체는 서열식별번호: 40-57 중 어느 하나에 대해 적어도 또는 적어도 약 85% 상동성을 갖는 스페이서 서열을 포함한다.
- [0366] 일부 실시양태에서, 조성물을 위한 gRNA는 게놈에서 표적 부위에 상보성인 스페이서 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 스페이서 서열은 15개 염기 내지 20개 염기 길이이다. 일부 실시양태에서, 게놈 서열에 대한 스페이서 서열 사이의 상보성은 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 적어도 약 100%이다.
- [0367] 일부 실시양태에서, 조성물은 DNA 엔도뉴클레아제, 또는 DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산, 및/또는 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드 및 CISC를 코딩하는 핵산 서열을 갖는 공여자 주형을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드 및 CISC를 코딩하는 핵산 서열은 서열식별번호: 3-4, 8, 28-30, 32 및 37-39에 따른 서열에 대해 적어도 또는 적어도 약 70% 서열 동일성, 예를 들어 적어도 또는 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 네이키드 FRB 도메인 폴리펩티드 및 CISC를 코딩하는 핵산 서열은 서열식별번호: 32에 따른 서열에 대해 적어도 또는 적어도 약 70% 서열 동일성, 예를 들어 적어도 또는 적어도 약 75%, 80%, 85%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제는 Cas9이다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 DNA 또는 RNA이다.
- [0368] 일부 실시양태에서, 키트를 위한 하나 이상의 임의의 핵산은 아데노 관련 바이러스 (AAV) 벡터에 코딩될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, gRNA는 AAV 벡터에 코딩될 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산은 AAV 벡터에 코딩될 수 있다. 일부 실시양태에서, 공여자 주형은 AAV 벡터에 코딩될 수 있다. 일부 실시양태에서, 2가지 이상의 핵산이 단일 AAV 벡터에 코딩될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, gRNA 서열 및 DNA 엔도뉴클레아제-코딩 핵산은 단일 AAV 벡터에 코딩될 수 있다.
- [0369] 일부 실시양태에서, 조성물은 리포솜 또는 지질 나노입자를 가질 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 조성물의 임의의 화합물 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제 또는 그를 코딩하는 핵산, gRNA, 및 공여자 주형)은 리포솜 또는 지질 나노입자에 제형화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 1종 이상의 화합물은 공유 결합 또는 비공유 결합을 통해 리포솜 또는 지질 나노입자와 회합된다. 일부 실시양태에서, 임의의 화합물은 리포솜 또는 지질 나노입자에 별도로 또는 함께 함유될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 각각의 DNA 엔도뉴클레아제 또는 그를 코딩하는 핵산, gRNA, 및 공여자 주형은 리포솜 또는 지질 나노입자에 별도로 제형화된다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제는 gRNA와 함께 리포솜 또는 지질 나노입자에 제형화된다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제 또는 그를 코딩하는 핵산, gRNA, 및 공여자 주형은 함께 리포솜 또는 지질 나노입자에 제형화된다.
- [0370] 일부 실시양태에서, 상기 기재된 조성물은 1종 이상의 추가의 시약을 추가로 가지며, 이러한 추가의 시약은 완충제, 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드를 세포에 도입시키기 위한 완충제, 세척 완충제, 조절 시약, 조절 벡터, 조절 RNA 폴리뉴클레오티드, DNA로부터 폴리펩티드의 시험관내 생성을 위한 시약, 시퀀싱을 위한 어댑터 등

으로부터 선택된다. 완충제는 안정화 완충제, 재구성 완충제, 희석 완충제 등일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 또한 엔도뉴클레아제에 의한 DNA의 온-타겟 결합 또는 절단을 용이하게 하거나 증강시키기 위해, 또는 표적화의 특이성을 개선시키기 위해 사용될 수 있는 1종 이상의 성분을 포함할 수 있다.

[0371] 일부 실시양태에서, 조성물의 임의의 성분은 특정한 투여 방식 및 용량 형태에 따라 제약상 허용가능한 부형제 예컨대 담체, 용매, 안정화제, 아주반트, 희석제 등과 함께 제형화된다. 실시양태에서, 가이드 RNA 조성물은 일반적으로 생리학적으로 상용성인 pH를 달성하도록 제형화되고, 제형 및 투여 경로에 따라 3 또는 약 3의 pH 내지 11 또는 약 11의 pH, 3 또는 약 3의 pH 내지 7 또는 약 pH 7의 pH이다. 일부 실시양태에서, pH는 pH 5.0 또는 약 pH 5.0 내지 pH 8 또는 약 pH 8의 범위로 조정된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 1종 이상의 제약상 허용가능한 부형제와 함께 본원에 기재된 적어도 1종의 화합물의 치료 유효량을 갖는다. 임의적으로, 조성물은 본원에 기재된 화합물의 조합물을 가질 수 있거나, 또는 박테리아 성장 (예를 들어 및 비제한적으로, 항박테리아제 또는 항미생물제)의 치료 또는 예방에 유용한 제2 활성 성분을 포함할 수 있거나, 또는 본 개시내용의 시약의 조합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, gRNA는 다른 하나 이상의 핵산, 예를 들어 DNA 엔도뉴클레아제 및/또는 공여자 주형을 코딩하는 핵산과 함께 제형화된다. 대안적으로, 다른 핵산과 별도로 또는 조합하여 DNA 엔도뉴클레아제 및 공여자 주형을 코딩하는 핵산은 gRNA 제형을 위해 상기 기재된 방법을 이용하여 제형화된다.

[0372] 적합한 부형제에는 예를 들어 천천히 대사되는 큰 거대분자, 예컨대 단백질, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성 아미노산, 아미노산 공중합체, 및 비활성 바이러스 입자를 포함하는 담체 분자가 포함된다. 다른 예시적인 부형제에는 항산화제 (예를 들어 및 비제한적으로, 아스코르브산), 킬레이팅제 (예를 들어 및 비제한적으로, EDTA), 탄수화물 (예를 들어 및 비제한적으로, 텍스트린, 히드록시알킬셀룰로스, 및 히드록시알킬메틸셀룰로스), 스테아르산, 액체 (예를 들어 및 비제한적으로, 오일, 물, 식염수, 글리세롤, 및 에탄올), 습윤화제 또는 유화제, pH 완충 물질 등이 포함된다.

[0373] 일부 실시양태에서, 조성물의 임의의 화합물 (예를 들어, DNA 엔도뉴클레아제 또는 그를 코딩하는 핵산, gRNA, 및 공여자 주형)은 형질감염, 예컨대 화학적 형질감염 (예를 들어, 리포펙션) 또는 전기천공을 통해 세포에 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, DNA 엔도뉴클레아제는 세포에 포함되기 전에 gRNA와 사전 복합체화되어 리보핵단백질 (RNP) 복합체를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, RNP 복합체는 형질감염을 통해 세포에 전달된다. 이러한 실시양태에서, 공여자 주형은 형질감염을 통해 세포에 전달된다.

[0374] 일부 실시양태에서, 조성물은 생체의 치료 방법에서 사용되는 치료 세포를 갖는 치료 조성물을 지칭한다.

[0375] 실시양태에서, 치료 조성물은 세포 조성물과 함께 생리학적으로 용인가능한 담체, 및 임의적으로 활성 성분으로서 그 안에 용해되거나 분산된 본원에 기재된 적어도 1종의 추가의 생활성 작용제를 함유한다. 일부 실시양태에서, 치료 조성물은 바람직한 경우가 아니라면 치료 목적을 위해 포유동물 또는 인간 대상체에게 투여될 때 실질적으로 면역원성이 아니다.

[0376] 일반적으로, 본원에 기재된 유전자 변형된 치료 세포는 제약상 허용가능한 담체와 함께 현탁액으로서 투여된다. 관련 기술분야의 기술자는 세포 조성물에서 사용될 제약상 허용가능한 담체가 대상체에게 전달될 세포의 생존율을 실질적으로 방해하는 양으로 완충제, 화합물, 동결보존제, 보존제, 또는 다른 작용제를 포함하지 않을 것임을 인식할 것이다. 세포를 갖는 제형은 예를 들어 세포 막 완전성을 유지시키는 삼투성 완충제, 및 임의적으로 투여시 세포 생존율을 유지하거나 생착을 증강시키기 위한 영양분을 포함할 수 있다. 이러한 제형 및 현탁액은 관련 기술분야의 기술자에게 공지되어 있고/거나, 일상적인 실험을 이용하여 본원에 기재된 바와 같이 전구 세포와 함께 사용하기 위해 적합화될 수 있다.

[0377] 일부 실시양태에서, 유화 절차가 세포 생존율에 부정적인 영향을 미치지 않는 한, 세포 조성물은 또한 리포솜 조성물로서 유화되거나 또는 제시될 수 있다. 세포 및 임의의 다른 활성 성분은 본원에 기재된 치료 방법에서 사용하기에 적합한 양으로 제약상 허용가능하고 활성 성분과 상용성인 1종 이상의 부형제와 혼합될 수 있다.

[0378] 세포 조성물에 포함되는 추가의 작용제에는 그 안의 성분의 제약상 허용가능한 염이 포함될 수 있다. 제약상 허용가능한 염에는 예를 들어 염산 또는 인산과 같은 무기 산, 또는 아세트산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기 산에 의해 형성되는 산 부가 염 (폴리펩티드의 유리 아미노기에 의해 형성됨)이 포함된다. 유리 카르복실기에 의해 형성되는 염은 또한 무기 염기, 예를 들어 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘 또는 수산화제2철과 같은 무기 염기, 및 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유래될 수 있다.

- [0379] 생리학적으로 용인가능한 담체는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예시적인 액체 담체는 활성 성분 및 물 이외의 물질은 함유하지 않거나, 또는 완충제, 예컨대 생리학적 pH 값의 인산나트륨, 생리학적 식염수 또는 이들 둘 다, 예컨대 인산염-완충된 식염수를 함유하는 멸균성 수성 용액이다. 여전히 추가로, 수성 담체는 1종 초과와 완충제 염, 뿐만 아니라 염화나트륨 및 염화칼륨과 같은 염, 텍스트로스, 폴리에틸렌 글리콜 및 다른 용질을 함유할 수 있다. 액체 조성물은 또한 물 이외에 물을 제외하고 액체 상을 함유할 수 있다. 예시적인 이러한 추가의 액체 상은 글리세린, 식물성유, 예컨대 면실유, 및 물-오일 에멀전이다. 특정한 장애 또는 상태의 치료에 효과적인 세포 조성물에서 사용되는 활성 화합물의 양은 장애 또는 상태의 성질에 따라 달라질 것이며, 공지된 임상 기술에 의해 결정될 수 있다.
- [0380] **키트 및 시스템**
- [0381] 또한, 본원에 제공되고 기재된 세포, 발현 벡터, 및 단백질 서열 뿐만 아니라 그의 제조 및 사용에 대한 서면 지침서를 포함하는 키트 및 시스템이 본원에 제공된다. 따라서, 예를 들어, 본원에 기재된 단백질 서열; 본원에 기재된 발현 벡터; 및/또는 본원에 기재된 세포 중 하나 이상을 포함하는 키트가 본원에 제공된다. 본원에 기재된 세포를 포함하는, 라파마이신 내성 세포의 내부로 신호를 선택적으로 활성화시키기 위한 시스템 또한 제공되며, 세포는 본원에 기재된 단백질 서열을 코딩하는 핵산을 포함하는 본원에 기재된 발현 벡터를 포함한다.
- [0382] 일부 실시양태는 본원에 기재된 게놈 편집을 위한 CRISPR/Cas 시스템의 1종 이상의 성분을 함유하는 키트를 제공한다.
- [0383] 일부 실시양태에서, 키트는 원하는 목적, 예를 들어 게놈 편집 또는 세포 요법을 위해 다른 키트 성분과 동시에 또는 순차적으로 투여될 수 있는 1종 이상의 추가의 치료제를 가질 수 있다.
- [0384] 일부 실시양태에서, 키트는 상기 방법을 수행하기 위해 키트의 성분을 사용하는 것에 대한 지침서를 추가로 포함할 수 있다. 상기 방법을 수행하기 위한 지침서는 일반적으로 적합한 기록 매체에 기록된다. 예를 들어, 지침서는 종이 또는 플라스틱 등과 같은 기관 상에 인쇄될 수 있다. 지침서는 키트 또는 그의 성분의 용기 라벨링에서 팩키지 삽입물로서 키트에 존재할 수 있는 등이다 (예컨대 팩키징 또는 서브팩키징과 관련됨). 지침서는 적합한 컴퓨터 판독가능한 저장 매체, 예를 들어 CD-ROM, 디스켓, 플래쉬 드라이브 등에 존재하는 전자 저장 데이터 파일로서 존재할 수 있다. 일부 예에서, 실제 지침서가 키트에 존재하지 않지만, 원격 소스로부터 (예를 들어 인터넷을 통해) 지침서를 획득하기 위한 수단이 제공될 수 있다. 이 실시양태의 예는 지침서를 볼 수 있고/거나 지침서를 다운로드할 수 있는 웹 주소를 포함하는 키트이다. 지침서와 관련하여, 지침서를 획득하기 위한 이러한 수단은 적합한 기관 상에 기록될 수 있다.
- [0385] 본원에서 복수 및/또는 단수 용어의 사용과 관련하여, 관련 기술분야의 기술자는 문맥상 및/또는 적용상 적절한 경우 복수를 단수로 및/또는 단수를 복수로 번역할 수 있다. 명확성을 위해 다양한 단수/복수 치환이 본원에 명시적으로 제시될 수 있다.
- [0386] 관련 기술분야의 기술자라면, 일반적으로 본원에서 특히 첨부된 청구항에서 (예를 들어 청구항의 본문) 사용된 용어들은 일반적으로 "개방" 용어로서 의도됨을 이해할 것이다 (예를 들어, 용어 "포함하는"은 "예컨대 비제한적으로"로 해석되어야 하고, 용어 "갖는"은 "적어도 갖는"으로 해석되어야 하고, 용어 "포함하다"는 "포함하거나 이로 제한되지 않는다" 등으로 해석되어야 함).
- [0387] 제1 내지 제11 측면의 실시양태의 임의의 특징은 본원에서 확인된 모든 측면 및 실시양태에 적용가능하다. 또한, 제1 내지 제11 측면의 실시양태의 임의의 특징은 독립적으로 임의의 방식으로 본원에 기재된 다른 실시양태와 부분적으로 또는 전체적으로 조합가능하고, 예를 들어 1, 2 또는 3개 또는 그 초과와 실시양태는 전체적으로 또는 부분적으로 조합가능하다. 추가로, 제1 내지 제11 측면의 실시양태의 임의의 특징은 다른 측면 또는 실시양태에 대해 임의적일 수 있다. 다양한 예시적인 실시양태 및 구현예와 관련하여 상기에 기재되었지만, 하나 이상의 개별 실시양태에 기재된 다양한 특징, 측면 및 기능이 그들이 기재된 특정한 실시양태에 대한 그들의 적용가능성으로 제한되지 않고, 대신에 이러한 실시양태가 기재되었는지 여부 및 이러한 특징이 기재된 실시양태의 일부인 것으로 제시되었는지 여부와 관계없이, 단독으로 또는 다양한 조합으로 본 출원의 하나 이상의 다른 실시양태에 적용될 수 있음을 이해해야 한다. 따라서, 본 출원의 범위는 상기 기재된 임의의 예시적인 실시양태에 의해 제한되지 않아야 한다.
- [0388] 본원에 기재된 실시예 및 실시양태는 단지 설명의 목적을 위한 것이며, 그에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 관련 기술분야의 기술자에게 제안될 것이고 본 출원의 개념 및 권한 및 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되어야 하는 것으로 이해된다. 본원에 인용된 모든 공보, 특허 및 특허 출원은 모든 목적을 위해 그의 전문이 본원에

참고로 포함된다.

[0389] 본원에 제공된 본 개시내용의 일부 실시양태는 하기 비제한적인 실시예에 의해 추가로 설명된다.

[0390] **실시예**

[0391] 본 발명의 실시는 달리 나타내지 않는다면 관련 기술분야의 기술자에게 널리 공지된 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학, 생화학, 핵산 화학 및 면역학의 통상적인 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술은 [Sambrook, J., & Russell, D. W. (2012). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (4th ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory and Sambrook, J., & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed.). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (본원에서 "Sambrook"으로 공동으로 지칭됨); Ausubel, F. M. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology* New York, NY: Wiley (2014년 까지의 보충서 포함); Mullis, K. B., Ferre, F. & Gibbs, R. (1994). *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, Boston: Birkhauser Publisher; Harlow, E., & Lane, D. (1999). *Antibodies: A Laboratory Manual* (2nd ed.). New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; Beaucage, S. L. et al. (2000). *Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry*, New York, NY: Wiley, (2014년까지의 보충서 포함); 및 Makrides, S. C. (2003). *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells* Amsterdam, NL: Elsevier Sciences B.V.]]와 같은 문헌에 충분히 설명되어 있다

[0392] **실시예 1: DISC 구축물의 생성 및 특징분석**

[0393] 이 실시예는 숙주 세포의 세포질에서 네이키드 "디코이" FRB 도메인을 세포내에서 발현시키기 위해 CISC-코딩 렌티바이러스 구축물을 생성하고 시험하는 것을 기재한다.

[0394] IL-2 신호 조절-CISC-함유 렌티바이러스 구축물은 CISC 키메라 수용체 단백질의 3'에 위치하는 추가의 네이키드 FRB* 도메인으로 변형시켰다 (도 1). CISC와 함께 추가의 네이키드 FRB* 도메인을 발현하는 구축물은 "디코이-CISC" 또는 "DISC"로 지정되었다. 이론에 구애되지 않고, 네이키드 FRB 도메인이 라파마이신과의 결합을 위해 mTOR의 내인성 FRB 도메인과 경쟁할 것이고, 이에 따라 CISC를 통한 라파마이신-매개된 세포내 신호전달을 일으키지만, 숙주 세포에 대한 라파마이신의 효과와 관련하여 수반된 세포독성이 없어서, 증식 억제제의 문제점을 극복할 것이라고 믿어진다.

[0395] 도 2에 도시된 바와 같이, FKBP 도메인-함유 단백질은 세포의 세포질에서 자연적으로 발현되고, mTOR은 FRB 도메인을 함유한다. 라파마이신의 부재하에서는, CISC 서브유닛이 이량체화하지 않고, 세포내 mTOR 신호가 정상이다 (왼쪽 패널). 라파마이신의 존재하에서는, CISC 서브유닛이 이량체하여 세포내 신호를 제공하지만, mTOR 신호는 억제되어 세포 성장을 제한하며 (중간); 네이키드 FRB 도메인이 공동-발현된 DISC 세포에서는, 세포내 신호가 라파마이신 유도된 이량체화에 의해 여전히 제공되지만, 세포내 라파마이신이 세포내에서 발현된 네이키드 FRB 및 내인성 FKBP 폴리펩티드와 결합하기 때문에 여러 mTOR 단백질은 여전히 신호를 제공할 수 있다.

[0396] 이어서, 신규한 DISC 구축물을 시험하여, 세포내 네이키드 FRB 도메인을 발현하지 않는 CISC 구축물과 비교하여, 숙주 세포 성장 및 생존율과 관련하여 어떻게 수행되었는지를 결정하였다. 간략히, 단리된 CD4+ T 세포를 61 시간 동안 활성화시켜서, 단리 후에 1.9×10^7 총 세포를 생성하였다. 이어서, 렌티바이러스 형질도입을 24-웰 디쉬에서 프로타민 술페이트 4 µg/ml와 함께 비드없이 수행하였다 (100만개 세포/500 µL/웰, 10 µl의 구축물 #1272 (CISC-단독 구축물)/10 µl의 DN-1272 (DISC-함유 구축물) (2 웰/LV)). 스피노쿨레이션 (Spinoculation)을 32°C에서 30 분 동안 800g에서 수행하였다. 이어서, 5 시간 인큐베이션 후에 배지 (1.5 mL)를 첨가하였다. 형질도입된 T 세포를 시토카인 (IL-2 50ng/ml, IL-7 5ng/ml, 및 IL-15 5ng/ml)과 함께 37°C에서 48 시간 동안 인큐베이션한 후, 형질도입 효율을 검증하였다. 그 후, 100만개 세포/웰을 2 mL 배지와 함께 24 웰 디쉬에 플레이팅하였다. 그 후, T 세포를 라파마이신 (0.1 nM, 1 nM 및 10nM), 라파로그 AP21967 (100nM) 또는 IL-2 (50ng/mL)로 처리하고, 배지를 2 일마다 교체하였다. 이 실험에는 배지만을 사용한 "비처리" 그룹 또한 포함되었다. 이어서, T 세포를 생존율 및 mCherry 양성 신호에 대해 평가하였다.

[0397] 도 3에 도시된 바와 같이, 라파마이신의 존재하에, DISC를 발현하는 T 세포는 모든 용량에서 CISC를 발현하는 것보다 더 잘 확장한다. 이 결과는 라파마이신 또는 라파마이신-관련 화합물이 숙주 세포의 성장 및 생존율에 대해 갖는 부정적인 효과를 DISC 구축물이 해결할 수 있음을 입증하며, 이는 DISC 구축물에 대한 개념 증명이다. 라파로그는 내인성 mTor에 결합하지 않기 때문에, CISC 및 DISC 구축물 둘 다 라파로그 AP21967의

존재하에 동등하게 잘 확장한다.

[0398] **실시예 2: DISC의 변형된 CISC 성분**

[0399] 이 실시예는 DISC 구축물의 CISC 성분의 변형된 수용체 단백질의 생성을 기재한다. 컴퓨터 기반 단백질 모델링은 DISC 구축물의 CISC 성분의 두 수용체 단백질 사이의 간격이 최적일 수 있음을 예측한다. 따라서, 몇몇 추가의 구축물을 만들어서, 키메라 수용체 단백질의 특정한 단면 (예를 들어, 세포외 도메인과 막횡단 도메인 사이의 계면)의 길이 변화가 성장 신호를 증가시키는지 여부를 시험하였다.

[0400] 다양한 아미노산 부가를 이용하여 버전 4 내지 7 (V4-V7)을 생성하여, 이것이 라파마이신에 의한 T 세포 확장을 개선시키는지 여부를 확인하였다. 하나 이상의 PAAL 스페이서 아미노산 서열 및/또는 GGS 또는 GGSP 링커 아미노산 서열을 함유하는 FRB-IL2Rβ /FKBP-IL2Rγ 수용체 단백질의 4가지 추가의 쌍 (V4-V7)을 생성하였다. 추가의 스페이서 및 링커 아미노산 서열은 세포외 FRB/FKBP와 IL2Rβ /IL2Rγ 도메인 사이의 계면에 또는 IL2Rβ 도메인 내에 위치하였다 (도 4). V3 표준 DISC는 FRB, FKBP, IL2Rβ, IL2Rγ를 갖고; V4는 FRB, FKBP, IL2Rβ, IL2Rγ, 및 IL2Rβ의 N-말단에 PAAL 스페이를 갖고; V5는 FRB, FKBP, IL2Rβ, IL2Rγ, GGS 링커 및 PAAL 스페이서를 갖고, 여기서 IL2Rβ는 N 말단에 링커 및 PAAL 스페이서를 갖고; V6은 FRB, FKBP, IL2Rβ, IL2Rγ, PAAL 스페이서 및 GGSP 링커를 갖고, 여기서 PAAL 스페이서는 IL2Rβ의 N 말단에 있고, GGSP 링커는 IL2Rγ의 N 말단에 있고; V7은 FRB, FKBP, IL2Rβ, IL2Rγ를 갖고, 여기서 IL2Rβ는 GGS 링커 및 PAAL 스페이서를 갖는 반면에, IL2Rγ를 GGSP 링커를 포함한다.

[0401] 일단 구축되면, 새로운 DISC 구축물 (V4-V7)을 시험하여 이들이 실시예 1에 기재된 원래 생성된 DISC 구축물과 비교하여 라파마이신의 존재하에 세포 증식 및 생존율을 개선시켰는지 여부를 결정하였다. 일차 인간 T 세포에서 이들 신규한 DISC 아키텍처를 시험하기 위해 이용된 절차의 시간선은 다음과 같다. CD4 단리 및 CD3/CD28 비드 자극 이전에 PBMC3을 대략 24 시간 동안 해동시켰다. 대략 61 시간 후에, 비드를 제거하였다. 렌티바이러스 스피노클레이션용 500 μL의 부피로 800 xg에서 수행한 후에, 시토키인으로 보충된 추가의 1.5 mL 배지에서 수행하였다. 형질도입된 세포를 4가지 처리 코호트로 분할하였고: (1) 1 nM 라파마이신, (2) 50 ng/mL IL-2, (3) 100 nM AP21967, 및 (4) 비처리; 형질도입된 세포의 성장을 공동-발현된 mCherry에 대해 유세포 분석에 의해 모니터링하였고, 2 일, 4 일, 11 일, 15 일 및 20 일 후에 총 세포 개수를 카운팅하였다.

[0402] 유세포 분석 연구의 결과는 하기 표 1에 나타내었으며, 여기서 T 세포 확장은 라파마이신으로 처리한지 48 시간 후에 결정하였다. mCherry 공동-발현을 갖는 세포의 백분율이 제시되고, 각각의 코호트에서 구축물의 유사한 형질도입 효율을 나타낸다. 하기 표 1B에 나타낸 바와 같이, 각각의 변형된 DISC 구축물은 원래의 DISC 구축물 (V3)과 비교하여 유사한 형질도입 효율을 나타내었다.

[0403] 표 1B

DISC 구축물	% mCherry 공동-발현
V3 (원래)	9.92
V4	11.8
V5	10.6
V6	12.9
V7	11.0
모의	0.67

[0404]

[0405] 유사하게, 도 5에 예시된 바와 같이, 1 nM 라파마이신으로 처리한지 20 일 후까지 DISC의 모든 버전에서 모든 시점에서 동일한 개수의 세포가 관찰되었다. 최종적으로, 도 6에 상세히 도시된 바와 같이, 라파마이신 또는 라파로그로 처리한 배양물에서 시간에 걸쳐 렌티바이러스 형질도입된 T 세포의 % 풍부화의 측정은, mCherry+인 세포의 백분율이 IL-2-처리 또는 비처리 (NT) 대조군과 비교하여 모든 LV 처리 그룹에서 유사하였음을 나타내었다. 따라서, 이 실시예는 변형된 DISC 구축물의 시험한 모든 버전이 형질도입 효율, 세포 성장 및 확장, 및 형질도입된 세포의 풍부화와 관련하여 유사하게 수행되었음을 보여준다.

[0406] **실시예 3: μDISC 구축물의 생성 및 특징분석**

[0407] 유전자 편집에서 발생할 수 있는 한가지 문제점은 전달 벡터, 예를 들어 바이러스에 패키징될 수 있는 물질의

양에 제한이 있다는 것이다. 이 실시예는 라파마이신 처리에 의해 증식을 조절하기 위해 T 세포로 조작된 CISC 결합 쌍의 절반의 IL2Rβ 세포질 성분의 변형을 기재한다. 변형은 라파마이신과의 결합 후에 이중이량체화에 대한 반응으로 하류 IL2 신호전달 사건을 활성화시키는 그의 능력을 보유하는 IL2Rβ 도메인의 말단절단이다.

[0408] CISC 및/또는 DISC 성분을 숙주 세포에 전달하기 위해 사용되는 바이러스에 패키징되어야 하는 유전자 물질의 양을 감소시키도록 변형이 이루어졌다. 변형은 IL2Rβ 내의 필수 신호전달 도메인을 확인한 이전의 보고를 기반으로 하였다 ([Lord, J. D. et al. (2000). *J. Immunol.*, 164(5):2533-2541], 본원에 참고로 포함됨). 이어서, 이 정보를 이용하여 IL2Rβ 도메인으로부터 비-필수 아미노산을 결실시켰다. 이 말단절단된 IL2Rβ 도메인 뿐만 아니라 실시예 1에 기재된 세포내에서 발현된 내이키드 FRB 도메인을 포함시키도록 생성된 구축물은 "마이크로-DISC" 또는 "μDISC"로 지칭된다 (도 7).

[0409] 이어서, 원래의 CISC 구축물, 실시예 1로부터의 DISC 구축물 및 μDISC 구축물을 시험하여, 세포에 형질도입 및 라파마이신으로의 처리 이후에 T 세포 확장을 유도하는 각각의 능력을 결정하였다. 일차 인간 T 세포에서 신규한 μDISC 구축물을 시험하기 위해 이용된 절차의 시간선은 다음과 같다. CD4 단리 및 CD3/CD28 비드 자극 이전에 PBMC를 대략 2 시간 동안 해동시켰다. 대략 24 시간 후에, 비드를 제거하였다. 렌티바이러스 형질도입을 하기 구축물을 사용하여 대략 100만개 세포에 의해 수행하였다: V3 CISC, V3 DISC, 및 V3 μDISC. 이어서, 형질도입된 세포를 대략 1 일 동안 확장시키고, 3가지 처리 코호트로 분할하였다: (1) 1 nM 라파마이신, (2) 5 nM 라파마이신, (3) 10 nM 라파마이신. 대략 40만개 세포를 각각의 처리를 위해 사용하였다. 형질도입된 세포의 성장을 공동-발현된 mCherry에 대한 유세포 분석에 의해 모니터링하고, 총 세포 개수를 카운팅하였다.

[0410] 바이러스 형질도입 효율을 하기 표 2에 나타내었으며, 여기서 10 nM 라파마이신의 존재하에 DISC 및 μDISC 구축물 둘 다에 의해 형질도입된 T 세포에서 유사한 바이러스 형질도입 효율이 관찰되었다. mCherry 공동-발현을 갖는 세포의 백분율이 제시되고, 각각의 코호트에서 구축물의 유사한 형질도입 효율을 나타낸다.

[0411] 표 2

CISC/DISC 구축물	% mCherry 공동-발현
CISC	55.7
DISC	46.3
μDISC	36.9
모의	1.32

[0412]

[0413] 도 8은 μDISC 구축물에 의해 형질도입된 T 세포가 사용된 모든 농도의 라파마이신하에 전장 DISC 구축물보다 비록 약간 적지만 유사하게 확장되었음을 도시한다. 이들 결과는 μDISC 구축물이 T 세포 성장 및 확장을 위해 충분한 IL2R 신호를 제공함을 나타내었다.

[0414] 도 9에 도시된 바와 같이, 배양 9 일 후에, mCherry+인 세포의 백분율은 DISC 및 CISC 렌티바이러스 구축물로 처리된 세포에서 유사하였다. μDISC 구축물에 의해 형질도입된 T 세포는 약간 적은 mCherry+ (~80% 대 90%)를 생성하였지만, 여전히 고도로 풍부화되었다. 도 10은 다양한 용량의 라파마이신과 함께 배양 21 일 후에 LV 형질도입된 (mCherry+) 세포의 수치적 확장 배수를 도시한다. 따라서, 이 실시예는 μDISC 구축물에 의해 형질도입된 세포에서 비교가능한 수준의 라파마이신-매개된 T 세포 확장이 달성될 수 있음을 입증한다. μDISC는 유전자 전달 실험 또는 치료적 처리를 위해 사용되는 바이러스에 추가의 유전자 요소 또는 마커의 패키징을 위한 추가의 여지를 갖는다는 추가 이점이 있다.

[0415] **실시예 4: FOXP3 유전자좌에서 DISC 구축물의 표적화된 통합을 갖는 세포의 생성 및 특징분석**

[0416] 이 실시예는 DISC를 코딩하는 구축물 및 CD4+ T 세포에서 내인성 FOXP3 (포크헤드 박스 P3) 유전자좌의 상류에 있는 프로모터를 녹-인(knock-in)시키기 위해 유전자 편집 기술을 이용하는 것을 설명한다. 도 11은 이 실험에서 이용된 실험 프로토콜을 개략적으로 도시한다. 간략히, FOXP3의 엑손 1의 유전자좌 5'에 대해 특이적인 가이드 RNA (gRNA)를 함유하는 CRISPR/CAS9 리보핵단백질을 FOXP3 유전자 편집을 위한 아데노-연관 바이러스 6 (AAV6) 공여자 주형과 조합하여 사용하였다. gRNA는 서열식별번호:58의 서열을 갖는 스페이서를 포함하였다. 이소성(ectopic) MND 프로모터를 도입하여 내인성 FOXP3의 상류에서 DISC 발현을 유도하였다. FOXP3의 발현은 키메라 단백질을 생성하기 위해 N-말단 헤마글루티닌 (HA) 에피토프 태그 및 핵 국소화 서열이 인프레임되도록 설계되었다.

[0417] 하기 표 3에 나타낸 바와 같이, 상기 기재된 DISC를 발현하는 편집된 T_{reg} 세포를 라파마이신 또는 AP21967을 함

유하는 배양물에서 선택적으로 확장시켰다. 이 실험에서, 단독으로 또는 IL-2, 라파마이신 또는 라파로그 AP21967과 함께 배지에서 배양한 후에 세포를 APC-표지된 항-HA 태그 및 PE-항-FOXP3+ T 세포로 표지하였다. 각각의 코호트에서 이중 양성 세포 (HA-FOXP3을 발현함)의 백분율이 도시된다.

[0418] 표 3

처리	처리후 7 일째		처리후 15 일째
	모의	DISC/HA-FOXP3	DISC/HA-FOXP3
비처리	0.025%	4.33%	6.16%
50 ng/mL IL-2	0.010%	4.92%	2.12%
10 nM 라파마이신	0.022%	47.6%	85.6%
100 nM AP21967	0.033%	45.7%	82.1%

[0419]

[0420] 또한, 하기 표 4에 나타낸 바와 같이, 조절 T 세포 마커의 존재하에 검정하였을 때, DISC-발현 편집된 T_{reg} 세포는 T 세포 마커 FOXP3, CTLA, LAG3 및 ICOS, 비교적 많은 양의 CD25, 및 비교적 적은 양의 CD127을 발현함으로써 이러한 세포 유형에서 예상되는 것과 표현형이 일치하였다. 각각의 코호트에서 단일 양성 세포 (T 세포 마커만을 발현함) 및 이중 양성 세포 (T 세포 마커 및 FOXP3을 발현함)의 백분율이 제시된다.

[0421] 표 4

처리	CD25+		CD127+		CTLA4+		LAG3+		ICOS+	
	FOX P3+	FOX P3-	FOX P3+	FOX P3-	FOX P3+	FOX P3-	FOX P3+	FOX P3-	FOX P3+	FOX P3-
비처리	0.88	1.35	0.56	0.90	0.25	3.26	0.31	0.37	0.14	0.20
IL-2 50 ng/mL	3.98	8.50	0.26	8.84	3.17	1.33	1.85	3.43	3.32	0.40
라파마이신 10 nM	28.9	14.5	1.47	40.8	15.5	29.4	7.86	33.3	38.2	2.38
AP21967 100nM	22.5	20.4	1.63	40.3	13.6	30.8	8.81	31.5	36.8	2.99

[0422]

[0423] 이어서, 실시예 3에 기재된 μDISC 구축물 또는 도 12에 도시된 구축물이 삽입된 DISC 구축물을 사용하여 CD4+ T 세포에서 내인성 유전자를 편집하였다. 이들 실험을 위해, MND 프로모터는 HA-태그 부착된 내인성 FOXP3 유전자의 상류에서 DISC/μDISC 발현을 유도하였다.

[0424] 하기 표 5에 나타낸 바와 같이, μDISC 및 DISC 편집된 T_{reg} 세포는 라파마이신의 존재하에 유사하게 우세하게 풍부화된다. 예상된 바와 같이, IL-2 또는 배지 단독은 HA-FOXP3 발현 분획을 풍부화시키지 않았다. 표 5에서, 각각의 코호트에서 이중 양성 세포 (DISC/μDISC 및 HA-FOXP3을 발현하는 편집된 세포)의 백분율이 제시된다.

[0425] 표 5

	처리	DISC	μDISC
0 일째		24.9	12.6
7 일째	비처리	7.70	4.55
	50 ng/mL IL-2	18.1	12.1
	1 nM 라파마이신	68.7	59.4

[0426]

[0427]

이들 데이터는, DISC 및 μDISC 구축물 둘 다 T 세포에서 유전자를 편집하기 위해서 뿐만 아니라 라파마이신의 존재에 따라 그들을 확장시키기 위해 사용될 수 있음을 입증한다.

[0428]

실시예 5: DISC 세포 확장의 최적화

[0429]

이 실시예는 동일한 배양물에서 편집되지 않은 세포에 비해 edTreg 세포를 우세하게 확장시키기 위해 DISC 구축물에 의해 수행된 실험을 기재한다. 이들 실험의 합리적 근거는 라파마이신 풍부화된 집단이 달성되었을 때 T 세포 확장을 촉진시키는 것이었다. 일반적으로, DISC FOXP3 AAV 공여자 주형을 사용하여 일차 인간 CD4+ T 세포를 편집한 후, 결과는 성공적으로 편집된 세포 (DISC edTreg) 및 편집되지 않은 세포의 혼합된 세포 집단이다. FOXP3 발현 Treg 세포는 통상적인 T 세포에 비해 배양물에서 더욱 천천히 성장한다. 따라서, IL-2의 존재하에 혼합된 배양물에서 Treg 세포의 백분율은 급속히 감소할 것이다. 혼합된 세포 집단을 라파마이신과 함께 IL-2는 없이 배양하면 편집된 세포가 풍부화될 수 있다. 그러나, TCR 신호가 없으면 총 세포 개수가 천천히 증가한다. 따라서, TCR 신호를 제공하기 위해 확장 동안에 항-CD3/CD28 비드를 추가하는 것이 유용할 것이다. 그러나, 편집 이후에 비드의 첨가는 또한 존재하는 편집되지 않은 세포를 활성화시켜, 이들이 IL-2를 분비하고, 이에 따라 재조합 IL-2가 없는 배지에서 DISC edTreg에 대한 라파마이신 처리의 선택적 이점을 제거할 수 있다. 이 시나리오에서, FOXP3 발현이 없는 세포는 FOXP3을 발현하는 DISC edTreg를 능가할 수 있다. 따라서, 몇몇 실험을 수행하여, DISC edTreg의 개수 및 풍부화 (%)를 최적화하였다. 하기에 더욱 상세하게 기재되는 바와 같이, 이들 최적화 실험은 2가지 상이한 프로토콜: 2-단계 확장 프로토콜 및 3-단계 확장 프로토콜을 이용하여 수행되었다.

[0430]

2-단계 확장 프로토콜

[0431]

2-단계 확장 프로토콜에서, 세포 확장을 2 단계로 수행하였다: 확장 단계 1에서는 회수 배지에서 IL-2 (50 ng/mL)의 존재 또는 부재하에 라파마이신 선택을 시험한 후, 확장 단계 2에서 항-CD3/CD28 비드를 첨가하고, 배지로부터 IL-2를 제거하였다. 일반적으로, CD4 T 세포를 -4 일째에 50 μg/mL IL-2 및 항-인간 CD3/CD28 비드를 갖는 T 세포 배지에서 배양된 인간 PBMC로부터 단리하였다. -1 일째에, CD3/CD28 비드를 제거하였다. 확장 단계 1 동안에 (0-9 일째), 유전자 편집을 CRISPR/Cas9 RNP 및 AAV6 (예시적인 구축물은 도 13A에 도시됨)에 의해 수행하였다. 세포를 하기 기재된 바와 같이 3가지 확장 코호트로 나누었다. 유세포 분석을 2 일째에 수행하여 유전자 편집을 평가하였다. 9 일째에, 세포를 2가지 확장 코호트로 추가로 나누어서, 비드 및 항체 CD3/CD28 자극을 시험하였다. 이어서, 확장 단계 2의 완료시에 (16 일째), 유세포 분석을 수행하여 편집된 세포의 풍부화 및 확장을 평가하였다.

[0432]

이 실험을 위해, μDISC를 발현하는 구축물 (짧아진 IL2Rβ 서열, 및 FOXP3과의 HA-태그 융합을 가짐)을 이용하였다. 이 실험에서 사용된 AAV 구축물의 구조는 도 13A에 제시되어 있으며, 여기서 MND 프로모터는 마이크로-DISC의 세포-표면 발현 및 HA-태그 부착된 FOXP3의 세포내 발현을 유도한다.

[0433]

이론에 구애되지 않고, 확장 단계 1이 라파마이신에서 DISC edTreg/ μDISC edTreg의 선택적 풍부화를 촉진시켜, 확장 단계 2 이전에 편집된 세포가 편집되지 않은 세포를 능가하게 하고, CD3/CD28 자극이 DISC edTreg의 개수를 확장시킬 것으로 믿어진다. 일반적으로, 확장 단계 1은 상동성-의존성 복구 (HDR), DISC 발현, 전기천공으로부터의 회수, 및 CD4+ T 세포 확장을 포함한다. 하기 코호트를 회수 배지에서 IL-2 (50 ng/mL)의 존재 또는 부재하에 라파마이신 또는 라파로그에 대해 시험하였다: (1) 50 ng/mL IL-2를 갖는 라파마이신; (2) 50 ng/mL IL-2를 갖는 라파로그; 및 (3) IL-2를 갖지 않는 라파마이신.

[0434]

확장 단계 2 동안에, DISC edTreg의 개수를 개선시키기 위해 제2 CD3/CD28 자극을 시험하였다. 하기 코호트는

CD3/CD28 확장기 비드 대 가용성 항-CD3/CD28 항체 둘 다를 시험하였다: (1) 없음 (비드 없음/항체 없음); (2) T 세포 확장기 비드; 및 (3) 가용성 CD3/CD8 항체. 이 실험에서, 배지의 절반을 제거하고, 3, 6, 8, 10, 13 및 15 일째에 2배 농도의 라파마이신, 라파로그 또는 IL-2를 함유하는 동일한 부피의 배지로 보충하였다.

[0435] 이 실험의 결과는 도 13B에 제시되며, HA+ FOXP3+ 세포에 대한 유세포 분석 관독에 의해 결정되는 바와 같이, 확장 단계 2 동안에 비드 자극을 제공받은 세포가 가장 높은 총 세포 개수 뿐만 아니라 가장 높은 μ DISC edTreg 개수를 나타내는 것으로 관찰되었다. 가용성 항체 자극은 또한 확장을 개선시켰지만, 더 적은 정도였다. 확장 단계 1 동안에 배지에서 IL-2의 존재가 최종 세포 개수를 개선시켰지만, 편집되지 않은 세포의 개수가 편집된 세포에 비해 더 많았으며, 따라서 단계 1에서 IL2의 양을 제한하는 것이 중요하였다. 가장 높은 백분율의 μ DISC edTreg를 갖는 코호트는 확장 단계 1 동안에 IL-2를 제공받지 않았지만, 비드 자극 조건을 위한 세포가 충분하지 않았기 때문에 확장 단계 2 동안에 비드 자극을 받았다. 이들 실험으로부터 도출된 결론은 다음과 같다: (1) 비드 확장 이전에 배지에서 IL-2의 제한은 μ DISC edTreg의 풍부화를 개선시킬 수 있었고; (2) 편집 이후에 IL-2는 총 세포 수율을 개선시켰고; (3) 항-CD3/CD28 비드는 가용성 CD3 및 CD28 항체의 사용 또는 자극 없음에 비해 세포 확장을 개선시켰다.

[0436] 3-단계 확장 프로토콜

[0437] 3-단계 확장 프로토콜은 IL-2를 완전히 제거하는 것이 아니라 편집 직후에 IL-2를 제한하는 것이 풍부화 및 세포 수율을 개선시키는지 여부를 시험하기 위해 설계되었다. 상기 기재된 2-단계 확장 프로토콜과 비교하여, 3-단계 확장 프로토콜에서 편집 직후에 추가의 짧은 확장 단계 (확장 단계 0; 0-3 일째)를 포함시켜, 다양한 양의 IL-2 (또는 라파마이신 또는 라파로그 단독)를 함유하는 배지에서 세포 회수 및 DISC 발현을 가능하게 하도록 설계되었다. 이어서, 확장 단계 0 이후에 회수된 세포를 G-Rex 플라스크로 옮기고, 라파마이신에서 확장시켜 (확장 단계 1; 3-10 일째), DISC edTreg를 풍부화시킨 후에, 항-CD3/CD28 비드를 첨가하였다 (확장 단계 2; 10-15 일째). 도 13A에 도시된 것과 동일한 AAV 구축물을 이 실험에서 사용하였다.

[0438] 항-FOXP3 및 항-HA 태그에 의한 세포내 염색 이후 3 일째에 유세포 분석을 수행하였고 (HA 태그는 FOXP3과 인프 레임 융합되어 융합 단백질을 생성함), 이는 편집후 확장 단계 0에서의 IL-2 농도와 μ DISC edTreg 세포의 백분 율 사이의 직접적인 상관관계를 설명한다. 결과는 하기 표 6에 나타내었다. 성공적으로 편집된 세포는 HA+ FOXP3+였다 (Q2 참고). HA-FOXP3+ 천연 발생 tTreg 및/또는 FOXP3 발현을 상향조절하는 활성화된 T 세포 또한 제시된다 (Q1 참고).

[0439] 표 6

3 일째 유세포 분석	Q1	Q2	Q3	Q4
모의 편집	15.40	1.03	4.08	79.50
50 μ g/mL IL-2	4.42	16.40	2.88	76.30
5 μ g/mL IL-2	2.71	8.24	3.61	85.20
0.5 μ g/mL IL-2	1.59	6.54	5.44	86.4
배지 단독	0.68	5.46	1.32	92.50
10 nM 라파마이신	0.38	6.41	1.48	91.70
100 nM AP21967	0.39	11.90	1.74	86.00

[0440]

[0441] 편집률이 IL-2 수준과 직접적인 상관관계가 있는 것으로 관찰되었으며, 이는 편집후 3 일 확장 단계 (단계 0) 동안에 IL-2 신호가 HDR 결과를 개선시켰음을 나타낸다. 추가로, 라파마이신이 이 시점에서 IL-2의 부재하에 편집률을 구제하지 않았음이 관찰되었다.

[0442] 확장 단계 1 이후에 (10 일째), 성공적으로 편집된 세포를 유세포 분석에 의해 평가하였다. 확장 단계 1 이후에 (10 일째) μ DISC edTreg의 풍부화를 보여주는 유세포 분석의 결과는 하기 표 7에 나타내었다.

[0443] 표 7

10 일째 유세포 분석	Q1	Q2	Q3	Q4
모의 편집	6.10	0.00	0.078	93.8
50 µg/mL IL-2	2.59	23.8	2.45	71.2
5 µg/mL IL-2	0.53	50.0	5.18	44.3
0.5 µg/mL IL-2	0.46	58.3	9.10	32.2
배지 단독	0.26	53.6	15.2	30.9
10 nM 라파마이신	0.44	70.1	9.31	20.1
100 nM AP21967	0.59	80.5	5.54	13.3

[0444]

[0445]

성공적으로 편집된 세포 HA+ FOXP3+는 컬럼 Q2에 나타내었다. HA-FOXP3+ 천연 발생 tTreg는 세포가 확장 단계 0 동안에 (모의 편집 포함) 50 ng/mL IL-2를 제공받았을 때에만 존재한다. 10 일째에 유세포 분석은, 확장 단계 0 동안에 보다 높은 용량의 IL-2 중에서 배양된 세포가 DISC edTreg에 대해 덜 풍부화되었음을 보여주며, 이는 확장 단계 0으로부터의 일부 IL-2 배지가 확장 단계 1 배지로 전달되었기 때문일 수 있다. 이 실험에서, 내내 라파마이신에서 또는 라파로그 AP21967과 함께 배양된 세포는 가장 높은 풍부화율을 가졌다.

[0446]

15 일째에, 예컨대 확장 단계 2의 완료시에 수행한 유세포 분석의 결과는 확장 단계 2 이후에 µDISC edTreg의 풍부화 수준을 보여주며, 하기 표 8에 나타내었다.

[0447]

표 8

15 일째 유세포 분석	Q1	Q2	Q3	Q4
모의 편집	3.20	0.12	1.04	95.6
50 µg/mL IL-2	3.97	24.0	7.77	64.3
5 µg/mL IL-2	1.54	68.2	2.81	27.4
0.5 µg/mL IL-2	0.46	72.9	5.37	21.3
배지 단독	1.12	60.1	4.49	34.3
10 nM 라파마이신	1.08	75.6	7.56	15.7
100 nM AP21967	0.33	84.1	4.93	10.7

[0448]

[0449]

확장 단계 2 이후에 IL-2 및 라파마이신 코호트 각각에 대해 풍부화가 개선되었지만, 확장 단계 0 동안에 보다 고용량의 IL-2에서 배양된 세포는 DISC edTreg에 대해 덜 풍부화된 상태로 유지된 반면에, 확장 단계 0 동안에 라파마이신 또는 라파로그 AP21967에서 배양된 세포는 심지어 15 일째에도 가장 높은 풍부화율을 가졌다.

[0450]

도 14A 및 14B에 도시된 바와 같이, 확장 단계 1 및 2 이후에 (각각 편집후 10 일째 및 15 일째) 세포 카운트는, 확장 단계 0 동안에 50 ng/mL IL-2가 배지에 존재할 때 가장 높은 개수의 HA+ (여기서 µDISC+로 표지됨) FOXP3+ 편집된 세포가 획득되었음을 보여주었다. 그러나, 이 조건은 또한 편집되지 않은 세포에 비해 가장 낮은 풍부화율 (%)을 가졌다. 확장 단계 0 동안에 5 ng/mL IL-2에서 세포 배양은 약간 더 적은 µDISC edTreg를 가졌지만, 이 집단은 총 세포의 거의 70%를 가졌다. 따라서, 확장 단계 0 동안에 5 ng/mL IL-2의 사용이, 전체 세포 µDISC edTreg 순도를 현저히 감소시키지 않으면서, µDISC edTreg의 총 수율을 가장 잘 최적화시켰다고 결론 내렸다.

[0451]

µDISC FOXP3 cDNA edTreg에 대한 3-단계 확장 프로토콜의 사용

[0452]

후속적인 실험에서, 유사한 3-단계 확장 프로토콜은 예를 들어 IPEX (면역 조절장애, 다발성 내분비병증, 장병증, X-관련)를 가진 대상체의 치료에 대해 잠재적인 용도를 갖는, 편집을 위해 상이한 rAAV6 공여자 구축물을 사용하여 시험하였다. 이 실험에서 사용된 rAAV6 공여자 구축물은 N-말단에서 C-말단 배향으로, HA tag-FOXP3 cDNA-µDISC에 대한 코딩 서열을 포함하였다. 통합 이후에, 삽입된 구축물은 HA-FOXP3 cDNA 융합 단백질 뿐만

아니라 μ DISC를 발현하도록 설계되었다. 세포 회수 및 DISC 발현을 가능하게 하기 위해 편집 직후에 추가된 짧은 확장 단계 (확장 단계 0; 0-3 일째)를 포함하는 것으로 설계되었다. 이어서, 확장 단계 0 이후에 회수된 세포를 G-Rex 플라스크로 옮기고, 10 nM 라파마이신에서 확장시켜, 편집된 세포를 선택하고 (확장 단계 1; 3-10 일째), DISC edTreg를 풍부화시킨 후에, 제2 자극을 위해 항-인간 CD3/CD28를 첨가하였다 (확장 단계 2; 10-17 일째). 이는 실험이며, 확장 단계 2는 세포 수율을 개선시키도록 17 일까지 연장되었다.

[0453] 상기 3-단계 프로토콜을 이용하여, 편집되지 않은 세포의 확장과 비교하여 μ DISC FOXP3 cDNA edTreg의 증가된 확장이 달성되었다. 특히, 3 일 내지 17 일째에 편집된 세포의 개수의 26배 확장이 달성되었고, 17 일째 시점에서 편집된 세포의 대략 78% 풍부화가 달성되었다 (데이터는 도시되지 않음). 시작 편집률이 약 10%인 것으로 관찰되었고, 이는 이 연구에서 AAV 공여자의 보다 큰 팩키징 크기를 반영할 수 있다.

[0454] 최적화된 DISC 확장을 이용하는 세포 확장의 편집

[0455] 후속적으로, 후보 임상적 AAV 공여자를 상기 논의된 최적화된 3-단계 확장 프로토콜을 이용하여 편집 및 확장에 대해 시험하였고, 상기 프로토콜은 3-단계 확장 프로토콜 이후에 편집되지 않은 세포의 확장과 비교하여 DISC edTreg의 확장을 결정하도록 설계되었다. 이 실험에서, 전장 DISC 요소 및 내인성 FOXP3이 상류 MND 프로모터의 조절하에 있는 여러 자가면역 적용에서 공여자 AAV를 사용하도록 설계되었다. HA 태그를 갖는 (AAV 공여자 주형 # 3187; 서열식별번호: 38) 또는 HA 태그를 갖지 않는 (AAV 공여자 주형 # 3195; 서열식별번호: 39) AAV 공여자는 내인성 FOXP3에 융합되었다. 이들 AAV 공여자를 이용하는 편집은 상류 MND 프로모터의 조절하에 전장 DISC 요소 및 내인성 FOXP3을 발현시켰다. 제1 시험 벡터 (AAV 공여자 주형 # 3187; 시험 1)는 내인성 FOXP3에 융합된 HA 태그를 포함하는 AAV 구축물을 사용하였고; 다음 3가지 시험 (시험 2, 시험 3 및 시험 4)은 임상적으로 더욱 관련이 있는 HA 태그가 없는 AAV 공여자 (AAV 공여자 주형 # 3195)를 사용하였다. 이 실험에서, 세포 회수 및 DISC 발현을 가능하게 하기 위해 편집 직후에 추가된 짧은 확장 단계 (확장 단계 0; 0-3 일째; 5 ng/mL IL-2의 존재하에)를 포함하도록 설계하였다. 이어서, 확장 단계 0 이후에 회수된 세포를 G-Rex 플라스크로 옮기고, 10 nM 라파마이신의 존재하에 확장시켜, 편집된 세포를 선택하고 (확장 단계 1; 3-10 일째), DISC edTreg를 풍부화시킨 후에, 유세포 분석을 수행하고, 항-CD3/CD28 비드를 첨가하였다 (확장 단계 2; 10-17 일째; 10 nM 라파마이신의 존재하에). 17 일째에, 확장 단계 2의 완료시에, 유세포 분석을 수행하였고, 세포를 카운트하고 동결시켰다.

[0456] 3 일째부터 비드 활성화가 시작될 때까지 (10-13 일째) 편집된 세포 (HA 태그를 갖거나 갖지 않음)의 평균 확장 배수가 2 ± 1.6 배이고; 비드 활성화 동안에 (10-13 일 내지 16-20 일째) 평균 확장 배수가 20.5 ± 5.9 배 (2명의 공여자에 대한 4회 실험의 평균 \pm s.d.) (데이터는 도시되지 않음)인 것으로 관찰되었다. 시작 3 일째 편집률 (예컨대 이중 양성 FOXP3+P2A+ 세포의 백분율)이 상기 나타난 실험보다 약 2배 높았기 때문에, 이들 실험은 제3 확장 단계의 완료시 살아있는 세포 게이트 내에서 매우 높은 순도 ($93.5 \pm 2.4\%$)를 갖는 최종 생성물을 지속적으로 생성하였다.

[0457] 실시예 6: 생체내에서 μ DISC GFP edTreg 확장 또는 생존에 대한 라파마이신의 효과

[0458] 이 실시예는 μ DISC 구축물을 발현하는 edTreg 세포가 생체내에서 라파마이신 처리에 의해 확장되는 능력을 시험하기 위해 수행된 실험을 기재한다. 조작된 T 세포 또는 확장된 천연 Treg는 종종 환자에게 충분히 확장되지 않기 때문에, 이는 중요한 개념이다. 예를 들어 일부 감염의 경우에 Treg를 확장시키는 것이 바람직하지 않은 조건도 있다. 따라서, Treg 특징을 갖는 본원에 제공된 조작된 세포의 유용한 특징은 생체내에서 확장에 대한 조절을 발휘하는 능력이다. 면역-비적격성 NOD-scid-IL2RgNULL (NSG) 마우스에게 전달된 인간 세포를 포함하는 인간화된 마우스 모델을 이용하여 라파마이신이 생체내에서 μ DISC edTreg의 개수를 증가시킬 수 있는지 여부를 결정하기 위한 실험이 수행되었다. 이들 실험을 위해, AAV 공여자를 사용하여 세포를 편집하여 MND 프로모터로부터 μ DISC 및 내인성 FOXP3의 시스-연결된 발현을 유도하였다. 이 AAV 공여자 주형은 내인성 FOXP3의 N-말단에 GFP 융합 단백질을 포함한다. GFP-표지된 FOXP3 융합 단백질을 이용하여 생체내 세포 샘플 내에서 유전자-편집된 세포를 검출하는 능력을 용이하게 하였다. 이 연구에서 이용된 3-단계 확장 프로토콜에서, CD4+ 세포를 -4 일째에 50 ng/mL IL-2에서 항-CD3/CD28 확장기 비드와 함께 배양하였다. 이어서, 비드를 -1 일째에 제거하였다. 편집 직후에, 5 ng/mL IL-2의 존재하에 확장 단계 0 (0-3 일째)을 수행하였다. 이 실험에서 이용된 3-단계 확장 프로토콜에서, 확장 단계 0 유세포 분석의 시기는 2 일째이다. 이어서, 확장 단계 0 이후에 회수된 세포를 G-Rex 플라스크로 옮기고, 10 nM 라파마이신의 존재하에 확장시켜, 편집된 세포를 선택하고 (확장 단계 1; 3-9 일째), DISC edTreg를 풍부화시킨 후에, 유세포 분석을 수행하고, 항-CD3/CD28 비드를 첨가하였다 (확장 단계 2; 9-16 일째; 10 nM 라파마이신의 존재하에). 유세포 분석을 2, 9, 12 및 16 일째에 수행하여, 편집된

GFP+FOXP3+ 세포 확장을 모니터링하였다. 하기 표 9에 나타난 바와 같이, 최종 세포 생성물이 16 일째까지 > 80% GFP+ 편집된 세포였고, 편집된 세포가 20배 넘게 확장된 것으로 관찰되었다.

[0459] 표 9

시점	2 일째	9 일째	12 일째	16 일째
편집된 GFP+FOXP3+ 세포	22%	79%	88%	89%

[0460]

[0461] 16 일째에, 확장 단계 2의 완료시에, 하기 기재된 바와 같이 세포를 정맥내 주사에서 사용하였다.

[0462] 라파마이신 결합 단백질을 포화시키고 혈청에 라파마이신을 제공하기 위해 NSG 마우스를 라파마이신으로 사전 처리하였다. 이어서, 하기 표 10에 나타난 바와 같이, 일부 마우스를 방사선 조사하여 (방사선 조사 = 200 cGy), 생체내 면역억제 검정에서 이용되는 방사선 조사를 모방하였다.

[0463] 표 10

	라파마이신	방사선 조사	#마우스
모의 편집	-	+	3
μDISC edTreg	-	+	5
μDISC edTreg	+	+	5
μDISC edTreg	-	-	5
μDISC edTreg	+	-	7

[0464]

[0465] 이어서, μDISC GFP edTreg (또는 모의-편집된 세포)를 하기 일반 절차에 따라 i.v. 주사하였다. -4 일째에 시작하여, 라파마이신 0.1 mg/kg의 복막내 (i.p.) 주사를 21 일째까지 격일로 수행하였다. 0 일째에, 방사선 조사를 수행하였고, μDISC edTreg를 i.v. 주사하였다. 말초 혈액 샘플을 수집하여 라파마이신 수준에 대해 (2 일째) 또는 유세포 분석에 대해 (7, 14, 21 및 28 일째) 시험하여, GFP+ edTreg 세포를 비롯하여 전달된 인간 T 세포의 표현형 및 개수를 추적하였다.

[0466] 라파마이신 처리 대 비히클에서 μDISC GFP edTreg의 확장을 설명하기 위해, NSG에 전달후 7 일째에 말초 혈액 으로부터의 유세포 분석 결과를 하기 표 11에 나타내었고 (게이트: 살아있는, hCD45+, hCD4+), 인간 T 세포 마 커 및 GFP+는 각각의 코호트로부터의 대표적인 마우스에 대해 나타내었다.

[0467] 표 11

	방사선 조사 (200 Gy)		방사선 조사 없음	
	비히클	라파마이신	비히클	라파마이신
CD25+ GFP+ edTreg 세포	44.8	82.6	35.1	79.9
CD25- GFP+ edTreg 세포	28.2	5.52	39.7	8.37
CD127+ GFP+ edTreg 세포	0.44	0.50	0.71	0.57
CD127- GFP+ edTreg 세포	71.9	87.6	74.1	88.2

[0468]

[0469] NSG에 전달후 7 일째에 라파마이신 처리 대 비히클에서 μDISC GFP edTreg의 확장을 설명하기 위해 수행된 유세포 분석 실험의 결과는 또한 도 15A-15B에 요약되어 있다. 이들 도면에서, 차트는 75 μL 말초 혈액 샘플에서 GFP+ 세포의 백분율 (도 15A) 또는 GFP+ 세포의 개수 (도 15B)의 평균 ± s.d.이다.

[0470] 마우스에게 세포 전달후 14 일째에 말초 혈액으로부터의 유세포 분석 결과는 도 16A-16B에 도시된다. 14 일째에, 말초 혈액 샘플을 인간 CD45, CD4, CD127 및 CD25에 대해 염색하였다. 두 날짜 모두에서, 대부분의 인간 CD45+ CD4+ 세포는 GFP+였다. 7 일째의 플롯은 Treg에 대해 예상된 바와 같이 GFP+ 세포가 CD25+ 및 CD127-인

것으로 확인되었다. 혈청 샘플에서 GFP+ 세포의 백분을 뿐만 아니라 GFP+ 세포의 개수는 마우스를 라파마이신으로 처리하였을 때보다 높았다.

[0471] 이들 마우스의 말초 혈액에서 μ DISC GFP edTreg의 수준을 총 4 주 동안 매주 계속 추적하였다. GFP+ 세포의 생성된 백분율 및 개수는 도 17의 그래프에 요약되어 있다. 이 실험으로부터 도출된 결론은, 라파마이신 처리된 마우스가 각각의 시점에서 보다 높은 수준의 μ DISC GFP edTreg를 가졌고, 세포 전달 이후에 2 내지 3 주 사이에 피크였다는 것이다. 방사선 조사는 세포의 개수를 약간 개선시켰고, 이는 입양에 의해 전달된 인간 edTreg 세포에 대해 무린 세포에 의한 항원 제시 수준이 보다 높기 때문일 수 있다.

[0472] 종합하면, 이 연구의 결과 (예를 들어, 표 9-11 및 도 17에 나타난 데이터)는 DISC 플랫폼의 버전을 발현하는 edTreg가 생체내에서 라파마이신을 이용하여 확장될 수 있음을 명백히 입증한다. 이는 이들 구축물 및 방법이 치료를 위해 이용될 수 있고, 예를 들어 상기 플랫폼이 자가면역 질환의 치료를 위해 DISC 발현 edTreg 생성물의 생체내 확장 및 지원에 유용하다는 직접적인 증거를 제공한다.

[0473] **실시예 7: 생체내에서 μ DISC GFP edTreg 확장 또는 생존에 대한 라파마이신 효과의 시험**

[0474] 이 실시예에서, 본 발명자들은 시험관내에서 라파마이신에서 확장된 DISC edTreg (본 발명의 3-단계 확장 프로토콜의 세포 생성물 제조 과정의 일부로서)가 생체내에서 기능하는 (예를 들어, 이펙터 T 세포 면역 반응을 억제하는) 능력을 갖는지 여부를 시험하였다. 이를 시험하기 위해 본 발명자들이 사용한 모델에서는, 인간 CD4 T 이펙터 세포를 최소한으로 방사선 조사된 NSG 마우스에게 주사하여, 마우스 조직에 대해 인간 T 세포에 의해 매개된 대규모 염증 반응을 일으킨다. 이 염증 반응은 마우스 MHC-II 발현에 대해 의존적이고, 이는 이 모델이 동종이계 T 세포 반응을 모방할 수 있고, 예컨대 이식편-대-숙주 질환을 일으킬 수 있음을 시사한다. 천연 발생 자가유래 흉선 Treg 및 이전에 보고된 신규한 edTreg 생성물은 이 면역 반응을 억제할 수 있다. 따라서, 이 실험에서 사용된 AAV 공여자 주형은 성공적으로 유전자-편집된 세포의 추적을 허용하는, 그의 N-말단에서 HA 에피토프를 함유하는 FOXP3 융합 단백질을 생성하도록 설계되었다. 이 AAV 공여자 주형은 MND 프로모터로부터 분리된, HA 태그 부착된 FOXP3 단백질의 상류에서 DISC 요소를 갖는 카세트를 발현하였다 (DISC HA ki edTreg로 약칭됨; ki = 녹-인). HDR 이후에, 카세트를 FOXP3 유전자좌에 삽입하여, DISC 및 내인성 FOXP3 둘 다의 MND-프로모터 매개된 발현을 유도하였다. 인간 T 세포 편집 및 확장은 다음과 같이 3-단계 확장 프로토콜을 이용하여 수행하였다. CD4+ 세포를 -4 일째에 50 ng/mL IL-2의 존재하에 항-CD3/CD28 확장기 비드와 함께 배양하였다. 이어서, 비드를 -1 일째에 제거하였다. 편집 직후에, 확장 단계 0 (0-3 일째)을 5 ng/mL IL-2의 존재하에 수행하였다. 이어서, 확장 단계 0 이후에 회수된 세포를 G-Rex 플라스크로 옮기고, 10 nM 라파마이신의 존재하에 확장시켜, 편집된 세포를 선택하고 (확장 단계 1; 3-10 일째), DISC edTreg를 풍부화시킨 후에, 유세포 분석을 수행하고, 항-CD3/CD28 비드를 첨가하였다 (확장 단계 2; 9-16 일째; 10 nM 라파마이신의 존재하에). 확장 단계 2의 완료시에, 세포를 16 일째에 수집하고 동결시켰다. 하기 표 12에 나타난 바와 같이, 유세포 분석을 14 일째에 수행하였고, 이는 세포 생성물이 확장되어 3 일째에서 14 일째까지 HA+FOXP3+ 세포에서 18.4배 증가되었고, 최종 세포 순도는 >90%였음을 나타내었다.

[0475] 표 12

확장 시점	3 일째	10 일째	14 일째
HA+FOXP3+ 세포	35.6%	63.3%	90.9%

[0476]

[0477] DISC HA ki edTreg가 생체내에서 활성화된 CD4 T 이펙터 세포를 억제하는 능력을 시험하기 위해 추가의 실험을 수행하였다. 하기 표 13은 다양한 NSG 마우스 코호트에 대한 상세한 내용을 제공하며, 이는 T 세포 집단이 IV 입양 전달에 의해 전달되었음을 나타낸다. LNGFR edTreg를 기능적으로 활성인 edTreg에 대한 양성 대조군으로 사용하였다. 이들 편집된 T 세포는 세포 표면 상에서 LNGFR 에피토프 태그 및 FOXP3 cDNA를 발현하고, 이전에 이 모델에서 면역억제성인 것으로 확인되었다.

[0478] 표 13

코호트	400만개 이펙터 T	800만개 모의 편집된 세포 (AAV 단독)	800만개 DISC HA-edTreg	800만개 LNGFR-edTreg	# 마우스
Teff 단독	+	N/A	N/A	N/A	4
Teff+ 모의	+	+	N/A	N/A	4
Teff+ 모의 (라파마이신에서 성장됨)	+	+	N/A	N/A	3
Teff+ DISC HA edTreg	+	N/A	+	N/A	5
Teff+ LNGFR edTreg	+	N/A	N/A	+	4

[0479]

[0480]

이 실험에서 사용된 일반적인 절차는 다음과 같다. 방사선 조사된 수용자 NSG 마우스에게 DISC HA ki edTreg 또는 모의-편집된 세포를 i.v. 주입하였다. 이어서, 3 일 후에 (edTreg 생착을 가능하게 하기 위해) CD4 T 이펙터 세포를 i.v. 주사에 의해 전달하였다. 체중을 추적하고 GvHD 증상을 평점함으로써 동물을 59 일까지 모니터링하였다. 마우스가 미리 결정된 인간 종점, 예컨대 그들의 체중의 >20% 감소에 도달하는 경우에 이들을 안락사시켰다.

[0481]

T 이펙터 세포와 함께 모의-편집된 세포를 제공받은 마우스가 가장 중증의 결과를 가졌고, 이들 코호트에서 모든 마우스가 45 일 이내에 사망한 것으로 확인되었다. 이 코호트는 모의-편집된 세포가 또한 무린 항원에 대한 생산적인 염증 반응을 일으키는 능력으로 인해 T 이펙터 세포 단독을 제공받은 마우스에 비해 더 악화되었다. LNGFR-발현 edTreg (본 발명자들의 실험실에서 다른 그룹에 의해 면역억제성인 것으로 입증된 양성 대조군 세포) 또는 DISC HA ki edTreg를 제공받은 마우스는 T 이펙터 단독 및 T 이펙터 그룹을 갖는 모의 edTreg 둘 다에 비해 개선된 생존율을 가졌고, 이는 DISC HA ki edTreg를 비롯한 edTreg가 T 이펙터 염증을 억제하였음을 나타낸다. 이들 조합된 발견은 DISC 구축물을 함유하는 edTreg가 생체내에서 Treg-유사 기능적 활성을 나타낼 수 있음을 명백히 입증하며; 이에 따라 자가면역 상태에서 요법에 대한 유사한 편집된 Treg 생성물의 사용을 뒷받침한다. 생체내 면역억제 모델의 카플란-마이어 생존 곡선이 도 18에 도시된다.

[0482]

실시예 8: 항-P2A 항체 염색 또는 ddPCR을 사용하는 DISC edTreg의 HDR 비율도의 평가

[0483]

편집된 세포를 검출하기 위한 항-P2A 염색

[0484]

이 실시예는 편집된 세포를 표지하기 위해 에피토프 태그 또는 형광 단백질에 의존하지 않는, DISC edTreg를 추적하고 혼합된 집단에서 성공적으로 편집된 세포의 비율을 측정하기 위한 임상적으로 관련된 방법의 개발을 기재한다. GFP 또는 HA와 같은 태그의 사용이 배양물에서 또는 생체내에서 편집된 세포의 민감하고 정량적인 검출을 가능하게 하지만, 이러한 태그는 태그에 대해 면역 반응을 매개할 수 있고/거나 FOXP3 기능을 억제할 수 있기 때문에, 이들은 임상적 세포 생성물에서 사용되지 않는다.

[0485]

본 발명자들이 개발한 새로운 세포 추적 방법은 P2A 리보솜 스킵 펩티드의 세포내 염색을 이용한다. P2A 서열을 AAV 공여자 서열에 통합시켜서, DISC 요소 및 FOXP3 시작 서열 각각의 코딩 서열을 분리한다. HDR 편집된 세포 내에서, 펩티드 서열의 일부분을 DISC 요소의 C-말단에서 편집된 세포에 도입시켰다. 이 실험에서는 노부스 바이올로지컬즈(Novus Biologicals)를 통해 상업적으로 입수가 가능한 P2A 항체 (CGDVEENPG에 대한 클론 3H4) 또한 사용하였다. 항-P2A 모노클로날 항체를 세포내 염색에서 사용하기 위해 형광단으로 표지하였다. 하기 표 14에 나타난 바와 같이, 일부 모의-편집된 세포는 FOXP3을 발현하였지만 (이 혼합된 세포 집단에서 흥선 Treg가 FOXP3을 발현하기 때문에 예상되는 결과임), 이들은 P2A 또는 HA 태그 항체 각각에 의해 염색하지 않았다. 이 실험에서, 편집후 3 일째에, 세포를 세포내 FOXP3, HA 태그, 및 P2A 펩티드에 대해 염색하였다. HA 태그를 포함하지 않는 AAV 공여자 주형 # 3195에 의해 편집된 세포는 FOXP3 및 P2A 둘 다를 높은 수준으로 발현하였다. HA 태그가 도입된 AAV 공여자 주형 # 3187에 의해 편집된 이들 세포는 유사한 수준의 P2A+ FOXP3+ 및 HA+ FOXP3+ 세포를 나타내었고, 이는 P2A 염색과 HA 염색 사이의 직접적인 상관관계를 입증한다. 따라서, P2A 염색의 사용은 제조된 edTreg의 일련의 평가 및/또는 생체내에서 이들 세포의 추적을 허용할 수 있다. 하기 표 14에서, 각각의 코호트에서 이중 양성 세포 (P2A-FOXP3 또는 HA-FOXP3을 발현함)의 백분율이 제시된다.

[0486] 표 14

AAV 공여자	편집된 세포 P2A+ FOXP3+	편집된 세포 HA+ FOXP3+
AAV #3195	42.3%	0.10%
AAV #3187	57.2%	59.8%
모의	0.20%	0.20%

[0487]

[0488] 분자 기반으로 HDR 사건을 정량화하기 위한 ddPCR 검정

[0489] 임상적 세포 생성물의 경우, 예를 들어 유세포 분석에 의해 결정되는 관심 유전자를 발현하는 세포의 백분율과 DNA 수준에서 결정되는 상동성-지정 복구 사건의 백분율 사이의 상관관계를 입증하는 것이 유용하다. 이러한 유용성을 설명하기 위해, FOXP3 발현은 심지어 유전자 편집 없이도 TCR 자극 이후에 이펙터 T 세포에서 상향조절될 수 있으며; 추가로 "오프 타겟" 이중 가닥 절단에 삽입된 AAV 주형은 또한 P2A 표지된 단백질을 발현할 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 혼합된 세포 집단에서 HDR 사건을 겪은 FOXP3 유전자의 백분율을 정량화하는 민감한 방법을 개발하였다. 이 단락은 게놈 DNA 샘플로부터 HDR 사건을 정량화하기 위해 개발된 디지털 액적 PCR (ddPCR) 검정에 대해 기재한다. 바이오-라드(Bio-Rad) QX200 액적 디지털(Droplet Digital) PCR 시스템 및 프로브에 대한 바이오-라드 ddPCR 슈퍼믹스(Supermix)를 사용하여 표적 유전자좌에서 성공적인 HDR의 검출을 가능하게 하도록 프라이머 및 프로브 세트를 설계하였다. 사용된 PCR 및 프로브 프라이머의 서열은 하기 표 15에 나타내었고, 어닐링 온도는 63°C였다.

[0490] 표 15

프라이머	서열	SEQ ID NO
DISC HDR FP	CGGCGACGTGGAAGAGAATC	34
DISC HDR RP	GGCTGTGGTTCAGCCTGACT	35
DISC HDR 프로브 (FAM)	AGGCTCTCCCCGACCTCCC	36

[0491]

[0492] 편집후 10 일째 시점에서 P2A 항체 염색에 의한 유세포 분석 결과에 대하여 ddPCR에 의해 계산된 HDR 비율의 결과는 하기 표 16에 요약된다.

[0493] 표 16

	편집 1 3195	편집 2 3195	편집 3 3195	편집 4 3195	편집 5 3195	편집 6 3195	편집 7 3195	편집 8 3195	편집 9 3195	편집 3187	모의
ddPCR	68.9	78.8	72.8	73.1	61.7	72.0	74.9	63.8	64.4	76.1	0.0
HDR 비율	61.3	69.1	65.0	67.4	58.3	63.8	66.6	55.8	52.9	67.6	5.26

[0494]

[0495] 이들 실험에서, 9개의 독립적인 샘플의 유세포 분석은 편집후 10 일째에 AAV 3195 (편집 1 내지 9) 또는 AAV 3187 또는 모의 편집에 의해 평가하였고, FOXP3 및 P2A에 의한 세포내 염색을 나타내었다. 각각의 코호트에서 이중 양성 세포 (P2A-FOXP3을 발현함)의 백분율이 제시된다. ddPCR 검정과 병행하여 세포로부터 게놈 DNA를 단리하였다. ddPCR 검정의 결과 또한 나타내었다. 유세포 분석에 의해 평가시 ddPCR 값과 양성 세포 사이에 밀접한 상관관계가 있는 것으로 관찰되었다 (편집 1의 경우 유세포 분석에 대해 68.9 ddPCR 대 61.3 등). 따라서, ddPCR은 시험관내에서 DISC edTreg의 비율을 추적하기 위한 제2 검정을 제공하고, 이 방법은 유세포 분석에 의한 P2A 염색의 사용과 좋은 상관관계가 있다.

[0496] 본 개시내용의 특정한 실시양태가 개시되었지만, 첨부된 청구항의 개념 및 범위 내에서 다양한 변형 및 조합이 가능하고 고려됨을 이해해야 한다. 따라서, 본원에 제시된 정확한 요약서 및 개시내용으로 제한되는 것으로 의도되지는 않는다.

[0497] 서열

[0498] 본 개시내용에서 개시된 서열 외에도, 하기 서열이 본 개시내용의 다양한 예시적인 실시양태에서 언급되거나 사용되었기 때문에 이들이 제공되며, 설명의 목적을 위해 제공된다.

SEQ ID NO	서열	설명
1	MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLME AQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISK	네이키드 FRB 야생형 폴리펩티드
2	MEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMFEVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLME AQEWCRKYMKSGNVKDLTQAWDLYYHVFRISK	네이키드 FRB 돌연변이 폴리펩티드
3	GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTG CCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAAATATGGGCCAAACAGGATATC TGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCG GTCCCAGCCTCAGCAGTTCTAGAGAACCATCAGATGTTCCAGGGTGCCCCAAGGAC CTGAAATGACCCCTGTGCTTATTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTGCTTCTGTTCG CGCGCTTCTGCTCCCGAGCTCTATAAAGCAGAGCTGTTTGTGAAACCGTCAAGTTC GCTAGCACCGGTGCCGCCACCATGCCTCTGGGCTGCTGTGGCTGGGCTGGCCCTGC TGGGCGCCCTGCACGCCAGGCCGGCTGCAGGTGGAGACAATCTCCCAGGCGAC GGACGCACATTCCTAAGCGGGGCCAGACTGCGTTGTGCACTATACAGGCATGCTG GAGGAGGGTCAAGAAAGTTGACAGCTCCCGGGATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATG CTGGGAAGCAGGAAGTATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCTGGCCAGATGTCTGT GGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCAGACTACGCCTATGGAGCAACAGGCCA CCCAGGAATCATCCACCTCACGCCACCCTGGTGTTCATGTGGAGCTGCTGAAGCTG GGCGAGGGATCCAAACACATCAAAGAGAAACCCCTTCTGTTGCAATTGGAGGCCGT GTCATATCTGTTGGATCCATGGACTTATTATCTCCCTGTTGTGTGTACTTCTGGCT GGAACGACTATGCCAGGATCCCCACGCTCAAGAAATCTGGAAGATCTCGTACAGAG ATACCATGGTAATTCAGCGCTGGAGCGGAGTCTTAAGGGTCTGGCCGAATCCCTC CAACCCGATTATTCTGAACGGTTGTGCTCGTATCCGAAATACCACAAAAGCGGGG CTCTGGGTGAGGGCCAGGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGTATTGGGCC CTCCTTGTATACGTTGAAGCCCGAAACTGGAAGCGGAGCTACTAAGTTCAGCTGCT GAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGCACTGCCCGTACCCG CCCTGCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCCCGCCATCTCTGTGGCAG GATGTGGCAGGAGGCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTGATTTTGGGAGCGCAACG TGAAGGGCATGTTGAGGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGAGGGCCAC AGACCCTGAAGGAGACATCCTTTAACAGGCCTATGGACGGGACCTGATGGAGGCAC AGGAGTGGTGACAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACCTGCTGCAGGCC TGGGATCTGACTATCACGTGTTTCGGAGAATCTCAAGGGCAAAGACACGATCCGT GGCTTGGGCATCTGCTGTTGGGCTGAGTGGTGCCTTTGTTTCATCATCTGGTCTA TCTCTTATCAATTGCAGAAATACAGGCCCTTGGCTGAAAAAGTCTCAAGTGTAA ACCCCGACCCAAAGCAAGTTCTTCCAGCTTTCTTACAGCATGGAGGCGATGTGC AGAAATGGCTCTTACCTTTTCCCTCCTCAAGCTTCTCCCGGGAGGGCTGGCGCC GAGATTTACCTCTTGAAGTACTTGAACGAGACAAGGTTACCCAACTTCTCTCAACA GGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCCAACCACTCTTACGAGCTGCTTC ACCAATCAGGGATACTTCTTTTCCACCTTCCGATGCGCTGGAAATCGAAGCTTGTCA AGTTTACTTTACCTATGATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGAAGGAGTCCCGGT GCGCCACGGGTTCTCACCCCAACCTTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAGATGATGCTT ATTGCACTTTCCAGTAGAGACGATCTCCTCTCTTTTCTCATCTTTTGGGGGAC CTTCCCCCTTCTACGGCACCTGCGGGTCTGGTCTGGCGAGGAGCGGATGCCGC CGTCCCTCCAGGAGCGAGTACCACGAGATTGGGATCCCGAGCCACTTGGACCCCCAC CCCCGGCTACCTGACCTTGTGATTTTCAACCTCCCTGAAATGGTCTGCGAGAG	DISC 벡터 DNA

[0499]

	<p>GCTGGGGAGGAAGTTCGGACGCTGGGCCGAGGGAGGGCGTCTCTTTCCATGGAG TAGGCCTCCAGGTCAAGGCGAGTTTAGGGCTCTCAACGCGCGGCTGCCGTTGAATAC AGACGCTTATCTCTACTGCAAGAACTGCAAGGTCAGGACCAACACATCTTGTAGGA TCTGGTGCTACTAATTTTTCTTTTTGAAGCAAGCTGGAGATGTTGAAGAGAACCCCG GTCCGGAGATGTGGCATGAGGGTCTGGAAGAAGCGTCTGACTGTACTTTGGTGAGC GCAATGTGAAGGCGATGTTTGAAGTCTCGAACCCCTTCATGCCATGATGGAAACGCG GACCCAGACCTTGAAGGAGACAAGTTTTAACCAAGCTTACGGAAGAGACCTGATGG AAGCCAGGAATGGTGCAGGAAATACATGAAAAGCGGGAATGTGAAGGACTTGCTC CAAGCGTGGACCTGTACTATCATGTCTTAGGCGCATTAGTAAGGGCAGCGGCC ACCAACTTCAGCTGCTGAAGCAGGCCGCGACGTGGAGGAGAACCCCGGCCCGT AGCAAGGGCGAGGAGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTCATGCGCTTCAAGGT GCACATGGAGGGTCCGTGAACGCGCCAGGATTCGAGATCGAGGGCGAGGGCGAG GGCCGCCCTCAGGAGGACCCAGACCCCAAGCTGAAGGTGACCAAGGTTGGCC CCTGCCCTTCGCTGGGACATCCTGTCCCCTCAGTTTCATGTACGGCTCCAAGGCCTACG TGAGCACCCCGCCGACATCCCGACTACTTGAAGCTGCTCTCCCGAGGGCTTCAA GTGGGAGCGGTGATGAATTCGAGGACGCGCGGTGGTGACCCGTGACCCAGGACT CCTCTCGCAGGACGGCGAGTTCTCTACAAGGTGAAGCTGCGCGGACCAACTTCCC CTCCGACGCGCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAGGCCTCTCCGAGCG GATGTACCCGAGGACGGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCAGAGGGTGAAGCTGA AGGACGCGCGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACTACAAGGCCAAGAAGCCC GTGCAGCTGCCGCGCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACATCACTCCCAACG AGGACTACACCATCGTGAACAGTACGAACGCGCGAGGGCCCACTCCACCGCG GCATGGACGAGTGTACAAGTGAAGTGTGACAAATCAACCTCTGGATTACAAAAT TTGTGAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCTTTACGCTATGTGGATACG CTGCTTAAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCT GTATAAATCTGGTGTCTCTTTATGAGGAGTGTGGCCGTTGTGAGGCAACGT GGCGTGTGTGACTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCA CCTGTGAGCTCTTCCGGGACTTTCGCTTCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAAGT ATGCGCGCTGCCTTCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATT CCGTGGTGTGCGGGGAAGTGTGACGCTCTTCCATGGTGTGCGCTGTGTTGCCAC CTGGATTCTGCGCGGACGCTCTCTGCTACGTCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGAC CTTCTTCCCGCGGCTGCTGCCGGCTGCGGCGCTTCCGCGCTTCCGCTTCCGCC TCAGACGAGTCGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCGCCTGGA</p>	
4	<p>CCAGCAGCTCTCGGCAAAGACACGATTCCGTGGCTTGGGCATCTGCTCGTTGGGCTGA GCGGTGCGTTTGGTTTCATCATCTTGGTCTATCTTGTATCAATTGCAGAAATACAGGC CCTTGGCTGAAAAAGTGTCAAGTGAATACCCCGACCCAAGCAAGTCTTCTCCC AGCTTCTTCAAGAGCATGGAGCGATGTGCAGAAATGGCTCTTTCACCTTTTCCCTCC TCAAGCTTCTCCCGGGAGGGCTGGCGCCGAGATTTACCTCTTGAAGTACTTGAAC GAGACAAGTTACCAACTTCTCTTCAACAGGATAAGGTACCCGAACTGCGAGCCT TAGCTTGAATACAGACGCTTATCTCTACTGCAGAACTGCAA</p>	<p>μDISC DNA (세포질 꼬리 단백질; 코돈 분기됨)</p>
5	<p>PAALGKDTIPWLGHLVGLSGAFGIILVYLLINCRNTGPWLKVKLCNTPDPSKFFSLSSE HGGDVQKWLSSPFPSSPGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQDKVPEPASLNTDAYL SLQELQ</p>	<p>μDISC 폴리펩티드 (세포질 꼬리 단백질)</p>
6	<p>GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLDGGKFDSSRDRNKPFKMLGKQEVIRG WEEGVAQMSVQRAKLITSPDYAYGATGHPGIIPPHATLVDFVLLKLGE</p>	<p>FKBP CISC 도메인</p>
7	<p>MALPVTALLPLALLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEWCRKYMKSGNVKDLLQAWDYHVFRRISKPA LGKDTIPWLGHLVGLSGAFGIILVYLLINCRNTGPWLKVKLCNTPDPSKFFSLSSEHG GDVQKWLSSPFPSSPGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQDKVPEPASLNTDAYLSL QELQ</p>	<p>전체 μDISC 폴리펩티드 (FRB- 말단절단된 IL2Rβ)</p>
8	<p>GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGTAAGCAGTTCTG CCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATC</p>	<p>μDISC 벡터 DNA</p>

[0500]

TGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCG
 GTCCCCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTCCAGGGTGCCCCAAGGAC
 CTGAAATGACCCCTGTGCCTTATTTGAACATAACCAATCAGTTCGCTTCTCGTTCTGTTCCG
 CGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTGTAGTAAACCGTCAGATC
 GCTAGCACCGGTGCCGCCACCATGCCTCTGGGCCTGTGTGGCTGGCCCTGGCCCTGC
 TGGGCGCCCTGCACGCCAGGCCGGCTGCAGGTGGAGACAATCTCCCCAGGCGAC
 GGACGCACATTCCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCGTTGTGCACATACAGGCATGCTG
 GAGGATGGCAAGAAGTTTACAGCTCCCGGGATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATG
 CTGGGCAAGCAGGAAGTATCAGAGGCTGGAGGAGGGCGTGGCCAGATGTCTGT
 GGGCCAGAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCCAGACTACGCTATGGAGCAACAGGCCA
 CCCAGGAATCATCCACCTCACGCCACCTGGTGTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTG
 GCGGAGGGATCCAACACATCAAAGAGAACCCCTTCTGTTGCGATTGGAGGCCGTA
 GTCATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCTCCCTGTTGTGTGTACTTCTGGCT
 GGAACGGACTATGCCAGGATCCCACGCTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTACAGA
 ATACCATGTAATTTACAGCGCTGGAGCGGAGTCTCTAAGGGTCTGGCCGAATCCCTC
 CAACCCGATTATTCTGAACGGTTGTGCCTCGTATCCGAAATACCACCAAAGGCGGGG
 CTCTGGTCCAGGGCCAGGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGTATTGGGCC
 CTCCTGTTATACGTTGAAGCCGAAACTGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCCTGCT
 GAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCTGGACCTATGGCACTGCCCGTGACCG
 CCCTGCTGCTGCCTGTGCCCTGTGTGCACGCGAGCCCGCCTATCTGTGGCACGA
 GATGTGGCAGGAGGGCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTGATTTTGGCGAGCGCAACG
 TGAAGGGCATGTTGAGGTGTGGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGAGGGCCAC
 AGACCCGAAAGGAGACATCTTTAACCGCCATGGACGGGACCTGATGGAGGCAC
 AGGAGTGGTGAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACCTGCTGCAGGCC
 TGGATCTGACTATCACGTGTTTCGAGAACTCCAAGGGCAAAGACACGATTCCGT
 GGCTTGGCATCTGCTCGTTGGGCTGAGTGGTGCCTTTGGTTTCATCATCTTGGTCTA
 TCTCTTGAATGCAAGAAATACAGGCCCTTGCTGAAAAAAGTGTCAAGTGAAT
 ACCCCGACCCAAAGTCTTCTCCAGCTTCTCAGAGCATGGAGGCGATGTGC
 AGAAATGGCTCTTCCACCTTTCCCTCCTCAAGCTTCTCCCGGGAGGGCTGGCGCC
 GAGATTTACCTTGTGAGTACTTGAACGAGACAAGTTACCCAATTCTCCTTCAACA
 GGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTTGAATACAGACGCTTATCTCACTG
 CAGGAAGTGAAGGATCTGGTGTACTAATTTTTCTTTTTGAAGCAAGCTGGAGATG
 TTGAAGAGAACCCCGTCCGGAGATGTGGCATGAGGGTCTGGAAGAAAGCTCTCGA
 CTGTACTTTGGTGAAGCAATGTGAAGGGCATGTTGAAGTCTCGAACCCCTTCATG
 CCATGATGGAACGCGGACCCAGACCTTGAAGGAGACAAGTTTTAACCAAGCTTACG
 GAAGAGACCTGATGGAAGCCAGGAATGGTGCAGGAAATACATGAAAAGCGGGAAT
 GTGAAGGACTTGTCCAAGCGTGGGACCTGACTATCATGTCTTTAGGCGCATTAGTA
 AGGGCAGCGGCCACCAACTTCAGCCTGTGAAGCAGGCCGGGACGTGGAGGAG
 AACCCCGGCCCGTGAGCAAGGGCGAGGAGGATAACATGGCCATCATCAAGGAGTTT
 ATGCGCTTCAAGGTGCACATGGAGGGCTCCGTGAACGGCCACGAGTTCGAGATCGAG
 GGGAGGGCGAGGGCCGCCCTACGAGGGCACCCAGACCCGAAGCTGAAGGTGAC
 CAAGGGTGGCCCTGCCCTTGCCTGGGACATCCTGTCCCTCAGTTTATGTACGGC
 TCCAAGGCCTACGTGAAGCACCCCGCGACATCCCCGACTACTTGAAGCTGTCTTCC
 CCGAGGGCTCAAGTGGGAGCGGTGATGAACTTCGAGGACGGCGGGCTGGTGACC
 GTGACCCAGGACTCCTCTGCAAGACGGCGAGTTTATCTACAAGGTGAAGCTGCGC
 GGCACCAACTCCCTCCGACGGCCCGTAATGCAGAAGAAGACCATGGGCTGGGAG
 GCCTCTCCGAGCGGATGTACCCGAGGACGGCGCCCTGAAGGGCGAGATCAAGCA
 GAGGCTGAAGCTGAAGGACGGCGGCCACTACGACGCTGAGGTCAAGACCACCTACA
 AGGCCAAGAAGCCCGTGCAGCTGCCCGGCCCTACAACGTCAACATCAAGTTGGACA
 TCACCTCCCAACAGGAGACTACCCATCGTGAACAGTACGAACGCGCCGAGGGCC
 GCCACTCCACGGCGGATGGACGAGCTGTACAAGTGAAGTGTGCGCAATCAAC
 CTCTGGATTACAAAATTTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAAGTATGTTGCTCCTTTTA
 CGCTATGTGGATACGCTGCTTAAATGCCTTGTATCATGTATTGCTTCCCGTATGGCT

[0501]

	TTCAATTTCTCCTCTGTATAAATCCTGGTTGCTGCTCTTTATGAGGAGTTGGCCCGTTGTGTCAGGCAACCTGGCGTGGTGTGACTGTGTTTGTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCCTGTACAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCTATTGCCACGGCGGAATCATCGCCGCTGCCTTGCCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATCCGTGGTGTGTCGGGGAAGCTGACGTCTTTCCATGGCTGCTCGCTGTGTTGCGCACCTGGATTCTGCGCGGGACGCTCTCTGCTACGCTCCCTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTCCTTCCCGCGGCTGCTGCGGCTGCTGCGGCTCCTCCGCGTCTTCCGCGTCTCGCCTCAGACGAGTCGGATCCTCCTTTGGGCCGCTCCCGCCTGGA	
9	MPLGLLWGLLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMKGQEVIRGWEEGVAQMSVQRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLLEGSSNTSKENPFLFALEAVVISVSGMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPLYWAPPCTYLPET	IL2R γ -CISC 폴리펩티드
10	MPLGLLWGLLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMKGQEVIRGWEEGVAQMSVQRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLLEGSSQNLVWPAPENLTLHKLSEQLLNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDRYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFPNLCGSAQHWSEWSPHWHWSNTSKENPFLFALEAVVISVSGMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPLYWAPPCTYLPET	IL2R γ -CISC 폴리펩티드
11	MPLGLLWGLLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMKGQEVIRGWEEGVAQMSVQRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLLEGQNLVWPAPENLTLHKLSEQLLNWNNRFLNHCLEHLVQYRTDWDHSWTEQSVDRYRHKFSLPSVDGQKRYTFRVRSRFPNLCGSAQHWSEWSPHWHWSNTSKENPFLFALEAVVISVSGMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPLYWAPPCTYLPET	IL2R γ -CISC 폴리펩티드
12	MPLGLLWGLLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMLEDGKKFDSSRDRNKPFKFMKGQEVIRGWEEGVAQMSVQRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLVFDVELLKLLEGSSNTSKENPFLFALEAVVISVSGMGLIISLLCVYFWLERTMPRIPTLKNLEDLVTEYHGNFSAWSGVSKGLAESLQPDYSERLCLVSEIPPKGGALGEGPGASPCNQHSPLYWAPPCTYLPET	IL2R γ -CISC 폴리펩티드
13	MALPVTALLPLALLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKGDKDTIPWLGHLVLSGAFGIILVYLLINCRNTGPWLKVLKCNTPDPSKFFSLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLQDQKVPPEASLSSNHLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFYDYPYSEEDPDEGVAGAPTGSQPQLPLSGEDDAYCTFSPSRDLLLLFSPLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHV	IL2R β -CISC 폴리펩티드
14	MALPVTALLPLALLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKGSKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSWSPQPLAFRTKPAALGKDTIPWLGHLVLSGAFGIILVYLLINCRNTGPWLKVLKCNTPDPSKFFSLSSEHGGDVQKWLSSPFPSSSFGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLQDQKVPPEASLSSNHLTSCFTNQGYFFFHLPDALEIEACQVYFYDYPYSEEDPDEGVAGAPTGSQPQLPLSGEDDAYCTFSPSRDLLLLFSPLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPLVDFQPPPELVREAGEEVPDAGPREGVSPWSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGQDPTHV	IL2R β -CISC 폴리펩티드
15	MALPVTALLPLALLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEFVLEPLHAMMERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQWCRKYMKSGNVKDLLQAWDLYYHVFRRISKKPFENLRLMAPISLQVVHVETHRCNISWEISQASHYFERHLEFEARTLSPGHTWEEAPLLTLKQKQEWICLETLPDTQYEFQVRVKPLQGEFTTWSWSPQPLAFRTKPAALGKDTIPWLGHLV	IL2R β -CISC 폴리펩티드

[0502]

	VGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKVKLCNTPDPSKFFSLSSEHGDDVQKWLSPPFPSSFSPPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHLSLTSCTFNQGYFFHLPDAL EIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQLQLPLSGEDDAYCTFSPRDDLFLFSPSLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPTPGVPLVDFQPPPELVLR EAGEEVPDAGPREGVSPWRSRPPGQGEFRALNARLPLNTDAYLSLQELQGGQDPTHV	
16	MALPVTALLPLALLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSWLGHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKVKLCNTPDPSKFFSLS SEHGDDVQKWLSPPFPSSFSPPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSSNHLS TSCFTNQGYYFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQLQLPLSGEDD AYCTFSPRDDLFLFSPSLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPLGPPT PGVPLVDFQPPPELVLR EAGEEVPDAGPREGVSPWRSRPPGQGEFRALNARLPLNTDA YLSLQELQGGQDPTHV	IL7Rα-CISC 폴리펩티드
17	MALPVTALLPLALLHAARPILWHEMWHEGLEEASRLYFGERNVKGMEVLEPLHAMM ERGPQTLKETSFNQAYGRDLMEAEQEWCRKYMKS GNVKDLQAWDLYYHVFRISKGEI NNSSGEMDPIILLTISLFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLEHLCKKPRKNLN VSFNPFESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQLEESEKQRLGGDVQSPNCPSEDVV ITPEFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLLSLGTTNSTLPPP FSLQSGILTLPVPAQGGPILTSLSGNSQEEAYVTMSSFYQNQ	IL7Rα-CISC 폴리펩티드
18	GGGS	링커 폴리펩티드
19	GGGSGGG	링커 폴리펩티드
20	GGG	링커 폴리펩티드
21	GGG	링커 폴리펩티드
22	GGSP	링커 폴리펩티드
23	MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMELEDGKKVDSS RDRNKPFKFMGLKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLV FDEVLLKLEGGSDTIPWGLHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKVKLCNTPDPSKFF SLSSEHGDDVQKWLSPPFPSSFSPPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSS NHLSLTSCTFNQGYFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQLQLPLS GEDDAYCTFSPRDDLFLFSPSLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPL GPPTPGVPLVDFQPPPELVLR EAGEEVPDAGPREGVSPWRSRPPGQGEFRALNARLPL NTDAYLSLQELQGGQDPTHV	IL2Ry-CISC 폴리펩티드
24	MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMELEDGKKVDSS RDRNKPFKFMGLKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLV FDEVLLKLEGGSDTIPWGLHLLVGLSGAFGFIILVYLLINCRNTGPWLKVKLCNTPDPSKFF SLSSEHGDDVQKWLSPPFPSSFSPPGGLAPEISPLEVLERDKVTQLLLQQDKVPEPASLSS NHLSLTSCTFNQGYFFHLPDALEIEACQVYFTYDPYSEEDPDEGVAGAPTGSSPQLQLPLS GEDDAYCTFSPRDDLFLFSPSLLGGPSPSTAPGGSGAGEERMPPSLQERVPRDWDQPPL GPPTPGVPLVDFQPPPELVLR EAGEEVPDAGPREGVSPWRSRPPGQGEFRALNARLPL NTDAYLSLQELQGGQDPTHV	IL2Rβ-CISC 폴리펩티드
25	MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMELEDGKKVDSS RDRNKPFKFMGLKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLV FDEVLLKLEGEINSSGEMDPIILLTISLFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLE HLCCKKPRKNLNVSFNPFESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQLEESEKQRLGGDV QSPNCPSEDVVITPEFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLL SLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLPVPAQGGPILTSLSGNSQEEAYVTMSSFYQNQ	IL2Rα-CISC 폴리펩티드
26	MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMELEDGKKVDSS RDRNKPFKFMGLKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLV FDEVLLKLEGEINSSGEMDPIILLTISLFFSVALLVILACVLWKKRIKPIVWPSLPDHKKTLE HLCCKKPRKNLNVSFNPFESFLDCQIHRVDDIQARDEVEGFLQDTFPQLEESEKQRLGGDV QSPNCPSEDVVITPEFGRDSSLTCLAGNVSACDAPILSSSRSLDCRESGKNGPHVYQDLLLL SLGTTNSTLPPPFSLQSGILTLPVPAQGGPILTSLSGNSQEEAYVTMSSFYQNQ	IL7Rα-CISC 폴리펩티드
27	MPLGLLWLGLALLGALHAQAGVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVVHYTGMELEDGKKVDSS RDRNKPFKFMGLKQEVIRGWEEGVAQMSVGQRAKLTISPDIYAGATGHPGIIPPHATLV FDEVLLKLEGETAWISLVTALHLVGLSAVLGLLLLRWQFPAHYRRLHALWPSLPDLHRVL GQYLRDAAALSPPKATVSDTCEEVPSLLEILPKSSERTPLPLCSSQAQMDYRRLQPSCLGT	MPL-CISC 폴리펩티드

[0503]

	MPLSVCPMAESGSCCTTHIANHSYLPLSYWQQP	
28	<p>AGCTTAATGTAGTCTTATGCAATACTCTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTA GCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAGCACCGTGATGCCGATTGGTGGAAAGTAAG GTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACG AACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAGATTTGATTTAAGTGCTAGCTCGATACAAT AAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGG GAACCACTGCTTAAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC CGTCTGTTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGA AAATCTTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGACTTGAAGCGAAAGGGAAACCAGAGG AGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGG CGGCGACTGTGAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGA TGGGTGCGAGAGCGTCAAGTAAAGCGGGGAGAAATTAGATCGCGATGGGAAAAAA TTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATAAAATTAACATATAGTATGGGCAA GCAGGGAGCTAGAACGATTTCAGTAAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCT GTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTA GATCATTATATAACAGTAGCAACCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAA AGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAGACCA CCGCACAGCAAGCGCCGCTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAA TTGGAGAAGTGAATTATATAAATAAAAGTAGTAAAAATTGAACCATTAGGAGTAGC ACCCAAGGCAAGAGAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATA GGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCCTCA ATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTCAGCAGCAGAAC AATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGCTGGGGC ATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGATACCTAAAGGATCAACAG CTCCTGGGATTGGGTTGCTCTGGAAAACTCATTTGCACCACTGCTGTGCCTTGGA ATGCTAGTTGGAGTAATAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGG AGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCTTAATTTGAAGAACT GCAAAACCAGCAAGAAAGAAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAA GTTTGTGGAAATGGTTAACATAACAATTTGGCTGTGGTATATAAAATTATTCATAATG ATAGTAGGAGCTTGGTAGGTTAAGAATAGTTTTGCTGTACTTTCTATAGTGAATA GAGTTAGGACGGGATATTCACCATATCGTTTCAGACCCACCTCCAACCCCGAGGGG ACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGA TCCATTGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTTAACTTTTAAAAGAAAAGGGG GGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATA CAAACTAAAGAAATTAACAAAAAAATTAACAAAAATTAACAAATTTTATCGATCACGAGA CTAGCCTCGAGAAGCTTGATATCGAATCCCACGGGGTTGGACGCGTAGGAACAGAG AAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCT CAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTA AGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCC CCTCAGCAGTTCTAGAGAACCATCAGATGTTCCAGGGTGCCCCAAGGACCTGAAAT GACCCTGTGCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCCGCTTCTCGCTTCTGTTCCGCGCTT CTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTAGCA CCGGTGCCGCCACCATGCTCTGGGCTGCTGTGGCTGGGCTGGCCCTGCTGGGGC CCTGACGCCAGGCGCGTGCAGGTGGAGACAATCTCCCAGGCGACGGACGCA CATTCCCTAAGCGGGGCCAGACCTGCGTGGTGCATATACAGGCATGCTGGAGGATG GCAAGAAGTTGACAGCTCCCGGATAGAAACAAGCCATTCAAGTTTATGCTGGGCA AGCAGGAAGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGGCCAGATGCTGTGGGCCA GAGGGCAAGCTGACCATCAGCCAGACTACGCCTATGGAGCAACAGGCCACCCAGG AATCATCCACCTCACGCCACCTGTTGTTGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAG GGATCCAACATCAAAGAGAAACCCCTTCTGTTGCTGATTGGAGGCGGTAGTCATAT CTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCTCCTGTTGTGTGTACTTCTGGCTGGAACGG ACTATGCCAGGATCCCACGCTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTACAGAAATACCATG</p>	CISC 벡터 DNA

[0504]

GTAATTCAGCGCCTGGAGCGGAGTCTCTAAGGGTCTGGCCGAATCCCTCCAACCCGA
 TTATTCTGAACGGTTGTGCTCTGATCCGAAATACCACAAAAGGCGGGGCTGTTGGT
 GAGGGCCAGGGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGTATTGGGCCCTCTTGT
 TATACGTTGAAGCCCGAAACTGGAAGCGGAGCTACTAATTCAGCCTGCTGAAGCAG
 GCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGCACTGCCCCGTACCCGCTGCTG
 CTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCCCGCCTATCCTGTGGCACGAGATGTGGC
 ACGAGGGCCTGGAGGAGCCAGCAGGCTGTATTTGGCGAGCGCAACGTGAAGGGC
 ATGTTGAGGTGCTGGAGCCTGCAACGCCATGATGGAGAGAGGGCCACAGACCCTG
 AAGGAGACATCCTTTAACCAGGCCTATGGACGGGACCTGATGGAGGCACAGGAGTG
 GTGCAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACCTGCTGCAGGCCTGGGATCT
 GTACTATCAGTGTTTCGGAGAATCTCAAGGGCAAAGACACGATCCGTGGCTTGG
 GCATCTGCTCGTTGGGTGAGTGGTGCCTTTGGTTTCATCATCTTGGTCTATCTTTGA
 TCAATTGCAGAAATACAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTGTCAAGTGAATACCCCGA
 CCCAAGCAAGTCTCTCCAGCTTTCTTCAGAGCATGGAGGCGATGTGCAGAAATGG
 CTCTCTCACCTTTCCCTCCTCAAGCTTCTCCCGGGAGGGCTGGCGCCGAGATTC
 ACCTCTGAGGTACTTGAACGAGACAAGGTTACCCAACTTCTCCTTCAACAGGATAAG
 GTACCCGAACCTTTAGCAGCCTTAGCTCAACCACTCTTACGAGCTGCTTACCAATCA
 GGGATACCTCTTTTCCACCTTCCCGATGCGCTGGAATCGAAGCTTGTCAAGTTACT
 TTACCTATGATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGAAGGAGTCGCCGTGCGCCCA
 CGGGTCTCACCCCACTCTCCAGCCTCTCAGGAGAAAGATGATGCTTATTGCACT
 TTTCCAGTAGAGACGATCTCCTCTTTTCTCCATCTTTTGGGGGACCTTCCCC
 CCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTGGTGTGGCGAGGAGCGGATGCCCGCTCCCTC
 CAGGAGCGAGTACCACGAGATTGGGATCCCGACCACTTGGACCCCAACCCCGGC
 GTACCTGACCTTGTGATTTTCAACCTCCCTGAAATGGTGTGCGAGAGGCTGGGG
 AGGAAGTTCGGACGCTGGGCCGAGGGAGGGCGTCTTTCCATGGAGTAGGCCTC
 CAGGTCAAGGCGAGTTTGGGCTCTCAACGCGCGGCTGCCGTTGAATACAGACGCTT
 ATCTCTACTGCGAAGTCAAGGTCAAGGCCAACACATCTTGTAGGATCTGGTGC
 TACTAATTTTCTTTTGAAGCAAGCTGGAGATGTTGAAGAGAACCCTGGTCCAGTG
 AGCAAGGGCGAGGAGCTTACCAGGGTGGTGGCCATCCTGGTGCAGCTGGACGG
 CGACGTAAACGGCCACAAGTTAGCGGTGTCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACT
 ACGGCAAGCTGACCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCC
 CACCTCTGTGACCACTGACTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCCGACCAC
 ATGAAGCAGCACGACTTTCAAGTCCGCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGC
 ACCATCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAG
 GGGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATGACTTCAAGGAGGACGG
 CAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG
 GCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTCAAGATCCGCCACAACATCGAG
 GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGC
 CCGTGTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACC
 CCAACGAGAAGCGCATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCGCGGGATCA
 CTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAACTAGTGTGACAATCAACCTCTGGATTA
 CAAAATTTGTAAAGATTGACTGGTATTCTTAATATGTTGCTCTTTTACGCTATGTG
 GATACGCTGCTTAAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTCCCGTATGGCTTTCATTTCT
 CCTCTGTATAAATCCTGGTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCGTTGTGACGG
 CAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTG
 CCACCACCTGTGAGCTCCTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCTCCCTATTGCCACGGCG
 GAACTCATGCCCGCTGCTTCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACT
 GACAATTCCTGGTGTGTCGGGGAAGTGCAGCTCTTTCCATGGTGTGCTCGCTGTG
 TTGCCACTGGATTCTGCGCGGACGCTCCTTCTGCTACGTCCCTCGGCCCTCAATCCA
 GCGGACCTCTTCCCGCGCTGCTGCCGGCTCTGCGCCTCTTCCGCGTCTTCCGCT
 TCGCCCTCAGACGAGTGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCGCCTGGAATTCGAGCT
 CGGTACCTTAAAGCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTAAAA
 GAAAAGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTT

[0505]

GCTTGTACTGGGTTCTCTGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTGGCTAAC
 TAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTCTCAAGTAGTGTG
 TGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAGTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAGTGT
 GGAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCACTTATTATTAGTATTTATAACTTGCA
 AAGAAATGAATATCAGAGAGTGAAGGAACTTGTATTGACGCTTATAATGTTTACA
 AATAAGCAATAGCATCACAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGT
 TGTGTTTTGTCAAAATCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCC
 TAACTCCGCCAGTCCGCCCACTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTATTATG
 CAGAGGCCGAGGCCCTCGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTAGGAGGCTTTT
 TTGGAGGCTAGGCTTTTGCCTCGAGACGTACCCAATTCGCCCTATAGTAGTCGTAT
 TACGCGCGCTCACTGGCCGCTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTA
 CCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCTTTTCCGACGCTGGCGTAATAGCGAAGA
 GGCCCGCACCGATCGCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCGA
 CGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGA
 CCGTCACTTCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTTCTCG
 CCACGTTCCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCG
 ATTTAGTTTACCGCACTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTATGGTTCAGT
 AGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCCGCCCTTGACGTTGGAGTCCACGTTCT
 TAATAGTGGACTTTGTTCCAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTT
 TTGATTTAAGGGATTTTCCGATTTCCGCTATTGGTTAAAAATGAGCTGATTTAA
 CAAAATTTAAGCGGAATTTTAAACAAAATTTAACGTTTTACAATTTCCAGTGGCACT
 TTTCCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAATAT
 GTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTTCAATAATTTGAAAAAGGAAG
 AGTATGAGTATCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTCGCTT
 CCTGTTTTGTTACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGG
 GTGCACGAGTGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTT
 TTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGGGCGC
 GGTATTATCCCGTATTGACCGCGGCAAGGCAACTCGGTCCGCGCATACACTATTCT
 CAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAAGTACACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGA
 CAGTAAGAGAATTATGCAAGTCTGCCATAACCATGAGTATAACTGCGGCCAACTT
 ACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGG
 GGATCATGTAACCTGCCTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAA
 CGACGAGCGTGACACCCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATT
 AACTGGCGAACTACTACTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCG
 GATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTG
 ATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAG
 ATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACAGACGGGGAGTCAGGCAACTATGG
 ATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAAGCATTGGTAACT
 GTCAGACCAAGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCAATTTAATTTAA
 AAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAG
 TTTTCGTTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATC
 CTTTTTTCTGCGCGTAACTGCTGCTTGCAACAAAAAACACCGCTACCAAGCGGT
 GTTTGTTTCCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCA
 GAGCGCAGATACCAAACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAA
 GAACCTGTAGCACCCCTACATACTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAAGTGGCTGCTG
 CCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATA
 AGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGA
 ACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAAGCGCCACGCTT
 CCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGAGGGTCCGGAACAGGAG
 AGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGTATCTTTATAGTCTGTGCGGT
 TTCGCCACCTCTGACTTGAAGCGTGAATTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCT
 ATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGCGCTTTTG
 CTCACATGTTCTTCTGCTTATCCCTGATTCTGTGATAACCGTATTACCGCTTTG

[0506]

	<p>AGTGAGCTGATACCGCTCGCCGACGCCGAACGACCCAGCGCAGCGAGTCACTGAGC GAGGAAGCGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATT CATTAAATGCAGCTGGCACGACAGGTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAAC GCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCC GGCTCGTATGTTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTAT GACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAG CTGCA</p>	
<p>29</p>	<p>AGCTTAATGTAGTCTTATGCAACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGAGTTA GCAACATGCCCTTAAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCCGATTGGTGGAAAGTAAG GTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACG AACCACTGAATTGCCGATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAAT AAACGGGTCTCTGTGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTGGCTAACTAGG GAACCACTGCTTAAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGTAGTGCCTCAAGTGTGTGCC CGTCTGTGTGTGACTCTGTAACCTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTTAGTCAGTGTGGA AAATCTTAGCAGTGGCGCCGAACAGGGACTTGAAAGCGAAAGGGAACACAGAGG AGCTCTCGACGCGAGACTCGGCTTGTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGCGAGGGG CGGCGACTGGTGTGACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGA TGGGTGCGAGGCGTCACTATTAAAGCGGGGAGAATTAGATCGCGATGGGAAAAAA TTGCTTAAAGGCCAGGGGAAAGAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAA GCAGGGAGCTAGAAGGATTGCGAGTTAATCCTGGCCTGTAGAAACATCAGAAGGCT GTAGACAAACTGGGACAGCTACAACATCCCTCAGACAGGATCAGAAGAACTTA GATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAA AGACACCAAGGAAGCTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAAACAAAGTAAAGACCA CCGACAGCAAGCGGCCGCTGATCTTCAAGCTGGAGGAGGAGATATGAGGGACAA TTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACATTAGGAGTAGC ACCCACCAAGGCAAAGAGAAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAATA GGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCCTCA ATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGCTGTGTATAGTCAGCAGCAGAAAC AATTTGCTGAGGGCTATTGAGGCGCAACGCATCTGTGCAACTCACAGTCTGGGCG ATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAGATACCTAAAGGATCAACAG CTCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGAAAACCTATTGCAACCTGCTGTGCTTGGGA ATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGG AGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTTAATTGAAGAATC GCAAAACAGCAAGAAAAGAAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAA GTTTGTGGAATTGGTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAAATTTATCATAATG ATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAAGAATAGTTTTTGTGTACTTTCTATAGTGAATA GAGTTAGGCAGGGATATTCACCTATTCGTTTTAGACCCACCTCCCAACCCGAGGGG ACCCGACAGGCCCAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGACAGAGACAGAGA TCCATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTTAACTTTTAAAGAAAAGGGG GGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATA CAAACAAAGAAATTACAAAACAAATTACAAAATTTCAAATTTTATCGATCACGAGA CTAGCCTCGAGAAGCTTGATATCGAATCCACGGGGTTGGACGCTAGGAACAGAG AAACAGGAGAAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGGCT CAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTA AGCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAGATGCGGTCCCGC CCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTCCAGGGTGCCTCAAGGACCTGAAAT GACCCTGTGCTTATTGAACTAACCAATCAGTTCTGCTTCTGCTTCTGTTGCGCGCTT CTGCTCCCCGAGCTCTATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTAGCA CCGCTGCCGCCACCATGCCTCTGGGCTGTGTGGCTGGGCTGGCCCTGCTGGGCG CCCTGCACGCCAGGCGCGTGCAGGTGGAGACAATCTCCCAGGCGACGGACGCA CATTCCCTAAGCGGGCCAGACCTGCGTGGTGCATATACAGGCATGCTGGAGGATG GCAAGAAGTTGACAGCTCCCGGATAGAAAACAGCCATTCAAGTTTATGCTGGGCA</p>	<p>CISC 벡터 DNA</p>

[0507]

AGCAGGAAGTGATCAGAGGCTGGGAGGAGGGCGTGCCAGATGTCTGTGGCCA
 GAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCAGACTACGCCTATGGAGCAACAGGCCACCCAGG
 AATCATCCACCTCACGCCACCTGTGTTCGATGTGGAGCTGCTGAAGCTGGGCGAG
 GGCGGTAGTCAGAACCTTGATACCATGGGCCCCAGAAAATCTCACACTTCATAAAC
 TTTCCGAATCAAACTCGAACTCAACTGGAATAACCGTTCTGAATCACTGTCTGAA
 CACTGGTACAATATCGGACCGACTGGGATCACTCATGGACAGAACATCTGTGGACT
 ATAGGCACAAATCTCACTCCCAAGCGTAGACGGCCAAAAAGATACACTTTTCGCGT
 ACGATCCCCTTAAATCCTCTCTGCGGCTGCTCAGCACTGGAGTGAATGGTCCCATC
 CCATTCATTGGGGATCCAACACATCAAAAGAGAACCCTTTCTGTTTCGATTGGAGGC
 CGTAGTCATATCTGTTGGATCCATGGGACTTATTATCTCCCTGTTGTGTGTACTTCT
 GGCTGGAACGGACTATGCCAGGATCCCACGCTCAAGAATCTGGAAGATCTCGTCA
 CAGAATACCATGGTAATTCAGCGCTGGAGCGGAGTCTTAAGGGTCTGGCCGAAT
 CCCTCAACCCGATTATTCTGAACGGTTGTGCCTCGATCCGAAATACCACAAAAGG
 CGGGGCTCTGGGTGAGGGCCAGGGGCGAGTCCGTGCAATCAACACAGCCCGTATT
 GGCCCTCTTTTATACGTTGAAGCCGAAACTGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAG
 CCTGTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGCACTGCCCGT
 GACCCCTCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCACGACAGCCCGCCTATCTGTGG
 CACGAGATGTGGCAGGAGGCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTGATTTTGGCGAGCG
 CAACGTGAAGGGCATGTTGAGGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGAG
 GCCACAGACCCTGAAGGAGACATCCTTAAACAGGCCTATGGACGGACCTGATGG
 AGGCACAGGAGTGTGAGAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACCTGCTG
 CAGGCTGGGATCTACTATCACGTGTTTCGGAGAATCTCCAAGGGAGTTCAAAAC
 CTTTTGAGAACCTTAGACTGATGGCGCCATCTCTCTGCAGTAGTTACGTTGAGAC
 CCATAGATGCAATAAAGCTGGGAAATCTCAAGCCAGCCATTACTTTGAACGGCAT
 TTGGAATTCGAGGCCCGAACACTTTCCCGGTCATACGTGGGAAGAAGCTCCTCTCT
 TGACGCTGAAGCAGAAGCAGGAGTGGATTTGTCTGGAGACTTTGACTCCTGATACTC
 AGTATGAGTTCGAAGTTCGGGTGAAACCACTCCAAGGCGAGTTCACGACGTGGTCTCC
 GTGGAGTCAACCGTTGGCGTCCGACGAAAGCCCGTCCCTTGGCAAAGACACGAT
 TCCGTGGCTTGCGCATCTGCTCGTTGGCTGAGTGGTGCCTTTGTTTCATCATCTTG
 GTCTATCTTGTATCAATTGCAGAAATACAGGCCCTTGGTGAAAAAGTGTCAAGT
 GTAATACCCCGACCCAAAGCAAGTTCTCTCCAGCTTTCTCAGAGCATGGAGGCGA
 TGTGCAGAAATGGCTCTTACCTTTCCCTCTCAAGCTTCTCCCGGGAGGGCTGG
 CGCCGAGATTTACCTCTTGAAGTACTTGAACGAGACAAGGTTACCCAACTTCTCCTT
 CAACAGGATAAGGTACCCGAACCTGCGAGCCTTAGCTCAACCACTCTCTTACGAGCT
 GCTTCAACAATCAGGGATACTTCTTTCCACCTTCCCGATGCGCTGGAATCGAAGCT
 TGTCAAGTTTACTTTACCTATGATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGAAGGATCG
 CCGGTGCGCCACGGGTTCTCACCCCAACCTCTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAGATGA
 TGCTATTGCACTTTCCAGTAGAGACGATCTCCTCTTTTCTCCATCTCTTTGGG
 GGGACCTTCCCCCTTCTACGGCACCTGGCGGGTCTGCTGCTGGCGAGGAGCGGAT
 GCCCGCTCCCTCCAGGAGCGAGTACCACGAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGGACC
 CCCCACCCCGGCGTACCTGACCTTGTGATTTTCAACCTCCCTGAATTGGTGTCTGC
 GAGAGGCTGGGAGGAAGTCCGGACGCTGGGCCGAGGAGGGCGTGTCTTTCCA
 TGAGTAGGCTCCAGGTCAAGGCGAGTTAGGGCTCTCAACGCGCGGCTGCCGTTG
 AATACAGACGCTTATCTCACTGCAGGAAGTCAAGGTCAAGGACCAACACATCTTG
 TAGGATCTGGTCTACTAATTTTTCTTTTTGAAGCAAGCTGGAGATGTTGAAGAGAA
 CCCTGGTCCAGTAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGTGGTCCCCATCTGGT
 CGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCAAGTTCAAGCTGTCCGGCAGGGCGAGG
 GCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTCACTGCACCACCGGCAAGCTGCC
 CGTGCCCTGGCCCACTCTGTGACCACTGACCTACGGCGTGCACTGCTTACGCCG
 TACCCCGACCATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCTGCCCCAAGGCTACG
 TCCAGGAGCGACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGG
 TGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGCGATCGACTTCA
 AGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAGCCACAAC

[0508]

<p>GTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGC CACAACATCGAGGACGGCAGCGTGACGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCC ATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCC TGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCTGTACCG CGCCCGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAACTAGTGTGACAATC AACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAAGATTGACTGGTATTCTTAACATATGTTGCTCT TTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCCTATG GCTTTCATTTTCTCCTCTGTATAAACTCTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGG CCCGTTGTCAAGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTGCTGACGCAACCCCACTG GTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCT ATTGCCACGGCGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGG CTGTTGGGCACTGACAATTCCTGGTGTGTGCGGGAAAGCTGACGTCCTTTCCATGGC TGCTCGCTGTGGTGGCCACCTGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTG GCCCTCAATCCAGCGGACCTTCTTCCGCGGCTGCTGCGGGCTGCGGCCTCTTCC GCGTCTTGCCTTCCGCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCTCCCGCCTG GAATTCGAGCTCGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCACTGTAGATCTTAGC CACTTTTTAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATCACTCCAACGAAGACAA GATCTGCTTTTTGCTTACTGGGTCTCTGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCT CTCTGGCTAACTAGGGAACCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTC AAGTAGTGTGCCCCGTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTT TAGTCAGTGTGAAAATCTAGCAGTAGTAGTTTCATGTATCTTATTATTAGTATTT ATAACCTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAACCTGTTTATTGCAGCTTAT AATGGTTACAATAAAGCAATAGCATCAAAATTTACAATAAAGCAATTTTTTCACT GCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTTAGCT ATCCGCCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTT TTTATTTATGCAGAGGCGGAGGCCCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAG GAGGCTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCCTCGAGACGTACCCAATTCGCCCTATAGT GAGTCGATTACGCGCGCTACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACC CTGGCGTTACCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAAT AGCGAAGAGGCCCGACCGATCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAA TGGCGCGACGCGCCCTGTAGCGCGCATTAAAGCGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCG CAGCGTGACCGCTACACTTCCAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTCGCTTTCTCCCTT CCTTTTCGCCACGTTTCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTA GGGTTCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAACTTGATTAGGGTGATG GTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCCGCTTTGACGTTGGAGTC CACTTTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCTATTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAG CTGATTTAAAAAATTTAACGCGAATTTTAAAAAATTTAACGTTTACAATTTCCA GGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTCTAAATACA TTCAAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCCGATAAATGCTTCAATAATATTGAA AAAAGGAAGATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGGCGCA TTTTGCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAG ATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAAGTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCC TTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTA TGTGGCGGGTATTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATA CACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAAGTACAGAAAAGCATCTTACGG ATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAAGCTG CGGCCAATTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCA CAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGC CATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACACGTTGCG CAACTATTAAGTGGCAACTACTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAAGACTGGA TGGAGGCGGATAAAGTTGACGAGCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGCTGGCTGGT TTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACT</p>	
---	--

[0509]

	<p>GGGGCCAGATGGTAAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGC AACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCA TTGGTAACGTGACAGCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATT TTAATTTAAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCCCTT AACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTC TTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGTTGCAAAACAAAAAACCCACCGCTAC CAGCGGTGGTTTTTTGCGCGGATCAAGAGCTACCAACTTTTTCCGAAGGTAAGTGG CTTCAGCAGAGCGAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCAC CACTCAAGAAGTGTAGCAGCCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGT GGCTGCTGCCAGTGCGGATAAGTCTGTCTTACCGGGTTGGAAGTCAAGACGATAGTT ACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCT TGAGGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCG CCAGCTTCCGGAAGGGAGAAAGGGCGGACAGGTATCCGTAAGCGGACGGTCCGGA ACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCT GTCGGGTTTCCGACCTCTGACTGAGCGTGGATTTTTGTGATGCTGTCAGGGGGC GGAGCCTATGGAAAAACGCGAGCAACGCGCCCTTTTACGGTTCCTGGCTTTTGTG GCCTTTTGTCTACATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGATTAC CGCTTTGAGTGAAGTATACCGCTCGCCGACCGCAACGACCGAGCGCAGCGAGT AGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCTCTCCCGCGCGTTG GCCGATTCAATAGCAGCTGGCAGCAGAGTTTCCGACTGGAAGCGGGCAGTGA GCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTATTAGCACCCAGGCTTACACTTTA TGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAA CAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCGCGCAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAA GCTGGAGCTGCA</p>	
30	<p>AGCTTAATGTAGTCTTATGCAATACTCTGTAGTCTTGCAACATGGTAAAGTGAAGT GCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGAAGTAAG GTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGATTGGACG AACCACTGAATGCCGCTTGCAGAGATATTGATTTAAGTGCCTAGCTCGATACAAT AAACGGGTCTCTCTGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCTAAGT GAACCACTGCTTAAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAAGTCTCAAGTGTGTGTC CGTCTGTTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCCTTTAGTCAAGTGTGGA AAATCTTAGCAGTGGCGCCGAAACAGGGACTTGAAGCGAAAGGGAAACAGAGG AGCTCTCTCGACGACGACTCGGCTTCTGTAAGCGCGCACGCAAGAGGCGAGGGG CGGCGACTGGTGAAGTACGCCAAAAATTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGAGAGAGA TGGGTGCGAGAGCGTCAATTAAGCGGGGAGAAATTAGATCGCGATGGGAAAAAA TTCGGTTAAGGCCAGGGGAAAGAAAAATATAAATTAACATATAGTATGGGCAA GCAGGGAGCTAGAACGATTCCGAGTTAATCCTGGCCTTTAGAAACATCAGAAGGCT GTAGACAAACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTACAGACAGGATCAGAAGAACTTA GATCATTATATAATACAGTAGCAACCCCTTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAA AGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAACAAAAGTAAAGCCA CCGCACAGCAAGCGCCGCTGATCTTACAGACCTGGAGGAGGAGATAGAGGGACAA TTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAACATTAGGAGTAGC ACCCACCAAGGCAAGAGAAAGTGGTGCAGAGAGAAAAAGAGCAGTGGGAAATA GGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACTATGGGCGCAGCCTCA ATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTATAGTGCAGCAGCAGAAC AATTTGTGAGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGCAACTCACAGTCTGGGGC ATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAGGATACCTAAAGGATCAACAG CTCCTGGGGATTTGGGGTGTCTGTGAAAACTATTTGCACCAGTCTGTGCCTTGG ATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTGTGAAACAGATTTGGAATCACACGACCTGGATGG AGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATACACTCCTAATTGAAGAAATC GCAAAACAGCAAGAAAAGAAATGAACAAGAATTATTGGAATTAGATAAATGGGCAA GTTTGTGGAATGGTTAACATAACAAATTGGCTGTGGTATATAAATATTCAATG</p>	CISC 벡터 DNA

[0510]

ATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTAAGAATAGTTTTGCTGTACTTCTATAGTGAATA
 GAGTTAGGCAGGGATATTCACCATATCGTTTTAGACCCACCTCCCAACCCGAGGGG
 ACCCGACAGGCCGAAGGAATAGAAGAAGAAGGTGGAGAGAGACAGAGACAGA
 TCATTTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTATCGGTTAACTTTAAAAGAAAAGGGG
 GGATTGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATA
 CAAACTAAAGAATTAACAAAACAAATTAACAAAATTAACAAAATTTTATCGATCAGGAGA
 CTAGCCTCGAGAAGCTTGATATCGAATCCACGGGGTTGGACGCTAGGAACAGAG
 AAACAGGAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCTGCCCGGGCT
 CAGGGCCAAGAACAGTTGGAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTA
 AGCAGTTCTGCCCGGGCTCAGGGCCAAGAACAGATGGTCCCAAGATGCGGTCCCGC
 CCTCAGCAGTTCTAGAGAACCATCAGATGTTCCAGGGTGCCCAAGGACCTGAAAT
 GACCCTGTGCCTATTTGAACTAACCAATCAGTTCTCGCTTCTCGCTTCTGTCGCGCTT
 CTGCTCCCGAGCTCTATAAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCTAGCA
 CCGGTGCCCGCACCATGCCTCTGGGCTGCTGTGGCTGGGCTGGCCCTGCTGGGGC
 CCCTGCACGCCAGGCCGGCTGCAGGTGGAGACAATCTCCCAAGGCGACGGACGCA
 CATTCCCTAAGCGGGCCAGACCTGCTGGTGCATATACAGGCATGCTGGAGGATG
 GAAGAAGTTGACAGCTCCCGGATAGAAACAAGCATTCAAGTTTATGCTGGCA
 AGCAGGAAGTATCAGAGCTGGGAGGAGGGCTGGCCAGATGCTGTGGCCA
 GAGGGCCAAGCTGACCATCAGCCAGACTACGCTATGGAGCAACAGGCCACCCAGG
 AATCATCCACCTCAGCCACCTGGTGTTCGATGTGGAGCTGTGAAGCTGGGCGAG
 CAAAACCTGGTATTCTTGGGCCAGAAAATCTCAGCTTCAAGTTTCTCCGAAT
 CCCAGCTCAGACTCAACTGGAATAATAGATTTCTTAATCATTGTTTGAACACCTGGT
 CAATATAGAACGGATTGGGACCCTCATGGACCGAGCAGTCACTTACTACCGCCAC
 AAATTTTCACTTCCAGCGTAGATGGGCAAGAGGTACACATTTAGGGTCAGATCCA
 GGTAAATCCTGTGTGGTTCTGCTCAACACTGCTGAGTGGAGCCATCCGATCCAC
 TGGGGCTCAAATACCTCTAAAGAAAATCCGTTCTCTTTCGCTCGAAGCCGTTGTTAT
 CAGCGTCGGAAGCATGGGACTTATCATTCCCTTCTCTGCTGTAATCTGCTGGAG
 CGGACGATGCCCGGATTCCGACGCTCAAAAACCTGGAGGACCTGTAACAGAATAT
 CACGGTAATTTCTCGCTTGGAGTGGCGTATCAAAGGGGCTTCTGCTGAGTCCCTTCAAC
 CGGATTACTCTGAGCGCTCTGCTTGGTGTCCGAGATACCTCCAAAGGAGGTGCACT
 TGGGAGGGGGCAGGCGCTCCCTTGAATCAGCATAGTCCGATTTGGGCGCCCCC
 CTGTTATACCTCAAACCGGAAACGGGAAGCGGAGCTACTAACTTCAGCTGCTGAA
 GCAGGCTGGAGACGTGGAGGAGAACCCTGGACCTATGGCACTGCCCGTACCGCCCT
 GCTGCTGCCTCTGGCCCTGCTGCTGCACGCAGCCCGCCTATCCTGTGGCAGGAGATG
 TGGCAGGAGGGCCTGGAGGAGGCCAGCAGGCTGATTTTGGCGAGCGCAACGTGAA
 GGGCATGTTTCGAGGTGCTGGAGCCTCTGCACGCCATGATGGAGAGAGGCCACAGA
 CCCTGAAGGAGACATCCTTTAACAGGCCCTATGGACGGGACCTGATGGAGGCACAGG
 AGTGGTGAGAAAAGTACATGAAGTCTGGCAATGTGAAGGACCTGCTGCAGGCCTGG
 GATCTGACTATCACGTGTTTCGGAGAATCTCCAAGAAACCTTTGAGAACCTTAGACT
 GATGGGCCCATCTCTGCGAGGTAGTTCACGTTGAGACCCATAGATGCAATATAAGC
 TGGGAAATCTCACAGCCAGCCATTACTTTGAACGGCATTGGAATTCGAGGCCCGAA
 CACTTTCCCGGTCATACGTGGGAAGAAGCTCCTCTTACGCTGAAGCAGAAGCA
 GGAGTGGATTTGTCTGAGACTTTGACTCCTGATACTCAGTATGAGTTCCAAGTTCCGG
 GTGAAACCACTCAAAGGCGAGTTCACGACGTTGCTCCGTGGAGTCAACCGTTGGCG
 TTCCGACGAAGCCCGCTGCCCTTGGCAAAGACACGATTCCGTGGCTTGGGCATCTGC
 TCGTTGGGCTGAGTGGTGGTTTGGTTTTCATCATCTTGGTCTATCTTGTATCAATTGC
 AGAAATACAGGCCCTTGGCTGAAAAAAGTGCTCAAGTGAATACCCCGACCCAAAGC
 AAGTTCTTCCAGCTTTCTCAGAGCATGGAGGCGATGTGCAGAAATGGCTCTCTTC
 ACCTTTCCCTCTCAAGCTTCTCCCGGAGGGCTGGCGCCGAGATTTACCTCTTG
 AGGTACTTGAACGAGACAAGGTTACCAACTTCTCTTCAACAGGATAAGGTACCCGA
 ACCTGCGAGCCTTAGCTCAACCACTCTCTTACGAGCTGCTTCAACATCAGGGATACT
 TCTTTTTCCACTTCCCGATGCGCTGAAAATCGAAGCTTGTCAAGTTTACTTTACCTATG
 ATCCATATAGCGAGGAAGATCCCGACGAAGGAGTCCCGGTGCGCCACGGGTTCT

[0511]

<p> CACCCCAACCTCTCCAGCCTCTCTCAGGAGAAGATGATGCTTATTGCACCTTTCCAGT AGAGACGATCTCCTCTCTTTTCTCATCTCTTTGGGGGACCTTCCCCCTTCTACG GCACCTGGCGGCTGGTGTGGCGAGGAGCGGATGCCGCGTCCCTCCAGGAGCG AGTACCACGAGATTGGGATCCCCAGCCACTTGGACCCCCACCCCGGCTACCTGAC CTTGTGATTTTAACTCCCTGAATTGGTGTGCGAGAGGCTGGGAGGAAGTTC CGGACGCTGGGCGAGGGAGGGCGTGTCTTTCCATGGAGTAGGCCTCCAGGTCAA GCGGAGTTTAGGGCTCAACGCGCGGCTGCCGTTGAATACAGACGTTATCTCTCAC TGAGGAACTGCAAGGTGAGACCAACACATCTGTAGGATCTGGTGTACTAATTT TTCTTTTGAAGCAAGCTGGAGATGTTGAAGAGAACCCTGGTCCAGTGAGCAAGGG CGAGGAGCTGTTACCGGGTGGTGGCCATCCTGGTGTGAGCTGGACGGCGACGTAAA CGGCCAACAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACTACGGCAAGC TGACCTGAAGTTCTGTGACCAACCGCAAGCTGCCGCTGCCCTGGCCACCTCGT GACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCGACCATGAAGCAG CACGACTTCTCAAGTCCGCCATGCCGAAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTCT TCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTGAGGGCGACACC CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTG GGGCAAGCTGGAGTCAACTACAACAGCCACAACGTATATCATGCGCGACAAG CAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCAACATCGAGGACGGCAGC GTGAGCTGCCGACCACTACAGCAGAACACCCCATCGGCGAGGGCCCGTGTGTG CTGCCGCAACCACTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGA AGCGGATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTACCGCCCGGGGATCACTCTCGGCAT GGACGAGCTGTACAAGTAACTAGTGTGACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGT GAAAGATTGACTGGTATTCTAACTATGTTGCTCCTTTACGCTATGTGGATACGCTGC TTTAATGCCTTGTATCATGCTATTGCTCCCGTATGGCTTTCAATTTCTCCTCTGTAT AAATCGGTTGCTGTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCGTTGTGAGGCAACGTGGCG TGGTGTGACTGTGTTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCCTG TCAGCTCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCTCCCTATTGCCACGGCGAACTCATCG CCGCCTGCCTTCCCGCTGTGTGACAGGGGCTCGGCTGTGGGCACTGACAATTCGT GGTGTGTGGGGAAGCTGACGCTCTTTCCATGGCTGTCTCGCTGTGTTGCCACTGG ATTCTGCGGGGACGCTCTTCTGCTACGTCCTTCCGCCCTCAATCCAGCGACCTTCC TTCCGCGGCTGTGCGGCTCTGCGGCTCTCCGCGTCTCGCCTTCCGCTCAGA CGAGTCGGATCTCCCTTTGGGCGCCTCCCGCCTGGAATTCGAGCTCGGTACCTTA AGACCAATGACTTACAAGGACGCTGTAGATCTTAGCCACTTTTTAAAGAAAAGGGG GGACTGGAAGGGTAATCACTCCCAACGAAGACAAGATCTGCTTTTGTGTACTG GGTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTGTGCTAACTAGGGAACCC ACTGTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAAGTCTCAAGTAGTGTGCCCCGTCTGT TGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCTTTTAGTCAGTGTGAAAATCTCT AGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTTATTATCAGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAAT ATCAGAGAGTGAGAGGAACCTGTTTATTGAGCTTATAATGGTTACAAAATAAGCAAT AGCATCAAAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCC AAATCAATCAATGTATCTTATCATGTCTGGCTTAGCTATCCCGCCCTAACTCCGCCA GTTCCGCCCATCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTATTTATGACAGGGCCGAG GCCGCTCGGCTCTGAGCTATTCAGAAGTAGTAGGAGGCTTTTTGGAGGCTAG GCTTTGCGTGCAGACGTACCAATTCGCCCTATAGTGAAGTCTATTACGCGGCTCA CTGGCCGCTGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAATTAATC GCCTTGACGACATCCCTTTGCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGA TCGCCCTTCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGGACGCGCCCTGTAG CGGCGCATTAAGCGCGGGGTGTGGTGTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGC CAGCGCCCTAGCGCCGCTCCTTTGCTTTCTCCCTCCTTTCTGCCACGTTCCGGG CTTTCCCGCTCAAGCTCAAAATCGGGGCTCCCTTAGGGTCCGATTTAGTGTCTTAC GGCACCTCGACCCAAAAAATGATTAGGGTGTGGTTACGCTAGTGGCCATCGC CCTGATAGACGTTTTTCCGCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTAAATAGTGGACTC TTGTTCCAACTGGAAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTCTTTGATTTATAAG </p>
--

[0512]

	<p>GATTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACG CGAATTTTAAACAAATATTAACGTTTACAATTTCCAGGTGGCACTTTTCGGGAAATG TGC GCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA GACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATGAGTATTCA ACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTGCGGCATTTGCTTCCTGTTTTGCTCAC CCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGG TTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAA CGTTTTCAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTAT TGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTT GAGTACTCACCAGTACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTA TGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAAGCTGCGGCAACTTACTTCTGACAACGA TCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAATC GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACA CCACGATGCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACT TACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAAG ACCACTTCTGCGCTCGGCCCTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCC GGTACGCTGGGTGCGCGTATCATTGCAAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCC CGTATCGTAGTATCTACACGACGGGGAGTCAAGCAACTATGGATGAACGAAATAGA CAGATCGGTGAGATAGGTGCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTGAGCAAGATTT ACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGTGA AGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAGCTGAGTTTTCTGTTCACTGA GCGTCAGACCCCGTAGAAAAGTCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGT AATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCGCTACCAAGCGGTGGTTGTTGCGCGGAT CAAGAGTACCAACTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAAGCAGCGCAGATACCAA ATACTGCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCG CCTACATACCTCGCTGCTAATCCTGTTACAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTC GTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCGGG CTGAACGGGGGTTCTGTGACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACGAACT GAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAG CGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCT TCCAGGGGAAACGCTGTTATCTTTATAGTCTGTCGGGTTTTCGCCACCTCTGACT GAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGC AACGCGGCCTTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCT GCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGC TCGCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGCGGAAAGCGGAAAGAGC GCCAATACGCAAAACCGCCTTCCCGCGCTTGGCGGATTCTTAAATGCAAGCTGGCA CGACAGTTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTA GCTCACTATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTATGCTTCCGGCTGATGTTGTGTG GAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAA GCGCGCAATTAACCCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGGAGCTGCA</p>	
31	PAAL	링커/스페이스 폴리펩티드
32	<p>GAGATGTGGCATGAGGGTCTGGAAGAAGCGTCTCGACTGTACTTTGGTGAGCGCAAT GTGAAGGGCATGTTTGAAGTCTCGAACCCCTTATGCCATGATGGAACGCGGACCCC AGACCTTGAAGGAGACAAGTTTTAACCAAGCTTACGGAAGAGACCTGATGGAAGCCC AGGAATGGTGAGGAAATACATGAAAAGCGGGAATGTGAAGGACTTGACCCAAGCG TGGGACCTGACTATCATGCTTTAGGCGCATTAAGTAAAG</p>	네이키드 FRB 도메인 핵산 서열
33	<p>GAACAGAGAAACAGGAGAATATGGGCCAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTTCTG CCCCGGCTCAGGGCCAAGAAGCTTGGAAACAGCAGAATATGGGCCAAACAGGATATC TGTGGTAAGCAGTTCTGCCCCGCTCAGGGCCAAGAACAGATGTTCCCGAGATGCG GTCCCCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTCCAGGGTGGCCCCAAGGAC CTGAAATGACCCCTGTGCCTTATTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTG</p>	MND 프로모터

[0513]

	CGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATC GCTAGC	
34	CGGCGACGTGGAAGAGAATC	DISC HDR FP
35	GGCTGTGGTTGAGCCTGACT	DISC HDR RP
36	AGGCTCTCCCCGACCTCCC	
37	ATGCCACTGGGACTGCTGTGGCTTGGACTGGCCCTTCTGGAGCACTGCATGCTCAGG CTGGCGTGCAGGTGCAGACAATTAGTCTGGCGACGGCCGGACCTTCTAAGCGAG GACAGACATGCGTGGTGCACCTACACCGGCATGCTGGAAGATGGCAAGAAGTTCGACA GCAGCCGGGACAGAACAAGCCTTCAAGTTCATGCTGGGCAAGCAAGAAGTGATCA GAGGCTGGGAAGAGGGCGTCCGCCAGATGTCTGTTGGACAGAGAGCCAAGTGCACA ATCAGCCCCGATTACGCCTATGGCGCCACAGGACACCCTGGGATCATTCTCCACATG CCACACTGGTGTTCGATGTGGAAGTCTGAAGCTCGGCGAAGGCAAGCAATACCAAGCA AAGAGAACCCCTTCTGTTCCGCTGGAAGCCGTGGTTATCAGCGTGGGATCTATGGC CCTGATCATCTCCCTGCTGTGCGTGTACTTCTGGCTGGAAACGACCATGCCTCGGATCC CCACACTGAAGAATCTGGAAGATCTGGTACCCGAGTACCACGGCAATTTAGCGCTTG GAGTGGCGTGTCAAAGGCGCTGGCTGAAAGCCTGCAGCCTGACTACTCTGAGAGACT GTGCTGGCAATGTGAGATCCCTCCTAAAGCGGCGCTCTCGAGAGAAGGACCAAGCGC TTCTCCATGCAATCAGCACAGCCCTATTGGGCCCTCCTGTACACCTGAAGCCTG AACTGGAAAGCGGAGCTACTAATTTAGCCTGTGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG GAGAACCCTGGACATATGGCTCTGCCAGTGACAGCTCTGCTTCTCTGGCTCTGTT AGTCAGTCCCGCAGACCTATTTCTGTGGCACGAGATGTGGCATGAAGGCGTGGAAAG GGCCTCCAGACTGTACTTGGCGAGAGAAACGTGAAGGGCATGTTGAGGTGCTGGA ACCCTCGATGCCATGATGAAAGAGGCGCTCAGACACTGAAAGAGACAAGCTTCAA CCAGGCTACGGCCGGATCTGATGGAAGCCAAAGAGTGGTCCCGAAGTACATGA AGTCCGGCAATGTGAAGGACCTCCTGCAGGCATGGGACCTGTACTACCACTGTTCC GGCGGATCTAAGGGCAAAGACACAATCCCTTGGCTGGCCATCTGCTCGTTGGACT GTCTGGCGCTTGGCTTATCATCTGCTGTACCTGTGATCAACTGTGCGAAACACA GGCCATGGCTGAAGAAAGTGTGAAGTGCAACACCCCTGATCCGAGCAAGTCTTT AGCCAGCTGTCCAGCGACACGCGGGAGATGTTCAAGTGGCTGAGCAGCCATTT CCTAGCAGCAGCTTTAGCCCTGGCGGACTGGCTCCTGAGATCAGCCACTGGAAGTG CTGAAAGGGACAAGTGACCCAGCTGCTCTGCAACAGGACAAGGTGCCAGAACT GCCAGCTGTCTGAACACCGATGCCTATCTGTCCCTGCAAGAGCTGCAAGGATCCG GCGCCACCAACTTTAGTCTGCTCAAGCAAGCCGGGACGTCGAGGAAAATCCTGGGC CAGAAATGTGGCACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCGGCTGATTTTGGCGAGCGG AATGTGAAGGGATGTTTGAAGTGTGAGCCTCTCCACGCTATGATGGAACGGGGA CCCAGACTCTAAAGAAACAGCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCATGGAAG CTCAAGAATGGTGTAGAAAGTATATGAAGAGTGGCAACGTGAAAGATCTGCTGCAAG CCTGGGATCTCTATTATCAGTGTTCAGACGCATCAGCAAAGGACGCGGCCACAAA TTTCTCCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGGAAGAGAATCCCGGACCTATGCCTAAT CCTCGCCCTTCAAAGGCGAGGAACTGTTTACAGGCGTGGTCCCATCTGGTGAA CTGGACGGGATGTGAACGGCCACAAGTTTAGCGTTAGCGGCGAAGGCGAAGGGGA TGCCACATACGGAAGGCTGACCCGAAAGTTCATCTGCACCACGGCAAGTGCCTGTG CCTTGGCCTACACTGGTCAACCACTGACATACGGCGTGCAGTGTCTCAGCAGATACC CCGACCATATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGAGCGCCATGCTGAGGGCTACGTGC AAGAGCGGACCATCTTTTAAAGGACGACGGCAACTACAAGACCAAGGCGGAAGTGA AGTTCGAGGGGACACCCGTGCAACCGGATCGAGCTGAAGGCATCGACTTCAAAG AGGACGGCAACATCTGGGCCACAAGCTCGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTGT ACATCATGGCCGACAAGCAGAAAAACGGCATCAAAGTGAACCTTCAAGATCCGGCACA ACATCGAGGACGGCTCTGTGCAAGCTGGCCGATCACTACCAGCAGAAACACCCATCG GAGATGGCCCTGTGCTGCTGCCGATAACCACTACCTGAGCACAAGAGCGCCCTGA GCAAGGACCCCAACGAGAAGAGGGATCACATGGTGTGCTGGAATTCGTGACCGCC GCTGGCATCACACTCGGCATGGATGAGCTGTACAAGATGCCAATCCTAGACTGGC	3186에 대한 코딩 서열 (신호-FKBP- IL2Rg-P2A-신호- FRB-IL2Rb-P2A- FRB-P2A-GFP- FOXP3 (녹-인))

[0514]

	<p>AAGCCACGCGCTCCTTCTTCTGCTCTTGGACCTTCTCTGGTGCCTCGCCAGCTGGAG GGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGCTGGGGGCCCGGGGCCAGGGGGAACCTTCCA GGGCCGAGATCTCGAGGCGGGGCCATGCTCCTCTTCTTCTTGAACCCATGCCA CCATCGCAGCTGCAG</p>	
<p>38</p>	<p>ATGCCACTGGGACTGCTGGCTTGGACTGGCCCTTCTGGAGCACTGCATGCTCAGG CTGGCGTGCAAGTTCGAGACAATTAAGTCTGGCGACGCGGACCTTTCCTAAGCGAG GACAGACATGCGTGGTGCACCTACCGGCATGCTGGAAGATGGCAAGAAGTTCGACA GCAGCCGGGACAGAAACAAGCCTTCAAGTTCATGCTGGGCAAGCAAGAAGTGCATCA GAGGCTGGGAAGAGGGCGTCCGCCAGATGCTGTTGGACAGAGAGCCAAGCTGACA ATCAGCCCCGATTACGCCTATGGCGCCACAGGACCCCTGGGATCATTCTCCACATG CCACTGCTGTTGATGTGGAAGTCTGAAAGTCTGGCGAAGGCAGCAATACCAGCA AAGAGAACCCTTCTGTTCCCTGGAAGCCGTGGTATCAGCGTGGGATCTATGGG CCTGATCATCTCCCTGCTGCGTGTACTTCTGGTGGAAACGGACCATGCTCGGATCC CCACTGAAGAATCTGGAAGTCTGGTACCGAGTACCACGGCAATTCAGCGCTTG GAGTGGCGTGC AAAGGCCTGGTGAAGCCTGCAGCCTGACTACTCTGAGAGACT GTGCTGGTGTCTGAGATCCCTCTAAAGCGCGCTCTCGGAGAAGGACCAGGGCGC TTCTCCATGCTCAGCACAGCCCTTATTGGGCCCTCTTGTACACCTGAAGCGT AACTGGAAGCGGAGCTACTAAGCTTACCTGCTGAAGCAGGCTGGAGCGTGGAG GAGAACCTGGACCTATGGCTCTGCCAGTGACAGCTGCTGCTCTCTGCTGCTGTT GCTGCATGCCCGCAGACCTATTCTGTGGCAGAGATGTGGCATGAAGCCTGGGAAG GGCCTCCAGCTACTTTCGGCGAGAGAAACGTGAAGGGCATGTTGAGGTTGCTGGA ACCCCTGCATGCCATGATGGAAGAGGCCCTCAGACACTGAAAGAGACAAGCTCAA CCAGGCTACGGCCGGGATCTGATGGAAGCCAAAGAGTGGTCCGGAAGTACATGA AGTCCGGAATGTGAAGGACCTCTGCAGGCATGGGACCTGTAACACGTTGTC GGCGGATCTAAGGGCAAAGACACAATCCCTGGCTGGCCATCTGCTCGTTGGACT GTGTGGCGCTTCCGCTTCTCATCTCTGGTGTACTGCTGATCAACTGTCGGAACACA GGCCCATGGCTGAAGAAAGTGTGAAGTGC AACCCCTGATCCGAGCAAGTCTTT AGCCAGCTGTCCAGCGACGCGCGGAGATGTTCAGAAGTGGCTGAGCAGCCATTT CCTAGCAGCAGCTTTAGCCCTGGCGGACTGGCTCTGAGATCAGCCACTGGAAGTG CTGGAAGGGGACAAAGTACCAGCTGCTCTGCAACAGGACAAGGTCCAGAACCT GCCAGCCTGTAGCAATCACAGCCTGACCAGCTGCTTACCAACCAAGGGTACTTCTT CTTCCATGCTGACGCTCTGGAATCGAGGCCTGCCAGGTGTACTTCACTACGATC CCTACAGCGAAGAGGACCCCGATGAAGGTGTTGCCGGTCTCTACCGGAAGCTCTC CTCAACCTGCAACCACTGAGCGGCGAGGATGACGCCTACTGCATTCCCCAGCAG AGATGACCTGCTGCTGTTGAGCCCTTCTGCTCGGCGGACCTTCTCCACCTACAG CTCCAGGTGGAAGCGGAGCCGGCGAGGAAAGAATGCCTCAAGCCTGCAAGAGCGG GTGCCAGAGATTGGGATCCTCAACCACTGGGCCCTCAACACCTGGCGTCCAGATC TCGTGGATTCCAGCCTCTCCAGAGCTGGTGTGAGAGAAGTGGCGAAGAAGTGC CAGACGCTGGCCCTAGAGAGGGCGTTAGCTTCTTGGAGCAGACCTCTGACAGG GCGAGTTCAGAGCCCTGAATGTAGACTGCCCTGAACACCGATGCCTATCTGTCCCT GCAAGAGCTGCAAGGACAAGACCCACACACCTGGTTGGATCCGGCGCCCAACTT TAGTCTGCTCAAGCAAGCCGGGACGTCGAGGAAAATCCTGGGCCAGAAATGTGGC ACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCCGCTGATTTTGGCGAGCGAATGTGAAGGG ATGTTGAAGTGTGAGCCTCTCCAGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCTCA AAGAAACCAGCTTAAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCATGGAAGCTCAAGAATGT GTAGAAAGTATATGAAGAGTGGCAACGTGAAAGATCTGCTGCAAGCCTGGGATCTCT ATTATCAGTGTTCAGACGCATCAGCAAAGGCAAGCGGCCACAAATTTCTCCCTGCT GAAACAGGCCGGCAGCTGGAAGAGAATCCCGGACCTATGTATCCATACGATGTCCC AGATTATGCGCCCAATCCTAGACCTGGCAAGCCAGCGCTCCTTCTTGTCTTGGAC CTTCTCTGGTGCCTGCCAGCTGGAGGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACCTGCTGGG GGCCCGGGCCAGGGGAACCTTCCAGGGCCGAGATCTTCGAGCGGGGCCCATG CCTCCTCTTCTTCTTGAACCCATGCCACCTCGCAGCTGCAG</p>	<p>3187에 대한 코딩 서열 (신호-PKBP- IL2Rg-P2A-신호- FRB-IL2Rb-P2A- FRB-P2A-HA- FOXP3 (녹-인))</p>

[0515]

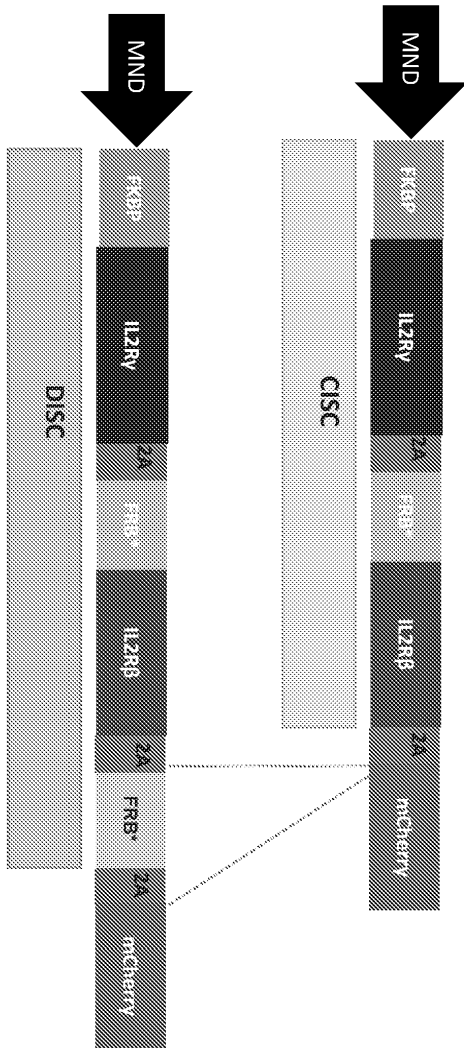
39	<p>ATGCCACTGGGACTGTGTGGCTTGGACTGGCCCTTCTTGGAGCACTGCATGCTCAGG CTGGCGTGCAGGTCGAGACAATTAGTCCTGGCGACGGCCGGACCTTTCTAAGCGAG GACAGACATGCGTGGTGCCTACACCGGCATGCTGGAAGATGGCAAGAAGTTCGACA GCAGCCGGGACAGAAACAAGCCTTTAAAGTTATGCTGGGCAAGCAAGAAGTATCA GAGGCTGGGAAGAGGGCGTCCGCCAGATGCTGTTGGACAGAGAGCCAAAGCTGACA ATCAGCCCCGATTACGCCATATGGGCCACAGGACACCCTGGGATCATTCTCCACATG CCACACTGTGTTCGATGTGAACTGCTGAAGCTCGGCCAAGGCAGCAATACCAGCA AAGAGAACCCTTCTGTTCCGCTGGAAGCCGTGGTTATCAGCGTGGGATCTATGGG CCTGATCATCTCCCTGCTGTGCGTGTACTTCTGGCTGGAACGACCATGCTCGGATCC CCACACTGAAGAATCTGGAAGATCTGGTACCAGTACCACGGCAATTTAGCGCTTG GAGTGGCGTGTCCAAAGGCCTGGCTGAAAGCCTGCAGCCTGACTACTCTGAGAGACT GTGCCTGGTGTCTGAGATCCCTCTAAAGCGGGCCTCTCGGAGAAGGACCAGGCGC TTCTCCATGCAATCAGCACAGCCCTTATTGGGCCCTCTTCTACACCTGAAAGCCTG AAAGTGAAGCGGAGCTACTAAGCTTGTGCTGGAAGCAGGCTGGAGACGTGGAG GAGAACCTGGACCTATGGCTCTGCCAGTGACAGCTCTGCTGCTTCTCTGGCTGTT GCTGCATGCCCGCAGACCTATTCTGTGGCAGAGATGTGGCATGAAGGCTGGAAGA GGCCTCCAGACTTACTTCGGCGAGAGAAACGTGAAGGGCATGTTGAGGTGCTGGA ACCCTGCATGCCATGATGAAAGAGGCCCTCAGACACTGAAAGAGACAAGCTCAA CCAGGCCTACGGCCGGGATCTGATGGAAGCCAAAGAGTGGTCCCGAAGTACATGA AGTCCGGCAATGTGAAGGACCTCTGCAGGCATGGGACCTGTACTACCAGTGTCC GCGGATCTCTAAGGGCAAAGACACAATCCCTTGGCTGGGCCATCTGCTCGTTGGACT GTCTGGCGCTTCGGCTTATCATCTGCTGTACTGCTGATCAACTGTCGGAACACA GGCCCATGGCTGAAGAAAGTGTGAAGTGAACACCCCTGATCCGAGCAAGTTCTTT AGCCAGCTGTCCAGCGACGCGCGGAGATGTTTCAAGTGGCTGAGCAGCCATTT CCTAGCAGCAGCTTTAGCCCTGGCGGACTGGCTCCTGAGATCAGCCACTGGAAGT CTGGAAGGGGACAAAGTACCAGCTGCTCCTGCAACAGGACAAGGTCCAGAACCT GCCAGCTGTCTAGCAATCACAGCCTGACCCAGCTGCTTACCAACAGGGCTACTTCT CTTCCATGCTGACGCTCTGAAATCGAGGCCTGCCAGGTGTAATTACCTACGATC CCTACAGCGAAGAGGACCCCGATGAAGGTGTTGCCGGTGTCTCCTACCGAAGCTCTC CTCAACCTGCAACCACTGAGCGCGAGGATGACGCCTACTGCATTCCCCAGCAG AGATGACCTGCTGCTTTCAGCCCTCTCTGCTCGGCGGACCTTCTCCACCATCTACAG CTCAGGTGGAAGCGGAGCGCGGAGGAAAGAATGCCTCAAGCCTGCAAGAGCGG GTGCCAGAGATTGGGATCCTCAACCACTGGGCCCTCAACACCTGGCGTGCCAGATC TCGTGGATTCCAGCCTCTCAGAGCTGGTGTGAGAGAAGCTGGCGAAGAAGTGC CAGACGCTGGCCCTAGAGAGGGCGTTAGCTTCTTGGAGCAGACCTCTGACAGG GCGAGTTCAGAGCCCTGAATGCTAGACTGCCCTGAACACCGATGCCTATCTGCCCT GCAAGAGCTGCAAGGACAAGACCCACACACCTGTTGGATCCGGCGCCACCAACTT TAGTCTGCTCAAGCAAGCCGGGACGTCGAGGAAAATCCTGGCCAGAAAATGTGGC ACGAAGGACTCGAGGAAGCCAGTCCGCTGTATTTGGCGAGCGGAATGTGAAAGGG ATGTTTGAAGTGTGAGCCTCTCCAGCTATGATGGAACGGGGACCCAGACTCTCA AAGAAACAGCTTTAATCAGGCTTACGGACGCGACCTCATGGAAGCTCAAGAAATGTT GTAGAAAGTATATGAAGAGTGGCAACGTGAAAGATCTGTGCAAGCCTGGGATCTCT ATTATCAGGTGTTACAGCAGATCAGCAAAGGAGCGGCGCCACAATTTCTCCCTGCT GAAACAGGCGCGGACGTGGAAGAGAATCCCGGACCTATGCCAATCTAGACTG CAAGCCAGCGCTCTTCTTGTCTTGGACCTTCTCCTGGTGCCTCGCCAGCTGGA GGGCTGCACCCAAAGCCTCAGACTGCTGGGGCCCGGGGCCAGGGGGAACCTTC CAGGGCCGAGATCTTCGAGGCGGGGCCATGCCTCTTCTTCAACCCATGC CACCATCGCAGCTGCAG</p>	<p>3195에 대한 코딩 서열 (신호-FKBP- IL2Rg-P2A-신호- FRB-IL2Rb-P2A- FRB-P2A-FOXP3 (녹-인))</p>
40	TTCCAGGGCCGAGATCTCG	인간 FOXP3을 표적화 하는 T1 스페이서
41	CGCCTCGAAGATCTCGGCC	인간 FOXP3을 표적화 하는 T3 스페이서

[0516]

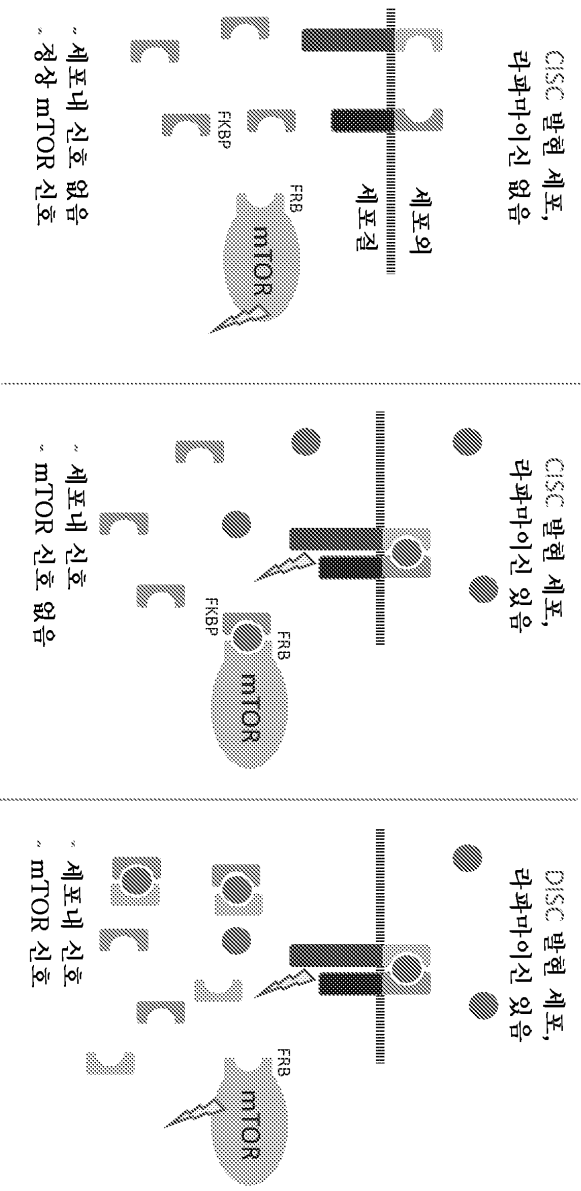
42	TCGAAGATCTCGGCCCTGGA	인간 FOXP3을 표적화하는 T4 스페이서
43	GGCCCTGGAAGGTTCCCCCT	인간 FOXP3을 표적화하는 T7 스페이서
44	TCCAGCTGGGCGAGGCTCCT	인간 FOXP3을 표적화하는 T9 스페이서
45	TCAGACCTGCTGGGGGCCG	인간 FOXP3을 표적화하는 T18 스페이서
46	GAGCCCCGCCTCGAAGATCT	인간 FOXP3을 표적화하는 R1 스페이서
47	ATCCACAGGGCCGTTAATG	인간 AAVS1을 표적화하는 P1 스페이서
48	GTCCCCTCCACCCACAGTG	인간 AAVS1을 표적화하는 P3 스페이서
49	ACCCACAGTGGGGCCACTA	인간 AAVS1을 표적화하는 P4 스페이서
50	CCTCTAAGGTTTGCTTACGA	인간 AAVS1을 표적화하는 N1 스페이서
51	TATAAGGTGGTCCAGCTCG	인간 AAVS1을 표적화하는 N2 스페이서
52	CCATCGTAAGCAAACCTTAG	인간 AAVS1을 표적화하는 N3 스페이서
53	GACTCCTGGGGATGGCCAA	뮤린 FOXP3을 표적화하는 mT20 스페이서
54	TTGGCCCTTGCCCATCCCC	뮤린 FOXP3을 표적화하는 mT22 스페이서
55	CCAGCTTGGCAAGACTCTG	뮤린 FOXP3을 표적화하는 mT23 스페이서
56	ACAAAAGTGTGCTAGACATG	인간 TRAC 스페이서 서열 G2
57	TCAAGAGCAACAGTGCTG	인간 TRAC 스페이서 서열 G4
58	CCGATGCCCAACCCAGGCC	스페이서

[0517]

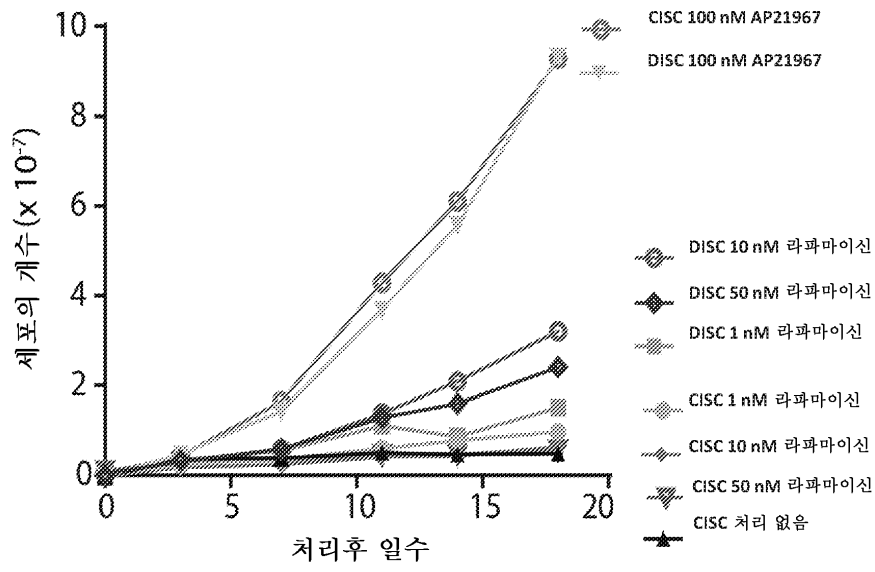
도면
도면1



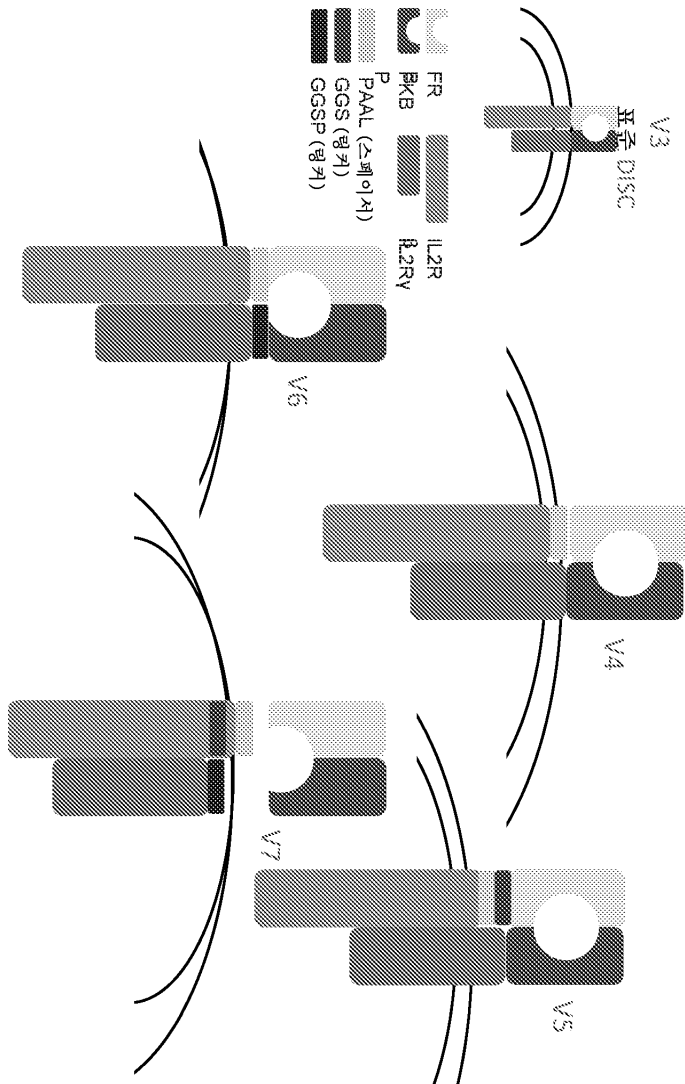
도면2



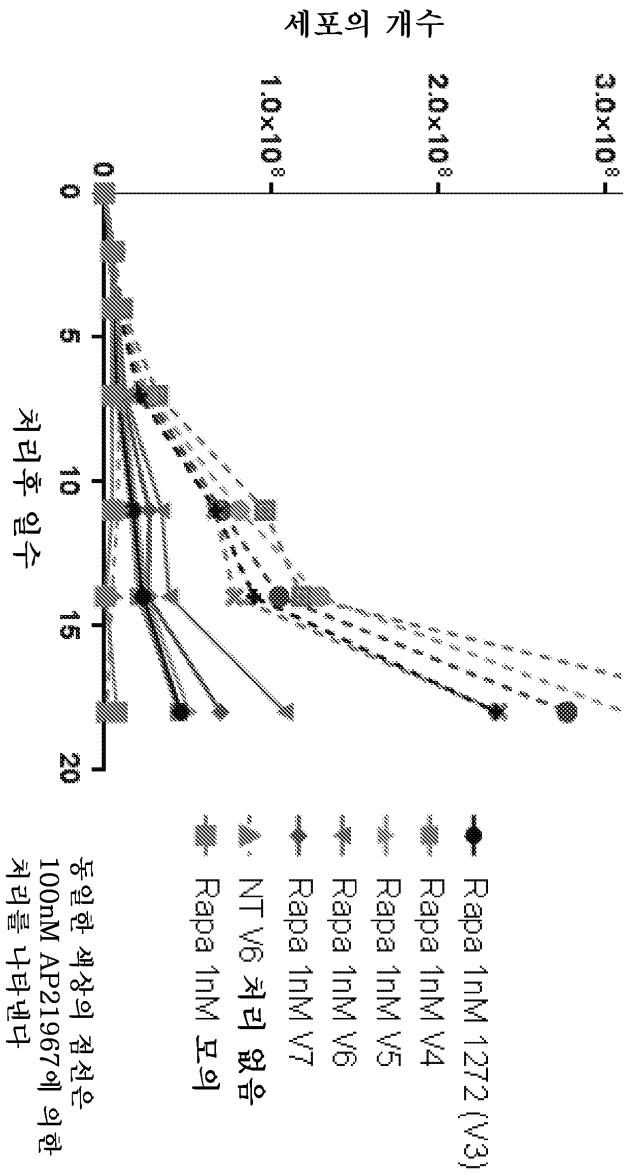
도면3



도면4

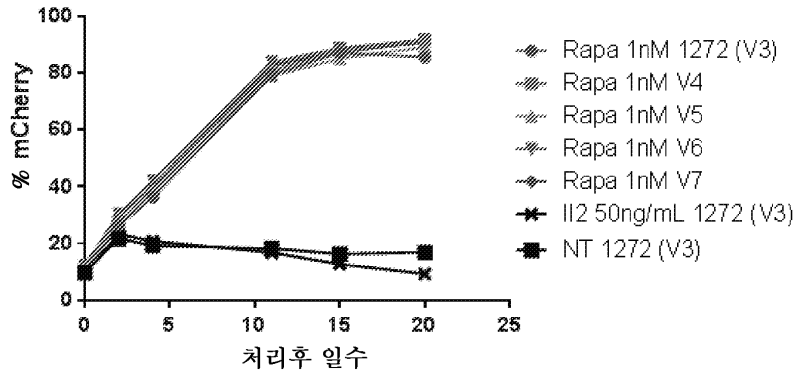


도면5

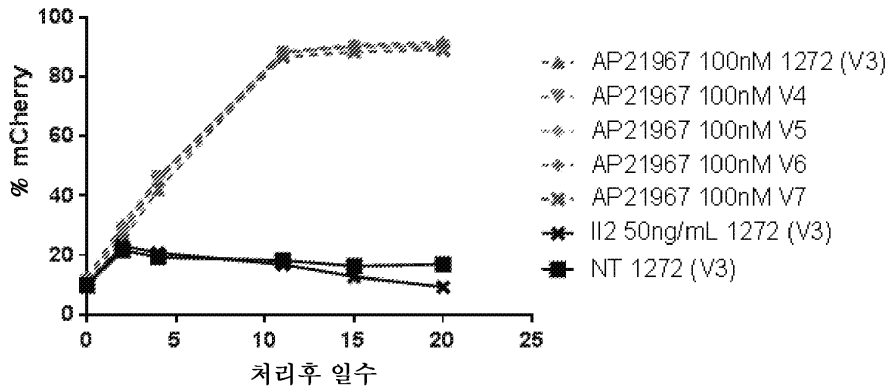


도면6

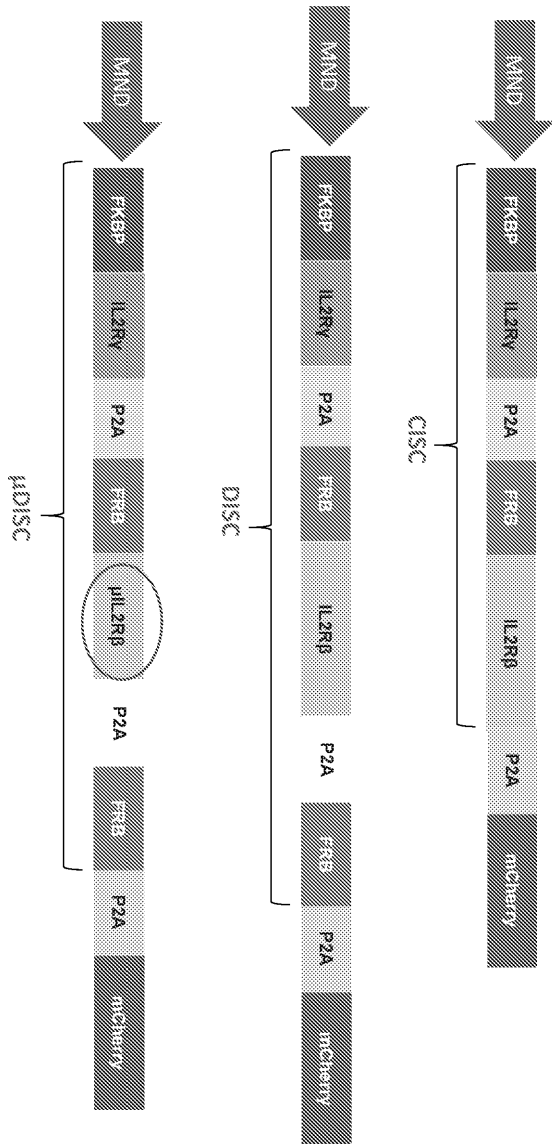
1 nM 라파마이신에서



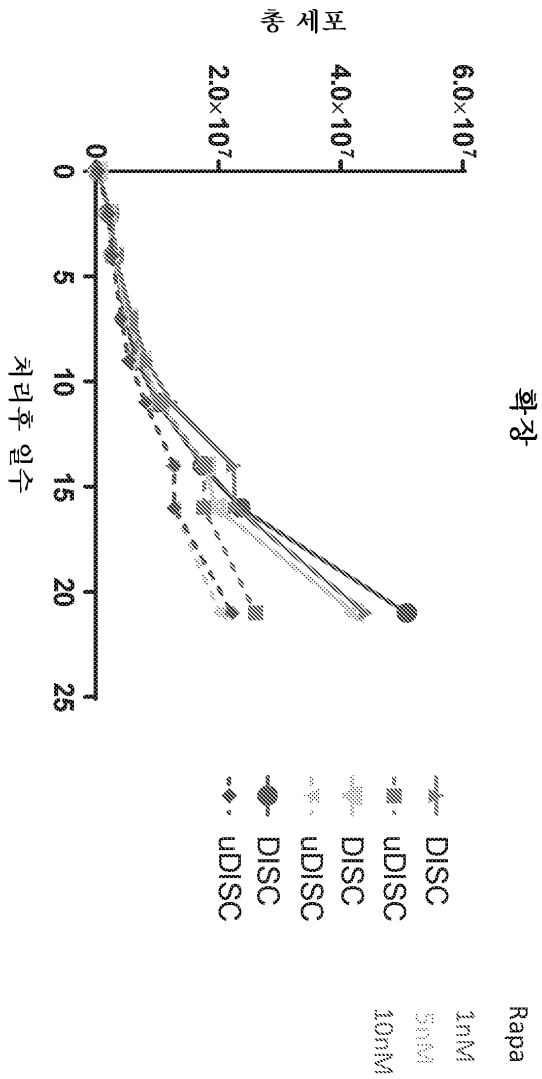
100 nM의 라파로그 AP21967에서



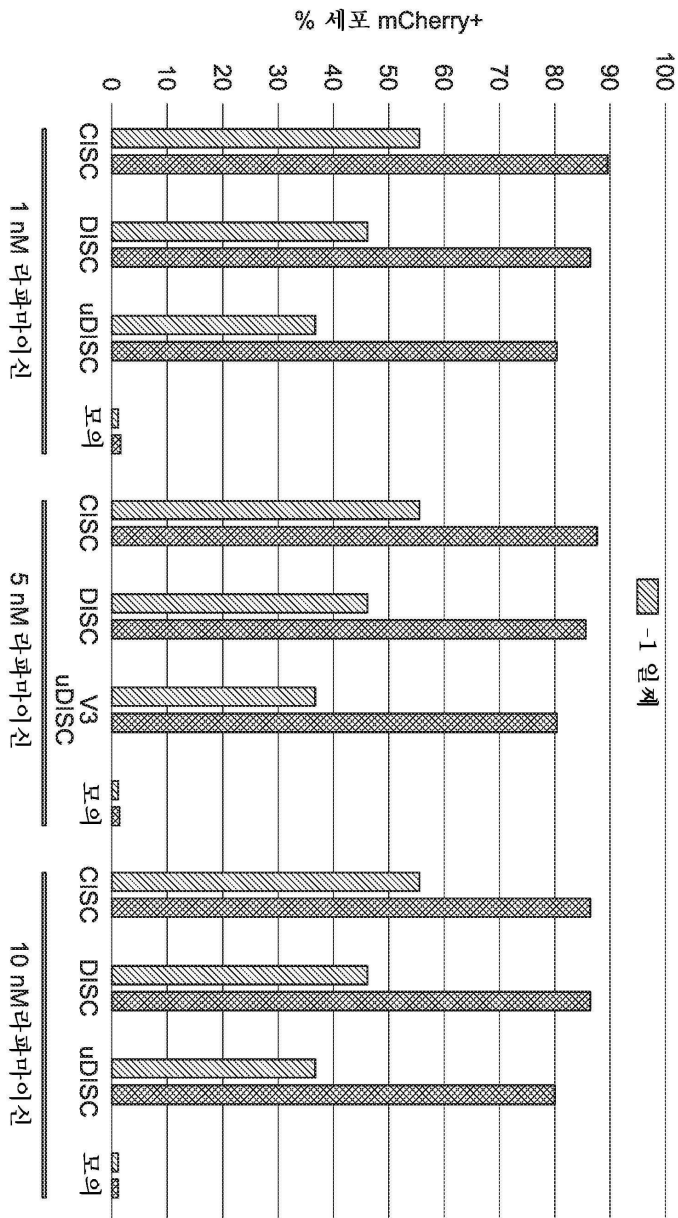
도면7



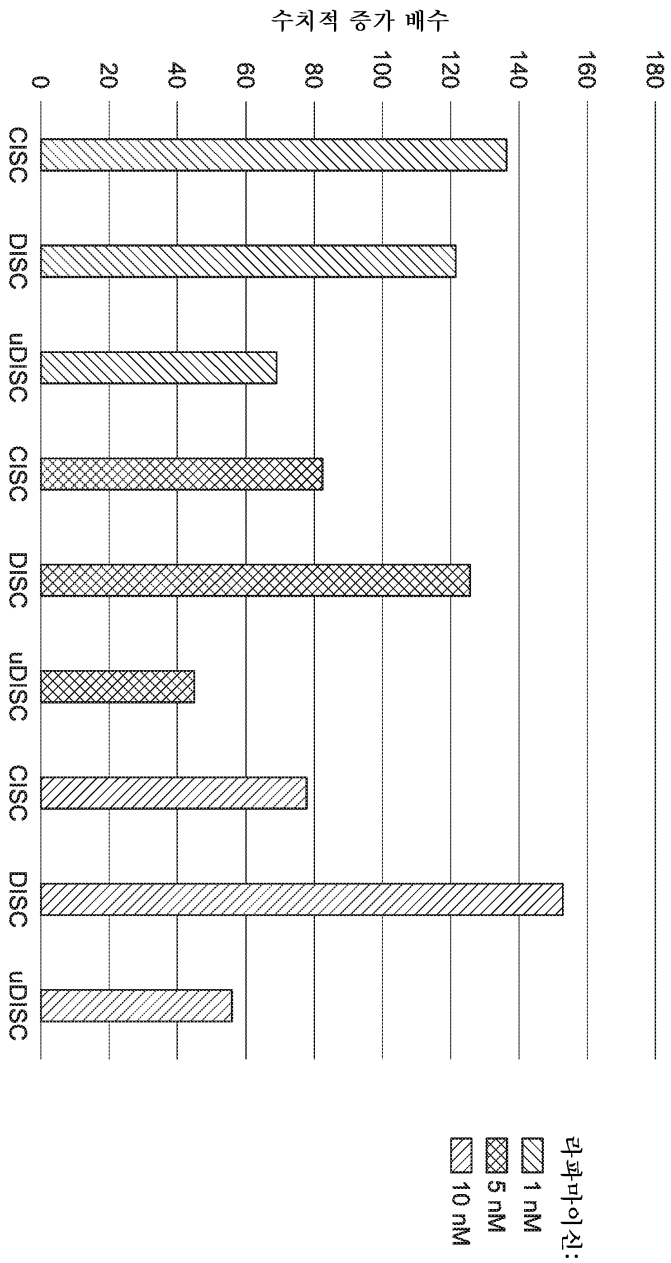
도면8



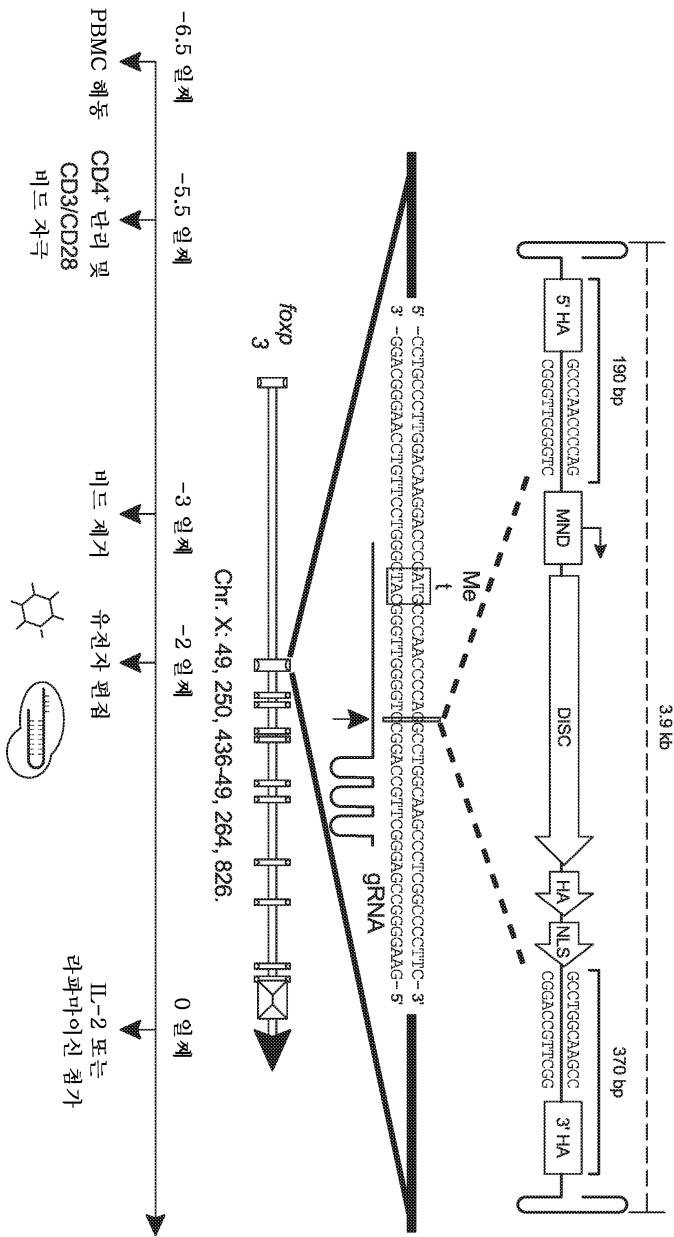
도면9



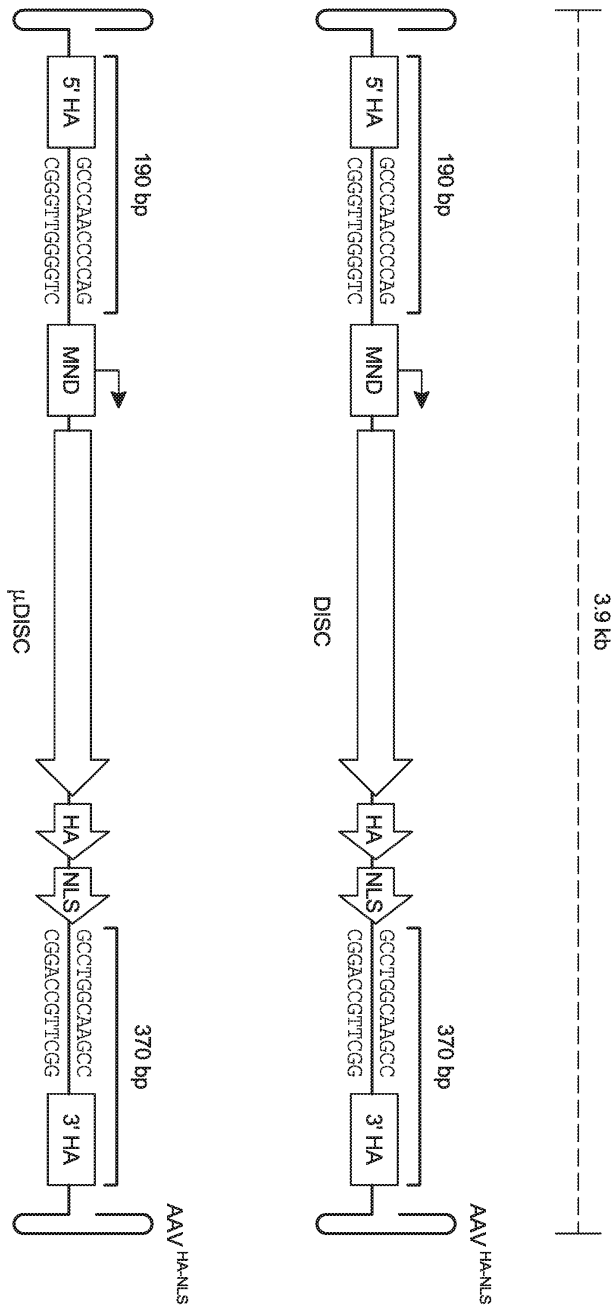
도면10



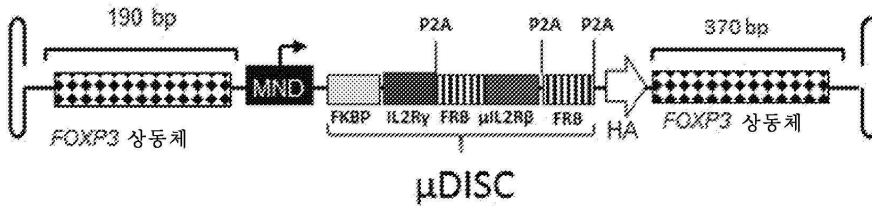
도면11



도면12

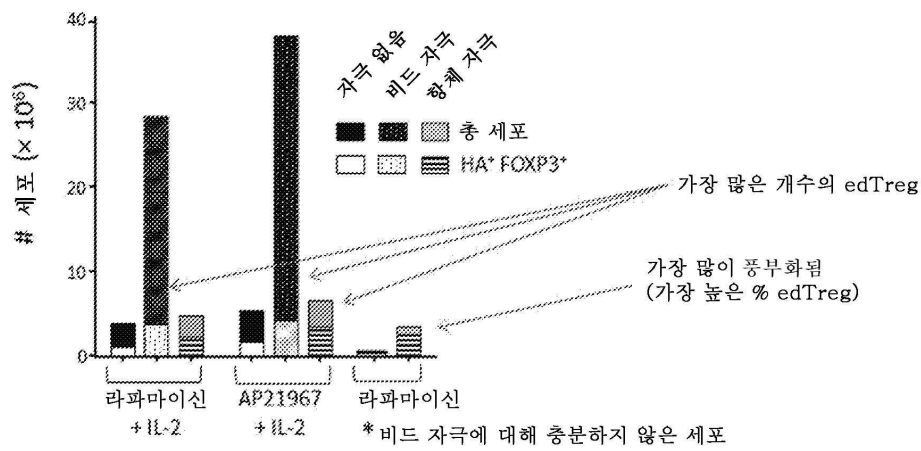


도면13



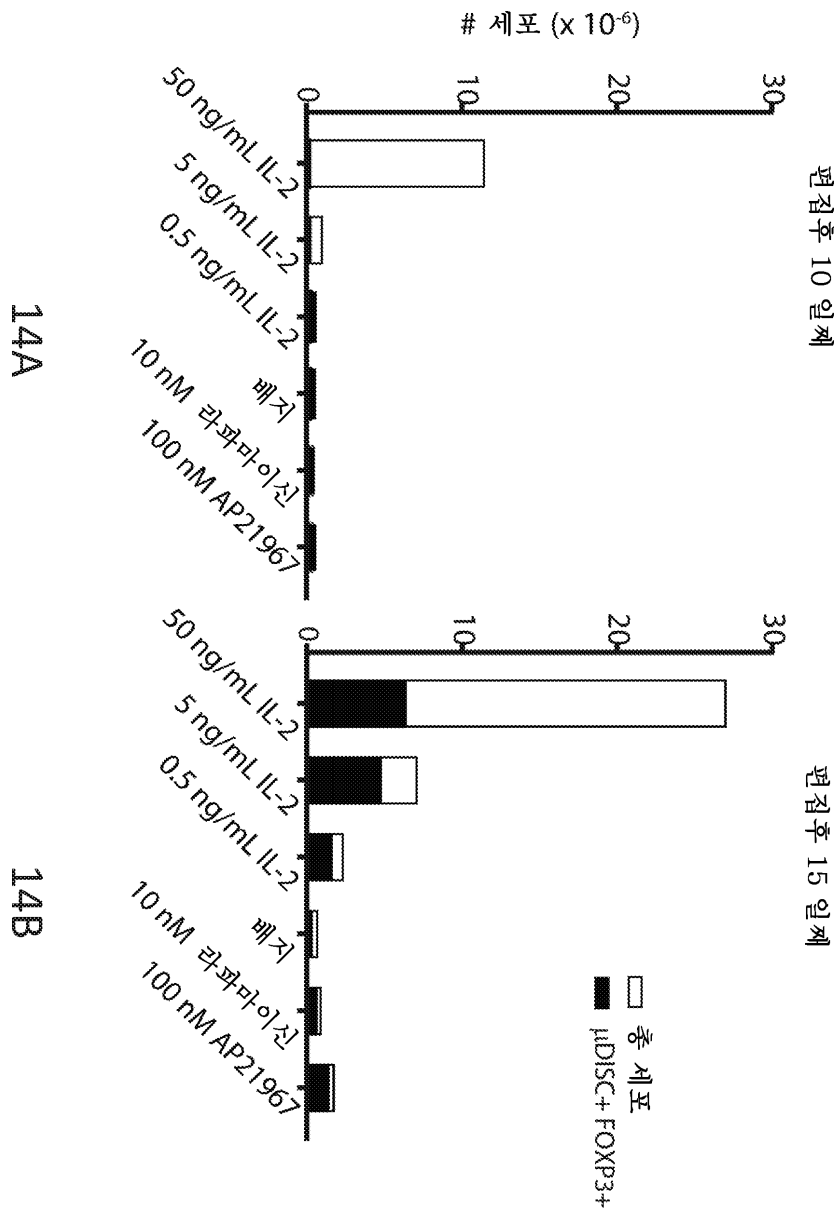
13A

16 일째에 DISC edTreg

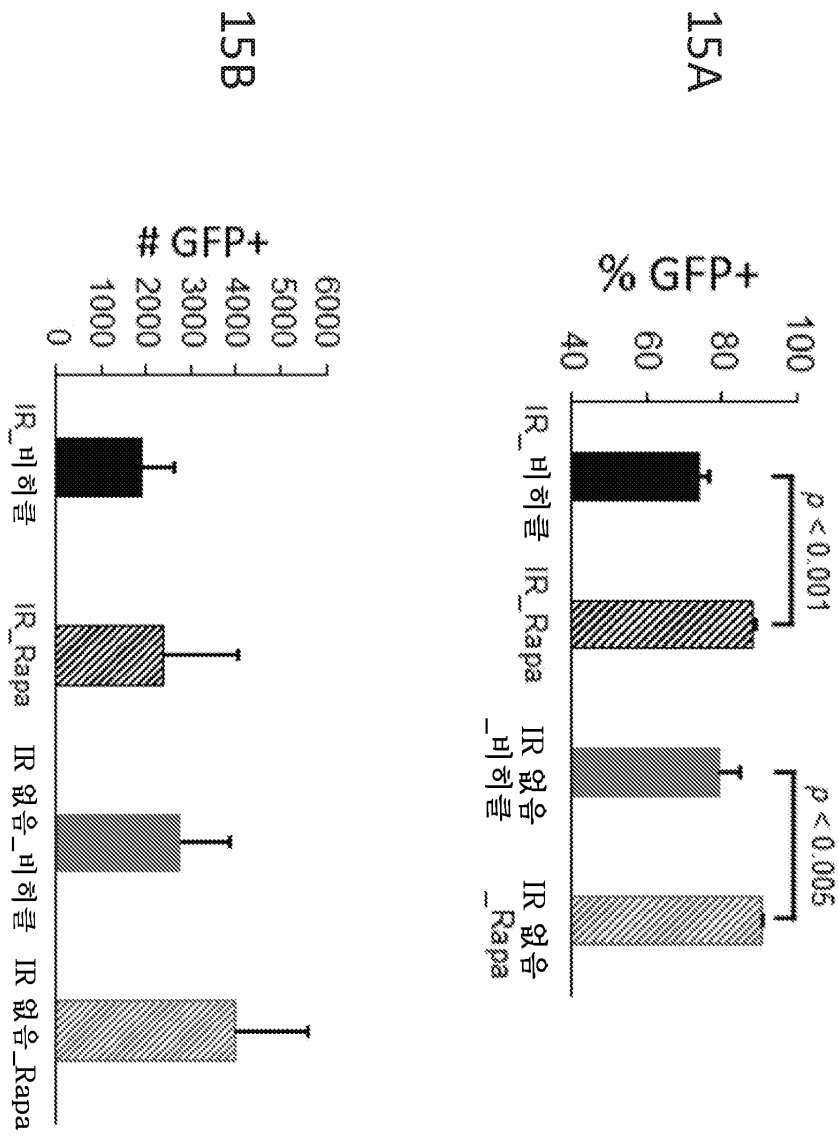


13B

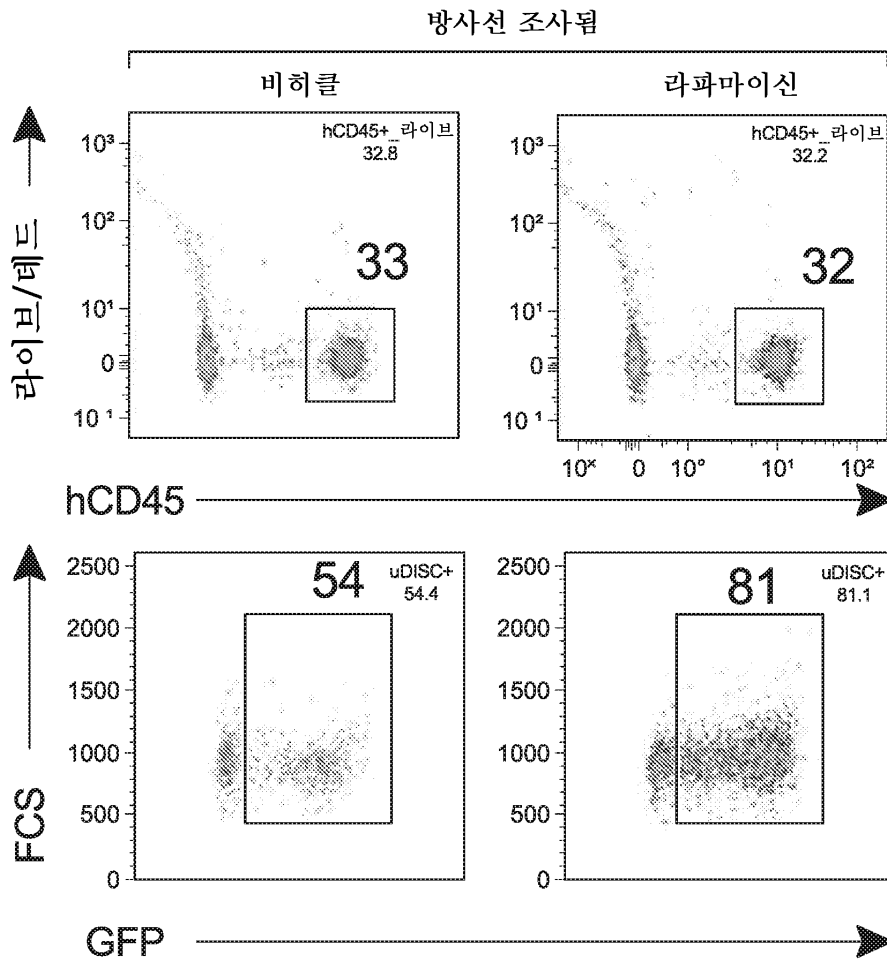
도면14



도면15

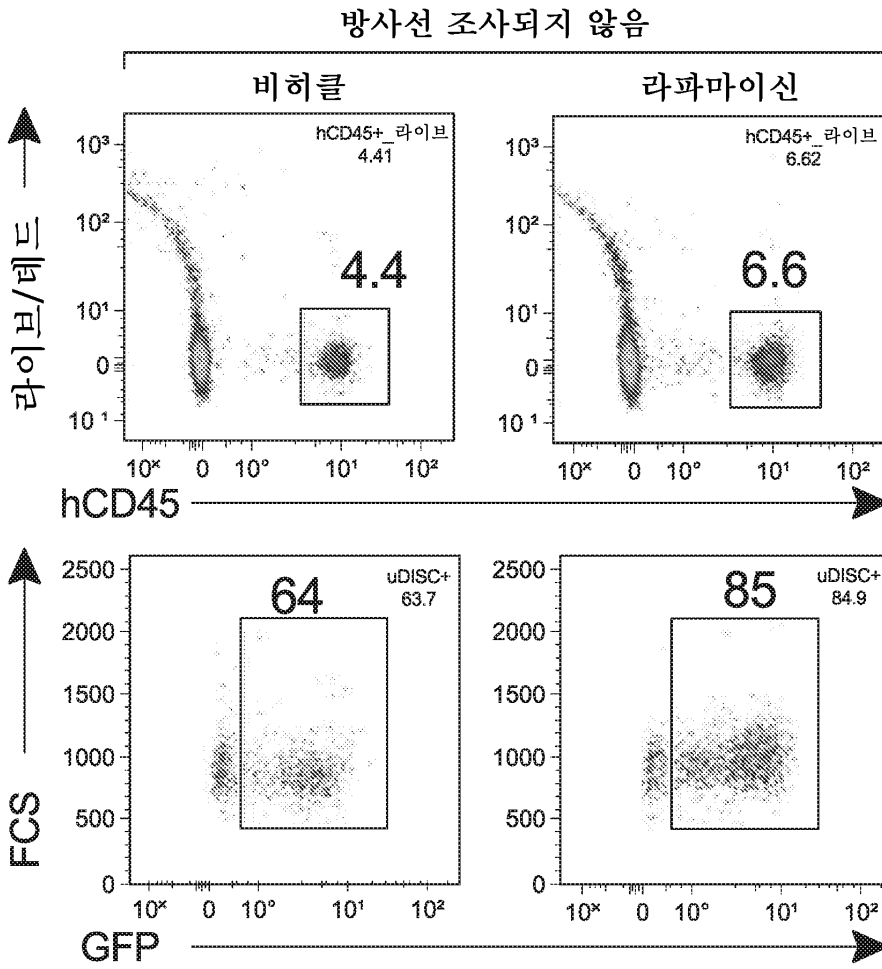


도면16i



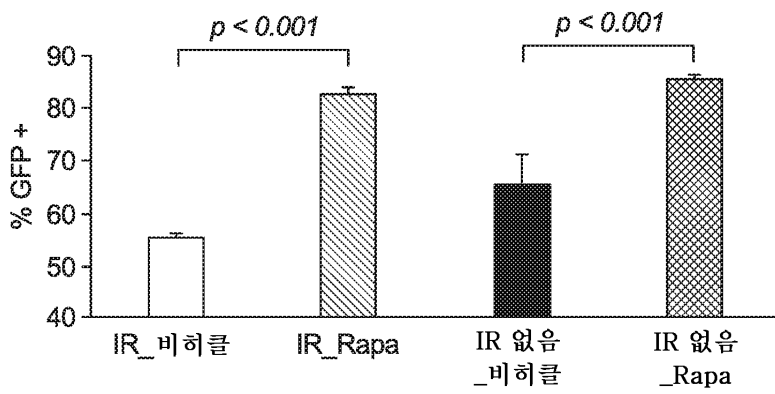
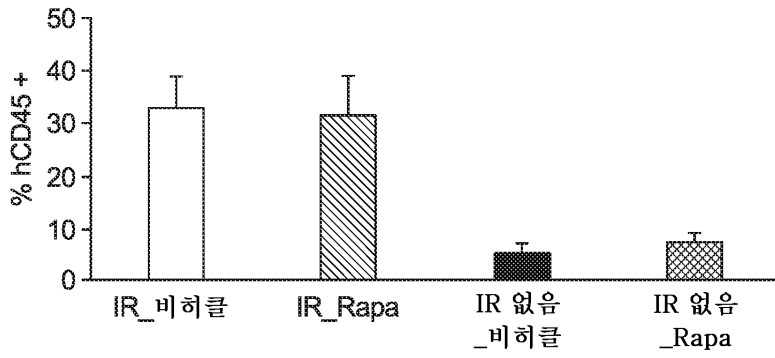
16A

도면16i



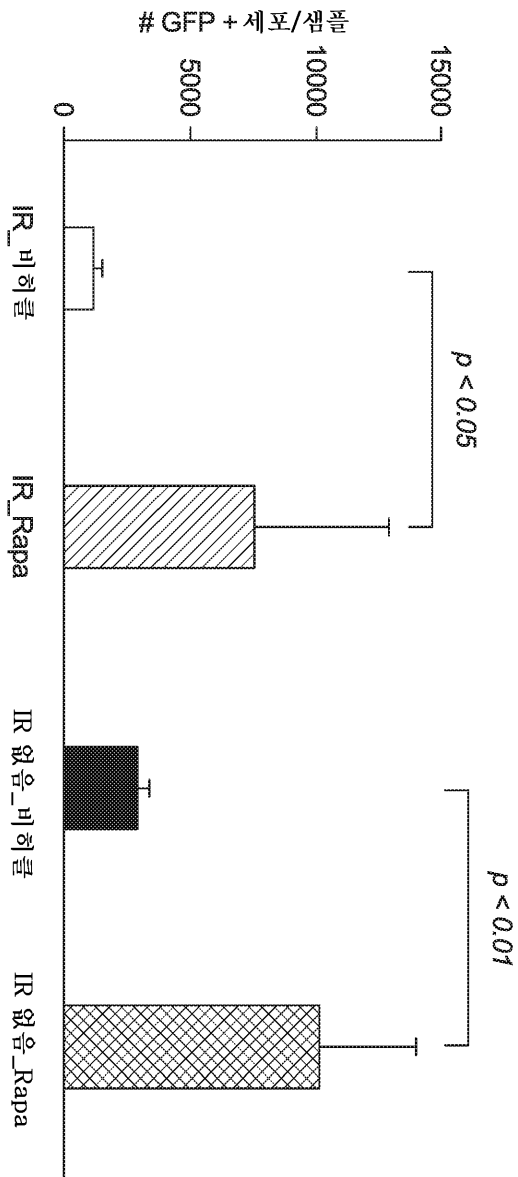
16A(계속)

도면16iii



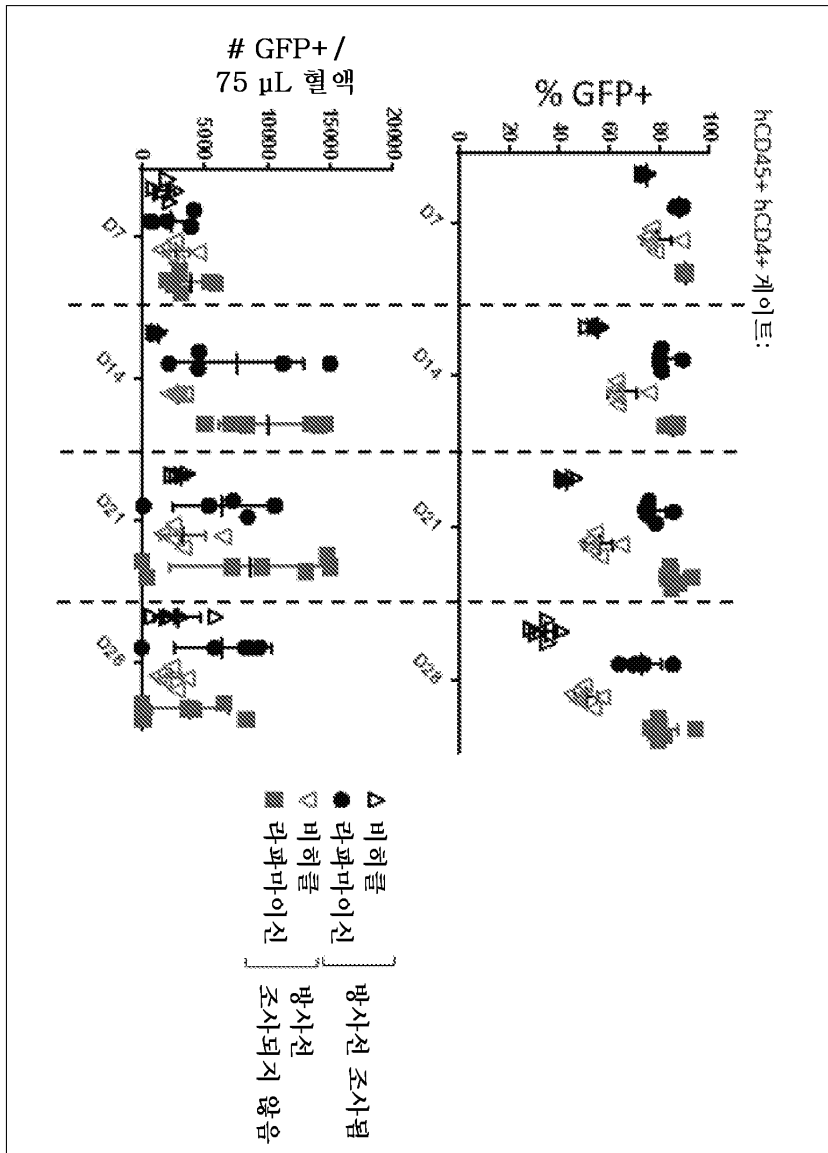
16A (계속)

도면16iv

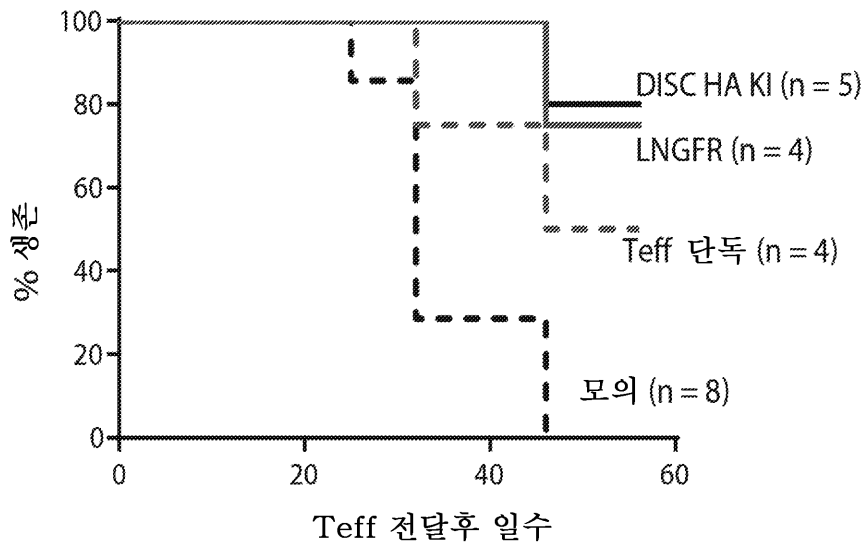


16B

도면17



도면18



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Scharenberg, Andrew M.
 Rawlings, David J.
 Sommer, Karen
 West, Samuel
 Honaker, Yuchi Chiang
 Takeuchi, Ryo

<120> Rapamycin Resistant Cells

<130> SCRI.186W0

<150> US 62/663,562

<151> 2018-04-27

<160> 58

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> naked FRB wild-type polypeptide

<400> 1

Met Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe

1 5 10 15

Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His

20 25 30

Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn

35 40 45

Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys

50 55 60

Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Thr Gln Ala Trp Asp Leu

65 70 75 80

Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys

85 90

<210> 2

<211> 90

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> naked FRB mutant polypeptide

<400> 2

Met Glu Met Trp His Glu Gly Leu Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe

1 5 10 15

Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His

20 25 30

Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn

35 40 45

Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys

50 55 60

Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu

65 70 75 80

Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile Ser Lys

85

90

<210> 3

<211> 4187

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> DISC vector DNA

<400> 3

```

gaacagagaa acaggagaat atgggcaaaa caggatatct gtgtaagca gttcctgccc      60
cggctcaggg ccaagaacag ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt      120
aagcagttcc tgccccggct caggccaag aacagatggt ccccagatgc ggtcccggcc      180
tcagcagttt ctagagaacc atcagatggt tccagggtgc cccaaggacc tgaatgacc      240
ctgtgcctta ttgaaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc      300

tccccgagct ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgct agcaccggtg      360
ccgccacat gcctctgggc ctgctgtggc tgggcctggc cctgctgggc gcctgcacg      420
cccaggccgg cgtgcaggtg gagacaatct ccccaggcga cggacgcaca ttcctaagc      480
ggggccagac ctgcgttgtg cactatacag gcatgctgga ggatggcaag aagtttgaca      540
gctcccggga tagaacaag ccattcaagt ttatgctggg caagcaggaa gtgatcagag      600
gctgggagga gggcgtggcc cagatgtctg tggccagag ggccaagctg accatcagcc      660
cagactacgc ctatggagca acaggccacc caggaatcat cccacctcac gccaccctgg      720

tgttcgatgt ggagctgctg aagctgggcg agggatccaa cacatcaaaa gagaaccct      780
ttctgttcgc attggaggcc gtagtcatat ctgttgatc catgggactt attatctccc      840
tgtttgtgtg gtacttctgg ctggaacgga ctatgcccag gatccccacg ctcaagaatc      900
tggaagatct cgtcacagaa taccatggta atttcagcgc ctggagcgga gtctctaagg      960
gtctggccga atccctcaa cccgattatt ctgaacggtt gtgcctcgta tccgaaatac     1020
cacaaaagg cgggctctg ggtgagggcc cagggcgag tccgtgcaat caacacagcc     1080
cgtattgggc cctccttgt tatacgttga agcccgaac tggaagcgga gctactaact     1140

tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaacc tggacctatg gcactgcccg     1200
tgaccgccct gctgctgect ctggccctgc tgetgcacgc ageccggcct atcctgtggc     1260
acgagatgtg gcacgagggc ctggaggagg ccagcaggct gtattttggc gagcgcaacg     1320

```

tgaagggcat gttcagaggc ctggagcctc tgcacgccat gatggagaga ggcccacaga 1380
 ccctgaagga gacatccttt aaccaggcct atggacggga cctgatggag gcacaggagt 1440
 ggtgcagaaa gtacatgaag tctggcaatg tgaaggacct gctgcaggcc tgggatctgt 1500
 actatcacgt gtttcggaga atctccaagg gcaaagacac gattccgtgg ctgggcatc 1560

tgctcgttgg gctgagtggc gcgtttggtt tcatcatctt ggtctatctc ttgatcaatt 1620
 gcagaaatac aggcccttgg ctgaaaaaag tgctcaagtg taatacccc gacccaagca 1680
 agttcttctc ccagctttct tcagagcatg gaggcgatgt gcagaaatgg ctctcttcac 1740
 cttttccctc ctcaagcttc tccccgggag ggctggcgcc cgagatttca cctcttgagg 1800
 tacttgaacg agacaaggtt acccaacttc tccttcaaca ggataaggta cccgaacctg 1860
 cgagccttag ctccaaccac tctcttacga gctgcttcac caatcaggga tacttctttt 1920
 tccaccttcc cgatgcgctg gaaatcgaag ctgtcaagt ttactttacc tatgatccat 1980

atagcgagga agatcccac gaaggagtgc ccggtgcgcc cacgggttcc tcacccaac 2040
 ctctccagcc tctctcagga gaagatgatg cttattgcac ttttcccagt agagacgatc 2100
 tcctctctt tcttccatct cttttggggg gacctteccc ccttctacg gcacctggcg 2160
 ggtctggcgc tggcgaggag cggatgccgc cgtccctcca ggagcgagta ccacgagatt 2220
 gggatcccca gccacttga cccccacc cggcgtacc tgacctgtc gattttcaac 2280
 ctccccctga attggctctg cgagaggctg gggaggaagt tccggacgct gggccgaggg 2340
 agggcgtgtc ctttccatgg agtaggcctc caggtcaagg cgagtttagg gctctcaacg 2400

cgcggtgcc gttgaatata gacgttata tctcactgca ggaactgcaa ggtcaggacc 2460
 caacacatct tgiaggatct ggtgctacta atttttctct tttgaagcaa gctggagatg 2520
 ttgaagaaa ccccggtccg gagatgtggc atgagggtct ggaagaagcg tctcactgt 2580
 actttggatg gcgcaatgtg aaggcatgt ttgaagtct cgaaccctt catgccatga 2640
 tggaacgagg accccagacc ttgaaggaga caagttttaa ccaagcttac ggaagagacc 2700
 tgatggaagc ccaggaatgg tgcaggaaat acatgaaaag cgggaatgtg aaggacttgc 2760
 tccaagcgtg ggacctgtac tatcatgtct ttaggcgcat tagtaagggc agcggcgcca 2820

ccaacttcag cctgctgaag caggccggcg acgtggagga gaaccccgcc cccgtgagca 2880
 agggcgagga ggataacatg gccatcatca aggagtcat gcgcttcaag gtgcacatgg 2940
 agggctccgt gaacggccac gagttcgaga tcgaggcgga gggcgagggc cggccctacg 3000
 agggcaccca gaccgcaag ctgaaggtga ccaagggtgg cccctgccc ttcgctggg 3060
 acatctgtc cctcagttc atgtacggt ccaaggccta cgtgaagcac cccgcccaca 3120
 tccccgacta ctgaagctg tccttccccg agggcttcaa gtgggagcgc gtgatgaact 3180

tcgaggacgg cggcgtggg accgtgaccc aggactcctc tctgcaggac ggcgagttca 3240

tctacaaggt gaagctgctc ggcaccaact tcccctccga cggccccgta atgcagaaga 3300

agaccatggg ctgggaggcc tccctcgagc ggatgtaccc cgaggacggc gccctgaagg 3360

gcgagatcaa gcagaggctg aagctgaagg acggcggcca ctacgacgct gaggtcaaga 3420

ccacctacaa ggccaagaag cccgtgcagc tgcccggcgc ctacaacgct aacatcaagt 3480

tggacatcac ctcccacaac gaggactaca ccatcgtgga acagtacgaa cgcgccgagg 3540

gccgccactc caccggcggc atggacgagc tgtacaagtg aactagtgtc gacaatcaac 3600

ctctggatta caaaatttgt gaaagattga ctggtattct taactatgtt gctcctttta 3660

cgctatgtgg atacgctgct ttaatgcctt tgtatcatgc tattgcttcc cgtatggctt 3720

tcattttctc ctcttctgat aaatcctggt tgcgtctctt ttatgaggag ttgtggcccc 3780

ttgtcaggca acgtggcgtg gtgtgcactg tgtttgctga cgcaaccccc actggttggg 3840

gcattgccac cacctgtcag ctcttttccg ggactttcgc tttccccctc cctattgcc 3900

cggcggaact catcgccgcc tgccttggcc gctgctggac aggggctcgg ctgttgggca 3960

ctgacaatte cgtggtgttg tggggaagc tgacgtcctt tccatggctg ctgcctgtg 4020

ttgccacctg gattctgcgc gggacgtcct tctgctacgt ccttcggcc ctcaatccag 4080

cggacettcc ttcccgcggc ctgctgccgg ctctgcggcc tcttccgctt cttegccttc 4140

gccctcagac gactcggatc tccctttggg ccgcctcccc gcctgga 4187

<210> 4

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> micro-DISC DNA (cytoplasmic tail only; codon diverged)

<400> 4

ccagcagctc tcggcaaaga cacgattccg tggcttgggc atctgctcgt tgggctgagc 60

ggtgcgtttg gtttcatcat cttggtctat ctcttgatca attgcagaaa tacaggcctt 120

tggctgaaaa aagtgtctaa gtgtaatacc cccgacccaa gcaagttctt ctcccagctt 180

tcttcagagc atggaggcga tgtgcagaaa tgctctctt caccttttcc ctctcaagc 240

ttctccccgg gagggctggc gcccgagatt tcacctcttg aggtacttga acgagacaag 300

gttacccaac ttctccttca acaggataag gtacccgaac ctgcgagcct tagcttgaat 360

acagacgctt atctctcact gcaggaactg caa

393

<210> 5

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> micro-DISC polypeptide (cytoplasmic tail only)

<400> 5

Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu

1 5 10 15

Val Gly Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu

 20 25 30

Ile Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys

 35 40 45

Asn Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His

 50 55 60

Gly Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser

65 70 75 80

Phe Ser Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu

 85 90 95

Glu Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro

 100 105 110

Glu Pro Ala Ser Leu Ser Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln

 115 120 125

Glu Leu Gln

 130

<210> 6

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> FKBP CISC domain

<400> 6

Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly Arg Thr Phe Pro

1 5 10 15

Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly Met Leu Glu Asp

 20 25 30

Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys Pro Phe Lys Phe

 35 40 45

Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu Glu Gly Val Ala

 50 55 60

Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile Ser Pro Asp Tyr

65 70 75 80

Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro Pro His Ala Thr

 85 90 95

Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu

 100 105

<210> 7

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> Entire micro-DISC polypeptide (FRB-truncated IL2Rbeta)

<400> 7

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu

 20 25 30

Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met

 35 40 45

Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln

<400> 8

gaacagagaa acaggagaat atgggcaaaa caggatatct gtgtaagca gttcctgccc 60
 cggctcaggg ccaagaacag ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt 120
 aagcagttcc tgccccggct cagggccaag aacagatggt ccccagatgc ggtccccccc 180

 tcagcagttt ctagagaacc atcagatggt tccagggtgc cccaaggacc tgaatgacc 240
 ctgtgcctta ttgaaactaa ccaatcagtt cgcttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc 300
 tccccgagct ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgct agcaccggtg 360
 ccgccacat gcctctgggc ctgctgtggc tgggcctggc cctgctgggc gcctgcacg 420
 cccaggccgg cgtgcaggtg gagacaatct ccccaggcga cggacgcaca tccctaagc 480
 ggggccagac ctgcgttgtg cactatacag gcatgctgga ggatggcaag aagtttgaca 540
 gctccccgga tagaacaag ccattcaagt ttatgctggg caagcaggaa gtgatcagag 600

 gctgggagga gggcgtggcc cagatgtctg tggccagag ggccaagctg accatcagcc 660
 cagactacgc ctatggagca acaggccacc caggaatcat cccacctcac gccaccctgg 720
 tgttcgatgt ggagctgctg aagctgggcg agggatccaa cacatcaaaa gagaaccct 780
 ttctgttcgc attggagccc gtagtcatat ctgttggatc catgggactt attatctccc 840
 tgttgtgtgt gtacttctgg ctggaacgga ctatgccag gatccccacg ctcaagaatc 900
 tgaagatct cgtcacagaa taccatggta atttcagcgc ctggagcggg gtctctaagg 960
 gtctggccga atccctcaa cccgattatt ctgaacggtt gtgcctcgta tccgaaatac 1020

 caccaaaagg cgggctctg ggtgagggcc caggggcgag tccgtgcaat caacacagcc 1080
 cgtattgggc ccctcctgt tatacgttga agcccgaac tgaagcggg gctactaact 1140
 tcagcctgct gaagcaggtt ggagacgtgg aggagaacc tggacctatg gcaactcccc 1200
 tgaccgccct gctgctgct ctggccctgc tgetgcacgc agcccggcct atcctgtggc 1260
 acgagatgtg gcacgagggc ctggaggagg ccagcaggct gtattttggc gagcgcaacg 1320
 tgaagggcat gttcagagtg ctggagcctc tgcacgcat gatggagaga ggcccacaga 1380
 ccctgaagga gacatccttt aaccaggcct atggacggga cctgatggag gcacaggagt 1440

 ggtgcagaaa gtacatgaag tctgccaatg tgaaggacct gctgcaggcc tgggatctgt 1500
 actatcacgt gtttcggaga atctccaagg gcaagacac gattccgtgg ctggggcctc 1560
 tgctcgttgg gctgagtggt gcgtttggtt tcatcatctt ggtctatctc ttgatcaatt 1620
 gcagaaatac aggcccttgg ctgaaaaaag tgctcaagtg taatacccc gaccaagca 1680
 agttcttctc ccagcttctc tcagagcatg gaggcgatgt gcagaaatgg ctctcttcc 1740
 cttttccctc ctcaagcttc tccccgggag ggctggcgcc cgagatttca cctcttgagg 1800

tacttgaacg agacaagggtt acccaacttc tccttcaaca ggataaggta cccgaacctg 1860

cgagccttag ctgaafaca gacgcttalc tctcactgca ggaactgcaa ggatctggtg 1920

ctactaattt ttctcttttg aagcaagctg gagatgttga agagaacccc ggtccggaga 1980

tgtggcatga gggctctggaa gaagcgtctc gactgtactt tggtagagc aatgtgaagg 2040

gcatgtttga agtcctcgaa ccccttcatg ccatgatgga acgcggaacc cagaccttga 2100

aggagacaag ttttaaccaa gcttacggaa gagacctgat ggaagcccag gaatggtgca 2160

ggaaatacat gaaaagcggg aatgtgaagg acttgctcca agcgtgggac ctgtactatc 2220

atgtcttttag gcgcattagt aagggcagcg gcgccaccaa cttcagcctg ctgaagcagg 2280

ccggcgacgt ggaggagaac cccggccccg tgagcaaggg cgaggaggat aacatggcca 2340

tcatcaagga gttcatgcgc ttcaaggtgc acatggaggg ctccgtgaac ggccacgagt 2400

tcgagatcga gggcgagggc gagggccgcc cctacgaggg caccagacc gccaagctga 2460

aggtgaccaa gggtagcccc ctgcccttcg cctgggacat cctgtcccct cagttcatgt 2520

acggctcaa ggcctacgtg aagcaccg cgacatccc cgactacttg aagctgtcct 2580

tccccgaggg cttaagtg gagcgcgtga tgaacttca ggacggcggc gtggtgaccg 2640

tgaccagga ctctctctg caggacggcg agttcatcta caagtggaag ctgcgcggca 2700

ccaacttccc ctccgacggc cccgtaatgc agaagaagac catgggctgg gaggcctcct 2760

ccgagcggat gtaccccgag gacggcgccc tgaagggcga gatcaagcag aggctgaagc 2820

tgaaggacgg cgccactac gacgctgagg tcaagaccac ctacaaggcc aagaagcccg 2880

tgcagctgcc cggcgctac aacgtcaaca tcaagttgga catcacctcc cacaacgagg 2940

actacacat cgiggaaacag tacgaacgcg ccgagggccg cactccacc ggcggcatgg 3000

acgagctgta caagtgaact agtgtcgaca atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa 3060

gattgactgg tattctaac tatgtgtctc cttttacgct atgtggatac getgctttaa 3120

tgccittgta tcatgctatt gcttccgta tgctttcat tttctctcc ttgtataaat 3180

cctggttget gtctctttat gaggagttgt ggcccgtgt caggcaactg ggcgtggtgt 3240

gcactgtgtt tgctgacga accccactg gttggggcat tgccaccacc tgcagctcc 3300

tttccgggac tttcgtttc cccctcceta ttgccacggc ggaactcacc gccgctgcc 3360

ttgcccgctg ctggacaggg gctcggctgt tgggcaactga caattccgtg gtgtgtcgg 3420

ggaagctgac gtctttcca tggctgctcg cctgtgttc cacctggatt ctgcgcggga 3480

ctccttctg ctacgtccct tcggccctca atccagcga ccttcttcc cgcggcctgc 3540

tgccggctct gcggcctctt ccgcgtcttc gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc 3600
 tttgggccgc ctccccgcct gga 3623

<210> 9
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <220><221> misc_feature
 <223> IL2Rgamma-CISC polypeptide
 <400> 9

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu
 1 5 10 15
 His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly
 20 25 30
 Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly
 35 40 45
 Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys
 50 55 60
 Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu
 65 70 75 80
 Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro
 100 105 110
 Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Gly Glu
 115 120 125
 Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala
 130 135 140
 Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys
 145 150 155 160
 Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys
 165 170 175

Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp
 180 185 190

Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser
 195 200 205

Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu
 210 215 220

Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp
 225 230 235 240

Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
 245 250

<210> 10

<211> 352

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> IL2Rgamma-CISC polypeptide

<400> 10

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu

1 5 10 15
 His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly

20 25 30
 Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly

35 40 45
 Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys

50 55 60
 Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu

65 70 75 80
 Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile

85 90 95
 Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro

100 105 110

Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu Thr
 130 135 140

Leu His Lys Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn Arg
 145 150 155 160

Phe Leu Asn His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp Trp
 165 170 175

Asp His Ser Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe Ser
 180 185 190

Leu Pro Ser Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser
 195 200 205

Arg Phe Asn Pro Leu Cys Gly Ser Ala Gln His Trp Ser Glu Trp Ser
 210 215 220

His Pro Ile His Trp Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu
 225 230 235 240

Phe Ala Leu Glu Ala Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile
 245 250 255

Ile Ser Leu Leu Cys Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg
 260 265 270

Ile Pro Thr Leu Lys Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly
 275 280 285

Asn Phe Ser Ala Trp Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu
 290 295 300

Gln Pro Asp Tyr Ser Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro
 305 310 315 320

Lys Gly Gly Ala Leu Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln
 325 330 335

His Ser Pro Tyr Trp Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr
 340 345 350

<210> 11

<211> 349

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> IL2Rgamma-CISC polypeptide

<400> 11

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu

1 5 10 15

His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly

20 25 30

Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly

35 40 45

Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys

50 55 60

Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu

65 70 75 80

Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro

100 105 110

Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly

115 120 125

Gln Asn Leu Val Ile Pro Trp Ala Pro Glu Asn Leu Thr Leu His Lys

130 135 140

Leu Ser Glu Ser Gln Leu Glu Leu Asn Trp Asn Asn Arg Phe Leu Asn

145 150 155 160

His Cys Leu Glu His Leu Val Gln Tyr Arg Thr Asp Trp Asp His Ser

165 170 175

Trp Thr Glu Gln Ser Val Asp Tyr Arg His Lys Phe Ser Leu Pro Ser

180 185 190

Val Asp Gly Gln Lys Arg Tyr Thr Phe Arg Val Arg Ser Arg Phe Asn

Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly

35 40 45

Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Phe Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys

50 55 60

Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu

65 70 75 80

Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro

100 105 110

Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly

115 120 125

Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala

130 135 140

Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys

145 150 155 160

Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys

165 170 175

Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp

180 185 190

Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser

195 200 205

Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu

210 215 220

Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp

225 230 235 240

Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr

245 250

<210> 13

<211> 429

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> IL2Rbeta-CISC polypeptide

<400> 13

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu

20 25 30

Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met

35 40 45

Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln

50 55 60

Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met

65 70 75 80

Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys

85 90 95

Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile

100 105 110

Ser Lys Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly

115 120 125

Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn

130 135 140

Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr

145 150 155 160

Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly

165 170 175

Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser

180 185 190

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

195 200 205

Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro

210 215 220

Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln

225 230 235 240

Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys

245 250 255

Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu

260 265 270

Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro

275 280 285

Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp

290 295 300

Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser

305 310 315 320

Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser

325 330 335

Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro

340 345 350

Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu

355 360 365

Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg

370 375 380

Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe

385 390 395 400

Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser

405 410 415

Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val

420 425

<210> 14

<211> 543

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> IL2Rbeta-CISC polypeptide

<400> 14

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu

20 25 30

Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met

35 40 45

Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln

50 55 60

Thr Leu Lys Glu Thr Ser Phe Asn Gln Ala Tyr Gly Arg Asp Leu Met

65 70 75 80

Glu Ala Gln Glu Trp Cys Arg Lys Tyr Met Lys Ser Gly Asn Val Lys

85 90 95

Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile

100 105 110

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

115 120 125

Ile Ser Leu Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys Asn Ile Ser

130 135 140

Trp Glu Ile Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His Leu Glu Phe

145 150 155 160

Glu Ala Arg Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu

165 170 175

Leu Thr Leu Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr

180 185 190

Pro Asp Thr Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro Leu Gln Gly

195 200 205

Glu Phe Thr Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala Phe Arg Thr
 210 215 220
 Lys Pro Ala Ala Leu Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu
 225 230 235 240
 Leu Val Gly Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu
 245 250 255
 Leu Ile Asn Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys
 260 265 270
 Cys Asn Thr Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Gln Leu Ser Ser Glu His
 275 280 285
 Gly Gly Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser
 290 295 300
 Phe Ser Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu
 305 310 315 320
 Glu Arg Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro
 325 330 335
 Glu Pro Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr
 340 345 350
 Asn Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu
 355 360 365
 Ala Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro
 370 375 380
 Asp Glu Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu
 385 390 395 400
 Gln Pro Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg
 405 410 415
 Asp Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro
 420 425 430
 Pro Ser Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro
 435 440 445
 Pro Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu

Asp Leu Leu Gln Ala Trp Asp Leu Tyr Tyr His Val Phe Arg Arg Ile
 100 105 110
 Ser Lys Lys Pro Phe Glu Asn Leu Arg Leu Met Ala Pro Ile Ser Leu
 115 120 125
 Gln Val Val His Val Glu Thr His Arg Cys Asn Ile Ser Trp Glu Ile
 130 135 140
 Ser Gln Ala Ser His Tyr Phe Glu Arg His Leu Glu Phe Glu Ala Arg
 145 150 155 160
 Thr Leu Ser Pro Gly His Thr Trp Glu Glu Ala Pro Leu Leu Thr Leu
 165 170 175
 Lys Gln Lys Gln Glu Trp Ile Cys Leu Glu Thr Leu Thr Pro Asp Thr
 180 185 190
 Gln Tyr Glu Phe Gln Val Arg Val Lys Pro Leu Gln Gly Glu Phe Thr
 195 200 205
 Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln Pro Leu Ala Phe Arg Thr Lys Pro Ala
 210 215 220
 Ala Leu Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly
 225 230 235 240
 Leu Ser Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn
 245 250 255
 Cys Arg Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr
 260 265 270
 Pro Asp Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly
 275 280 285
 Asp Val Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser
 290 295 300
 Pro Gly Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg
 305 310 315 320
 Asp Lys Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro
 325 330 335
 Ala Ser Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln

340 345 350
 Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys

355 360 365
 Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu

370 375 380
 Gly Val Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro

385 390 395 400
 Leu Ser Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp

405 410 415
 Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser

420 425 430
 Thr Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser

435 440 445
 Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro

450 455 460
 Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu

465 470 475 480
 Leu Val Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg

485 490 495
 Glu Gly Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe

500 505 510
 Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser

515 520 525
 Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val

530 535 540

<210> 16

<211> 379

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220

><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> IL7Ralpha-CISC polypeptide

<400> 16

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu
 20 25 30
 Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met
 35 40 45
 Phe Glu Val Leu Glu Pro Leu His Ala Met Met Glu Arg Gly Pro Gln
 50 55 60
 Thr Leu Lys Glu Thr Ser Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly Leu Ser
 65 70 75 80
 Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn Cys Arg
 85 90 95
 Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp
 100 105 110
 Pro Ser Lys Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Glu His Gly Gly Asp Val
 115 120 125
 Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Phe Pro Ser Ser Ser Phe Ser Pro Gly
 130 135 140
 Gly Leu Ala Pro Glu Ile Ser Pro Leu Glu Val Leu Glu Arg Asp Lys
 145 150 155 160
 Val Thr Gln Leu Leu Leu Gln Gln Asp Lys Val Pro Glu Pro Ala Ser
 165 170 175
 Leu Ser Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr
 180 185 190
 Phe Phe Phe His Leu Pro Asp Ala Leu Glu Ile Glu Ala Cys Gln Val
 195 200 205
 Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Tyr Ser Glu Glu Asp Pro Asp Glu Gly Val
 210 215 220
 Ala Gly Ala Pro Thr Gly Ser Ser Pro Gln Pro Leu Gln Pro Leu Ser
 225 230 235 240

Gly Glu Asp Asp Ala Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp Leu Leu

245 250 255

Leu Phe Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr Ala

260 265 270

Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro Pro Ser Leu Gln

275 280 285

Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro Gln Pro Leu Gly Pro Pro Thr

290 295 300

Pro Gly Val Pro Asp Leu Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu Leu Val

305 310 315 320

Leu Arg Glu Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg Glu Gly

325 330 335

Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu Phe Arg Ala

340 345 350

Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser Leu Gln

355 360 365

Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro Thr His Leu Val

370 375

<210> 17

<211> 345

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> IL7Ralpha-CISC polypeptide

<400> 17

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ile Leu Trp His Glu Met Trp His Glu Gly Leu

20 25 30

Glu Glu Ala Ser Arg Leu Tyr Phe Gly Glu Arg Asn Val Lys Gly Met

Asp Leu Leu Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro
 290 295 300

Phe Ser Leu Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly
 305 310 315 320

Gln Pro Ile Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val
 325 330 335

Thr Met Ser Ser Phe Tyr Gln Asn Gln
 340 345

<210> 18

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> Linker polypeptide

<400> 18

Gly Gly Gly Ser

1

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> Linker polypeptide

<400> 19

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5

<210> 20

<211> 3

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature
<223> Linker polypeptide
<400> 20
Gly Gly Gly
1
<210> 21
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220>
><223> Synthetic polypeptide
<220><221> misc_feature
<223> Linker polypeptide
<400> 21
Gly Gly Ser
1
<210> 22
<211> 4
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<220><221> misc_feature
<223> Linker polypeptide
<400> 22
Gly Gly Ser Pro
1
<210> 23
<211> 251
<212> PRT
<213> Artificial sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<220><221> misc_feature
<223> IL2Rgamma-CISC polypeptide
<400> 23

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu

1 5 10 15

His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly

 20 25 30

Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly

 35 40 45

Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys

 50 55 60

Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu

65 70 75 80

Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile

 85 90 95

Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro

 100 105 110

Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly

 115 120 125

Gly Ser Asn Thr Ser Lys Glu Asn Pro Phe Leu Phe Ala Leu Glu Ala

130 135 140

Val Val Ile Ser Val Gly Ser Met Gly Leu Ile Ile Ser Leu Leu Cys

145 150 155 160

Val Tyr Phe Trp Leu Glu Arg Thr Met Pro Arg Ile Pro Thr Leu Lys

 165 170 175

Asn Leu Glu Asp Leu Val Thr Glu Tyr His Gly Asn Phe Ser Ala Trp

 180 185 190

Ser Gly Val Ser Lys Gly Leu Ala Glu Ser Leu Gln Pro Asp Tyr Ser

195 200 205

Glu Arg Leu Cys Leu Val Ser Glu Ile Pro Pro Lys Gly Gly Ala Leu

210 215 220

Gly Glu Gly Pro Gly Ala Ser Pro Cys Asn Gln His Ser Pro Tyr Trp

225 230 235 240

Ala Pro Pro Cys Tyr Thr Leu Lys Pro Glu Thr

245 250

<210> 24
 <211> 443
 <212> PRT
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature
 <223> IL2Rbeta-CISC polypeptide

<400> 24

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu

1 5 10 15

His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly

20 25 30

Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly

35 40 45

Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys

50 55 60

Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu

65 70 75 80

Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile

85 90 95

Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro

100 105 110

Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly

115 120 125

Gly Lys Asp Thr Ile Pro Trp Leu Gly His Leu Leu Val Gly Leu Ser

130 135 140

Gly Ala Phe Gly Phe Ile Ile Leu Val Tyr Leu Leu Ile Asn Cys Arg

145 150 155 160

Asn Thr Gly Pro Trp Leu Lys Lys Val Leu Lys Cys Asn Thr Pro Asp

165 170 175

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

<223> IL7Ralpha-CISC polypeptide

<400> 26

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu
 1 5 10 15
 His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly
 20 25 30
 Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly
 35 40 45
 Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys
 50 55 60
 Pro Phe Lys Phe Met Leu Gly Lys Gln Glu Val Ile Arg Gly Trp Glu
 65 70 75 80
 Glu Gly Val Ala Gln Met Ser Val Gly Gln Arg Ala Lys Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Pro Asp Tyr Ala Tyr Gly Ala Thr Gly His Pro Gly Ile Ile Pro
 100 105 110
 Pro His Ala Thr Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu Gly
 115 120 125
 Glu Ile Asn Asn Ser Ser Gly Glu Met Asp Pro Ile Leu Leu Thr Ile
 130 135 140
 Ser Ile Leu Ser Phe Phe Ser Val Ala Leu Leu Val Ile Leu Ala Cys
 145 150 155 160
 Val Leu Trp Lys Lys Arg Ile Lys Pro Ile Val Trp Pro Ser Leu Pro
 165 170 175
 Asp His Lys Lys Thr Leu Glu His Leu Cys Lys Lys Pro Arg Lys Asn
 180 185 190
 Leu Asn Val Ser Phe Asn Pro Glu Ser Phe Leu Asp Cys Gln Ile His
 195 200 205
 Arg Val Asp Asp Ile Gln Ala Arg Asp Glu Val Glu Gly Phe Leu Gln
 210 215 220
 Asp Thr Phe Pro Gln Gln Leu Glu Glu Ser Glu Lys Gln Arg Leu Gly
 225 230 235 240

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

245 250 255

Pro Glu Ser Phe Gly Arg Asp Ser Ser Leu Thr Cys Leu Ala Gly Asn

260 265 270

Val Ser Ala Cys Asp Ala Pro Ile Leu Ser Ser Ser Arg Ser Leu Asp

275 280 285

Cys Arg Glu Ser Gly Lys Asn Gly Pro His Val Tyr Gln Asp Leu Leu

290 295 300

Leu Ser Leu Gly Thr Thr Asn Ser Thr Leu Pro Pro Pro Phe Ser Leu

305 310 315 320

Gln Ser Gly Ile Leu Thr Leu Asn Pro Val Ala Gln Gly Gln Pro Ile

325 330 335

Leu Thr Ser Leu Gly Ser Asn Gln Glu Glu Ala Tyr Val Thr Met Ser

340 345 350

Ser Phe Tyr Gln Asn Gln

355

<210> 27

<211> 276

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> MPL-CISC polypeptide

<400> 27

Met Pro Leu Gly Leu Leu Trp Leu Gly Leu Ala Leu Leu Gly Ala Leu

1 5 10 15

His Ala Gln Ala Gly Val Gln Val Glu Thr Ile Ser Pro Gly Asp Gly

20 25 30

Arg Thr Phe Pro Lys Arg Gly Gln Thr Cys Val Val His Tyr Thr Gly

35 40 45

Met Leu Glu Asp Gly Lys Lys Val Asp Ser Ser Arg Asp Arg Asn Lys

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> CISC vector DNA

<400> 28

```

agcttaatgt agtcttatgc aatactcttg tagtcttgca acatggtaac gatgagttag      60
caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac cgtgcatgcc gattggtgga agtaaggtgg      120
tacgatcgtg ccttattagg aaggcaacag acgggtctga catggattgg acgaaccact      180

gaattgccgc attgcagaga tattgtattt aagtgcctag ctcgatacaa taaacgggtc      240
tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagga acccactgct      300
taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgct tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga      360
ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtgg      420
cgcccgaaca gggacttgaa agcgaagagg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact      480
cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagaggc gaggggcggc gactggtgag tacgccaaaa      540
atthtgacta gcggaggcta gaaggagaga gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg      600

gggagaatta gatcgcatg ggaaaaaatt cggttaaggc cagggggaaa gaaaaaatat      660
aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgcatg taatcctggc      720
ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag      780
acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat      840
caaaggatag agataaaaga caccaaggaa gcttttagaca agatagagga agagcaaac      900
aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat      960
gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg      1020

agtagcacc accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat      1080
aggagctttg ttcttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcctcaat      1140
gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt      1200
gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca      1260
gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcttggggat      1320
ttggggttgc tctggaaaac tcatttgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagtggag      1380
taataaatct ctggaacaga tttggaatca cagcacctgg atggagtggg acagagaaat      1440

taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa      1500

```

gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
 aacaaattgg ctgtggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt 1620
 aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
 atcgtttcag acccacctcc caaccccag gggacccgac aggccccaag gaatagaaga 1740
 agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctgcacggta 1800
 tcggttaact tttaaaagaa aaggggggat tgggggtac agtgcagggg aaagaatagt 1860

 agacataata gcaacagaca tacaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaaattca 1920
 aaattttate gatcacgaga ctagectcga gaagcttgat atcgaattcc cacggggttg 1980
 gacgcgtagg aacagagaaa caggagaata tgggccaac aggatatctg tggtaaagcag 2040
 ttctgcccc ggctcagggc caagaacagt tggaacagca gaatatgggc caaacaggat 2100
 atctgtgga agcagttctt gccccggctc agggccaaga acagatggtc cccagatgcg 2160
 gtccccctt cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct 2220
 gaaatgacc tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc gcttctcgct tctgttcgcg 2280

 cgcttctgct ccccagctc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgcta 2340
 gcaccggtgc cgccaccatg cctctgggcc tgctgtggct gggcctggcc ctgctgggcg 2400
 ccctgcacgc ccaggccggc gtgcaggtgg agacaatctc cccaggcgac ggacgcacat 2460
 tcctaaagcg gggccagacc tgcgtgggtc actatacagg catgctggag gatggcaaga 2520
 agtttgacag ctcccgggat agaaacaagc cattcaagtt tatgctgggc aagcaggaag 2580
 tgatcagagg ctgggaggag ggcgtggccc agatgtctgt gggccagagg gccaaactga 2640
 ccatcagccc agactacgcc tatggagcaa caggccacc aggaatcctc ccacctcacg 2700

 ccacctggt gttcgatgtg gagctgctga agctgggcga gggatccaac acatcaaaag 2760
 agaaccctt tctgttcgca ttggaggccg tagtcatatc tgttggatcc atgggactta 2820
 ttatctcctt gttgtgtgtg tacttctggc tggaacggac tatgcccagg atccccacgc 2880
 tcaagaatct ggaagatctc gtcacagaat accatggtaa tttcagcgcc tggagcggag 2940
 tctctaaggg tctgcccga tccctccaac ccgattatc tgaacggttg tgcctcgat 3000
 ccgaaatacc accaaaaggc ggggctctgg gtgagggcc agggcgagt ccgtgcaatc 3060
 aacacagccc gtattgggcc cctccttgtt atacgttgaa gcccgaaact ggaagcggag 3120

 ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct ggacctatgg 3180
 cactgcccgt gaccgcctg ctgctgctc tggccctgct gctgcacgca gcccgccta 3240
 tcctgtggca cgagatgtgg cacgaggcc tggaggaggc cagcaggtg tattttggcg 3300
 agcgcaacgt gaagggcatg ttcaggtgc tggagcctct gcacccatg atggagagag 3360

gcccacagac cctgaaggag acatccttta accaggccta tggacgggac ctgatggagg 3420
cacaggagtg gtcagaaag tacatgaagt ctggcaatgt gaaggacctg ctgcaggcct 3480
gggatctgta ctatcacgtg tttcggagaa tctccaaggg caaagacacg attccgtggc 3540

ttgggcatct gctcgttggg ctgagtggig cgtttggttt catcatcttg gtctatctct 3600
tgatcaattg cagaaatata ggcccttggc tgaaaaaagt gctcaagtgt aatacccccg 3660
acccaagcaa gttcttctcc cagctttctt cagagcatgg aggcgatgtg cagaaatggc 3720
tctcttcacc tttccctcc tcaagcttct ccccgggagg gctggcgccc gagatttcac 3780
ctcttgaggt acttgaacga gacaaggtta cccaacttct ccttcaacag gataaggtag 3840
ccgaacctgc gagccttagc tccaaccact ctcttacgag ctgcttcacc aatcagggat 3900
acttcttttt ccaccttccc gatgcgctgg aaatcgaagc ttgtcaagtt tactttacct 3960

atgatccata tagcgaggaa gatcccagc aaggagtgc cggtgcgccc acgggttctct 4020
cacccaacc tctccagcct ctctcaggag aagatgatgc ttatgcaact tttcccagta 4080
gagacgatct cctcctcttt tctccatctc ttttgggggg accttcccc ccttctacgg 4140
cacctggcgg gtctgggtct ggcgaggagc ggatgcccgc gtcctccag gagcagtagc 4200
cacgagattg ggatccccag ccacttggac cccccaccc cggcgtacct gaccttgtcg 4260
atcttcaacc tccccctgaa ttgggtctgc gagaggctgg ggaggaagtt ccggacgctg 4320
ggccgaggga ggcgctgtcc tttccatgga gtaggcctcc aggtcaagc gagtttaggg 4380

ctctcaacgc gcggctgccg ttgaatacag acgcttatct ctcaactgcag gaactgcaag 4440
gtcaggacce aacacatctt gtaggatctg gtgctactaa tttttctctt ttgaagcaag 4500
ctggagatgt tgaagagaac cctggtccag tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg 4560
tggtgcccat cctggctcag ctggacggcg acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg 4620
gcgagggcga ggcgcatgcc acctacggca agctgacct gaagttcac tgcaccaccg 4680
gcaagctgcc cgtgccctgg cccacctcg tgaccacct gacctacgc gtgcagtgt 4740
tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc acgacttctt caagtccgc atgcccgaag 4800

gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca aggacgacgg caactacaag acccgcccg 4860
aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga accgcatcga gctgaagggc atcgacttca 4920
aggaggacgg caacatcctg ggcgacaagc tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct 4980
atatcatggc cgacaagcag aagaacggca tcaaggtaga cttcaagatc cgccacaaca 5040
tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcgccgacc actaccagca gaacacccc atcggcgacg 5100
gccccgtgct gctgcccagc aacctacc tgagcaccca gtcgccctg agcaaagacc 5160

ccaacgagaa gcgcgatcac atggctctgc tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc 5220

tggcatgga cgagctgtac aagtaaacta gtgtcgacaa tcaacctctg gattacaaaa 5280

tttgtgaaag attgactggt attcttaact atgttgetcc ttttacgcta tgtggatacg 5340

ctgctttaat gcctttgtat catgctattg ctccccgtat ggctttcatt ttctcctcct 5400

tgtataaatc ctggttctgt tctctttatg aggagtctgt gcccgttgtc aggcaactgt 5460

gcgtggtgtg cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg ttggggcatt gccaccacct 5520

gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc cctccctat tgccacggcg gaactcatcg 5580

ccgcctgcct tgcccgtgc tggacagggg ctggctgtt gggcactgac aattccgtgg 5640

tgttgcggg gaagctgacg tctttccat ggctgctcgc ctgtgttgcc acctggattc 5700

tgcgcgggac gtccttctgc tacgtccctt cggccctcaa tccagcggac ctctcttccc 5760

gcgccctgct gccgctctg cggcctcttc cgcgtcttcg ccttcgcctt cagacgagtc 5820

ggatctccct ttgggccgcc tccccgcctg gaattcgagc tcggtacctt taagaccaat 5880

gacttacaag gcagctgtag atcttagcca ctttttaaaa gaaaaggggg gactggaagg 5940

gctaattcac tccaacgaa gacaagatct gctttttgct tgtactgggt ctctctggtt 6000

agaccagatc tgagcctggg agctctctgg ctaactaggg aaccactgc ttaagcctca 6060

ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt gtgtgccctg ctgttgtgtg actctggtaa 6120

ctagagatcc ctgagacct tttagtcagt gtggaaaatc tctagcagta gtagttcatg 6180

tcatcttatt attcagfatt tataacttgc aaagaaatga atatcagaga gtgagaggaa 6240

cttgtttatt gcagcttata atggttacia ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa 6300

taaagcattt ttttcactgc attctagtig tggtttctcc aaactcatca atgtatctta 6360

tcatgtctgg ctctagctat cccgcccta actccgccca gttccgccca ttctccgcc 6420

catggetgac taatTTTTT tatttatgca gaggccgagg ccgctcggc ctctgagcta 6480

ttccagaagt agtgaggagg cttttttgga ggcttaggct tttgcgtcga gacgtacca 6540

attcgccta tagtgagtgc tattacgcgc gctcaactggc cgtcgtttta caacgtcgtg 6600

actgggaaaa cctggcgtt acccaactta atcgccttgc agcacatccc ctttcgcca 6660

gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg atcgccttc ccaacagtig cgcagcctga 6720

atggcgaatg gcgcgacgcg ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcgggt gtgggtggtta 6780

cgcgacgct gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctccttc gctttcttcc 6840

cttctttct cgcacgttc gccgcttcc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctcctt 6900

tagggttccg atttagtct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg 6960
 gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggtttttcg cccittgacg ttggagtcca 7020
 cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggctc 7080
 attcttttga tttataaggg attttgccga tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga 7140
 tttacaacaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gtttacaatt tcccaggtgg 7200
 cacttttcgg ggaaatgtgc gcggaacccc tatttgitta tttttctaaa tacattcaaa 7260
 tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa 7320

gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc ccttattccc ttttttgcgg cattttgctt 7380
 tcctgttttt gtcacccag aaacgctggt gaaagtaaaa gatgctgaag atcagttggg 7440
 tgcacgagtg ggttacctg aactggatct caacagcggg aagatccttg agagttttcg 7500
 ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt 7560
 atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga 7620
 cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa gcattctacg gatggcatga cagtaagaga 7680
 attatgcagt gctgccataa ccatgagtga taacactgcg gccaaacttac ttctgacaac 7740

gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt ttgacacaac atgggggatc atgtaactcg 7800
 ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac 7860
 gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactct 7920
 agcttcccgg caacaattaa tagactggat ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct 7980
 gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg 8040
 gtctcgggt atcattgcag cactggggcc agatggtaag ccctcccgtg tcgtagttat 8100
 ctacacgacg gggagtcagg caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg 8160

tgccctactg attaagcatt ggtaactgtc agaccaagtt tactcatata tactttagat 8220
 tgatttaaaa ctcatTTTT aatttaaaag gatctagggtg aagatccttt ttgataatct 8280
 catgacaaa atccctaac gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa 8340
 gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa 8400
 aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc 8460
 gaaggtaaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact gtccttctag tgtagccgta 8520
 gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaactct 8580

gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg 8640
 atagttaccg gataaggcgc agcgttcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag 8700
 cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc 8760

cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta agcggcaggg tcggaacagg 8820
 agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt 8880
 tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg 8940
 gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca 9000

catgttcttt cctgcgttat cccctgattc tgtggataac cgtattaccg cctttgagtg 9060
 agctgatacc gctcggcga gccgaacgac cgagcgcagc gagtcaatga gcgaggaagc 9120
 ggaagagcgc ccaatacga aaccgcctct ccccgcgctg tggccgattc attaatgcag 9180
 ctggcagcag aggtttcccg actgaaaagc gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag 9240
 ttagctcact cattagcagc cccaggcttt acactttatg cttccggctc gtatgttgtg 9300
 tggattgtg agcggataac aatttcacac aggaaacagc tatgacctg attacgcaa 9360
 gcgcgcaatt aaccctcact aaaggaaca aaagctggag ctgca 9405

<210> 29

<211> 10053

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> CISC vector DNA

<400> 29

agcttaatgt agtcttatgc aatactcttg tagtcttgca acatggtaac gatgagttag 60
 caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac cgtgcatgcc gattggtgga agtaaggtgg 120
 tacgatcgtg ccttattagg aaggcaacag acgggtctga catggattgg acgaaccact 180
 gaattgccgc attgcagaga tattgtattt aagtgcctag ctcgatacaa taaacgggtc 240
 tctctggtta gaccagatct gacccctggga gctctctggc taactagga acccactgct 300

taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgt tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360
 ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtgg 420
 cgcccgaaca gggacttgaa agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact 480
 cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagaggg gaggggcggc gactggtgag tacgccaaaa 540
 attttgacta gcggaggcta gaaggagaga gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg 600
 gggagaatta gatcgcgatg ggaaaaaatt cggttaaggg cagggggaaa gaaaaaatat 660
 aaattaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgcagt taatcctggc 720

ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag 780
 acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840
 caaaggatag agataaaaaga caccaaggaa gcttttagaca agatagagga agagcaaaac 900
 aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat 960
 gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg 1020
 agtagcacc accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaaagag cagtgggaat 1080
 aggagctttg ttccttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggcg cagcctcaat 1140

 gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 1200
 gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 1260
 gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcttggggat 1320
 ttgggttgc tctgaaaac tcatctgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagtggag 1380
 taataaatct ctggaacaga tttggaatca cagcactgg atggagtggg acagagaaat 1440
 taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa 1500
 gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560

 aacaaattgg ctgtggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt 1620
 aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
 atcgtttcag acccacctcc caaccggag gggaccggac aggccgaag gaatagaaga 1740
 agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctcgacggta 1800
 tcggttaact tttaaaagaa aaggggggat tgggggttac agtgcagggg aaagaatagt 1860
 agacataata gcaacagaca taaaactaa agaattacaa aaacaaatta caaaaattca 1920
 aaatattatc gatcacgaga ctagcctcga gaagcttgat atcgaattcc cacggggttg 1980

 gacgcgtagg aacagagaaa caggagaata tgggccaac aggatatctg tggtaagcag 2040
 ttctgcccc ggctcagggc caagaacagt tggacagca gaatatgggc caaacaggat 2100
 atctgtggtg agcagttcct gccccggctc agggccaaga acagatggtc cccagatgcg 2160
 gtccccctt cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct 2220
 gaaatgacc tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc gcttctcgct tctgttcgcg 2280
 cgcttctgct ccccgagctc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgcta 2340
 gcaccggtgc cgcaccatg cctctgggcc tgctgtggct gggcctggcc ctgctgggcg 2400

 ccctgcacgc ccaggccggc gtgcaggtgg agacaatctc cccaggcgac ggacgcacat 2460
 tccttaagcg gggccagacc tgcgtggtgc actatacagg catgctggag gatggcaaga 2520
 agtttgacag ctcccgggat agaaacaagc cattcaagtt tatgctgggc aagcaggaag 2580

tgatcagagg ctgggaggag ggcgtggccc agatgtctgt gggccagagg gccaagctga 2640
 ccatcagccc agactacgcc tatggagcaa caggccaccc aggaatcatc ccacctcacg 2700
 ccacctggtg gttcgatgtg gagctgctga agctgggcga gggcggtagt cagaaccttg 2760
 tgataccatg ggccccagaa aatctcacac ttcataaact ttccgaatca caactcgaac 2820

 tcaactgga taaccggttc ctgaatcact gtcttgaaca cctggtacaa tatcggaccg 2880
 actgggatca ctcatggaca gaacaatctg tggactatag gcacaaatc tcaactccaa 2940
 gcgtagacgg ccaaaaaaga tacacttttc gcgtacgac cgcctttaat cctctctgcg 3000
 gctctgctca gcaactggagt gaatggtecc atccattca ttggggatcc aacacatcaa 3060
 aagagaaccc ctttctgttc gcattggagg ccgtagtcat atctgttga tccatgggac 3120
 ttattatctc cctgttgtgt gtgtacttct ggctggaacg gactatgccc aggatcccca 3180
 cgctcaagaa tctggaagat ctcgtcacag aataccatgg taatttcagc gcctggagcg 3240

 gagtctctaa gggctctgcc gaatccctcc aaccgatta tctgaacgg ttgtgcctcg 3300
 tatccgaaat accacaaaaa ggcggggctc tgggtgaggg cccaggggcg agtccgtgca 3360
 atcaacacag cccgtattgg gccctctctt gttatacgtt gaagcccga actggaagcg 3420
 gagtactaa cttcagcctg ctgaagcagg ctggagacgt ggaggagaac cctggaccta 3480
 tggcactgcc cgtgaccgcc ctgctgctgc ctctggcct gctgctgac gcagcccggc 3540
 ctatctgtg gcacgagatg tggcacgagg gcctggagga ggccagcagg ctgtattttg 3600
 gcgagcgcaa cgtgaagggc atgttcgagg tgctggagcc tctgcacgcc atgatggaga 3660

 gagggccaca gaccctgaag gagacatcct ttaaccaggc ctatggacgg gacctgatgg 3720
 aggcacagga gtggtgcaga aagtacatga agtctggcaa tgtgaaggac ctgctgcagg 3780
 cctgggatct gtactatcac gtgtttcgga gaatctcaa gggaggttca aaacctttg 3840
 agaaccttag actgatggcg cccatctctc tgcaggtagt tcacgttgag acctatagat 3900
 gcaatataag ctgggaaatc tcacaagcca gccattactt tgaacggcat ttggaattcg 3960
 aggcccgaac actttcccc ggtcatacgt gggaagaagc tcctctcttg acgtgaagc 4020
 agaagcagga gtggatttgt ctggagactt tgactcctga tactcagtat gagttccaag 4080

 ttcgggtgaa accactcaa ggcgagtca cgactggtc tccgtggagt caaccgttg 4140
 cgttccgcac gaagcccgt gcccttggca aagacacgat tccgtggctt gggcatctgc 4200
 tcgttggct gagtgggtcg tttggttca tcactttgt ctatctctg atcaattgca 4260
 gaaatacagg cccttggctg aaaaaagtgc tcaagtgtaa tacccccac ccaagcaagt 4320
 tcttctccca gctttctca gagcatggag gcgatgtgca gaaatggctc tcttcaactt 4380
 ttccctctc aagcttctcc ccgggagggc tggcgcccga gatttcacct cttgaggtac 4440

ttgaacgaga caaggttacc caacttctcc ttcaacagga taaggtacc gaacctgcga 4500

 gccttagctc caaccactct cttacgagct gcttcaccaa tcaggatac ttctttttcc 4560
 accttcccga tgcgctggaa atcgaagctt gtcaagtta ctttacctat gatccatata 4620
 gcgaggaaga tcccgcagaa ggagtcgccg gtgcgccac gggttctca cccaacctc 4680
 tccagcctct ctcaggagaa gatgatgctt attgcacttt tcccagtaga gacgatctcc 4740
 tcctcttttc tecatctctt ttggggggac cttccccccc ttctacggca cctggcgggt 4800
 ctggtgctgg cgaggagcgg atgcccccgt cctccagga gcgagtacca cgagattggg 4860
 atccccagcc acttggacc cccacccccg gcgtacctga ccttgtcgat tttcaacctc 4920

 ccctgaatt ggigtgcga gaggtgggg aggaagtcc ggacgtggg ccgagggagg 4980
 gcgtgtcctt tccatggagt aggcctccag gtcaaggcga gtttagggct ctcaacgcgc 5040
 ggctgccgtt gaatacacag gcttatctct cactgcagga actgcaaggt caggacccaa 5100
 cacatcttgt aggatctggt gctactaatt tttctctttt gaagcaagct ggagatgttg 5160
 aagagaacct tggctcagtg agcaagggcg aggagctgtt caccggggtg gtgccatcc 5220
 tggctcagct ggacggcgac gtaaacggcc acaagttcag cgtgtccggc gagggcgagg 5280
 gcgatgccac ctacggcaag ctgacctga agttcatctg caccaccggc aagctgcccc 5340

 tgccctggcc caccctcgtg accacctga cctacggcgt gcagtgttc agccctacc 5400
 ccgaccacat gaagcagcac gacttcttca agtccgcat gcccgaaaggc tacgtccagg 5460
 agcgcacat ctcttcaag gacgacggca actacaagac ccgcgccgag gtgaagttcg 5520
 agggcgacac cctggtgaac cgcatcgagc tgaaggcat cgacttcaag gaggacggca 5580
 acatcctggg gcacaagctg gagtacaact acaacagcca caactctat atcatggccg 5640
 acaagcagaa gaacggcatc aaggtgaact tcaagatccg ccacaacatc gaggacggca 5700
 gcgtgcagct cgccgaccac taccagcaga acaccccat cggcgacggc cccgtgctgc 5760

 tgcccgaaa cactacctg agcaccagt ccgccctgag caaagacccc aacgagaagc 5820
 gcgatcacat ggtcctgctg gagttcgtga ccgccgccg gatcactctc ggcatggacg 5880
 agctgtacaa gtaaactagt gtcgacaatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat 5940
 tgactggat tcttaactat gttgtcctt ttacgtatg tggatagct gctttaatgc 6000
 ctttgatca tgetattgt tcccgtatgg ctttcatttt ctctctcttg tataaatcct 6060
 ggttgctgtc tctttatgag gagttgtggc ccgttgcag gcaacgtggc gtggtgtgca 6120
 ctgtgtttgc tgacgaacc cccactggtt ggggcattgc caccactgt cagctccttt 6180

ccgggacttt cgctttcccc ctccctattg ccacggcggga actcatcgcc gcctgccttg 6240
 cccgtgctg gacaggggct cggctgttgg gactgacaa ttccgtggtg ttgtcgggga 6300
 agctgacgtc ctttccatgg ctgctcgct gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgt 6360
 ctttctgcta cgicccctcg gccctcaatc cagcggacct tccttcccgc ggctgctgc 6420
 cggctctgcg gcctcttccg cgtcttcgcc ttcgccctca gacgagtcgg atctcccttt 6480
 gggccgcctc cccgcctgga attcgagctc ggtaccttta agaccaatga cttacaaggc 6540
 agctgtagat cttagccact ttttaaaaga aaagggggga ctggaagggc taattcactc 6600

 ccaacgaaga caagatctgc ttttggcttg tactgggtct ctctggttag accagatctg 6660
 agcctgggag ctctctggct aactagggaa cccactgctt aagcctcaat aaagcttgcc 6720
 ttgagtctt caagtagtgt gtgccctct gttgtgtgac tctgtaact agagatccct 6780
 cagacccttt tagtcagtg ggaaaaatc tagcagtagt agttcatgtc atcttattat 6840
 tcagtattta taacttgcaa agaaatgaat atcagagagt gagaggaact tgtttattgc 6900
 agcttataat ggttacaat aaagcaatag catcacaat ttcacaaata aagcattttt 6960
 ttactgcat tctagttgtg gtttgcctca actcatcaat gtatcttacc atgtctggct 7020

 ctagctatcc cgcccctaac tccgcccagt tccgccatt ctcccccga tggtgacta 7080
 atttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct ctgagctatt ccagaagtag 7140
 tgaggaggct ttttggagg cctaggcttt tgcgtcgaga cgtaccaat tcgcccata 7200
 gtgagtcgta ttacgcgcgc tcactggccg tcgttttaca acgtcgtgac tgggaaaacc 7260
 ctggcgttac ccaacttaat cgcttgcag cacatcccc tttcggcagc tggcgtaata 7320
 gcgaagaggc ccgcaccgat cgcccttccc aacagttgcg cagcctgaat ggccaatggc 7380
 gcgacgcgcc ctgtagcgcc gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga 7440

 ccgctacact tgccagcgcc ctagegcccg ctcttttcgc tttcttccct tectttcteg 7500
 ccacgttcgc cggctttccc cgtcaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat 7560
 ttagtgcttt acggcacctc gaccccaaaa aacttgatta gggtagtggt tcacgtagt 7620
 ggccatcgcc ctgatagacg gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtccacg tcttttaata 7680
 gtggactctt gttccaaact ggaacaacac tcaaccctat ctcggtctat tcttttgatt 7740
 tataagggat tttgccgatt tcggcctatt ggttaaaaa tgagctgatt taacaaaaat 7800
 ttaacgcgaa ttttaacaaa atattaacgt ttacaatttc ccaggtggca cttttcgggg 7860

 aaatgtgcgc ggaaccctta tttgtttatt tttctaata cattcaaata tgtatccgct 7920
 catgagacaa taacctgat aaatgcttca ataataatga aaaaggaaga gtatgagtat 7980
 tcaacatttc cgtgctgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgtttttgc 8040

tcaccagaa acgctgggta aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg 8100
 ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccttgag agttttcgcc ccgaagaacg 8160
 ttttccaatg atgagcactt ttaaagtctt gctatgtggc gcggtattat cccgtattga 8220
 cgccgggcaa gagcaactcg gtcgccgat acactattct cagaatgact tggttgagta 8280

 ctaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc 8340
 tgccataacc atgagtgata acaactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc 8400
 gaaggagcta accgcttttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcgttg 8460
 ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgctgtagc 8520
 aatggcaaca acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttcccggca 8580
 acaattaata gactggatgg aggcggataa agttgcagga ccacttctgc gctcggccct 8640
 tccgctggc tggtttatg ctgataaatc tggagccggt gagcgtgggt ctgcggtat 8700

 cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgtatc gtagttatct acacgacggg 8760
 gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat 8820
 taagcattgg taactgtcag accaagttta ctcatatata ctttagattg atttaaaact 8880
 tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca tgacaaaat 8940
 cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga tcaaaggatc 9000
 ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa aaccaccgct 9060
 accagcgggt gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact cttttccga aggtaactgg 9120

 cttcagcaga ggcagatac caaatactgt ctttctagt tagccgtagt taggccacca 9180
 cttcaagaac tcigtacac gcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc 9240
 tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttgac tcaagacgat agttaccgga 9300
 taaggcgag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca cagcccagct tggagcgaac 9360
 gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttcccga 9420
 agggagaaaag gcggacagg atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag 9480
 ggagcttcca ggggaaaacg cctgtatct ttatagtcct gtcgggttc gccacctctg 9540

 acttgagcgt cgatttttgt gatgctctc agggggcgcg agcctatgga aaaacgccag 9600
 caacgcggcc tttttacgt tctggcctt ttgctggcct tttgctcaca tgttctttcc 9660
 tgcgttatcc ccgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag ctgataccgc 9720
 tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc 9780
 aatacgcaaa ccgcctctcc ccgcgcttg gccgattcat taatgcagct ggcaagacag 9840
 gtttcccgac tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcaatt aatgtgagtt agctcactca 9900

ttaggcaccc caggctttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg gaattgtgag 9960

cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccaagc gcgcaattaa 10020

ccctcactaa agggaacaaa agctggagct gca 10053

<210> 30

<211> 10035

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> CISC vector DNA

<400> 30

agcttaatgt agicttatgc aatactcttg tagtcttgca acatggtaac gatgagttag 60

caacatgcct tacaaggaga gaaaaagcac cgtgcatgcc gattggtgga agtaaggtgg 120

tacgatcgtg ccttattagg aaggcaacag acgggtctga catggattgg acgaaccact 180

gaattgccgc attgcagaga tattgtattt aagtgcctag ctcgatacaa taaacgggtc 240

tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactagga acccactgct 300

taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgtc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 360

ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtgg 420

cgcccgaaca gggacttgaa agcgaaaggg aaaccagagg agctctctcg acgcaggact 480

cggcttgctg aagcgcgcac ggcaagaggc gaggggcggc gactggtgag tacgccaaaa 540

atthtgaacta gcggaggcta gaaggagaga gatgggtgcg agagcgtcag tattaagcgg 600

gggagaatta gatcgcgatg ggaaaaaatt cggttaaggc cagggggaaa gaaaaaatat 660

aaattaaaac atatagtatg ggcaagcagg gagctagaac gattcgcagt taatcctggc 720

ctgttagaaa catcagaagg ctgtagacaa atactgggac agctacaacc atcccttcag 780

acaggatcag aagaacttag atcattatat aatacagtag caaccctcta ttgtgtgcat 840

caaaggatag agataaaaga caccaaggaa gctttagaca agatagagga agagcaaac 900

aaaagtaaga ccaccgcaca gcaagcggcc gctgatcttc agacctggag gaggagatat 960

gagggacaat tggagaagtg aattatataa atataaagta gtaaaaattg aaccattagg 1020

agtagcacc accaaggcaa agagaagagt ggtgcagaga gaaaaagag cagtgggaat 1080

aggagctttg ttctttgggt tcttgggagc agcaggaagc actatgggag cagcctcaat 1140

gacgctgacg gtacaggcca gacaattatt gtctggtata gtgcagcagc agaacaattt 1200

gctgagggct attgaggcgc aacagcatct gttgcaactc acagtctggg gcatcaagca 1260
gctccaggca agaatcctgg ctgtggaaag atacctaaag gatcaacagc tcttggggat 1320
ttggggttgc tctggaaaac tcatittgcac cactgctgtg ccttggaatg ctagttaggag 1380
taataaatct ctggaacaga tttggaatca cagcacctgg atggagtggg acagagaaat 1440

taacaattac acaagcttaa tacactcctt aattgaagaa tcgcaaaacc agcaagaaaa 1500
gaatgaacaa gaattattgg aattagataa atgggcaagt ttgtggaatt ggtttaacat 1560
aacaatttgg ctgtggtata taaaattatt cataatgata gtaggaggct tggtaggttt 1620
aagaatagtt tttgctgtac tttctatagt gaatagagtt aggcagggat attcaccatt 1680
atcgtttcag acccacctcc caaccccag gggacccgac aggccccaag gaatagaaga 1740
agaaggtgga gagagagaca gagacagatc cattcgatta gtgaacggat ctcgacggta 1800
tcggttaact tttaaaagaa aaggggggat tgggggttac agtgcagggg aaagaatagt 1860

agacataata gcaacagaca tacaactaa agaattaca aaacaaatta caaaaattca 1920
aaattttacc gatcacgaga ctagcctcga gaagcttgat atcgaattcc cacggggttg 1980
gacgcgtagg aacagagaaa caggagaata tggccaacac aggatatctg tggtaagcag 2040
ttcctgcccc ggctcagggc caagaacagt tggaacagca gaatatgggc caaacaggat 2100
atctgtggta agcagttcct gccccggctc agggccaaga acagatggtc cccagatgcg 2160
gtccccctt cagcagtttc tagagaacca tcagatgttt ccagggtgcc ccaaggacct 2220
gaaatgacce tgtgccttat ttgaactaac caatcagttc gtttctcgct tctgttcgcg 2280

cgcttctgct ccccgagctc tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcgcta 2340
gcaccggtgc cgccaccatg cctctgggcc tgctgtggct gggcctggcc ctgctgggcg 2400
ccctgcacgc ccaggccggc gtgcaggtgg agacaatctc cccaggcgac ggacgacat 2460
tccttaagcg gggccagacc tgcgtgggtc actatacagg catgctggag gatggcaaga 2520
agtttgacag ctcccgggat agaaacaagc cattcaagtt tatgctgggc aagcaggaag 2580
tgatcagagg ctgggaggag ggcgtggccc agatgtctgt gggccagagg gccaaactga 2640
ccatcagccc agactacgcc tatggagcaa caggccacce aggaatcacc ccacctcagc 2700

ccaccctggt gttcgatgtg gagctgctga agctggcgca gcaaaacttg gtgattcctt 2760
gggccccaga aaatctcagc cttcacaagt tgfccgaatc ccagctcgag ctcaactgga 2820
ataatagatt tcttaatcat tgtttggaac acctggttca atatagaacg gattgggacc 2880
actcatggac cgagcagtca gttgactacc gccacaaatt ttcacttccc agcgtagatg 2940
ggcagaagag gtacacatit agggtcagat ccaggtttaa tcctctgtgt ggttctgctc 3000
aacactggtc tgagtggagc catccgatcc actggggctc aaatacctt aaagaaaatc 3060

cgttcctctt tgcgctcga gcccgttgta tcagcgtcgg aagcatggga cttatcattt 3120

 cccttctctg cgtgtacttc tggctggagc ggacgatgcc gcgattccg acgctcaaaa 3180
 acctggagga ccttgaaca gaatatcacg gtaatttctc cgcttggagt ggcgtatcaa 3240
 aggggcttgc ttagtccctt caaccggatt actctgagcg cctctgcttg gtgtccgaga 3300
 tacctcccaa aggaggtgca cttggggagg ggccaggcgc gtccccttgc aatcagcata 3360
 gtccgtattg ggcgcccc tgttataacc tcaaaccgga aacgggaagc ggagctacta 3420
 acttcagcct gctgaagcag gctggagacg tggaggagaa ccctggacct atggcactgc 3480
 ccgtgaccgc cctgctgctg cctctggccc tctgctgca cgcagcccgg cctatcctgt 3540

 ggcacagat gtggcacgag ggcctggagg aggccagcag gctgtatttt ggcgagcga 3600
 acgtgaaggg catgttcgag gtgctggagc ctctgcacgc catgatggag agaggccac 3660
 agacctgaa ggagacatcc ttttaaccagg cctatggacg ggacctgat gaggcacagg 3720
 agtgggtcag aaagtacatg aagtctggca atgtgaagga cctgctgcag gcctgggatc 3780
 tgtactatca cgtgtttcgg agaactcca agaaaccttt tgagaacctt agactgatgg 3840
 cgcccatctc tctcaggtg gttcacgttg agacccatag atgcaatata agctgggaaa 3900
 tctcacaagc cagccattac tttgaacggc atttggaatt cgaggcccga acactttccc 3960

 ccggtcatac gtgggaagaa gctcctctct tgacgctgaa gcagaagcag gagtggattt 4020
 gtctggagac ttgactcct gatactcagt atgagtcca agttcgggtg aaaccactcc 4080
 aaggcgatt cagcagctgg tctccgtgga gtcaaccgtt ggcgttccgc acgaagcccg 4140
 ctgcccttgg caaagacacg attccgtggc ttgggcatct gctcgttggg ctgagtgggtg 4200
 cgtttggttt catcatcttg gtctatctct tgatcaattg cagaaataca ggcccttggc 4260
 tgaaaaaagt gctcaagtg aataccccg acccaagcaa gttcttctcc cagctttctt 4320
 cagagcatgg aggcgatgtg cagaaatgac tctcttcacc ttttccctcc tcaagcttct 4380

 cccgggagg gctggcggc gagatttac ctcttgaggt acttgaacga gacaaggtta 4440
 cccaacttct ccttcaacag gataaggtac ccgaacctgc gagccttagc tccaaccact 4500
 ctcttacgag ctgcttcacc aatcagggat acttcttttt ccaccttccc gatgcgctgg 4560
 aaatcgaagc ttgtcaagtt tactttacct atgatccata tagcgaggaa gatcccgacg 4620
 aaggagtgc cggtgcgccc acgggttctt caccceaacc tctccagcct ctctcaggag 4680
 aagatgatgc ttattgcact tttcccagta gagacgatct cctcctcttt tctccatctc 4740
 ttttgggggg accttcccc cttctacgg cacctggcgg gtctggtgct ggcgaggagc 4800

ggatgccgcc gtccctccag gagcgagtac cacgagattg ggatccccag ccacttggac 4860
 cccccacccc cggcgtacct gaccttgtcg attttcaacc tccccctgaa ttggtgctgc 4920
 gagaggctgg ggaggaagtt ccggacgctg ggccgagggga gggcgtgtcc ttccatgga 4980
 gtaggcctcc aggtcaaggc gagtttaggg ctctcaacgc gcgctgccg ttgaatacag 5040
 acgcttatct ctactgcag gaactgcaag gtcaggacc aacacatctt gtaggatctg 5100
 gtgctactaa tttttctctt ttgaagcaag ctggagatgt tgaagagaac cctggtccag 5160
 tgagcaaggg cgaggagctg ttcaccgggg tggtgcccat cctggtcgag ctggacggcg 5220

 acgtaaacgg ccacaagttc agcgtgtccg gcgagggcga gggcgtgcc acctacggca 5280
 agctgacct gaagttcatc tgaccaccg gcaagctgcc cgtgccctgg cccacctcg 5340
 tgaccacct gacctacggc gtgcagtgtc tcagccgcta ccccgaccac atgaagcagc 5400
 acgacttctt caagtccgcc atgcccgaag gctacgtcca ggagcgcacc atcttcttca 5460
 aggacgacgg caactacaag acccgcgccg aggtgaagtt cgagggcgac accctggtga 5520
 accgcatcga gctgaagggc atcgacttca aggaggacgg caacatcctg gggcacaagc 5580
 tggagtacaa ctacaacagc cacaacgtct atatcatggc cgacaagcag aagaacggca 5640

 tcaagtgaa ctcaagatc cgccacaaca tcgaggacgg cagcgtgcag ctgcccgacc 5700
 actaccagca gaacaccccc atcggcgacg gccccgtgct gctgcccgac aaccactacc 5760
 tgagcaccca gtccgcctg agcaaaagacc ccaacgagaa gcgcgatcac atggtcctgc 5820
 tggagtctgt gaccgccgcc gggatcactc tcggcatgga cgagctgtac aagtaacta 5880
 gtgtcgacaa tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag attgactggt atcttact 5940
 atgttctcc ttttacgta tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg 6000
 cttccgctat ggctttcatt ttctctctct tgtataaatc ctggttgctg tctcttatg 6060

 aggagtgtg gcccttgtc aggcaacgtg gcgtggtgtg cactgtgttt getgacgcaa 6120
 cccccactgg ttggggcatt gccaccacct gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc 6180
 ccctccctat tgccacggcg gaactcatcg ccgctgctt tgcccctgc tggacagggg 6240
 ctggtctgtt gggcactgac aattecgtgg tgttgcggg gaagctgacg tectttccat 6300
 ggctgctcgc ctgtgttgcc acctggattc tgcgctggac gtccttctgc tacgtccctt 6360
 cggccctcaa tccagggac cttcttccc gcggcctgct gccgctctg cggcctctc 6420
 cgctcttcg ccttcgctc cagacgagtc ggatctccct ttggcggcc tccccgctg 6480

 gaattcgagc tcggtacctt taagaccaat gacttacaag gcagctgtag atcttagcca 6540
 ctttttaaaa gaaaaggggg gactggaagg gctaattcac tccaacgaa gacaagatct 6600
 gctttttgct tglactgggt ctctctggtt agaccagatc tgagcctggg agctctctgg 6660

ctaactaggg aaccactgc ttaagcctca ataaagcttg ccttgagtgc ttcaagtagt 6720
 gtgtgcccg ctgttgttg actctggtaa ctagagatcc ctgagacct tttagtcagt 6780
 gtggaaaatc tctagcagta gtagttcatg tcatcttatt attcagtatt tataacttgc 6840
 aaagaaatga atatcagaga gtgagaggaa cttgtttatt gcagcttata atggttacaa 6900

 ataaagcaat agcatcacia atttcaciaa taaagcattt ttttactgc attctagtgg 6960
 tggtttgcc aaactcaica atgtatctta tcatgtctgg ctctagctat cccgcccta 7020
 actccgcca gtccgcca ttctccgcc catggctgac taatTTTTT tatttatgca 7080
 gaggccgagg ccgctcggc ctctgagcta ttccagaagt agtgaggagg ctttttggga 7140
 ggcctaggct tttgcgtcga gacgtacca attcgcccta tagtgagtgc tattacgcgc 7200
 gctcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcgtt acccaactta 7260
 atgccttgc agcacatccc ctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgaccg 7320

 atcgcccttc ccaacagttg cgcagcctga atggcgaatg gcgcgacgcg ccctgtagcg 7380
 gcgcattaag cgcggcgggt gtggtggtta cgcgcagcgt gaccgtaca ctgcccagcg 7440
 ccctagcgc cgtctcttc gctttcttc ctctcttct cgcacagttc gccgcttcc 7500
 cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccct tagggttccg atttagtgct ttacggcacc 7560
 tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg gttcacgtag tgggcatcg ccctgataga 7620
 cggtttttcg cctttgacg ttggagteca cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa 7680
 ctggaacaac actcaacct atctcgtct attcttttga tttataaggg attttccga 7740

 tttcggccta ttggttaaaa aatgagctga tttacaaaa atttaacgcg aattttaaca 7800
 aaatattaac gtttacaatt tcccagggtg cacttttcgg ggaatgtgc gcggaacccc 7860
 tatttgttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac aataaccctg 7920
 ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagtatgagt attcaacatt tccgtgtcgc 7980
 ccttattccc tttttgcgg cttttgcct tctgttttt gctcaccag aaacgtggt 8040
 gaaagtataa gatgctgaag atcagttggg tgcacgagtg ggttacctg aactggatct 8100
 caacagcggg aagatcctg agagttttcg ccccgaagaa cgttttccaa tgatgagcac 8160

 ttttaaagtt ctgctatgtg gcgcggtatt atcccgtatt gacgccgggc aagagcaact 8220
 cggctcgcgc atacactatt ctgagaatga cttggttgag tactcaccag tcacagaaaa 8280
 gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa ccatgagtga 8340
 taactctgc gccaaacttac ttctgacaac gatcggagga ccgaaggagc taaccgcttt 8400
 ttgacacaac atgggggatc atgtaactcg ccttgatcgt tgggaaccgg agctgaatga 8460
 agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgta gcaatggcaa caacgttgcg 8520

caaactatta actggcgaac tacttactct agcttcccgg caacaattaa tagactggat 8580

 ggaggcggat aaagttgcag gaccacttct gcgctcggcc cttccggctg gctggtttat 8640
 tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgcggt atcattgcag cactggggcc 8700
 agatggttaag ccctcccgtc tcgtagttat ctacacgacg gggagtcagg caactatgga 8760
 tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt ggtaactgtc 8820
 agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgatttaaaa cttcattttt aatttaaaag 8880
 gatctagggt aagatccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac gtgagttttc 8940
 gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt 9000

 tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttgttt 9060
 gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca gagcgcagat 9120
 accaaatact gtctttctag tgtagccgta gttagccac cacttcaaga actctgtagc 9180
 accgcctaca tactcgcctc tgctaatacct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa 9240
 gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg 9300
 ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag ctgggagcga acgacctaca ccgaactgag 9360
 atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaaggagaa aggcggacag 9420

 gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa 9480
 cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt 9540
 gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg ctttttacg 9600
 gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat cccctgattc 9660
 tgtggataac cgiattaccg cctttgagtg agctgatacc gctcgcgca gccgaacgac 9720
 cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatagca aaccgcctct 9780
 ccccgcgctg tgccgattc attaatgcag ctggcacgac aggtttcccg actggaagc 9840

 gggcagtgag cgcaacgcaa ttaatgtgag ttagctcact cattaggcac cccaggcttt 9900
 acactttatg cttccgctc gtatgttggtg tggaattgtg agcggataac aatttcacac 9960
 aggaaacagc taigaccatg attacccaa gcgcgcaatt aaccctcact aaaggaaca 10020
 aaagctggag ctgca 10035

<210> 31

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<220><221> misc_feature

<223> Linker/spacer polypeptide

<400> 31

Pro Ala Ala Leu

1

<210> 32

<211> 267

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> Naked FRB domain nucleic acid sequence

<400> 32

```

gagatgtggc atgagggtct ggaagaagcg tctcgactgt actttggtga gcgcaatgtg      60
aagggcatgt ttgaagtctt cgaaccctt catgcatga tggaacgagg accccagacc      120
ttgaaggaga caagttttaa ccaagcttac ggaagagacc tgatggaagc ccaggaatgg      180
tcaggaaat acatgaaaag cgggaatgtg aaggacttga cccaagcgtg ggacctgtac      240
tatcatgtct ttaggcgcat tagtaag                                           267
    
```

<210> 33

<211> 353

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> MND promoter

<400> 33

```

gaacagagaa acaggagaat atgggcaaaa caggatatct gtgtaagca gttcctgccc      60
cggctcaggc ccaagaacag ttggaacagc agaatatggg ccaaacagga tatctgtggt      120
aagcagttcc tgccccggct caggccaag aacagatggt cccagatgc ggtccccccc      180
tcagcagttt ctagagaacc atcagatggt tccagggtgc ccaaggacc tgaatgacc      240
ctgtgcctta ttgaaactaa ccaatcagtt cgtttctcgc ttctgttcgc gcgcttctgc      300
tccccgagct ctatataagc agagctcgtt tagtgaaccg tcagatcgct agc           353
    
```

<210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> DICS HDR FP
 <400> 34
 cggcgacgtg gaagagaatc 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> DISC HDR RP
 <400> 35
 ggctgtggtt cagcctgact 20

 <210> 36
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> DISC HDR probe (FAM)
 <400> 36
 aggctctccc cgacctccc 19
 <210> 37
 <211> 2880
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> Coding sequences for 3186

(Signal-FKBP-IL2R α -P2A-signal-FRB-IL2R β -P2A-FRB-P2A-GFP-FOXP3
(knock-in)

<400

> 37

atgccactgg gactgctgtg gcttggactg gcccttcttg gagcactgca tgctcaggct 60
ggcgtgcagg tcgagacaat tagtctctggc gacggccgga cctttcctaa gcgaggacag 120
acatgcgtgg tgactacac cggcatgctg gaagatggca agaagttcga cagcagccgg 180
gacagaaaca agcctttcaa gttcatgctg ggcaagcaag aagtgatcag aggctgggaa 240
gagggcgctc cccagatgtc tgttggacag agagccaagc tgacaatcag ccccattac 300
gcctatggcg ccacaggaca ccctgggac attcctccac atgccacact ggtgttcgat 360
gtggaactgc tgaagctcgg cgaaggcagc aataccagca aagagaaccc cttcctgttc 420

gccctggaag ccgtggttat cagcgtggga tctatgggcc tgatcatctc cctgctgtgc 480
gtgtacttct ggctggaacg gaccatgcct cggatcccca cactgaagaa tctggaagat 540
ctggtcaccg agtaccacgg caatttcagc gcttggagtg gcgtgtccaa aggcctggct 600
gaaagcctgc agcctgacta ctctgagaga ctgtgcctgg tgtctgagat cctcctctaaa 660
ggcggcgctc tcggagaagg accagcgctc tctccatgca atcagcacag cccttattgg 720
gccccctctt gctacacct gaagcctgaa actggaagcg gagctactaa ctttagcctg 780
ctgaagcagg ctggagacgt ggaggagaac cctggaccta tggtctgtcc agtgacagct 840

ctgctgcttc ctctggctct gttgtgcat gccgccagac ctattctgtg gcacgagatg 900
tggcatgaag gcctggaaga ggcctccaga ctgtacttcg gcgagagaaa cgtgaagggc 960
atgttcgagg tgctggaacc cctgcatgcc atgatgaaa gaggccctca gacactgaaa 1020
gagacaagct tcaaccagcg ctacggccgg gatctgatgg aagcccaaga gtggtgccgg 1080
aagtacatga agtccggcaa tgtgaaggac ctctgcagg catgggacct gtactaccac 1140
gtgtccggc ggatctctaa gggcaaagac acaatcctt ggctgggcca tctgctcgtt 1200
ggactgtctg gcgccttcgg ctteatcctc ctggtgtacc tgctgatcaa ctgtcggaac 1260

acaggcccat ggctgaagaa agtgtgaag tgcaacaccc ctgatccgag caagtctttt 1320
agccagctgt ccagcgagca cggcggagat gttcagaagt ggctgagcag cccatttctt 1380
agcagcagct ttagccctgg cggactggct cctgagatca gccactgga agtgttgaa 1440
agggacaaag tgaccagct gctcctgcaa caggacaagg tgccagaacc tgccagcctg 1500
tctctgaaca ccgatgccta tctgtccctg caagagctgc aaggatccgg cgccaccaac 1560
tttagtctgc tcaagcaagc cggggacgtc gaggaaaatc ctgggccaga aatgtggcac 1620

gaaggactcg aggaagccag tccgctgtat ttggcgagc ggaatgtgaa agggatgttt 1680

gaagtgctcg agcctctcca cgctatgatg gaacggggac cccagactct caaagaaacc 1740

agctttaate aggcttacgg acgcgacctc atggaagctc aagaatggtg tagaaagtat 1800

atgaagagtg gcaacgtgaa agatctgctg caagcctggg atctctatta tcacgtgttc 1860

agacgcata gcaaaggcag cggcgcacaa aattttctcc tgctgaaaca ggccggcgac 1920

gtggaagaga atccccgacc tatgcctaata cctcggcctt ccaaaggcga ggaactgttt 1980

acaggcgtgg tgcccatcct ggtggaactg gacggggatg tgaacggcca caagtttagc 2040

gttagcggcg aaggcgaagg ggatgccaca tacggaaagc tgaccctgaa gttcatctgc 2100

accaccggca agctgcctgt gccttggcct aactgtgtca ccacactgac atacggcgtg 2160

cagtgttca gcagataccc cgaccatag aagcagcacg acttcttcaa gagcgccatg 2220

cctgagggct acgtgcaaga gcgaccatc ttctttaagg acgacggcaa ctacaagacc 2280

agggccgaag tgaagttcga gggcgacacc ctggtcaacc ggatcgagct gaagggcatc 2340

gacttcaaag aggacggcaa catcctgggc cacaagctcg agtacaacta caacagccac 2400

aacgtgtaca tcatggccga caagcagaaa aacggcatca aagtgaactt caagatccgg 2460

cacaacatcg aggacggctc tgtgcagctg gccgatcact accagcagaa cacaccatc 2520

ggagatggcc ctgtgctgct gcccgataac cactacctga gcacacagag cgccctgagc 2580

aaggacccca acgagaagag ggatcacatg gtgctgctgg aattcgtgac cgccgctggc 2640

atcacactcg gcatggaatg gctgtacaag atgcccaatc ctagacctgg caagcccagc 2700

gtctcttctc ttgctcttgg accttctctt ggtgcctcgc ccagctggag ggctgcacc 2760

aaagcctcag acctgctggg ggccccgggc ccagggggaa ccttccaggg ccgagatctt 2820

cgaggcgggg ccatgcctc ctcttcttcc ttgaacccca tgccaccatc gcagctgcag 2880

<210> 38

<211> 2742

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> Coding sequences for 3187

(Signal-FKBP-IL2Rg-P2A-signal-FRB-IL2Rb-P2A-FRB-P2A-HA-FOXP3

(knock-in)

<400> 38

atgccactgg gactgctgtg gcttggactg gcccttcttg gagcactgca tgctcaggct 60
 ggcgtagcagg tcgagacaat tagtctcggc gacggccgga cctttcctaa gcgaggacag 120
 acatgcgtgg tgcactacac cggcatgctg gaagatggca agaagtcca cagcagccgg 180
 gacagaaaca agcctttcaa gttcatgctg ggcaagcaag aagtatcag aggctgggaa 240
 gagggcgtcg cccagatgtc tgttggacag agagccaagc tgacaatcag ccccgattac 300

 gcctatggcg ccacaggaca ccctgggatc attcctccac atgccacact ggtgttcgat 360
 gtggaactgc tgaagctcgg cgaaggcagc aataccagca aagagaacct cttcctgttc 420
 gccctggaag ccgtggttat cagcgtggga tctatgggcc tgatcatctc cctgctgtgc 480
 gtgtacttct ggctggaacg gaccatgcct cggatcccca cactgaagaa tctggaagat 540
 ctggtcaccg agtaccacgg caatttcagc gcttggagtg gcgtgtcaa aggcctggct 600
 gaaagcctgc agcctgacta ctctgagaga ctgtgcctgg tgtctgagat cctcctaaa 660
 ggcggcgctc tcgagaagg accagcgct tctccatgca atcagcacag cccttattgg 720

 gccctcctt gctacacct gaagcctgaa actggaagcg gagctactaa ctttagcctg 780
 ctgaagcagg ctggagactg ggaggagaac cctggaccta tggtctgcc agtgacagct 840
 ctgctgcttc ctctggctct gttgtgcat gccgccagac ctattctgtg gcacagatg 900
 tggcatgaag gcctggaaga ggctccaga ctgtacttcg gcgagagaaa cgtgaagggc 960
 atgttcgagg tgctggaacc cctgcatgcc atgatgaaa gaggccctca gacactgaaa 1020
 gagacaagct tcaaccaggc ctacggccgg gatctgatgg aagccaaga gtggtgccgg 1080
 aagtacatga agtccgcaa tgtgaaggac ctctgcagg catgggacct gtactaccac 1140

 gtgttccggc ggatctctaa gggcaaagac acaatccctt ggctgggcca tctgctcgtt 1200
 ggactgtctg gcgcttcggc cttcatcctc ctggtgtacc tgctgatcaa ctgctggaac 1260
 acaggcccat ggetgaagaa agtgetgaag tgcaacacct ctgatccgag caagtctttt 1320
 agccagctgt ccagcgagca cggcggagat gttcagaagt ggctgagcag cccatttctt 1380
 agcagcagct ttagccctgg cggactggct cctgagatca gccactgga agtgetgga 1440
 agggacaaag tgacceagct gctcctgcaa caggacaagg tgccagaacc tgccagcctg 1500
 tctagcaatc acagcctgac cagctgcttt accaaccagg gctacttctt cttccatctg 1560

 cctgacgctc tggaatcga ggctgccag gtgtacttca cctacgatcc ctacagcgaa 1620
 gaggaccccg atgaagggtg tgccggtgct cctaccgaa gctctcctca acctctgcaa 1680
 cactgagcg gcgagatga cgcctactgc acattccca gcagagatga cctgctgctg 1740
 ttcagccctt ctctgctcgg cggaccttct ccaccatcta cagctccagg tggaagcgga 1800
 gccggcgagg aaagaatgcc tccaagcctg caagagcggg tgcccagaga ttgggatcct 1860

caaccactgg gcctccaac acctggcgtg ccagatctcg tggatttcca gcctcctcca 1920
gagctggtgc tgagagaagc tggcgaagaa gtgccagacg ctggccctag agagggcgtt 1980

agctttcctt ggagcagacc tcttggacag ggcgagttca gagccctgaa tgctagactg 2040
cccctgaaca ccgatgccta tctgtccctg caagagctgc aaggacaaga cccacacac 2100
ctggttggat cggcgccac caactttagt ctgctcaagc aagccgggga cgtcaggaa 2160
aatcctgggc cagaaatgtg gcacgaagga ctcgaggaag ccagtcggct gtattttggc 2220
gagcggaatg taaagggat gtttgaagtg ctcgagcctc tccacgctat gatggaacgg 2280
ggaccccaga ctctcaaaga aaccagcttt aatcagcgtt acggacgcga cctcatggaa 2340
gctcaagaat ggtgtagaaa gtatatgaag agtggcaacg tgaaagatct gctgcaagcc 2400

tgggatctct attatcacgt gttcagacgc atcagcaaag gcagcggcgc cacaaatttc 2460
tccctgctga aacaggcccg cgacgtggaa gagaatcccg gacctatgta tccatagat 2520
gtcccagatt atgcgcccaa tcttagacct ggcaagccca gcgctccttc tcttgctctt 2580
ggaccttctc ctggtgcctc gccagctgg agggctgcac ccaaagcctc agacctgctg 2640
ggggcccggg gccaggggg aaccttccag ggccgagatc ttgagggcgg ggcccatgcc 2700
tctcttctt ccttgaacc catgccacca tgcagctgc ag 2742

<210> 39

<211> 2715

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> Coding sequences for 3195

(Signal-FKBP-IL2Rg-P2A-signal-FRB-IL2Rb-P2A-FRB-P2A-FOXP3
(knock-in))

<400> 39

atgccactgg gactgctgtg gcttggactg gccttcttg gagcactgca tgctcaggct 60
ggcgtgcagg tcgagacaat tagtctctgc gacggccgga cctttcctaa gcgaggacag 120
acatgcgtgg tgcactacac cggcatgctg gaagatggca agaagtctga cagcagccgg 180
gacagaaaca agcctttcaa gttcatgctg ggcaagcaag aagtgatcag aggctgggaa 240
gagggcgtgc cccagatgtc tgttggacag agagccaagc tgacaatcag ccccgattac 300

gcctatggcg ccacaggaca ccctgggatc attcctccac atgccacact ggtgttcgat 360

gtggaactgc tgaagctcgg cgaaggcagc aataccagca aagagaaccc cttcctgttc 420
gccctggaag ccgtggttat cagcgtggga tctatgggcc tgatcatctc cctgctgtgc 480
gtgtacttct ggctggaacg gaccatgcct cggatcccca cactgaagaa tctggaagat 540
ctggtcaccg agtaccacgg caatttcagc gcttggagtg gcgtgtccaa aggcctggct 600
gaaagcctgc agcctgacta ctctgagaga ctgtgcctgg tgtctgagat ccctcctaaa 660
ggcggcgctc tcggagaagg accaggcgct tctccatgca atcagcacag cccttattgg 720

gcccctcctt gctacacct gaagcctgaa actggaagcg gagctactaa ctttagcctg 780
ctgaagcagg ctggagacgt ggaggagaac cctggaccta tggctctgcc agtgacagct 840
ctgctgcttc ctctggctct gttgctgcat gccgccagac ctattctgtg gcacgagatg 900
tggcatgaag gcctggaaga ggcctccaga ctgtacttcg gcgagagaaa cgtgaagggc 960
atgttcgagg tgcctggaacc cctgcatgcc atgatggaaa gaggcctca gacactgaaa 1020
gagacaagct tcaaccaggc ctacggccgg gatctgatgg aagccaaga gtggtgccgg 1080
aagtacatga agtccggcaa tgtgaaggac ctctgcagg catgggacct gtactaccac 1140

gtgttcgggc ggatctctaa gggcaaagac acaatcctt ggctgggcca tetgctcgtt 1200
ggactgtctg gcgccttcgg cttcatcatc ctggtgtacc tgctgatcaa ctgtcggaac 1260
acaggcccat ggctgaagaa agtgcctgag tgcaacaccc ctgatccgag caagtctttt 1320
agccagctgt ccagcgagca cggcgggagat gttcagaagt ggctgagcag cccatttctt 1380
agcagcagct ttagccctgg cggactggct cctgagatca gcccactgga agtgctggaa 1440
agggacaaag tgaccagct gctcctgcaa caggacaagg tgccagaacc tgccagcctg 1500
tctagcaatc acagcctgac cagctgcttt accaaccagg gctacttctt cttccatctg 1560

cctgacgctc tggaatcga ggcctgccag gtgtacttca cctacgatcc ctacagcgaa 1620
gaggaccccg atgaaggtgt tgccggtgct cctaccggaa gctctcctca acctctgcaa 1680
ccactgagcg gcgaggatga cgcctactgc acattccca gcagagatga cctgctgctg 1740
ttcagccctt ctctgctcgg cggaccttct ccaccatcta cagctccagg tggaagcggg 1800
gccggcgagg aaagaatgcc tccaagcctg caagagcggg tgcccagaga ttgggatcct 1860
caaccactgg gcctccaac acctggcgtg ccagatctcg tggatttcca gcctcctcca 1920
gagctggtgc tgagagaagc tggcgaagaa gtgccagacg ctggccttag agagggcgtt 1980

agctttcctt ggagcagacc tcctggacag ggcgagtca gagccctgaa tgctagactg 2040
ccctgaaca ccgatgccta tctgtccctg caagagctgc aaggacaaga cccacacac 2100
ctggttggat ccggcggccac caactttagt ctgctcaagc aagccgggga cgtcgaggaa 2160
aatcctgggc cagaaatgtg gcacgaagga ctcgaggaag ccagctcgct gtattttggc 2220

gagcggaatg tgaagggat gtttgaagtg ctcgagcctc tccacgctat gatggaacgg 2280
 ggaccccaga ctctcaaaga aaccagcttt aatcaggctt acggacgcga cctcatggaa 2340
 gctcaagaat ggtgtagaaa gtatatgaag agtggcaacg tgaagatct gctgcaagcc 2400

tgggatctct attatcacgt gttcagacgc atcagcaaag gcagcggcgc cacaaatttc 2460
 tccttctga aacaggccgg cgacgtggaa gagaatcccg gacctatgcc caatcctaga 2520
 cctggcaage ccagcgtcc ttctettgct cttggacctt ctctgggtgc ctgcccagc 2580
 tggaggctg cacccaaagc ctgagacctg ctgggggccc ggggcccagg gggaaccttc 2640
 cagggccgag atcttcgagg cggggcccat gcctctctt cttccttgaa ccccatgcca 2700
 ccatcgacg tgcag 2715

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> T1 spacer targeting human FOXP3

<400> 40

ttccagggcc gagatcttcg 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> T3 spacer targeting human FOXP3

<400> 41

gcctcgaag atctcgccc 20

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature
 <223> T4 spacer targeting human FOXP3
 <400> 42
 tcgaagatct cggccctgga 20
 <210> 43
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> T7 spacer targeting human FOXP3
 <400> 43
 ggccctgga ggttcccct 20
 <210> 44
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> T9 spacer targeting human FOXP3
 <400> 44
 tccagctggg cgaggctcct 20
 <210> 45
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> T18 spacer targeting human FOXP3
 <400> 45
 tcagacctgc tgggggcccg 20
 <210> 46
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> R1 spacer targeting human FOXP3

<400> 46

gagccccgcc tgaagatct 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> P1 spacer targeting human AAVS1

<400> 47

attcccaggg ccggttaatg 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> P3 spacer targeting human AAVS1

<400> 48

gtcccctcca ccccacagtg 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> P4 spacer targeting human AAVS1

<400> 49

accccacagt ggggccacta 20

<210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> N1 spacer targeting human AAVS1
 <400> 50
 cctctaaggt ttgcttacga 20
 <210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> N2 spacer targeting human AAVS1
 <400> 51
 tataaggtgg tcccagctcg 20
 <210> 52
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> N3 spacer targeting human AAVS1
 <400> 52
 ccatcgtaag caaaccttag 20
 <210> 53
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature

<223> mT20 spacer target murine FOXP3
 <400> 53
 gactcctggg gatgggccaa 20
 <210> 54
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> mT22 spacer target murine FOXP3
 <400> 54
 ttggcccttg gcccatcccc 20
 <210> 55
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> mT23 spacer target murine FOXP3
 <400> 55
 ccagcttggc aagactcctg 20
 <210> 56
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial sequence

 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> human TRAC spacer sequence G2
 <400> 56
 acaaaactgt gctagacatg 20
 <210> 57
 <211> 18
 <212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> human TRAC spacer sequence G4

<400> 57

tcaagagcaa cagtgctg

18

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> spacer sequence

<400> 58

ccgatgccca accccaggcc

20