



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0090337
(43) 공개일자 2023년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 39/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) C12N 15/86 (2006.01)
C12N 5/0783 (2010.01) C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/113 (2013.01)
A61K 39/4631 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2023-7016342
(22) 출원일자(국제) 2021년10월18일
심사청구일자 2023년06월08일
(85) 번역문제출일자 2023년05월15일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/055394
(87) 국제공개번호 WO 2022/086846
국제공개일자 2022년04월28일
(30) 우선권주장
63/093,459 2020년10월19일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
카리부 바이오사이언시스 인코포레이티드
미국 94710 캘리포니아주 버클리 7번 스트리트
2929 스위트 105
(72) 발명자
도노후에, 폴, 대니얼
미국 94710 캘리포니아주 버클리 세븐쓰 스트리트
2929 스위트 105
(74) 대리인
한상욱, 이순복

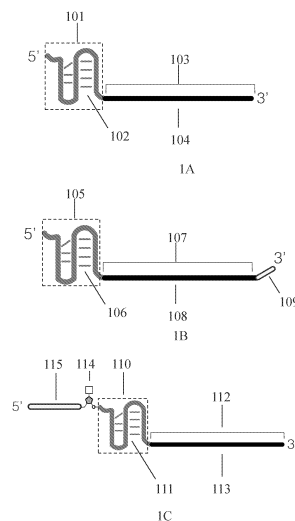
전체 청구항 수 : 총 43 항

(54) 발명의 명칭 CRISPR 유형 V 시스템을 위한 DNA-함유 폴리뉴클레오타이드 및 가이드, 및 그의 제조 및 사용 방법

(57) 요약

본 개시내용은 유형 V CRISPR 시스템에서 사용하기 위한 가이드를 제공하며, 여기서 이러한 가이드는 리보뉴클레오타이드 염기 및 적어도 하나의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 함유한다. 적어도 하나의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 함유하는 CRISPR Cas12 가이드 뿐만 아니라 유형 V CRISPR-Cas12 단백질과 이러한 가이드의 핵단백질 복합체가 또한 기재된다. 또한 데옥시리보뉴클레오타이드-함유 폴리뉴클레오타이드 및 가이드를 제조하고 사용하는 방법과, 핵단백질 복합체를 제조하고 사용하는 방법이 개시되어 있다. 또한 CAR-발현 세포를 생산하기 위해 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용하여 세포를 조작하는 방법; 및 입양 세포 요법에서의 이러한 CAR-발현 세포의 용도가 개시되어 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/464417 (2023.05)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/7051 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 5/0636 (2023.05)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2510/00 (2013.01)

(30) 우선권주장

63/127,648 2020년12월18일 미국(US)
 63/229,870 2021년08월05일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

하기를 포함하는, CRISPR 가이드 분자:

표적 핵산 서열과 결합할 수 있는 표적화 영역 및

리보뉴클레오타이드 대신 적어도 하나의 데옥시리보뉴클레오타이드를 포함한 RNA 서열 UAAUUUCUACUCUUGUAGAU를 포함하는 활성화 영역으로서, Cas12 단백질과 핵단백질 복합체를 형성할 수 있는 활성화 영역.

청구항 2

제1항에 있어서, 활성화 영역 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18 및 19 중 하나 이상이 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 3

제1항에 있어서, 활성화 영역 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18 및 19 중 10개 이하가 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 4

제1항에 있어서, 이노신, 데옥시-이노신, 데옥시-우라실, 크산토신, C3 스페이서, 5-메틸 dC, 5-히드록시부틸-2'-데옥시우리딘, 5-니트로인돌, 5-메틸 이소데옥시시토신, 이소 데옥시구아노신, 데옥시우리딘, 이소-데옥시시티딘, 및 무염기 부위를 포함한 염기 변형, 및 포스포로티오에이트 변형을 포함한 백본 변형으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화학적 변형을 포함하는 CRISPR 가이드 분자.

청구항 5

제1항에 있어서, 표적화 영역이 B2M 유전자를 표적으로 하고 RNA 서열 AGUGGGGGUGAAUUCAGUGU를 포함하며, 여기서 임의로, 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 염기 유사체 또는 무염기 부위로 대체되는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 6

제5항에 있어서, 표적화 영역 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 하나 이상이 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 7

제5항에 있어서, 표적화 영역 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 5개 이하가 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 8

제5항에 있어서, 표적화 영역이 서열식별번호: 51-133으로부터 선택된 서열과 혼성화할 수 있는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 9

제5항에 있어서, 서열식별번호: 212-231, 275-315, 및 331-350으로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR 가이드 분자.

청구항 10

제5항에 있어서, 서열식별번호: 416의 서열을 포함하는 CRISPR 가이드 분자.

청구항 11

제1항에 있어서, 표적화 영역이 TRAC 유전자를 표적으로 하고 RNA 서열 GAGUCUCUCAGCUGGUACAC를 포함하며, 여기서 임의로, 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 염기 유사체 또는 무염기 부위로 대체되는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 12

제11항에 있어서, 표적화 영역 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 하나 이상이 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 13

제11항에 있어서, 표적화 영역 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 5개 이하가 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 14

제11항에 있어서, 표적화 영역이 서열식별번호: 15-20으로부터 선택된 서열과 혼성화할 수 있는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 15

제11항에 있어서, 서열식별번호: 233-252, 317-329, 491-492, 및 508로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR 가이드 분자.

청구항 16

제11항에 있어서, 화학적 변형을 추가로 포함하며, 여기서 CRISPR 가이드 분자는 서열식별번호: 512-517로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 17

제11항에 있어서, 서열식별번호: 415의 서열을 포함하는 CRISPR 가이드 분자.

청구항 18

제1항에 있어서, 표적화 영역이 CISH 유전자를 표적으로 하고 서열식별번호: 157-165로부터 선택된 서열과 혼성화할 수 있는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 19

제18항에 있어서, 서열식별번호: 509, 및 519-529로부터 선택된 서열을 포함하는 CRISPR 가이드 분자.

청구항 20

제1항에 있어서, 표적화 영역이 PDCD1 유전자를 표적으로 하고 서열식별번호: 135-155로부터 선택된 서열과 혼성화할 수 있는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 21

제1항에 있어서, 표적화 영역이 CBLB 유전자를 표적으로 하고 서열식별번호: 167-189로부터 선택된 서열과 혼성화할 수 있는 것인 CRISPR 가이드 분자.

청구항 22

제21항에 있어서, 서열식별번호: 510의 서열을 포함하는 CRISPR 가이드 분자.

청구항 23

제1항의 CRISPR 가이드 분자 및 Cas12 단백질을 포함하는, CRISPR 핵산/단백질 조성물.

청구항 24

제23항에 있어서, Cas12 단백질이 C-말단에, 서열식별번호: 479-490으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 링커- 및 핵 국제화 신호 (NLS)-함유 서열을 포함하는 Cas12a 단백질인 CRISPR 핵산/단백질 조성물.

청구항 25

제1항의 CRISPR 핵산/단백질 조성물을 포함하는 세포로서, 여기서 세포는 림프구, 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포, T 세포 수용체 (TCR) 세포, TCR-조작된 CAR-T 세포, 종양 침윤 림프구 (TIL), CAR TIL, 수지상 세포 (DC), CAR-DC, 대식세포, CAR-대식세포 (CAR-M), 자연 살해 (NK) 세포, 유도 다능성 줄기 세포 (iPSC), iPSC 세포로부터 분화된 세포, 또는 CAR-NK 세포인 세포.

청구항 26

하기 단계를 포함하는, 키메라 항원 수용체 (CAR)-발현 세포를 생산하는 방법:

- 세포 내의 TRAC 서열을 포함하는 제1 표적 핵산을, 촉매적으로 활성인 Cas12 단백질 및 제1 표적 핵산 서열과 결합할 수 있는 표적화 영역; 및 Cas12 단백질과 핵단백질 복합체를 형성할 수 있는 활성화 영역을 갖는 제1 CRISPR 가이드 분자를 포함하는 핵단백질 복합체와 접촉시키며, 여기서 상기 CRISPR 가이드 분자는 활성화 영역, 표적화 영역 또는 이들 둘 다에 리보뉴클레오타이드 염기 및 적어도 하나의 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하고, 핵단백질 복합체는 제1 표적 핵산 서열을 절단할 수 있는 것인 단계;
- 동일한 세포 내의 B2M 서열을 포함하는 제2 표적 핵산 서열을, 촉매적으로 활성인 Cas12 단백질 및 제2 표적 핵산 서열과 결합할 수 있는 표적화 영역; 및 Cas12 단백질과 핵단백질 복합체를 형성할 수 있는 활성화 영역을 갖는 제2 CRISPR 가이드 분자를 포함하는 핵단백질 복합체와 접촉시키며, 여기서 상기 CRISPR 가이드 분자는 활성화 영역, 표적화 영역 또는 이들 둘 다에 리보뉴클레오타이드 염기 및 적어도 하나의 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하고, 핵단백질 복합체는 제2 표적 핵산 서열을 절단할 수 있는 것인 단계;
- scFv, 막횡단 도메인, 공동-자극 도메인, 및 활성화 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 제1 공여자 폴리뉴클레오타이드를 제공하며, 여기서 CAR은 제1 표적 핵산 서열 내의 절단 부위에 삽입될 수 있는 것인 단계;
- B2M 분비 신호, HLA-G 펩티드 신호 서열, 제1 링커 서열, B2M 서열, 제2 링커 서열, 및 HLA-E 서열을 포함하는 B2M-HLA-E 융합 구축물을 코딩하는 제2 공여자 폴리뉴클레오타이드를 제공하며, 여기서 B2M-HLA-E 융합 구축물은 제2 표적 핵산 서열 내의 절단 부위에 삽입될 수 있는 것인 단계;
- 제1 표적 핵산 서열을 절단하고 제1 공여자 폴리뉴클레오타이드의 적어도 일부분을 절단 부위에 삽입하는 단계; 및
- 제2 표적 핵산 서열을 절단하고 제2 공여자 폴리뉴클레오타이드의 적어도 일부분을 절단 부위에 삽입하는 단계.

청구항 27

제26항에 있어서, 제2 공여자 폴리뉴클레오타이드가 B2M-HLA-E 융합 구축물의 5'-단부에 P2A 서열을 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 제1 공여자 폴리뉴클레오타이드가 서열식별번호: 413을 포함하는 것인 방법.

청구항 29

제26항에 있어서, 제2 공여자 폴리뉴클레오타이드가 서열식별번호: 414를 포함하는 것인 방법.

청구항 30

제26항에 있어서, CAR 내의 scFv가 CD37, CD38, CD47, CD73, CD4, CS1, PD-L1, NGFR, ENPP3, PSCA, CD79B, TACI, VEGFR2, B7-H3, B7-H6, B-세포 성숙 항원 (BCMA), CD123, CD138, CD171/L1CAM, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD70, CD371, CEA, 클라우딘 18.1, 클라우딘 18.2, CSPG4, EFGvIII, EpCAM, EphA2, 표피 성장 인

자 수용체, ErbB, ErbB2 (HER2), FAP, FR α , GD2, GD3, 글리피칸 3, IL-11R α , IL-13R α 2, IL13 수용체 알파, 루이스Y/LeY, 메소텔린, MUC1, MUC16, NKG2D 리간드, PD1, PSMA, ROR-1, SLAMF7, TAG72, ULBP 및 MICA/B 단백질, VEGF2 및 WT1로 이루어진 군으로부터 선택된 세포 표적과 결합할 수 있는 것인 방법.

청구항 31

제26항에 있어서, scFv가 BCMA와 결합할 수 있고, 서열식별번호: 474의 아미노산 서열을 포함하는 제1 가변 영역, 서열식별번호: 475의 아미노산 서열을 포함하는 제2 가변 영역, 및 서열식별번호: 476의 아미노산 서열을 포함하는 제1 가변 영역과 제2 가변 영역 사이의 링커를 포함하는 것인 방법.

청구항 32

제26항에 있어서, scFv가 서열식별번호: 477의 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제26항에 있어서, CAR의 막횡단 도메인이 T 세포 수용체 α 채, T 세포 수용체 β 채, CD3 ζ 채, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, 또는 GITR로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 34

제26항에 있어서, CAR의 공동-자극 도메인이 CD28, 4-1BB, GITR, ICOS-1, CD27, OX-40 또는 DAP10으로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 35

제26항에 있어서, CAR이 CD8로부터 유래된 막횡단 도메인, 4-1BB 공동-자극 도메인, 및 CD3 ζ 활성화 도메인을 포함하는 것인 방법.

청구항 36

제26항에 있어서, CAR 서열을 함유하는 벡터가 서열식별번호: 478의 핵산 서열을 갖는 리더 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 37

제26항에 있어서, 촉매적으로 활성인 Cas12 단백질이 C-말단에, 서열식별번호: 479-490으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 링커 및 핵 국제화 신호 (NLS)-함유 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 38

제26항에 있어서, 하기 단계를 추가로 포함하며:

- 동일한 세포 내의 제3 표적 핵산 서열을, 촉매적으로 활성인 Cas12 단백질 및 제3 표적 핵산 서열과 결합할 수 있는 표적화 영역; 및 Cas12 단백질과 핵단백질 복합체를 형성할 수 있는 활성화 영역을 갖는 제3 CRISPR 가이드 분자를 포함하는 핵단백질 복합체와 접촉시키며, 여기서 상기 CRISPR 가이드 분자는 활성화 영역, 표적화 영역 또는 이들 둘 다에 리보뉴클레오티드 염기 및 적어도 하나의 데옥시리보뉴클레오티드 염기를 포함하고, 핵단백질 복합체는 제3 표적 핵산 서열을 절단할 수 있는 것인 단계;
- 제3 표적 핵산 서열을 절단하고 절단 부위에서 제3 표적 핵산 서열로부터 하나 이상의 뉴클레오티드를 결실시키는 단계,

여기서 제3 표적 핵산 서열은 PDCD 유전자, CISH 유전자 및 CBLB 유전자로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 39

제26항에 있어서, CAR-발현 세포가 T-림프구로부터 생산된 동종이계 또는 자가 CAR-T 세포인 방법.

청구항 40

제26항의 방법에 의해 생산된 CAR-발현 세포로서, 여기서 세포는 림프구, CAR-T 세포, TCR 세포, TCR-조작된 CAR-T 세포, TIL, CAR TIL, 수지상 세포, CAR-DC, 대식세포, CAR-M, iPSC 세포, iPSC 세포로부터 분화된 세포, NK 세포 또는 CAR-NK 세포로부터 선택되는 것인 CAR-발현 세포.

청구항 41

입양 세포 요법의 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 제40항의 CAR-발현 세포를 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 입양 세포 요법이 BCMA-양성 암 세포를 사멸시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, BCMA-양성 암 세포가 다발성 골수종 암 세포를 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2021년 8월 5일에 출원된 미국 가출원 번호 63/229,870, 2020년 12월 18일에 출원된 미국 가출원 번호 63/127,648, 및 2020년 10월 19일에 출원된 미국 가출원 번호 63/093,459를 우선권 주장하며, 이들 모두는 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 연방 정부의 지원을 받는 연구 또는 개발에 관한 설명서

[0004] 적용 가능하지 않음.

[0005] 서열 목록

[0006] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자적으로 제출되었고 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2021년 10월 15일에 생성된, 상기 ASCII 카피는 CBI039.30_ST25.txt로 명명되고 그 크기가 165 킬로바이트이다.

[0007] 기술 분야

[0008] 본 개시내용은 일반적으로 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부 (CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 시스템에 관한 것이다. 특히, 본 개시내용은 CRISPR-Cas12 시스템에서 사용하기 위한 CRISPR 폴리뉴클레오타이드 및 가이드에 관한 것이며, 여기서 CRISPR 폴리뉴클레오타이드 및 Cas12 가이드는 리보뉴클레오타이드 염기 및 하나 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하도록 설계된다. 본 개시내용은 추가로, 설계된 CRISPR Cas12 가이드 및 CRISPR-Cas12 단백질을 포함하는 Cas12 가이드/핵단백질 복합체, 및 이러한 Cas12 가이드/핵단백질 복합체를 사용하는 변형된 세포의 생산에 관한 것이다. 본 개시내용은 추가로 CRISPR 폴리뉴클레오타이드, Cas12 가이드 및 Cas12 가이드/핵단백질 복합체를 함유하는 조성물, 및 이를 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다. 더 나아가, 본 개시내용은, 예를 들어, 암 치료를 위한 키메라 항원 수용체 (CAR)-발현 세포의 생성에 있어서, 본 개시내용의 Cas12 가이드/핵단백질 복합체를 사용하여 변형된 세포의 생산 및 치료적 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0009] 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부 (CRISPR) 및 CRISPR-연합 (Cas) 단백질 시스템은 많은 원핵생물 (박테리아 및 고세균)의 게놈에서 발견된다. 이러한 시스템은 원핵생물에서 외부 침입자 (예를 들어, 바이러스, 박테리오파지)에 대항한 적응 면역을 제공한다. 이러한 방식으로, CRISPR 시스템은 외부 침입자로부터 원핵생물을 방어하는데 도움이 되는 일종의 면역 시스템으로서 기능한다. 예를 들어, 문헌 [Barrangou et al. (Science, 2007, 315:1709-1712); Makarova et al. (Nature Reviews Microbiology, 2011, 9:467-477);

Garneau et al. (*Nature*, 2010, 468:67-71); Sapranaukas et al. (*Nucleic Acids Research*, 2011, 39:9275-9282); Koonin et al. (*Curr. Opin. Microbiol.*, 2017, 37:67-78); Shmakov et al. (*Nat. Rev. Microbiol.*, 2017, 15(3):169-182); Makarova et al. (*Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, 18:67-83)]을 참조한다.

[0010] CRISPR-Cas 면역 체계에는 (1) 획득, (2) 발현 및 (3) 간섭의 3가지 주요 단계가 있다. 획득은 침입 바이러스 및 플라스미드의 게놈을 절단하고 게놈 DNA의 세그먼트 (프로토스페이서라고 함)를 숙주 유기체의 CRISPR 로커스에 통합하는 것을 수반한다. 숙주 게놈에 통합되는 세그먼트는 스페이서로서 공지되어 있으며, 동일한 (또는 충분히 관련된) 바이러스 또는 플라스미드에 의한 후속 공격으로부터의 보호를 매개한다. 발현은 각각 단일 스페이서 서열을 함유하는 짧은 성숙한 CRISPR RNA를 생산하기 위한 CRISPR 로커스의 전사 및 후속 효소적 프로세싱을 수반한다. 간섭은 CRISPR RNA가 Cas 단백질과 연합하여 이펙터 복합체를 형성한 후에 유도되며, 이는 이어서 외래 유전 요소 내의 상보적 프로토스페이서를 표적으로 하여 핵산 분해를 유도한다.

[0011] 천연 숙주 내의 다양한 CRISPR-Cas 시스템은 DNA 표적화 (클래스 1 유형 I; 클래스 2 유형 II 및 V), RNA 표적화 (클래스 2 유형 VI), 및 공동 DNA 및 RNA 표적화 (클래스 1 유형 III)가 가능하다. 예를 들어, 문헌 [Makarova et al. (*Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, 13:722-736); Shmakov et al. (*Nat. Rev. Microbiol.*, 2017, 15:169-182); Abudayyeh et al. (*Science*, 2016, 353:1-17); and Makarova et al. (*The CRISPR Journal*, 2018, 1:325-336)]을 참조한다.

[0012] 유형 V 시스템은, 예를 들어, V-A, V-B, V-C, V-D, V-E, V-F, V-G, V-H, V-I, V-J, V-K 및 V-U를 포함한 여러 상이한 하위유형으로 분류된다. 예를 들어, 문헌 [Makarova et al. (*Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, 18:67-83) and Pausch et al. (*Science*, 2020, 369(6501):333-337)]을 참조한다. V-A 하위유형은 Cas12a 단백질 (이전에는 Cpf1로서 공지됨)을 코딩한다. Cas12a는 Cas9의 각각의 도메인과 상동인 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인을 가지고 있지만, Cas9 단백질에 존재하는 HNH 뉴클레아제 도메인이 결여된다.

[0013] 유형 V 시스템은 파르쿠박테리아 박테리움(*Parcubacteria bacterium*) GWC2011_GWC2_44_17 (PbCpf1), 라크노스피라세아에 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium*) MC2017 (Lb3 Cpf1), 부티리비브리오 프로테오클라스티쿠스(*Butyrivibrio proteoclasticus*) (BpCpf1), 페레그리니박테리아 박테리움(*Peregrinibacteria bacterium*) GW2011_GWA_33_10 (PeCpf1), 아시아미노코쿠스 종(*Acidaminococcus sp.*) BV3L6 (AsCpf1), 포르피로모나스 마카카에(*Porphyromonas macacae*) (PmCpf1), 라크노스피라세아에 박테리움 ND2006 (LbCpf1), 포르피로모나스 크레비오리카니스(*Porphyromonas crevioricanis*) (PcCpf1), 프레보텔라 디시엔스(*Prevotella disiens*) (PdCpf1), 모락셀라 보보쿨리(*Moraxella bovoculi*) 237 (MbCpf1), 스미텔라 종(*Smithella sp.*) SC_K08D17 (SsCpf1), 랩토스피라 이나다이(*Leptospira inadai*) (LiCpf1), 라크노스피라세아에 박테리움 MA2020 (Lb2Cpf1), 프란시스셀라 노비시다(*Franciscella novicida*) U112 (FnCpf1), 칸디다투스 메타노플라스마 테르미툼(*Candidatus methanoplasma termitum*) (CMTcPpf1), 및 유박테리움 엘리겐스(*Eubacterium eligens*) (EeCpf1)를 포함한 여러 박테리아에서 확인되었다.

[0014] CRISPR-Cas 시스템은 특이적 핵산 서열을 결실, 삽입, 돌연변이 또는 치환함으로써 부위-지정 게놈 편집을 위한 강력한 도구를 제공한다. 변경은 유전자- 또는 위치-특이적일 수 있다. 게놈 편집은 부위-지정 뉴클레아제, 예컨대 Cas 단백질 및 그의 동족 폴리뉴클레오티드를 사용하여 표적 핵산을 커팅함으로써 변경을 위한 부위를 생성할 수 있다. 특정 경우에, 절단은 표적 DNA 서열 내에 이중-가닥 파손부 (DSB)를 도입할 수 있다. DSB는, 예를 들어, 비상동 단부 연결 (NHEJ), 미세 상동성-매개 단부 연결 (MMEJ), 또는 상동성-지향 복구 (HDR)에 의해 복구될 수 있다. HDR은 복구를 위한 템플릿의 존재에 의존한다. 이러한 게놈 편집의 일부 예에서, 공여자 폴리뉴클레오티드 또는 그의 일부분이 파손부에 삽입될 수 있다.

발명의 내용

[0015] 본 개시내용은 유형 V CRISPR-Cas 시스템에서 사용하기 위한 새로운 폴리뉴클레오티드 및 가이드의 발견에 기초하며, 이러한 폴리뉴클레오티드 및 가이드는 리보뉴클레오티드 염기 및 하나 이상의 데옥시리보뉴클레오티드 염기를 포함한다. 개시된 가이드는 유형 V CRISPR-Cas 단백질, 예컨대 Cas12a와 복합체 형성될 때, 강력한 온-표적 편집 및 감소된 오프-표적 게놈 편집이 가능하다.

[0016] 이러한 게놈 편집 프로세스는 치료적 적용에 유용한 유전적으로 변형된 세포를 생성하는데 특히 유용하다. 예를 들어, 이러한 게놈 편집 프로세스를 통해, 면역 세포 (예컨대 T 세포)가 CAR을 발현하도록 유전적으로 변형될 수 있다. 이러한 CAR-발현 세포는, 예를 들어, 입양 면역요법에서 유용하며, 여기서 CAR-발현 면역 세포, 예컨대 T-세포 (CAR-T 세포)는 CAR에 의해 인식된 표적 항원 (예를 들어, 외래 항원 또는 암-연관 항원)을 발현

하는 세포를 표적으로 하기 위해 환자에게 주입될 수 있다.

- [0017] 본 개시내용의 비-제한적 실시양태는 하기와 같은 것을 포함한다.
- [0018] [1] 표적 핵산 서열과 결합할 수 있는 표적화 영역; 및 Cas12 단백질과 핵단백질 복합체를 형성할 수 있는 활성화 영역을 포함하는 CRISPR 가이드 분자로서, 여기서 상기 CRISPR 가이드 분자는 리보뉴클레오타이드 염기 및 적어도 하나의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인 CRISPR 가이드 분자.
- [0019] [2] CRISPR 가이드 분자가 활성화 영역, 표적화 영역, 또는 둘 다에 적어도 하나의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [1]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0020] [3] CRISPR 가이드 분자가 이노신, 데옥시-이노신, 데옥시-우라실, 크산토신, C3 스페이서, 5-메틸 dC, 5-히드록시부틸-2'-데옥시우리딘, 5-니트로인돌, 5-메틸 이소-데옥시시토신, 이소 데옥시구아노신, 데옥시우리딘 및 이소 데옥시시티딘으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 염기 유사체를 추가로 포함하는 것인, [1]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0021] [4] CRISPR 가이드 분자가 하나 이상의 무염기 부위를 추가로 포함하는 것인, [1]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0022] [5] CRISPR 가이드 분자가 RNA 서열 UAAUUUCUACUCUUGUAGUAGUCUCUCAGCUGGUACAC를 포함하는 CRISPR 가이드 분자 - 여기서 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 상응하는 데옥시리보뉴클레오타이드 염기로 대체되고, 임의로, 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 염기 유사체 또는 무염기 부위로 대체됨 - ; 및 RNA 서열 UAAUUUCUACUCUUGUAGUAGUGGGGUGAAUUCAGUGU를 포함하는 CRISPR 가이드 분자 - 여기서 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 상응하는 데옥시리보뉴클레오타이드 염기로 대체되고, 임의로, 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 염기 유사체 또는 무염기 부위로 대체됨 -로부터 선택되는 것인, [1]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0023] [6] CRISPR 가이드 분자 내의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기의 양이 CRISPR 가이드 분자의 전체 크기의 백분율로서 50% 이하인, [5]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0024] [7] CRISPR 가이드 분자 내의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기의 양이 가이드 분자의 전체 크기의 백분율로서 25% 이하인, [6]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0025] [8] 표적화 영역 내의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기의 양이 표적화 영역의 전체 크기의 백분율로서 25% 이하인, [5]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0026] [9] 표적화 영역 내의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기의 양이 표적화 영역의 전체 크기의 백분율로서 5% 이하인, [8]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0027] [10] 활성화 영역 내의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기의 양이 활성화 영역의 전체 크기의 백분율로서 50% 이하인, [5]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0028] [11] 활성화 영역 내의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기의 양이 활성화 영역의 전체 크기의 백분율로서 25% 이하인, [10]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0029] [12] CRISPR 가이드 분자가, 표적 핵산 서열과 결합하고 Cas12 단백질과 핵단백질 복합체를 형성할 수 있는 RNA-단독 CRISPR 가이드 분자와 비교 시 감소된 오프-표적 활성을 갖는 것인, [5]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0030] [13] 서열 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40 중 하나 이상이 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [5]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0031] [14] 서열 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40 중 15개 이하가 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [13]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0032] [15] 서열 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40 중 12개 이하가 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [14]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0033] [16] CRISPR 가이드 분자가 RNA 서열 UAAUUUCUACUCUUGUAGAU를 포함하는 활성화 영역을 함유하며, 여기서 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 상응하는 데옥시리보뉴클레오타이드 염기로 대체되고, 임의로, 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 염기 유사체 또는 무염기 부위로 대체되는 것인, [2]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0034] [17] 서열 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 및 19 중 하나 이상이 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [16]의 CRISPR 가이드 분자.

- [0035] [18] 서열 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 및 19 중 10개 이하가 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [17]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0036] [19] 서열 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 및 19 중 8개 이하가 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [18]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0037] [20] CRISPR 가이드 분자가 RNA 서열 GAGUCUCACAGCUGGUACAC를 포함하는 표적화 영역을 함유하며, 여기서 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 상응하는 테옥시리보뉴클레오타이드 염기로 대체되고, 임의로, 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 염기 유사체 또는 무염기 부위로 대체되는 것인, [2]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0038] [21] 서열 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 하나 이상이 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [20]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0039] [22] 서열 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 5개 이하가 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [21]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0040] [23] 서열 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 3개 이하가 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [22]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0041] [24] CRISPR 가이드 분자가 RNA 서열 AGUGGGGUGAAUUCAGUGU를 포함하는 표적화 영역을 함유하며, 여기서 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 상응하는 테옥시리보뉴클레오타이드 염기로 대체되고, 임의로, 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 염기 유사체 또는 무염기 부위로 대체되는 것인, [2]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0042] [25] 서열 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 하나 이상이 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [24]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0043] [26] 서열 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 5개 이하가 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [25]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0044] [27] 서열 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 3개 이하가 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [26]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0045] [28] CRISPR 가이드 분자가 서열 TAAUUUCUACUCUTGUAGAUAGAGUCUCACGUGGUACAC를 포함하며, 여기서 서열 내의 위치 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 및 39는 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하고, 서열 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19, 21, 31, 및 40은 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [5]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0046] [29] CRISPR 가이드 분자가 서열 TAAUUUCUACUCUTGUAGAUAGUGGGGUGAAUUCAGUGT를 포함하며, 여기서 서열 내의 위치 2, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 16, 17, 18, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 및 39는 리보뉴클레오타이드 염기를 포함하고, 서열 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19, 21, 31, 및 40은 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [5]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0047] [30] 활성화 영역이 20개 염기 길이이고, 20개-뉴클레오타이드 활성화 영역 서열 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 및 19 중 하나 이상이 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [2]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0048] [31] 서열 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 및 19 중 10개 이하가 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [30]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0049] [32] 서열 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 및 19 중 8개 이하가 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [31]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0050] [33] 표적화 영역이 20개 염기 길이이고, 20개-뉴클레오타이드 표적화 영역 서열 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 하나 이상이 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [2]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0051] [34] 서열 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 5개 이하가 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [33]의 CRISPR 가이드 분자.
- [0052] [35] 서열 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 3개 이하가 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하는 것인, [34]의 CRISPR 가이드 분자.

티드 염기를 포함하는 것인, [34]의 CRISPR 가이드 분자.

- [0053] [36] [1]-[35] 중 어느 하나의 CRISPR 가이드 분자; 및 Cas12 단백질을 포함하는, CRISPR 핵산/단백질 조성물.
- [0054] [37] CRISPR 가이드 분자가 Cas12 단백질과 복합체를 이루는 것인, [36]의 CRISPR 핵산/단백질 조성물.
- [0055] [38] Cas12 단백질이 Cas12a 단백질인, [36]의 CRISPR 핵산/단백질 조성물.
- [0056] [39] Cas12 단백질이 C-말단에, 서열식별번호(SEQ ID NO): 479-490으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 링커- 및 NLS-함유 서열을 포함하는 것인, [36]-[38] 중 어느 하나의 CRISPR 핵산/단백질 조성물.
- [0057] [40] 링커- 및 NLS-함유 서열이 서열식별번호: 483, 485, 487 및 489로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, [39]의 CRISPR 핵산/단백질 조성물.
- [0058] [41] [1]-[35] 중 어느 하나의 CRISPR 가이드 분자를 포함하는 세포.
- [0059] [42] Cas12 단백질을 추가로 포함하는 [41]의 세포.
- [0060] [43] Cas12 단백질이 Cas12a 단백질인, [42]의 세포.
- [0061] [44] Cas12 단백질이 C-말단에, 서열식별번호: 479-490으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 링커- 및 NLS-함유 서열을 포함하는 것인, [42] 또는 [43]의 세포.
- [0062] [45] 링커- 및 NLS-함유 서열이 서열식별번호: 483, 485, 487 및 489로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, [44]의 세포.
- [0063] [46] CRISPR 가이드 분자가 Cas12 단백질과 복합체를 이루는 것인, [42]-[45] 중 어느 하나의 세포.
- [0064] [47] 세포가 원핵 세포 또는 진핵 세포인, [41]-[46] 중 어느 하나의 세포.
- [0065] [48] 세포가 단세포 진핵 유기체, 진핵 유기체의 세포, 원생동물 세포, 식물로부터의 세포, 조류 세포, 진균 세포, 동물 세포, 무척추동물로부터의 세포, 척추동물로부터의 세포, 포유동물로부터의 세포, 줄기 세포 및 전구 세포로 이루어진 군으로부터 선택된 진핵 세포인, [47]의 세포.
- [0066] [49] 세포가 림프구, 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포, T 세포 수용체 (TCR) 세포, TCR-조작된 CAR-T 세포, 종양 침윤 림프구 (TIL), CAR TIL, 수지상 세포 (DC), CAR-DC, 대식세포, CAR-대식세포 (CAR-M), 자연 살해 (NK) 세포, 또는 CAR-NK 세포인, [48]의 세포.
- [0067] [50] 세포가 CAR-T 세포인, [49]의 세포.
- [0068] [51] 공여자 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하는, [41]-[50] 중 어느 하나의 세포.
- [0069] [52] 제1 표적 핵산 서열을, 촉매적으로 활성인 Cas12 단백질 및 제1 CRISPR 가이드 분자를 포함하는 핵단백질 복합체와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 제1 CRISPR 가이드 분자는 [1]-[35] 중 어느 하나의 CRISPR 가이드 분자를 포함하고, 제1 CRISPR 가이드 분자의 표적화 영역은 제1 표적 핵산 서열과 혼성화할 수 있고, 핵단백질 복합체는 제1 표적 핵산 서열을 절단할 수 있는 것인, 표적 핵산 서열을 절단하는 방법.
- [0070] [53] 공여자 폴리뉴클레오티드를 제공하는 단계를 추가로 포함하는, [52]의 방법.
- [0071] [54] 표적 핵산 서열이 절단되어 절단 부위를 제공하는 것이며, 상기 표적 핵산 서열을 변형시키는 단계를 추가로 포함하는 [53]의 방법.
- [0072] [55] 변형 단계가 절단 부위에 공여자 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부분을 삽입하는 것을 포함하는 것인, [54]의 방법.
- [0073] [56] 변형 단계가 절단 부위에서 하나 이상의 뉴클레오티드를 결실시키는 것을 포함하는 것인, [54]의 방법.
- [0074] [57] 표적 핵산 서열이 세포 내에 있는 것인, [55]의 방법.
- [0075] [58] 세포가 진핵 세포를 포함하는 것인, [57]의 방법.
- [0076] [59] 공여자 폴리뉴클레오티드가 CAR 발현 벡터를 포함하는 것인, [58]의 방법.
- [0077] [60] 바이러스 벡터를 사용하여 CAR 발현 벡터를 세포 내로 도입하는 단계를 추가로 포함하는 [59]의 방법.

- [0078] [61] 상기 도입 단계가 형질도입을 포함하는 것인, [60]의 방법.
- [0079] [62] 그 결과로 생성된 세포가 림프구, CAR-T 세포, TCR 세포, TCR-조작된 CAR-T 세포, TIL, CAR TIL, 수지상 세포, CAR-DC, 대식세포, CAR-M, NK 세포 또는 CAR-NK 세포를 포함하는 것인, [57]-[61] 중 어느 하나의 방법.
- [0080] [63] 제1 표적 핵산 서열이 TRAC; TRBV; 베타-2 마이크로글로불린 (B2M); PD1; PD-L1; CTLA-4; LAG-3; TIGIT; TIM3; HLA-E; HLA-A; HLA-B; HLA-C; HLA-DRA; ADAM17; BTLA; CD160; SIGLEC10; 2B4; LAIR1; CD52; CD96; VSIR; VISTA; KIR2DL1; KIR2DL2; KIR2DL3; CEACAM1; CBLB; CISH; IL-1R8; AHR; 아데노신 2A 수용체; GMCSF; VISTA; CII2A; 및 NKG2A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질을 코딩하는 표적 유전자 내에 있는 것인, [52]-[62] 중 어느 하나의 방법.
- [0081] [64] CAR 발현 벡터가 세포외 리간드-결합 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 것인, [59]-[61] 중 어느 하나의 방법.
- [0082] [65] CAR 발현 벡터가 힌지 영역, 막횡단 영역, 및 하나 이상의 세포내 신호전달 영역을 추가로 코딩하는 것인, [64]의 방법.
- [0083] [66] 세포외 리간드-결합 도메인이 이뮤노글로불린 단일-쇄 가변 단편 (scFv)을 포함하는 것인, [64] 또는 [65]의 방법.
- [0084] [67] scFv가 CD37, CD38, CD47, CD73, CD4, CS1, PD-L1, NGFR, ENPP3, PSCA, CD79B, TACI, VEGFR2, B7-H3, B7-H6, B-세포 성숙 항원 (BCMA), CD123, CD138, CD171/L1CAM, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD70, CD371, CEA, 클라우딘(Claudin) 18.1, 클라우딘 18.2, CSPG4, EGFRvIII, EpCAM, EphA2, 표피 성장 인자 수용체, ErbB, ErbB2 (HER2), FAP, FR α , GD2, GD3, 글리피칸 3, IL-11R α , IL-13R α 2, IL13 수용체 알파, 루이스Y/LeY, 메소텔린, MUC1, MUC16, NKG2D 리간드, PD1, PSMA, ROR-1, SLAMF7, TAG72, ULBP 및 MICA/B 단백질, VEGF2 및 WT1로 이루어진 군으로부터 선택된 세포 표적과 결합할 수 있는 것인, [66]의 방법.
- [0085] [68] scFv가 BCMA, CD19, CD20, CD22, CD47, CD371, ROR-1, EphA2, MUC16, 글리피칸 3, PSCA 및 클라우딘 18.2로 이루어진 군으로부터 선택된 세포 표적과 결합할 수 있는 것인, [67]의 방법.
- [0086] [69] scFv가 BCMA와 결합할 수 있는 것인, [68]의 방법.
- [0087] [70] scFv가 CD371과 결합할 수 있는 것인, [68]의 방법.
- [0088] [71] 세포 내의 제2 표적 핵산 서열을, 촉매적으로 활성인 Cas12 단백질을 및 제2 CRISPR 가이드 분자를 포함하는 핵단백질 복합체와 접촉시키는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 제2 CRISPR 가이드 분자는 제1 CRISPR 가이드 분자와 상이한 표적 핵산 서열과 결합할 수 있는 [1]-[35] 중 어느 하나의 CRISPR 가이드 분자를 포함하고, 제2 CRISPR 가이드 분자의 표적화 영역은 제2 표적 핵산 서열과 혼성화할 수 있고, 핵단백질 복합체는 제2 표적 핵산 서열을 절단할 수 있는 것인, [57]-[62] 및 [64]-[70] 중 어느 하나의 방법.
- [0089] [72] 상기 제1 및 제2 표적 핵산 서열이 TRAC; TRBV 단백질; 베타-2 마이크로글로불린 (B2M); PD1; PD-L1; CTLA-4; LAG-3; TIGIT; TIM3; HLA-E; HLA-A; HLA-B; HLA-C; HLA-DRA; ADAM17; BTLA; CD160; SIGLEC10; 2B4; LAIR1; CD52; CD96; VSIR; VISTA; KIR2DL1; KIR2DL2; KIR2DL3; CEACAM1; CBLB; CISH; IL-1R8; AHR; 아데노신 2A 수용체; GMCSF; VISTA; CII2A; 및 NKG2A로 이루어진 군으로부터 선택된 단백질을 코딩하는 표적 유전자 내에 각각 독립적으로 존재하는 것인, [71]의 방법.
- [0090] [73] 공여자 폴리뉴클레오티드가 CAR 발현 벡터를 포함하며, 여기서 CAR은 세포외 리간드-결합 도메인을 포함하고, 여기서 세포외 리간드-결합 도메인은 scFv를 포함하는 것인, [71] 또는 [72]의 방법.
- [0091] [74] scFv가 BCMA와 결합할 수 있는 것인, [73]의 방법.
- [0092] [75] scFv가 CD371과 결합할 수 있는 것인, [73]의 방법.
- [0093] [76] 상기 제1 표적 핵산 서열이 TRAC 단백질을 코딩하는 유전자 내에 있고, 상기 제2 표적 핵산 서열이 PD1 단백질을 코딩하는 유전자 내에 있는 것인, [72]의 방법.
- [0094] [77] 상기 제1 표적 핵산 서열이 TRAC 단백질을 코딩하는 유전자 내에 있고, 상기 제2 표적 핵산 서열이 B2M 단백질을 코딩하는 유전자 내에 있는 것인, [72]의 방법.
- [0095] [78] B2M-HLA-E 융합 구축물을 포함하는 제2 공여자 폴리뉴클레오티드를 세포에 제공하는 단계를 추가로 포함하

며, 여기서 B2M-HLA-E 융합 구축물을 포함하는 제2 공여자 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부분은 제2 표적 핵산 서열의 절단 부위에 삽입되고; B2M-HLA-E 융합 구축물은 N-말단에서부터 C-말단으로, B2M 분비 신호, HLA-G 펩티드 신호 서열, 제1 링커 서열, B2M 서열, 제2 링커 서열, 및 HLA-E 서열을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 것인, [77]의 방법.

- [0096] [79] 항-BCMA scFv가 서열식별번호: 474의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH); 및 서열식별번호: 475의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 것인, [69] 또는 [74]의 방법.
- [0097] [80] scFv가 VH와 VL 사이에 링커를 추가로 포함하는 것인, [79]의 방법.
- [0098] [81] 링커가 서열식별번호: 476의 아미노산 서열을 포함하는 것인, [80]의 방법.
- [0099] [82] 상기 scFv가 서열식별번호: 477의 아미노산 서열을 포함하는 것인, [81]의 방법.
- [0100] [83] CAR이 VH 및 VL을 포함하는 scFv; 막횡단 도메인; 공동-자극 도메인; 및 활성화 도메인을 포함하는 것인, [64] 또는 [73]의 방법.
- [0101] [84] 막횡단 도메인이 T 세포 수용체 α 쇄, T 세포 수용체 β 쇄, CD3 ζ 쇄, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154 또는 GITR로부터 유래된 막횡단 도메인인, [83]의 방법.
- [0102] [85] 막횡단 도메인이 CD8로부터 유래된 막횡단 도메인을 포함하는 것인, [84]의 방법.
- [0103] [86] 공동-자극 도메인이 CD28, 4-1BB, GITR, ICOS-1, CD27, OX-40 또는 DAP10으로부터 유래된 공동-자극 도메인인, [83]의 방법.
- [0104] [87] 공동-자극 도메인이 4-1BB 공동-자극 도메인을 포함하는 것인, [86]의 방법.
- [0105] [88] 활성화 도메인이 CD3 ζ 활성화 도메인을 포함하는 것인, [83]의 방법.
- [0106] [89] 막횡단 도메인이 CD8로부터 유래된 막횡단 도메인을 포함하고, 공동-자극 도메인이 4-1BB 공동-자극 도메인을 포함하고, 활성화 도메인이 CD3 ζ 활성화 도메인을 포함하는 것인, [83]의 방법.
- [0107] [90] VH가 서열식별번호: 474의 아미노산 서열을 포함하고, VL이 서열식별번호: 475의 아미노산 서열을 포함하는 것인, [83]의 방법.
- [0108] [91] 상기 CAR 발현 벡터 내의 CAR을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이 5' 단부에 리더 서열을 갖는 것인, [59]-[62], [64]-[70], [73]-[75] 및 [78]-[90] 중 어느 하나의 방법.
- [0109] [92] 리더 서열이 서열식별번호: 478의 핵산 서열을 포함하는 것인, [91]의 방법.
- [0110] [93] CAR 발현 벡터가 프로모터를 포함하는 것인, [91]의 방법.
- [0111] [94] 프로모터가 MND 프로모터를 포함하는 것인, [93]의 방법.
- [0112] [95] Cas12 단백질이 C-말단에, 서열식별번호: 479-490으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 링커- 및 NLS-함유 서열을 포함하는 것인, [52]-[94] 중 어느 하나의 방법.
- [0113] [96] 링커- 및 NLS-함유 서열이 서열식별번호: 483, 485, 487, 및 489로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, [95]의 방법.
- [0114] [97] [57]-[96] 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 세포.
- [0115] [98] [59]-[96] 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 CAR-T 세포.
- [0116] [99] 상기 CAR-T 세포가 동종이계 CAR-T 세포인, [98]의 CAR-T 세포.
- [0117] [100] 상기 CAR-T 세포가 자가 CAR-T 세포인, [98]의 CAR-T 세포.
- [0118] [101] T-림프구를 세포로서 사용하여 [59]-[96] 중 어느 하나의 방법을 수행하는 것을 포함하는, CAR-T 세포를 생산하는 방법.
- [0119] [102] 입양 세포 요법의 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 [57]-[96] 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 세포를 투여하는 것을 포함하는 방법.

- [0120] [103] 입양 세포 요법의 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 [59]-[96] 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 CAR-T 세포를 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0121] [104] BCMA-양성 암 세포를 [69], [74] 및 [90] 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 CAR-T 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, BCMA-양성 암 세포를 사멸시키는 방법.
- [0122] [105] BCMA-양성 암 세포가 다발성 골수종 암 세포를 포함하는 것인, [104]의 방법.
- [0123] [106] 다발성 골수종 암 세포가 인간 세포를 포함하는 것인, [105]의 방법.
- [0124] [107] 접촉 단계가 종양내인 것인, [104]의 방법.
- [0125] [108] 세포 내의 제1 표적 핵산 서열을, 촉매적으로 활성인 Cas12 단백질 및 제1 CRISPR 가이드 분자를 포함하는 핵단백질 복합체와 접촉시키며, 여기서 제1 CRISPR 가이드 분자는 [1]-[35] 중 어느 하나의 CRISPR 가이드 분자를 포함하고, 여기서 제1 CRISPR 가이드 분자의 표적화 영역은 제1 표적 핵산 서열과 혼성화할 수 있고, 핵단백질 복합체는 제1 표적 핵산 서열을 절단할 수 있는 것인 단계; 세포 내의 제2 표적 핵산 서열을, 촉매적으로 활성인 Cas12 단백질 및 제2 CRISPR 가이드 분자를 포함하는 핵단백질 복합체와 접촉시키며, 여기서 제2 CRISPR 가이드 분자는 제1 CRISPR 가이드 분자와 상이한 표적 핵산 서열과 결합할 수 있는 [1]-[35] 중 어느 하나의 CRISPR 가이드 분자를 포함하고, 제2 CRISPR 가이드 분자의 표적화 영역은 제2 표적 핵산 서열과 혼성화할 수 있고, 핵단백질 복합체는 제2 표적 핵산 서열을 절단할 수 있는 것인 단계; 및 CAR 발현 벡터를 포함하는 공여자 폴리뉴클레오티드를 상기 세포에 제공하며, 여기서 상기 CAR 발현 벡터를 함유하는 공여자 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부는 상기 제1 표적 핵산 서열 내의 절단 부위에 삽입될 수 있고, 여기서 CAR은 세포의 리간드-결합 도메인을 포함하는 것인 단계를 포함하는, CAR-발현 세포를 생산하는 방법.
- [0126] [109] CAR 발현 벡터를 포함하는 공여자 폴리뉴클레오티드가 바이러스 벡터를 사용하여 세포 내로 도입되는 것인, [108]의 방법.
- [0127] [110] CAR 발현 벡터가 힌지 영역, 막횡단 영역 및 하나 이상의 세포내 신호전달 영역을 추가로 코딩하는 것인, [108]의 방법.
- [0128] [111] 상기 제1 표적 핵산 서열이 TRAC 단백질을 코딩하는 유전자 내에 있고, 상기 제2 표적 핵산 서열이 PD1 단백질을 코딩하는 유전자 내에 있는 것인, [108]-[110] 중 어느 하나의 방법.
- [0129] [112] 상기 제1 표적 핵산 서열이 TRAC 단백질을 코딩하는 유전자 내에 있고, 상기 제2 표적 핵산 서열이 B2M 단백질을 코딩하는 유전자 내에 있는 것인, [108]-[110] 중 어느 하나의 방법.
- [0130] [113] 세포의 리간드-결합 도메인이 이뮤노글로불린 단일-쇄 가변 단편 (scFv)을 포함하는 것인, [108]-[112] 중 어느 하나의 방법.
- [0131] [114] scFv가 BCMA와 결합할 수 있는 것인, [113]의 방법.
- [0132] [115] scFv가 CD371과 결합할 수 있는 것인, [113]의 방법.
- [0133] [116] 항-BCMA scFv가 서열식별번호: 474의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 서열식별번호: 475의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함하는 것인, [114]의 방법.
- [0134] [117] scFv가 VH와 VL 사이에 링커를 추가로 포함하는 것인, [116]의 방법.
- [0135] [118] 링커가 서열식별번호: 476의 아미노산 서열을 포함하는 것인, [117]의 방법.
- [0136] [119] 상기 scFv가 서열식별번호: 477의 아미노산 서열을 포함하는 것인, [114]의 방법.
- [0137] [120] B2M-HLA-E 융합 구축물을 포함하는 제2 공여자 폴리뉴클레오티드를 상기 세포에 제공하는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 B2M-HLA-E 융합 구축물을 포함하는 제2 공여자 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부는 제2 표적 핵산 서열의 절단 부위에 삽입될 수 있고; B2M-HLA-E 융합 구축물은 N-말단에서부터 C-말단으로, B2M 분비 신호, HLA-G 펩티드 신호 서열, 제1 링커 서열, B2M 서열, 제2 링커 서열, 및 HLA-E 서열을 포함하는 융합 단백질을 코딩하는 것인, [108]-[119] 중 어느 하나의 방법.
- [0138] [121] CAR이: VH 및 VL을 포함하는 scFv; 막횡단 도메인; 공동-자극 도메인; 및 활성화 도메인을 포함하는 것인, [108]-[120] 중 어느 하나의 방법.
- [0139] [122] 막횡단 도메인이 T 세포 수용체 α 쇄, T 세포 수용체 β 쇄, CD3 ζ 쇄, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5,

CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, 또는 GITR로부터 유래된 막횡단 도메인을 포함하는 것인, [121]의 방법.

- [0140] [123] 막횡단 도메인이 CD8로부터 유래된 막횡단 도메인을 포함하는 것인, [122]의 방법.
- [0141] [124] 공동-자극 도메인이 CD28, 4-1BB, GITR, ICOS-1, CD27, OX-40 또는 DAP10으로부터 유래된 공동-자극 도메인을 포함하는 것인, [121]의 방법.
- [0142] [125] 공동-자극 도메인이 4-1BB 공동-자극 도메인을 포함하는 것인, [124]의 방법.
- [0143] [126] 활성화 도메인이 CD3 ζ 활성화 도메인을 포함하는 것인, [121]의 방법.
- [0144] [127] 막횡단 도메인이 CD8로부터 유래된 막횡단 도메인을 포함하고, 공동-자극 도메인이 4-1BB 공동-자극 도메인을 포함하고, 활성화 도메인이 CD3 ζ 활성화 도메인을 포함하는 것인, [121]의 방법.
- [0145] [128] CAR-발현 세포가 CAR-T 세포인, [108]-[127] 중 어느 하나의 방법.
- [0146] [129] CAR-T 세포가 동종이계 CAR-T 세포인, [128]의 방법.
- [0147] [130] CAR-T 세포가 자가 CAR-T 세포인, [128]의 방법.
- [0148] [131] 제1 CRISPR 가이드 분자와 복합체 형성된 Cas12 단백질 및/또는 제2 CRISPR 가이드 분자와 복합체 형성된 Cas12 단백질이 C-말단에, 서열식별번호: 479-490으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 링커- 및 NLS-함유 서열을 포함하는 것인, [108]-[130] 중 어느 하나의 방법.
- [0149] [132] 제1 CRISPR 가이드 분자와 복합체 형성된 Cas12 단백질 및/또는 제2 CRISPR 가이드 분자와 복합체 형성된 Cas12 단백질이 서열식별번호: 483, 485, 487, 및 489로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 것인, [131]의 방법.
- [0150] [133] 제2 공여자 폴리뉴클레오티드가 B2M-HLA-E 융합 구축물의 N-말단에 P2A 서열을 추가로 포함하는 것인, [78]의 방법.
- [0151] [134] 제2 공여자 폴리뉴클레오티드가 B2M-HLA-E 융합 구축물 서열의 N-말단에 P2A 서열을 추가로 포함하는 것인, [120]의 방법.
- [0152] 일부 실시양태에서, 본 발명은 표적 핵산 서열과 결합할 수 있는 표적화 영역 및 리보뉴클레오티드 대신 적어도 하나의 데옥시리보뉴클레오티드를 포함한 RNA 서열 UAAUUUCUACUCUUGUAGAU를 포함하는 활성화 영역을 포함하는 CRISPR 가이드 분자이며, 여기서 활성화 영역은 Cas12 단백질과 핵단백질 복합체를 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 활성화 영역 내의 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18 및 19 중 하나 이상 (예를 들어, 10개 이하)은 데옥시리보뉴클레오티드 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자는 이노신, 데옥시-이노신, 데옥시-우라실, 크산토신, C3 스페이서, 5-메틸 dC, 5-히드록시부틸-2'-데옥시우리딘, 5-니트로인돌, 5-메틸 이소데옥시시토신, 이소 데옥시구아노신, 데옥시우리딘, 이소-데옥시시티딘, 및 무염기 부위를 포함한 염기 변형, 및 포스포로티오에이트 변형을 포함한 백본 변형으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 화학적 변형을 포함한다.
- [0153] 일부 실시양태에서, CRISPR 가이드의 표적화 영역은 B2M 유전자를 표적으로 하고 RNA 서열 AGUGGGGUGAAUUCAGUGU를 포함하며, 여기서 임의로, 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 염기 유사체 또는 무염기 부위로 대체된다. 일부 실시양태에서, 표적화 영역 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19 및 20 중 하나 이상 (예를 들어, 5개 이하)은 데옥시리보뉴클레오티드 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 서열식별번호: 51-133으로부터 선택된 서열과 혼성화할 수 있다. 일부 실시양태에서, CRISPR 가이드는 서열식별번호: 212-231, 275-315, 및 331-350으로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CRISPR 가이드는 서열식별번호: 416의 서열을 포함한다.
- [0154] 일부 실시양태에서, CRISPR 가이드의 표적화 영역은 TRAC 유전자를 표적으로 하고 RNA 서열 GAGUCUCACGUGGUACAC를 포함하며, 여기서 임의로, 서열 내의 염기 중 적어도 하나는 염기 유사체 또는 무염기 부위로 대체된다. 일부 실시양태에서, 표적화 영역 내의 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19 및 20 중 하나 이상 (예를 들어, 5개 이하)은 데옥시리보뉴클레오티드 염기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 서열식별번호: 15-20으로부터 선택된 서열과 혼성화할 수 있다. 일부 실시양태에서, CRISPR 가이드는 서열식별번호: 233-252, 317-329, 491-492, 및 508로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서,

CRISPR 가이드 분자는 화학적 변형을 추가로 포함하며, 서열식별번호: 512-517로부터 선택된 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, CRISPR 가이드 분자는 서열식별번호: 415의 서열을 포함한다.

- [0155] 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 CISH 유전자를 표적으로 하고 서열식별번호: 157-165로부터 선택된 서열과 혼성화할 수 있다. 일부 실시양태에서, CRISPR 가이드는 서열식별번호: 509, 및 519-529로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0156] 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 PDCD1 유전자를 표적으로 하고 서열식별번호: 135-155로부터 선택된 서열과 혼성화할 수 있다.
- [0157] 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 CBLB 유전자를 표적으로 하고 서열식별번호: 167-189로부터 선택된 서열과 혼성화할 수 있다. 일부 실시양태에서, CRISPR 가이드는 서열식별번호: 510의 서열을 포함한다.
- [0158] 일부 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재된 CRISPR 가이드 분자 및 Cas12 단백질을 포함하는 CRISPR 핵산/단백질 조성물이다. 일부 실시양태에서, Cas12 단백질은 C-말단에, 서열식별번호: 479-490으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 링커- 및 핵 국제화 신호 (NLS)-함유 서열을 포함하는 Cas12a 단백질이다.
- [0159] 일부 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재된 CRISPR 핵산/단백질 조성물을 포함하는 세포로서, 여기서 세포는 림프구, 키메라 항원 수용체 (CAR) T 세포, T 세포 수용체 (TCR) 세포, TCR-조작된 CAR-T 세포, 중앙 침윤 림프구 (TIL), CAR TIL, 수지상 세포 (DC), CAR-DC, 대식세포, CAR-대식세포 (CAR-M), 자연 살해 (NK) 세포, 유도 다능성 줄기 세포 (iPSC), iPSC 세포로부터 분화된 세포, 또는 CAR-NK 세포이다.
- [0160] 일부 실시양태에서, 본 발명은 키메라 항원 수용체 (CAR)-발현 세포를 생산하는 방법이며, 이러한 방법은 세포 내의 TRAC 서열을 포함하는 제1 표적 핵산을, 촉매적으로 활성인 Cas12 단백질 및 제1 표적 핵산 서열과 결합할 수 있는 표적화 영역; 및 Cas12 단백질과 핵단백질 복합체를 형성할 수 있는 활성화 영역을 갖는 제1 CRISPR 가이드 분자를 포함하는 핵단백질 복합체와 접촉시키며, 여기서 상기 CRISPR 가이드 분자는 활성화 영역, 표적화 영역 또는 이들 둘 다에 리보뉴클레오티드 염기 및 적어도 하나의 데옥시리보뉴클레오티드 염기를 포함하고, 핵단백질 복합체는 제1 표적 핵산 서열을 절단할 수 있는 것인 단계; 동일한 세포 내의 B2M 서열을 포함하는 제2 표적 핵산 서열을, 촉매적으로 활성인 Cas12 단백질 및 제2 표적 핵산 서열과 결합할 수 있는 표적화 영역; 및 Cas12 단백질과 핵단백질 복합체를 형성할 수 있는 활성화 영역을 갖는 제2 CRISPR 가이드 분자를 포함하는 핵단백질 복합체와 접촉시키며, 여기서 상기 CRISPR 가이드 분자는 활성화 영역, 표적화 영역 또는 이들 둘 다에 리보뉴클레오티드 염기 및 적어도 하나의 데옥시리보뉴클레오티드 염기를 포함하고, 핵단백질 복합체는 제2 표적 핵산 서열을 절단할 수 있는 것인 단계; scFv, 막횡단 도메인, 공동-자극 도메인, 및 활성화 도메인을 포함하는 CAR을 코딩하는 제1 공여자 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 CAR은 제1 표적 핵산 서열 내의 절단 부위에 삽입될 수 있는 것인 단계; B2M 분비 신호, HLA-G 펩티드 신호 서열, 제1 링커 서열, B2M 서열, 제2 링커 서열, 및 HLA-E 서열을 포함하는 B2M-HLA-E 융합 구축물을 코딩하는 제2 공여자 폴리뉴클레오티드를 제공하며, 여기서 B2M-HLA-E 융합 구축물은 제2 표적 핵산 서열 내의 절단 부위에 삽입될 수 있는 것인 단계; 제1 표적 핵산 서열을 절단하고 제1 공여자 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부분을 절단 부위에 삽입하는 단계; 및 제2 표적 핵산 서열을 절단하고 제2 공여자 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부분을 절단 부위에 삽입하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 공여자 폴리뉴클레오티드는 B2M-HLA-E 융합 구축물의 5'-단부에 P2A 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 공여자 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 413을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 공여자 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 414를 포함한다.
- [0161] 일부 실시양태에서, CAR 내의 scFv는 CD37, CD38, CD47, CD73, CD4, CS1, PD-L1, NGFR, ENPP3, PSCA, CD79B, TACI, VEGFR2, B7-H3, B7-H6, B-세포 성숙 항원 (BCMA), CD123, CD138, CD171/L1CAM, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD70, CD371, CEA, 클라우딘 18.1, 클라우딘 18.2, CSPG4, EFGRvIII, EpCAM, EphA2, 표피 성장 인자 수용체, ErbB, ErbB2 (HER2), FAP, FR α , GD2, GD3, 글리피칸 3, IL-11R α , IL-13R α 2, IL13 수용체 알파, 루이스Y/LeY, 메소텔린, MUC1, MUC16, NKG2D 리간드, PD1, PSMA, ROR-1, SLAMF7, TAG72, ULBP 및 MICA/B 단백질, VEGF2 및 WT1로 이루어진 군으로부터 선택된 세포 표적과 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, scFv는 BCMA와 결합할 수 있고, 서열식별번호: 474의 아미노산 서열을 포함하는 제1 가변 영역, 서열식별번호: 475의 아미노산 서열을 포함하는 제2 가변 영역, 및 서열식별번호: 476의 아미노산 서열을 포함하는 제1 가변 영역과 제2 가변 영역 사이의 링커를 포함한다. 일부 실시양태에서, scFv는 서열식별번호: 477의 아미노산 서열을 포함한다.

- [0162] 일부 실시양태에서, CAR의 막횡단 도메인은 T 세포 수용체 α 쇄, T 세포 수용체 β 쇄, CD3 ζ 쇄, CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, 또는 GITR로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, CAR의 공동-자극 도메인은 CD28, 4-1BB, GITR, ICOS-1, CD27, OX-40 또는 DAP10으로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, CAR은 CD8로부터 유래된 막횡단 도메인, 4-1BB 공동-자극 도메인, 및 CD3 ζ 활성화 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CAR 서열을 함유하는 벡터는 서열식별 번호: 478의 핵산 서열을 갖는 리더 서열을 포함한다.
- [0163] 일부 실시양태에서, 상기 방법에 사용되는 촉매적으로 활성인 Cas12 단백질은 C-말단에, 서열식별번호: 479-490으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80% 서열 동일성을 갖는 링커 및 핵 국제화 신호(NLS)-함유 서열을 포함한다.
- [0164] 일부 실시양태에서, 상기 방법은 동일한 세포 내의 제3 표적 핵산 서열을, 촉매적으로 활성인 Cas12 단백질 및 제3 표적 핵산 서열과 결합할 수 있는 표적화 영역; 및 Cas12 단백질과 핵단백질 복합체를 형성할 수 있는 활성화 영역을 갖는 제3 CRISPR 가이드 분자를 포함하는 핵단백질 복합체와 접촉시키며, 여기서 상기 CRISPR 가이드 분자는 활성화 영역, 표적화 영역 또는 이들 둘 다에 리보뉴클레오타이드 염기 및 적어도 하나의 테옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함하고, 핵단백질 복합체는 제3 표적 핵산 서열을 절단할 수 있는 것인 단계; 제3 표적 핵산 서열을 절단하고 절단 부위에서 제3 표적 핵산 서열로부터 하나 이상의 뉴클레오타이드를 결실시키는 단계를 추가로 포함하며, 여기서 제3 표적 핵산 서열은 PDCD 유전자, CISH 유전자 및 CBLB 유전자로부터 선택된다.
- [0165] 일부 실시양태에서, CAR-발현 세포는 T-림프구로부터 생산된 동종이계 또는 자가 CAR-T 세포이다.
- [0166] 일부 실시양태에서, 본 발명은 상기 기재된 방법에 의해 생산된 CAR-발현 세포이고, 여기서 세포는 림프구, CAR-T 세포, TCR 세포, TCR-조작된 CAR-T 세포, TIL, CAR TIL, 수지상 세포, CAR-DC, 대식세포, CAR-M, iPSC 세포, iPSC 세포로부터 분화된 세포, NK 세포 또는 CAR-NK 세포로부터 선택된다.
- [0167] 일부 실시양태에서, 본 발명은 입양 세포 요법의 방법으로서, 이를 필요로 하는 대상체에게 상기 기재된 CAR-발현 세포를 투여하는 것을 포함하는 방법이다. 일부 실시양태에서, 입양 세포 요법은 BCMA-양성 암 세포, 예를 들어 다발성 골수종 암 세포를 사멸시키는 것을 포함한다.
- [0168] **참조로 포함**
- [0169] 본 명세서에 인용된 모든 특허, 간행물 및 특허 출원은 각각의 개별 특허, 간행물 또는 특허 출원이 모든 목적을 위해 그 전체 내용이 참조로 포함되는 것으로 구체적이고 개별적으로 표시된 것처럼 본원에 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

- [0170] 본 개시내용의 특색은 특히 첨부된 청구범위에 제시되어 있다. 본 개시내용의 특색 및 이점에 대한 더 나은 이해는 본 개시내용의 원리가 활용되는 예시적인 실시양태를 제시하는 하기 상세한 설명, 및 첨부된 도면을 참조함으로써 수득될 것이다. 본 도면은 비율에 맞게 렌더링되지 않으며 축척도 맞지 않는다. 표시기의 위치는 근사치이다.
- 도 1A, 도 1B, 및 도 1C는 유형 V CRISPR-Cas12a 가이드 RNA의 예를 예시한다.
- 도 2는 표적 폴리뉴클레오타이드의 Cas12a chRNA 가이드/핵단백질 복합체 절단을 예시한다.
- 도 3A - 도 3I는 Cas12 chRNA 가이드에서 사용하기 위한 다양한 정규 및 비-정규 뉴클레오타이드를 예시한다.
- 도 4는 표적 폴리뉴클레오타이드의 Cas12a chRNA 가이드/핵단백질 복합체 절단을 예시한다.
- 도 5는 Cas12a crRNA 가이드를 예시한다.
- 도 6은 활성화 영역 및 표적 결합 서열 내의 DNA 염기를 포함하는 Cas12a chRNA 가이드를 예시한다.
- 도 7은 활성화 영역 및 표적 결합 서열 내의 DNA 염기 및 화학적으로 변형된 핵산을 포함하는 Cas12a chRNA 가이드를 예시한다.
- 도 8은 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체의 형성 및 표적 폴리뉴클레오타이드의 결합을 예시한다.
- 도 9는 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체에 의한 표적 폴리뉴클레오타이드에서의 삽입 또는 결실 (indel)의

생성을 예시한다.

도 10은 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체에 의한 표적 폴리뉴클레오티드에서 공여자 폴리뉴클레오티드 서열의 삽입을 예시한다.

도 11은 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체에 의한 표적 폴리뉴클레오티드의 Nicking을 예시한다.

도 12는 2개의 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용한 표적 폴리뉴클레오티드의 탠덤 Nicking 및 표적 폴리뉴클레오티드 내의 공여자 폴리뉴클레오티드 서열의 삽입을 예시한다.

도 13은 표적 결합 서열 내의 개별 DNA 염기를 갖는 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체의 평균 정규화된 편집 비율을 예시한다.

도 14는 활성화 영역 내의 개별 DNA 염기를 갖는 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체의 정규화된 편집 비율을 예시한다.

도 15A 및 도 15B는 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용하여 생성된 CAR-T 세포의 표현형 및 세포독성 프로파일을 예시한다.

도 16A 및 도 16B는 상이한 폴리펩티드 링커 및 핵 국제화 서열 (NLS) 구성을 갖는 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 편집 활성을 예시한다.

도 17은 상이한 폴리펩티드 링커 및 핵 국제화 서열 (NLS) 구성을 갖는 다중 유전자를 동시에 표적화할 때 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체의 편집 활성을 예시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0171] 본원에서 사용된 전문 용어는 단지 특정한 실시양태를 설명하기 위한 것이며 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥상 명백하게 달리 지시하지 않는 한 복수 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어 "폴리뉴클레오티드"에 대한 언급은 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하고, "벡터"에 대한 언급은 하나 이상의 벡터를 포함한다.
- [0172] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 개시내용이 속하는 기술분야의 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 등가인 다른 방법 및 물질이 본 개시내용에 유용할 수 있지만, 바람직한 물질 및 방법이 본원에 기재되어 있다.
- [0173] 용어 "SITE-Seq®" 및 "SITE-Seq® 검정"은 단일-가이드 RNA (sgRNA)로 프로그램된 Cas9를 사용하여 생성된 게놈 DNA 내의 커트 부위의 서열을 확인하는 생화학적 방법을 지칭한다. 이러한 검정은 문헌 [Cameron, P., et al., (2017). *Mapping the genomic landscape of CRISPR-Cas9 cleavage*. Nature Methods, 14(6), 600-606. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4284>]에 완전히 기재되어 있다.
- [0174] 본 명세서의 교시에 비추어 볼 때, 관련 기술분야의 통상의 기술자는, 예를 들어, 하기 표준 텍스트에 의해 교시된 바와 같이, 면역학, 생화학, 화학, 분자 생물학, 미생물학, 세포 생물학, 게놈학 및 재조합 폴리뉴클레오티드의 통상적인 기술을 적용할 수 있다 [Abbas et al. (Cellular and Molecular Immunology, 2017, 9th Edition, Elsevier, ISBN 978-0323479783); Butterfield et al. (Cancer Immunotherapy Principles and Practice, 2017, 1st Edition, Demos Medical, ISBN 978-1620700976); Kenneth Murphy (Janeway's Immunobiology, 2016, 9th Edition, Garland Science, ISBN 978-0815345053); Stevens et al. (Clinical Immunology and Serology: A Laboratory Perspective, 2016, 4th Edition, Davis Company, ISBN 978-0803644663); E.A. Greenfield (Antibodies: A Laboratory Manual, 2014, Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 978-1-936113-81-1); R.I. Freshney (Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications, 2016, 7th Edition, Wiley-Blackwell, ISBN 978-1118873656); C.A. Pinkert (Transgenic Animal Technology, Third Edition: A Laboratory Handbook, 2014, Elsevier, ISBN 978-0124104907); H. Hedrich (The Laboratory Mouse, 2012, Second Edition, Academic Press, ISBN 978-0123820082); Behringer et al. (Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 2013, Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 978-1936113019); McPherson et al. (PCR 2: A Practical Approach, 1995, IRL Press, ISBN 978-0199634248); J.M. Walker (Methods in Molecular Biology (Series), Humana Press, ISSN 1064-3745); Rio et al. (RNA: A Laboratory Manual, 2010, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 978-0879698911); Methods in Enzymology (Series), Academic Press;

Green et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2012, Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 978-1605500560); G.T. Hermanson (Bioconjugate Techniques, 2013, Third Edition, Academic Press, ISBN 978-0123822390)].

- [0175] 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부 (CRISPR) 및 관련 CRISPR-연합 단백질 (Cas 단백질)은 CRISPR-Cas 시스템을 구성한다. CRISPR-Cas 시스템의 분류는 많은 반복을 거쳤다. 문헌 [Makarova et al. (*Nat. Rev. Microbiol.*, 2020, 18:67-83)]에서는 CRISPR-Cas 시스템의 개별 유형 및 하위유형에 특이적인 시그니처 *cas* 유전자를 고려한 분류 시스템을 제안하였다. 분류는 또한 다중 공유된 Cas 단백질 간의 서열 유사성, 가장 잘 보존된 Cas 단백질의 계통발생, 유전자 조직 및 CRISPR 어레이의 구조를 고려하였다. 이러한 접근 방식은 CRISPR-Cas 시스템을 클래스 1과 클래스 2의 2가지 별개의 클래스로 나누는 분류 체계를 제공하였다.
- [0176] 클래스 2, 유형 V, 시스템에서, crRNA 및 표적 결합은 표적 핵산 절단과 마찬가지로 Cas12를 수반한다. 예를 들어, Cas12a의 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인은 엇갈린 구성으로 표적 핵산의 양쪽 가닥을 절단하여, Cas9 절단에 의해 생성된 평활 단부와 대조적으로 5' 오버행을 생산한다. 이러한 5' 오버행은 상동 재조합 방법을 통해 DNA의 삽입을 촉진할 수 있다.
- [0177] 유형 V crRNA 및 표적 결합 및 절단과 연관된 다른 단백질은 Cas12b (이전에 C2c1) 및 Cas12c (이전에 C2c3)를 포함한다. Cas12b 및 Cas12c 단백질은 길이가 CRISPR 클래스 2 유형 II Cas9 및 CRISPR 클래스 2 유형 V Cas12a 단백질과 유사하며, 그 범위는 대략 1,100개 아미노산 내지 대략 1,500개 아미노산이다. C2c1 및 C2c3 단백질은 또한 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인을 함유하며 Cas12a와 유사한 아키텍처를 가지고 있다. C2c1 단백질은 표적 결합 및 절단을 위해 crRNA 및 tracrRNA를 필요로 한다는 점에서 Cas9 단백질과 유사하지만, 최적 절단 온도는 50°C이다. C2c1 단백질은 Cas12a와 유사하게 표적 서열의 5'인 AT-풍부 PAM을 표적으로 한다. 예를 들어, 문헌 [Shmakov et al. (*Molecular Cell*, 2015, 60(3):385-397)]을 참조한다.
- [0178] CRISPR 유형 V 하위유형은 Cas12 단백질을 포함하며, 광범위한 서열과 크기의 다양성을 명확하게 보여주지만; Cas12 하위유형은 IS605-유사 트랜스포손에 의해 코딩된 TnpB 뉴클레아제로부터의 공통의 진화적 기원을 공유한다. 서열 유사성이 낮고 Cas12 단백질의 여러 독립적인 재조합 이벤트를 통한 진화 가능성으로 인해, Cas12 단백질을 각각의 하위유형으로 분류하면 여러 명명 규칙이 초래되었다. 표 1은 유형 V Cas12 단백질에 대한 분류 및 명칭 뿐만 아니라 대략적인 크기, 가이드 요구 사항, 선호하는 표적 폴리뉴클레오티드 및 대표적인 기원 유기체를 제시한다.

표 1 유형 V 하위유형의 분류						
유형 V	Cas 명명법	다른 명칭	이펙터 크기	가이드	표적 폴리뉴클레오티드	대표적인 유기체
V-A	Cas12a	MAD7	>1000aa	crRNA	dsDNA	<i>프란시셀라 cf. 노비시다</i>
V-B1	Cas12b1	c2c1	>1000aa	crRNA, tracrRNA	dsDNA	<i>알리시클로바실루스</i> <i>아시도테레스트리스</i>
V-B2	Cas12b2	-				<i>플란코토미세테스</i> <i>박테리움</i> RBG_13_46_10
V-C	Cas12c	c2c3	>1000aa	crRNA, tracrRNA	dsDNA	<i>올레이필루스</i> 종
V-D	Cas12d	CasY	>1000aa	crRNA	dsDNA	<i>박테리움</i> CG09_39_24
V-E	Cas12e	CasX	~1000aa	crRNA, tracrRNA	dsDNA	<i>델타프로테오박테리아</i> <i>박테리움</i>
V-F1	Cas12f1	Cas14a, c2c10, V-U3	400-800aa	crRNA, tracrRNA	dsDNA	<i>미배양된 아키온</i>
V-F2	Cas12f2	Cas14b		crRNA		<i>바실루스</i> <i>투링기엔시스</i> HD-771
V-F3	Cas12f3	Cas14c		crRNA		<i>칸디다투스</i> <i>미크라르카에오타</i> <i>아키온</i>
V-G	Cas12g	-	700-800aa	crRNA, tracrRNA	ssRNA	온천 메타게놈
V-H	Cas12h	-	~1000aa	crRNA	ssDNA, dsDNA	과염수 호수 퇴적물 메타게놈

[0179]

표 1 유형 V 하위유형의 분류						
유형 V	Cas 명명법	다른 명칭	이펙터 크기	가이드	표적 폴리뉴클레오티드	대표적인 유기체
V-I	Cas12i	-	~1000aa	crRNA	ssDNA, dsDNA	담수 메타게놈
V-J	Cas12j	Casφ (Cas-phi)	700-800aa	crRNA	dsDNA	비기파지
V-K	Cas12K	c2c5	>700aa	crRNA, tracrRNA	뉴클레아제 활성 없음	<i>시아노테세</i> 중 PCC 8801
V-U	-	c2c4, c2c8, c2c9	n.d.	n.d.	n.d.	<i>코르도니아</i> <i>오티티디스</i>

[0180]

[0181]

Cas12 상동체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 서열 유사성 검색 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 전형적으로, Cas12 단백질은 표적 핵산 서열과 결합할 수 있는 Cas12 가이드/핵단백질 복합체를 형성하기 위해 동족 Cas12 가이드와 상호작용할 수 있다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서, Cas12 단백질 또는 그의 상동체는 Cas12a 단백질 또는 그의 상동체이다.

[0182]

Cas12a 단백질은 파르쿠박테리아 박테리움 GWC2011_GWC2_44_17 (PbCpf1), 라크노스피라세아에 박테리움 MC2017 (Lb3 Cpf1), 부티리비브리오 프로테오클라스티쿠스 (BpCpf1), 페레그리니박테리아 박테리움 GW2011_GWA_33_10 (PcCpf1), 아시다미노코쿠스 종(*Acidaminococcus spp.*) BV3L6 (AsCpf1), 포르피로모나스 마카카에 (PmCpf1),

라크노스피라세아에 박테리움 ND2006 (LbCpf1), 포르피로모나스 크레비오리카니스 (PcCpf1), 프레보텔라 디시엔스 (PdCpf1), 모락셀라 보보쿨리 237 (MbCpf1), 스미텔라 종 SC_K08D17 (SsCpf1), 랩토스피라 이나다이 (LiCpf1), 라크노스피라세아에 박테리움 MA2020 (Lb2Cpf1), 프란시스셀라 노비시다 U112 (FnCpf1), 칸디다투스 메타노플라스마 테르미툼 (CmtCpf1), 및 유박테리움 엘리겐스 (EeCpf1)로부터의 Cas12a를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0183] 유형 V 시스템에서, 핵산 표적 서열 결합은 전형적으로, 핵산 표적 서열 절단과 마찬가지로 Cas12 단백질 및 crRNA를 수반한다. 유형 V 시스템에서, Cas12 단백질의 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인은 순차적인 방식으로 핵산 표적 서열의 양쪽 가닥을 절단하여 (문헌 [Swarts et al. (*Mol. Cell*, 2017, 66:221-233)] 참조), Cas9 단백질 절단에 의해 생성된 평활 단부와 대조되는 5' 오버행을 생산한다.

[0184] 유형 V 시스템의 Cas12 단백질 절단 활성은 tracrRNA (예를 들어, 유형 V-A)와 독립적일 수 있으며; 일부 유형 V 시스템은 내부 이중체를 형성하는 스템-루프 구조를 가진 단일 crRNA만을 필요로 한다. Cas12 단백질은 스템 루프와 스템 루프에 인접한 서열, 특히 핵산 표적 서열과 혼성화하는 스페이스 서열의 5'에 있는 뉴클레오타이드를 인식함으로써 서열- 및 구조-특이적 방식으로 crRNA와 결합한다. 이러한 스템-루프 구조는 전형적으로 길이가 15 내지 22개 뉴클레오타이드의 범위이다. 이러한 스템-루프 이중체를 방해하는 치환은 절단 활성을 없애는 반면, 스템-루프 이중체를 방해하지 않는 다른 치환은 절단 활성을 없애지 않는다. 특정 유형 V 시스템, 예컨대 유형 V-F1, V-G, V-C, V-E (CasX), V-K, 및 V-B는 crRNA와 tracrRNA 간의 혼성화를 필요로 한다. 예를 들어, 문헌 [Yan et al. (*Science*, 2019, 363(6422):88-91)]을 참조한다.

[0185] 본원에 사용된 바와 같은 "가이드" 및 "가이드 폴리뉴클레오타이드"는 Cas 단백질과 핵단백질 복합체를 형성하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 지칭하며, 여기서 핵단백질 복합체는 (핵산 표적 서열을 포함하지 않는 폴리뉴클레오타이드에 비해) 폴리뉴클레오타이드 내의 핵산 표적 서열과 우선적으로 결합한다. 그러한 가이드는 리보뉴클레오타이드 염기 (예를 들어, RNA), 데옥시리보뉴클레오타이드 염기 (예를 들어, DNA), 리보뉴클레오타이드 염기와 데옥시리보뉴클레오타이드 염기의 조합 (예를 들어, RNA/DNA), 뉴클레오타이드 유사체, 변형된 뉴클레오타이드 등 뿐만 아니라 합성, 자연적으로 발생하는, 및 비-자연적으로 발생하는 변형된 핵본 잔기 또는 연결을 포함할 수 있다. 단일-가이드 RNA (미니어처 및 말단절단된 단일-가이드 RNA 포함), crRNA, 이중-가이드 RNA (crRNA/tracrRNA 분자를 포함하나 이에 제한되지는 않음) 등이나 이에 제한되지는 않는 많은 그러한 가이드가 공지되어 있으며, 이들의 용도는 특정한 Cas 단백질에 의존한다. 예를 들어, "유형 V CRISPR-Cas12-연합 가이드"는 동족 Cas12 단백질과 특이적으로 연합하여 핵단백질 복합체를 형성하는 가이드이다.

[0186] 본원에 사용된 바와 같은, "CRISPR 폴리뉴클레오타이드"는 가이드 분자의 일부분을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열이다. 일부 실시양태에서, CRISPR 폴리뉴클레오타이드는 표적화 영역 및/또는 활성화 영역을 포함한다.

[0187] 가이드 분자와 관련하여, 본원에 사용된 바와 같은 "스페이스", "스페이스 서열", "스페이스 요소" 또는 "표적화 영역"은 표적 핵산 서열과 특이적으로 혼성화할 수 있는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 표적화 영역은 상보적인 염기쌍 (즉, 쌍을 이룬 염기) 간의 수소 결합을 통해 표적 핵산 서열과 상호작용한다. 표적화 영역은 선택된 핵산 표적 서열과 결합한다. 일부 실시양태에서, 표적 서열은 시험관내, 생체외 (예컨대 CAR-T 세포의 생성에서) 또는 생체내 (예컨대 조성물이 대상체에게 직접 투여되는 경우) 세포의 게놈 내의 서열이다. 가이드 분자는 임의의 표적 서열을 표적으로 하기 위해 선택된 임의의 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 예시적인 표적 서열은 표적 게놈에서 고유한 것들을 포함한다. 따라서, 표적화 영역은 핵산 표적-결합 서열이다. 표적화 영역은 Cas12 단백질의 부위-특이적 결합 및 핵분해 절단의 위치를 결정한다. 표적화 영역에 대한 기능적 길이의 가변성은 관련 기술분야에 공지되어 있다.

[0188] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "활성화 영역"은 Cas12 폴리펩티드, 예컨대 Cas12a 폴리펩티드와 연합 또는 결합할 수 있는 폴리뉴클레오타이드의 일부분을 지칭한다.

[0189] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "무염기", "무염기 부위", "무염기 뉴클레오타이드", "아퓨린/아피리미딘 부위" 및 "AP 부위"는 상호교환 가능하게 사용되며 퓨린 또는 피리미딘 염기가 결여된 뉴클레오타이드 서열 내의 부위를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 무염기 부위는 데옥시리보스 부위를 포함한다. 다른 실시양태에서, 무염기 부위는 리보스 부위를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 무염기 부위는 변형된 핵본, 예컨대 포스포로티오에이트 핵본 또는 모르폴리노 핵본을 포함한다. 무염기 부위는 질소 염기를 함유하지 않기 때문에 DNA 또는 RNA 뉴클레오타이드의 상보적인 질소 염기와 수소 염기쌍 결합을 형성할 수 없다.

[0190] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "염기 유사체", "비-정규 염기" 및 "화학적으로-변형된 염기"는 DNA 또는 RNA에

서 발생하는 정규 퓨린 또는 피리미딘 염기와 구조적 유사성을 갖는 화합물을 지칭한다. 염기 유사체는 DNA 또는 RNA에서 자연적으로 발생하는 퓨린 또는 피리미딘 염기와 비교 시, 변형된 당 및/또는 변형된 핵염기를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 염기 유사체는 이노신 또는 데옥시이노신, 예컨대 2'-데옥시이노신이다. 다른 실시양태에서, 염기 유사체는 2'-데옥시리보뉴클레오시드, 2'-리보뉴클레오시드, 2'-데옥시리보뉴클레오티드 또는 2'-리보뉴클레오티드이며, 여기서 핵염기는 변형된 염기 (예컨대 예를 들어, 크산틴, 우리딘, 옥사닌 (옥사노신), 7-메틸구아노신, 디히드로우리딘, 5-메틸시티딘, C3 스페이서, 5-메틸 dC, 5-히드록시부틸-2'-데옥시우리딘, 5-니트로인돌, 5-메틸 이소-데옥시시토신, 이소 데옥시구아노신, 데옥시우리딘, 이소 데옥시시티딘, 기타 0-1 퓨린 유사체, N-6-히드록실아미노퓨린, 네볼라린, 7-테아자 히포크산틴, 기타 7-테아자퓨린 및 2-메틸퓨린)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 염기 유사체는 7-테아자-2'-데옥시이노신, 2'-아자-2'-데옥시이노신, PNA-이노신, 모르폴리노-이노신, LNA-이노신, 포스포라미다이트-이노신, 2'-O-메톡시에틸-이노신 및 2'-OMe-이노신으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 용어 "염기 유사체"는 또한 예를 들어, 2'-데옥시리보뉴클레오시드, 2'-리보뉴클레오시드, 2'-데옥시리보뉴클레오티드 또는 2'-리보뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 핵염기는 치환된 히포크산틴이다. 예를 들어, 치환된 히포크산틴은 할로젠, 예컨대 플루오린 또는 염소로 치환될 수 있다. 일부 실시양태에서, 염기 유사체는 플루오로이노신 또는 클로로이노신, 예컨대 2-클로로이노신, 6-클로로이노신, 8-클로로이노신, 2-플루오로이노신, 6-플루오로이노신, 또는 8-플루오로이노신일 수 있다. 다른 실시양태에서, 염기 유사체는 데옥시우리딘이다. 다른 실시양태에서 염기 유사체는 핵산 모방체 (예컨대 예를 들어, 인공 핵산 및 제노 핵산 (XNA))이다.

[0191] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "CRISPR 하이브리드 RNA/DNA 가이드" (chRDNA)는 표적화 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드 가이드 분자를 지칭하며, 여기서 폴리뉴클레오티드는 이러한 폴리뉴클레오티드로 설계된 DNA를 갖는 RNA를 포함한다. 본원의 실시양태에서, Cas12a 가이드의 crRNA 성분은 chRDNA이다.

[0192] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체"는 Cas12 단백질과 복합체를 형성하여 핵단백질 복합체를 형성하는 chRDNA 가이드 분자를 지칭하며, 여기서 핵단백질 복합체는 chRDNA 가이드 분자에 존재하는 핵산 표적 결합 서열에 상보적인 핵산 표적 서열과 부위-지정 결합을 할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체"는 Cas12a 단백질과 복합체를 형성하여 핵단백질 복합체를 형성하는 chRDNA 가이드 분자를 지칭하며, 여기서 핵단백질 복합체는 chRDNA 가이드 분자에 존재하는 핵산 표적 결합 서열에 상보적인 핵산 표적 서열과 부위-지정 결합을 할 수 있다.

[0193] 본원에 사용된 바와 같은, "스텝 요소" 또는 "스텝 구조"는 이중 가닥 영역 ("스텝 요소")을 형성하는 핵산의 두 가닥을 지칭한다. "스텝-루프 요소" 또는 "스텝-루프 구조"는 한 가닥의 3'-단부 서열이 전형적으로 단일-가닥의 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열 ("스텝-루프 요소 뉴클레오티드 서열")에 의해 제2 가닥의 5'-단부 서열과 공유 결합되는 스텝 구조를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 루프 요소는 약 3개 내지 약 20개의 뉴클레오티드 길이, 바람직하게 약 4개 내지 약 10개의 뉴클레오티드 길이의 루프 요소 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 루프 요소 뉴클레오티드 서열은 이러한 루프 요소 뉴클레오티드 서열 내에 스텝 요소를 생성하기 위해 수소 결합 형성을 통해 상호작용하지 않는 쌍을 이루지 않은 핵산 염기의 단일 가닥 뉴클레오티드 서열이다. 용어 "헤어핀 요소"는 또한 스텝-루프 구조를 지칭하기 위해 본원에 사용된다. 이러한 구조는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 염기쌍 형성은 정확할 수 있지만; 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 스텝 요소는 정확한 염기쌍 형성을 필요로 하지 않는다. 따라서, 스텝 요소는 하나 이상의 염기 미스매치 또는 쌍을 이루지 않은 염기를 포함할 수 있다. 스텝-루프 요소는 유사매듭 구조를 추가로 포함할 수 있다.

[0194] "링커 요소 뉴클레오티드 서열", "링커 뉴클레오티드 서열" 및 "링커 폴리뉴클레오티드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용되며 제1 핵산 서열에 공유적으로 부착된 하나 이상의 뉴클레오티드의 서열 (5'-링커 뉴클레오티드 서열-제1 핵산 서열-3')을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 링커 뉴클레오티드 서열은 2개의 별도의 핵산 서열을 연결하여 단일 폴리뉴클레오티드를 형성한다 (예를 들어, 5'-제1 핵산 서열-링커 뉴클레오티드 서열-제2 핵산 서열-3'). 링커 서열의 다른 예는 5'-제1 핵산 서열-링커 뉴클레오티드 서열-3' 및 5'-링커 뉴클레오티드 서열-제1 핵산 서열-링커 뉴클레오티드 서열-3'을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 링커 요소 뉴클레오티드 서열은 이러한 링커 요소 뉴클레오티드 서열 내에 2차 구조 (예를 들어, 스텝-루프 구조)를 생성하기 위해 수소 결합 형성을 통해 서로 상호작용하지 않는 쌍을 이루지 않은 핵산 염기의 단일 가닥 뉴클레오티드 서열일 수 있다. 일부 실시양태에서, 2개의 단일 가닥 링커 요소 뉴클레오티드 서열은 2개의 링커 요소 뉴클레오티드 서열 간의 수소 결합을 통해 서로 상호작용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커 요소 뉴클레오티드 서열은 약 1개 내지 약 50개의 뉴클레오티드 길이, 바람직하게 약 1개 내지 약 15개의 뉴클레오티드 길이 일 수 있다.

- [0195] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "동족"은 전형적으로 Cas12 단백질 (예를 들어, Cas12a) 및 하나 이상의 가이드 중 하나에 존재하는 핵산 표적 결합 서열에 상보적인 핵산 표적 서열과 부위-지정 결합할 수 있는 핵단백질 복합체를 형성할 수 있는 하나 이상의 유형 V CRISPR-Cas12-연합 가이드 (예를 들어, Cas12 chDNA 가이드)를 지칭한다.
- [0196] 용어 "야생형", "자연적으로 발생하는" 및 "비변형된"은 본원에서 자연에 존재하는 전형적인 (또는 가장 통상적인) 형태, 외관, 표현형 또는 계통을 의미하는 것으로 사용되며; 예를 들어, 세포, 유기체, 폴리뉴클레오타이드, 단백질, 거대분자 복합체, 유전자, RNA, DNA 또는 계통의 전형적인 형태는 자연의 공급원에서 발생하고 그로부터 단리될 수 있다. 야생형 형태, 외관, 표현형 또는 계통은 의도적인 변형 전에 원래의 부모 역할을 한다. 따라서, 돌연변이체, 변이체, 조작된, 재조합 및 변형된 형태는 야생형 형태가 아니다.
- [0197] 폴리펩티드를 언급할 때 "단리된"은 표시된 분자가, 그러한 분자가 자연에서 발견되는 전체 유기체로부터 분리되고 별개의 것이거나 또는 동일한 유형의 다른 생물학적 거대분자의 실질적인 부재 하에 존재하는 것을 의미한다. 폴리뉴클레오타이드와 관련하여 용어 "단리된"은 자연에서 정상적으로 이와 연합된 서열이 전체적으로 또는 부분적으로 결여된 핵산 분자; 또는 자연에 존재하지만 그와 연합하여 이중 서열을 갖는 서열; 또는 염색체로부터 해리된 분자이다.
- [0198] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "정제된"은 바람직하게 동일한 분자의 적어도 75중량%, 보다 바람직하게 적어도 85중량%, 보다 더 바람직하게 적어도 95중량%, 가장 바람직하게 적어도 98중량%가 존재하는 것을 의미한다.
- [0199] 용어 "조작된", "유전적으로 조작된", "유전적으로 변형된", "재조합", "변형된", "비-자연적으로 발생하는" 및 "비-천연"은 유기체 또는 세포의 계통에 대한 의도적인 인간 조작을 나타낸다. 상기 용어는 본원에 정의된 바와 같은 계통 편집을 포함하는 계통 변형 방법 뿐만 아니라 유전자 발현 또는 불활성화, 효소 공학, 유도 진화, 지식 기반 설계, 무작위 돌연변이 유발 방법, 유전자 서플링, 코돈 최적화 등을 변경하는 기술을 포괄한다. 유전적 조작 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다.
- [0200] "공유 결합", "공유적으로 부착된", "공유적으로 결합된", "공유적으로 연결된", "공유적으로 연결된" 및 "분자 결합"은 본원에서 상호교환 가능하게 사용되며 원자 간에 전자쌍의 공유를 수반하는 화학 결합을 지칭한다. 공유 결합의 예는 포스포디에스테르 결합 및 포스포로티오에이트 결합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0201] "비-공유 결합", "비-공유적으로 부착된", "비-공유적으로 결합된", "비-공유적으로 연결된", "비-공유 상호작용" 및 "비-공유적으로 연결된"은 본원에서 상호교환 가능하게 사용되며, 한 쌍의 전자를 공유하지 않는 상대적으로 약한 임의의 화학 결합을 지칭한다. 다중 비-공유 결합은 종종 거대분자의 입체 형태를 안정화하고 분자 간의 특이적 상호작용을 매개한다. 비-공유 결합의 예는 수소 결합, 이온 상호작용 (예를 들어, Na^+Cl^-), 반 데르 발스 상호작용 및 소수성 결합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0202] 본원에 사용된 바와 같은, "수소 결합", "수소-염기쌍 형성" 및 "수소 결합된"은 상호교환 가능하게 사용되며, "왓슨-크릭-수소 결합 염기쌍" (W-C-수소 결합된 염기쌍 또는 W-C 수소 결합); "후그스틴-수소 결합된 염기쌍" (후그스틴 수소 결합); 및 "워블-수소 결합된 염기쌍" (워블 수소 결합)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 정규 수소 결합 및 비-정규 수소 결합을 지칭한다. 역 W-C 수소 결합을 포함한 W-C 수소 결합은 퓨린-피리미딘 염기쌍 형성, 즉 아데닌:티민, 구아닌:시토신 및 우라실:아데닌을 지칭한다. 역 후그스틴 수소 결합을 포함한 후그스틴 수소 결합은 각각의 가닥에 하나씩 2개의 핵염기가 주요 홈 내의 수소 결합에 의해 함께 유지되는 핵산 내의 염기쌍 형성의 변이를 지칭한다. 이러한 비-W-C 수소 결합은 제3 가닥이 이중체 주위를 감고 삼중 가닥 나선을 형성할 수 있게 한다. 역 워블 수소 결합을 포함한 워블 수소 결합은 왓슨-크릭 염기쌍 규칙을 따르지 않는 RNA 분자 내의 두 뉴클레오타이드 간의 염기쌍 형성을 지칭한다. 4가지 주요 워블 염기쌍이 있다: 구아닌:우라실, 이노신 (히포크산틴):우라실, 이노신:아데닌 및 이노신:시토신. 워블 염기 상호작용은 또한 이노신:티민과 이노신:구아닌 간에 발생하는 것으로 공지되어 있다. 이노신 염기 및 데옥시 이노신 염기는 정규 DNA 및 RNA 염기와 수소 결합할 수 있기 때문에 "범용 쌍형성 염기"로서 지칭될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Watkins et al. (*Nucleic Acid Research*, 2005, 33(19):6258-67)]을 참조한다. 정규 수소 결합 및 비-정규 수소 결합에 대한 규칙은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [R. F. Gesteland (*The RNA World*, Third Edition (Cold Spring Harbor Monograph Series), 2005, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 978-0879697396); R. F. Gesteland (*The RNA World*, Second Edition (Cold Spring Harbor Monograph Series), 1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 978-0879695613); R. F. Gesteland (*The RNA World*, First Edition (Cold Spring Harbor Monograph Series), 1993, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, 978-0879694562) (예를 들어, [Appendix 1: Structures of Base Pairs Involving at Least Two Hydrogen Bonds, I. Tinoco] 참조); W. Saenger (Principles of Nucleic Acid Structure, 1988, Springer International Publishing AG, ISBN 978-0-387-90761-1); S. Neidle (Principles of Nucleic Acid Structure, 2007, First Edition, Academic Press, ISBN 978-01236950791)]을 참조한다.

[0203] "연결하다", "연결된" 및 "연결하는"은 본원에서 상호교환 가능하게 사용되며, 2개의 거대분자 (예를 들어, 폴리뉴클레오티드, 단백질 등) 간의 공유 결합 또는 비-공유 결합을 지칭한다.

[0204] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "핵산 서열", "뉴클레오티드 서열" 및 "올리고뉴클레오티드"는 상호교환 가능하며 중합체 형태의 뉴클레오티드를 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "폴리뉴클레오티드"는 하나의 5' 단부 및 하나의 3' 단부를 갖고 하나 이상의 핵산 서열을 포함할 수 있는 중합체 형태의 뉴클레오티드를 지칭한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드 (DNA), 리보뉴클레오티드 (RNA), 그의 유사체 또는 그의 조합일 수 있고, 임의의 길이일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 임의의 기능을 수행할 수 있으며 다양한 2차 및 3차 구조를 가질 수 있다. 상기 용어는 자연 뉴클레오티드 및 염기, 당 및/또는 포스페이트 모이어티에서 변형되는 뉴클레오티드의 공지된 유사체를 포괄한다. 특정한 뉴클레오티드의 유사체는 동일한 염기쌍 형성 특이성을 가지고 있다 (예를 들어, T와 A 염기쌍의 유사체). 폴리뉴클레오티드는 하나의 변형된 뉴클레오티드 또는 다수의 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 변형된 뉴클레오티드의 예는 플루오린화된 뉴클레오티드, 메틸화된 뉴클레오티드, 화학적으로 변형된 당, 및 뉴클레오티드 유사체를 포함한다. 뉴클레오티드 구조는 중합체가 어셈블리되기 전 또는 후에 변형될 수 있다. 중합 후, 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 표지화 성분 또는 표적 결합 성분과의 접합을 통해 부가적으로 변형될 수 있다. 뉴클레오티드 서열은 비-뉴클레오티드 성분을 혼입할 수 있다. 상기 용어는 또한 합성, 자연적으로 발생하고/하거나 비-자연적으로 발생하며 참조 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, DNA 또는 RNA)와 유사한 결합 특성을 갖는, 변형된 백본 잔기 또는 연결을 포함하는 핵산을 포괄한다. 이러한 유사체의 예는 포스포로티오에이트, 포스포르아미다이트, 메틸 포스포네이트, 키랄-메틸 포스포네이트, 2-O-메틸 리보뉴클레오티드, 펩티드-핵산 (PNA), 잠금 핵산 (LNATM) [엑시곤 (Exiqon; 미국 매사추세츠주, 우번)] 뉴클레오시드, 글리콜 핵산, 가교된 핵산 및 모르폴리노 구조를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0205] 펩티드-핵산 (PNA)은 폴리뉴클레오티드 포스페이트-당 백본이 가요성 슈도-펩티드 중합체로 대체되는 핵산의 합성 상동체이다. 핵염기는 중합체에 연결되어 있다. PNA는 RNA와 DNA의 상보적인 서열에 대해 높은 친화성과 특이성으로 혼성화할 수 있는 능력을 가지고 있다.

[0206] 포스포로티오에이트 핵산에서, 포스포로티오에이트 (PS) 결합은 폴리뉴클레오티드 포스페이트 백본 내의 비-가교 산소를 황 원자로 대체한다. 이러한 변형은 뉴클레오티드간 연결이 뉴클레아제 분해에 대한 내성을 갖게 한다. 일부 실시양태에서, 포스포로티오에이트 결합은 엑소뉴클레아제 분해를 억제하기 위해 폴리뉴클레오티드 서열의 5'-단부 또는 3'-단부 서열에서 마지막 3 내지 5개 뉴클레오티드 사이에 도입된다. 전체 올리고뉴클레오티드 전반에 걸쳐 포스포로티오에이트 결합을 배치하면, 엔도뉴클레아제에 의한 분해를 감소시키는데 또한 도움이 된다.

[0207] 트레오스 핵산 (TNA)은 인공 유전적 중합체이다. TNA의 백본 구조는 포스포디에스테르 결합에 의해 연결된 반복되는 트레오스 당을 포함한다. TNA 중합체는 뉴클레아제 분해에 대한 내성이 있다. TNA는 염기쌍 수소 결합을 통해 이중체 구조로 자기 어셈블리할 수 있다.

[0208] 연결 반전은 "역전된 포스포르아미다이트"의 사용을 통해 폴리뉴클레오티드에 도입될 수 있다 (예를 들어, www.ucalgary.ca/dnalab/synthesis/-modifications/linkages 참조). 폴리뉴클레오티드의 말단에서의 3'-3' 연결은 2개의 5'-OH 말단을 갖지만 3'-OH 말단이 결여된 올리고뉴클레오티드를 생성함으로써 엑소뉴클레아제 분해에 대해 폴리뉴클레오티드를 안정화시킨다. 전형적으로, 이러한 폴리뉴클레오티드는 5'-OH 위치에 포스포르아미다이트 기를 갖고 3'-OH 위치에 디메톡시트리틸 (DMT) 보호기를 갖는다. 정상적으로, DMT 보호기는 5'-OH 상에 있고 포스포르아미다이트는 3'-OH 상에 있다.

[0209] 폴리뉴클레오티드 서열은 달리 나타내지 않는 한 본원에서 통상적인 5'에서 3' 배향으로 표시된다.

[0210] 본원에 사용된 바와 같은, "서열 동일성"은 일반적으로 다양한 가중 파라미터를 갖는 알고리즘을 사용하여, 각각 제1 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 제2 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 비교하는 뉴클레오티드 염기 또는 아미노산의 동일성 퍼센트를 지칭한다. 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 2개의 폴리펩티드 간의 서열 동일성은 GENBANK (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) 및 EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk)를 포함하나 이에 제한되지

는 않는 사이트에서 월드와이드 웹을 통해 이용 가능한 다양한 방법 및 컴퓨터 프로그램 (예를 들어, BLAST, CS-BLAST, FASTA, HMMER, L-ALIGN 등)에 의한 서열 정렬을 사용하여 결정될 수 있다. 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 2개의 폴리펩티드 서열 간의 서열 동일성은 일반적으로 다양한 방법 또는 컴퓨터 프로그램의 표준 디폴트 파라미터를 사용하여 계산된다. 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 2개의 폴리펩티드 간의 높은 정도의 서열 동일성은 전형적으로 참조 폴리펩티드의 길이 전체에 걸쳐 약 90% 내지 100% 동일성, 예를 들어 약 90% 이상의 동일성, 바람직하게 약 95% 이상의 동일성, 보다 바람직하게 약 98% 이상의 동일성이다. 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 2개의 폴리펩티드 간의 중간 정도의 서열 동일성은 전형적으로 참조 폴리펩티드의 길이 전체에 걸쳐 약 80% 동일성 내지 약 85% 동일성, 예를 들어 약 80% 이상의 동일성, 바람직하게 약 85% 동일성이다. 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 2개의 폴리펩티드 간의 낮은 정도의 서열 동일성은 전형적으로 참조 폴리펩티드의 길이 전체에 걸쳐 약 50% 동일성 내지 75% 동일성, 예를 들어 약 50% 동일성, 바람직하게 약 60% 동일성, 보다 바람직하게 약 75% 동일성이다. 예를 들어, Cas12 단백질 (예를 들어, 아미노산 치환을 포함하는 Cas12)은 참조 Cas12 단백질 (예를 들어, 야생형 Cas12)에 대해 그의 길이 전체에 걸쳐 낮은 정도의 서열 동일성, 중간 정도의 서열 동일성 또는 높은 정도의 서열 동일성을 가질 수 있다. 또 다른 예로서, 가이드 분자는 참조 Cas12 단백질과 복합체를 형성하는 그의 길이 전체에 걸쳐 참조 야생형 가이드 분자 (예를 들어, Cas12와 복합체를 형성하는 폴리뉴클레오타이드)와 비교하여 그의 길이 전체에 걸쳐 낮은 정도의 서열 동일성, 중간 정도의 서열 동일성 또는 높은 정도의 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0211] 본원에 사용된 바와 같은, "혼성화", "혼성화하다" 또는 "혼성화하는"은 수소 염기쌍 형성을 통해 단일 이중 가닥 분자 (예를 들어, DNA/DNA, DNA/RNA, RNA/RNA)를 형성하기 위해 2개의 상보적인 단일 가닥 핵산 (예를 들어, DNA 또는 RNA) 분자를 조합하는 프로세스이다. 혼성화 엄격도는 전형적으로 혼성화 온도와 혼성화 완충액의 염 농도에 의해 결정되며; 예를 들어, 고온 및 저염은 높은 엄격도 혼성화 조건을 제공한다. 상이한 혼성화 조건에 대한 염 농도 범위 및 온도 범위의 예는 하기와 같다: 높은 엄격도, 대략 0.01 M 내지 대략 0.05 M 염, 혼성화 온도 T_m 미만 5°C 내지 10°C; 중간 정도의 엄격도, 대략 0.16 M 내지 대략 0.33 M 염, 혼성화 온도 T_m 미만 20°C 내지 29°C; 및 낮은 엄격도, 대략 0.33 M 내지 대략 0.82 M 염, 혼성화 온도 T_m 미만 40°C 내지 48°C. 이중체 핵산 서열의 T_m 은 관련 기술분야에 널리 공지된 표준 방법에 의해 계산된다. 예를 들어, 문헌 [Maniatis et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1982, Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York); Casey et al. (Nucleic Acids Research, 1977, 4:1539-1552); Bodkin et al. (Journal of Virological Methods, 1985, 10(1):45-52); and Wallace et al. (Nucleic Acids Research, 1981, 9(4):879-894)]을 참조한다. T_m 을 추정하는 알고리즘 예측 도구가 또한 널리 이용 가능하다. 혼성화를 위한 높은 엄격도 조건은 전형적으로 표적 서열에 상보적인 폴리뉴클레오타이드가 주로 표적 서열과 혼성화하고 비-표적 서열과는 실질적으로 혼성화하지 않는 조건을 지칭한다. 전형적으로, 혼성화 조건은 중간 정도의 엄격도, 바람직하게 높은 엄격도의 것이다.

[0212] 본원에 사용된 바와 같은, "상보성"은 또 다른 핵산 서열과 수소 결합을 형성할 수 있는 핵산 서열의 능력 (예를 들어, 정규 왓슨-크릭 염기쌍 형성을 포함)을 지칭한다. 상보성 퍼센트는 제2 핵산 서열과 수소 결합을 형성할 수 있는 핵산 서열 내의 잔기의 백분율을 나타낸다. 2개의 핵산 서열이 100% 상보성을 갖는 경우, 이러한 2개의 서열은 완벽하게 상보적이며, 즉 제1 폴리뉴클레오타이드의 모든 연속 잔기는 제2 폴리뉴클레오타이드 내의 동일한 수의 연속 잔기와 수소 결합한다.

[0213] 리보뉴클레오타이드 염기와 관련하여 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상응하는 데옥시리보뉴클레오타이드 염기"는 리보뉴클레오타이드 염기와 동일한 염기와 상보적 (왓슨-크릭) 염기쌍 형성을 통해 결합하는 데옥시리보뉴클레오타이드 염기 (예를 들어, 정규 데옥시리보뉴클레오타이드 염기의 변형된 또는 변이체 버전 포함)를 지칭한다. 예를 들어, 리보뉴클레오타이드 염기 A, C 및 G의 경우, 상응하는 데옥시리보뉴클레오타이드 염기는 각각 A, C 및 G일 수 있다. 리보뉴클레오타이드 염기 U의 경우, 상응하는 데옥시리보뉴클레오타이드 염기는, 예를 들어, T일 수 있다.

[0214] 본원에 사용된 바와 같은, "결합"은 거대분자 간 (예를 들어, 단백질과 폴리뉴클레오타이드 간, 폴리뉴클레오타이드와 폴리뉴클레오타이드 간, 또는 단백질과 단백질 간 등)의 비-공유 상호작용을 지칭한다. 이러한 비-공유 상호작용은 또한 "연합" 또는 "상호작용"으로서 지칭된다 (예를 들어, 제1 거대분자가 제2 거대분자와 상호작용하는 경우, 제1 거대분자는 비-공유 방식으로 제2 거대분자와 결합함). 결합 상호작용의 일부 부분은 서열-특이적일 수 있다 (용어 "서열-특이적 결합", "서열-특이적으로 결합하다", "부위-특이적 결합" 및 "부위 특이적으로 결합하다"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용됨). 서열-특이적 결합은 전형적으로 단백질 (예를 들어, Cas12)과 복합체를 형성하여 이러한 단백질이, 핵산 표적 결합 서열 (예를 들어, DNA 표적 결합 서열)이 없는 제2 핵산

서열 (예를 들어, 제2 DNA 서열)에 비해 우선적으로 핵산 표적 서열 (예를 들어, 표적 DNA 서열)을 포함하는 핵산 서열 (예를 들어, DNA 서열)과 결합하도록 할 수 있는 하나 이상의 가이드 분자를 지칭한다. 결합 상호작용의 모든 성분은 DNA 백본 내의 포스페이트 잔기와 단백질의 접촉과 같이 서열-특이적일 필요는 없다. 결합 상호작용은 해리 상수 (Kd)를 특징으로 할 수 있다. "결합 친화도"는 결합 상호작용의 강도를 지칭한다. 증가된 결합 친화도는 더 낮은 Kd와 상관관계가 있다.

[0215] 본원에 사용된 바와 같은, Cas12 단백질은 Cas12 가이드/핵단백질 복합체가 폴리뉴클레오타이드 내의 핵산 표적 서열에서 폴리뉴클레오타이드와 결합하거나 이를 절단하는 경우에, 이러한 폴리뉴클레오타이드를 "표적으로 한다"고 한다.

[0216] 본원에 사용된 바와 같은 "프로토스페이서 인접 모티프" 또는 "PAM"은 Cas12 단백질-결합 인식 서열을 포함하는 이중 가닥 핵산 서열을 지칭하며, 여기서 Cas12 단백질의 아미노산은 인식 서열과 직접 상호작용한다 (예를 들어, Cas12a 단백질은 PAM 5'-TTTN-3' 또는 PAM 5'-TTTV-3'과 상호작용한다). PAM 서열은 비-표적 가닥에 있으며 표적 보체 서열의 5' 또는 3'일 수 있다 (예를 들어, CRISPR-Cas12a 시스템에서, PAM 5'-TTTN-3' 또는 PAM 5'-TTTV-3' 서열은 비-표적 가닥에 있고 표적-보체 서열의 5'이다). PAM은 표적 서열 풀림 및 표적 서열과 핵산 표적 결합 서열 간의 수소 염기쌍 결합 전에 Cas12 이펙터 단백질 (예를 들어, Cas12a 단백질)에 의해 인식된다.

[0217] "표적", "표적 서열", "핵산 표적 서열", "표적 핵산 서열" 및 "온-표적 서열"은 본원에서 Cas12 폴리뉴클레오타이드의 핵산 표적 결합 서열에 전체적으로 또는 부분적으로 상보적인 핵산 서열 (예를 들어, 표적화 영역)을 지칭하기 위해 상호교환 가능하게 사용된다. 전형적으로, 핵산 표적 결합 서열은 Cas12 핵단백질 복합체의 결합이 지시되는 핵산 표적 서열에 100% 상보적하도록 선택되지만; 핵산 표적 서열에 대한 결합을 약화시키기 위해, 더 낮은 퍼센트의 상보성을 사용할 수 있다.

[0218] 핵산 표적 결합 서열이 이러한 핵산 표적 결합 서열에 함유된 무염기 부위를 제외하고 표적 서열에 100% 상보적일 때, 표적 서열은 "온-표적"으로서 지칭된다. 온-표적 서열 결합은 Cas12 가이드/핵단백질 복합체가 핵산 표적 결합 서열 (스페이서)의 비-무염기 부위 부분에 대해 100% 상보성을 갖는 핵산 서열과 결합하는 것을 지칭한다. 핵산 표적 결합 서열 (스페이서)이 이러한 핵산 표적 결합 서열에 함유된 무염기 부위를 제외하고 표적 서열과 100% 미만의 상보성을 갖는 경우, 표적 서열은 "오프-표적"으로서 지칭될 수 있다. 오프-표적 서열 결합은 Cas12 가이드/핵단백질 복합체가 핵산 표적 결합 서열 (스페이서)의 비-무염기 부위 부분에 대해 100% 미만의 상보성을 갖는 핵산 서열과 결합하는 것을 지칭한다. 핵산 표적 서열은 이중 가닥 또는 단일 가닥 DNA 분자일 수 있다. 표적 서열은 이중 가닥 또는 단일 가닥 RNA 분자일 수 있다. 표적 서열은 RNA:DNA 하이브리드 분자일 수 있다. 표적 서열은 PAM 서열의 반대 가닥에 존재할 수 있다.

[0219] 본원에 사용된 바와 같은 "이중 가닥 파손부" (DSB)는 절단되는 DNA의 이중 가닥 세그먼트의 양쪽 가닥을 지칭한다. 일부 경우에, 그러한 파손이 발생하면, 하나의 가닥은 뉴클레오타이드가 노출되고 다른 가닥 상의 뉴클레오타이드와 수소 결합되지 않는 "점착성 단부"를 갖는다고 할 수 있다. 다른 경우에, 양쪽 가닥이 서로 완전히 염기쌍을 이룬 상태로 남아 있는 "평활 단부"가 발생할 수 있다.

[0220] "공여자 폴리뉴클레오타이드", "공여자 올리고뉴클레오타이드", "공여자 템플릿", "비-바이러스 공여자" 및 "비-바이러스 템플릿"은 본원에서 상호교환 가능하게 사용되며 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드 (예를 들어, DNA), 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드 (예를 들어, DNA 또는 RNA) 또는 그의 조합일 수 있다. 공여자 폴리뉴클레오타이드는 삽입 서열 (예를 들어, DNA 내의 DSB)을 플랭킹하는 상동성 아암을 포함할 수 있다. 각각의 측면 상의 상동성 아암은 길이가 다를 수 있다. 공여자 폴리뉴클레오타이드의 설계 및 구축을 위한 파라미터는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Ran et al. (*Nature Protocols*, 2013, 8(11):2281-2308); Smithies et al. (*Nature*, 1985, 317:230-234); Thomas et al. (*Cell*, 1986, 44:419-428); Wu et al. (*Nature Protocols*, 2008, 3:1056-1076); Singer et al. (*Cell*, 1982, 31:25-33); Shen et al. (*Genetics*, 1986, 112:441-457); Watt et al. (*PNAS*, 1985, 82:4768-4772); Sugawara et al. (*Journal of Molecular Cell Biology*, 1992, 12(2):563-575); Rubnitz et al. (*Journal of Molecular Cell Biology*, 1984, 4(11):2253-2258); Ayares et al. (*PNAS*, 1986, 83(14):5199-5203); and Liskay et al. (*Genetics*, 1987, 115(1):161-167)]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 공여자 폴리뉴클레오타이드는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함한다.

[0221] 본원에 사용된 바와 같은 "상동성-지향 복구" (HDR)는, 예를 들어 DNA에서의 DSB의 복구 동안 세포에서 일어나는 DNA 복구를 지칭한다. HDR은 뉴클레오타이드 서열 상동성을 필요로 하며 DSB (예를 들어, 표적 DNA 서열 내)가 발생한 서열을 복구하기 위해 공여자 폴리뉴클레오타이드를 사용한다. 공여자 폴리뉴클레오타이드는 일반적으로

DSB를 플랭킹하는 서열과 필수 서열 상동성을 가지므로, 공여자 폴리뉴클레오타이드가 복구를 위한 적합한 템플릿으로서 작용할 수 있다. HDR은, 예를 들어, 공여자 폴리뉴클레오타이드로부터 표적 DNA 서열로 유전 정보를 전달하게 한다. HDR은 공여자 폴리뉴클레오타이드 서열이 표적 DNA 서열과 상이하고 공여자 폴리뉴클레오타이드의 일부 또는 전부가 표적 DNA 서열에 혼입되는 경우, 표적 DNA 서열의 변경 (예를 들어, 삽입, 결실 또는 돌연변이)을 초래할 수 있다. 일부 실시양태에서, 전체 공여자 폴리뉴클레오타이드, 공여자 폴리뉴클레오타이드의 일부분, 또는 공여자 폴리뉴클레오타이드의 카피가 표적 DNA 서열의 부위에 통합된다. 예를 들어, 공여자 폴리뉴클레오타이드는 표적 DNA 서열 내에서의 파손부의 복구를 위해 사용될 수 있으며, 여기서 복구는 DNA 내의 파손 부위 또는 이와 매우 근접한 부위에서 공여자 폴리뉴클레오타이드로부터의 유전 정보 (예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열)의 전달을 초래한다. 따라서, 표적 DNA 서열에 새로운 유전 정보 (예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열)가 삽입되거나 카피될 수 있다.

[0222] 본원에 사용된 바와 같은 "상동성-독립적 표적 통합" (HITI)은 예를 들어 DNA에서의 DSB의 복구 동안 세포에서 일어나는 DNA 복구를 지칭한다. HITI는 HDR과 달리, 뉴클레오타이드 서열 상동성을 필요로 하지 않으며 DSB가 발생한 서열 (예를 들어, 표적 DNA 서열 내)을 복구하기 위해 공여자 폴리뉴클레오타이드를 사용한다. HITI는, 예를 들어, 공여자 폴리뉴클레오타이드로부터 표적 DNA 서열로 유전 정보를 전달하게 한다. HITI는 공여자 폴리뉴클레오타이드 서열이 표적 DNA 서열과 상이하고 공여자 폴리뉴클레오타이드의 일부 또는 전부가 표적 DNA 서열에 혼입되는 경우 표적 DNA 서열의 변경 (예를 들어, 삽입, 결실 또는 돌연변이)을 초래할 수 있다. 일부 실시양태에서, 전체 공여자 폴리뉴클레오타이드, 공여자 폴리뉴클레오타이드의 일부분, 또는 공여자 폴리뉴클레오타이드의 카피가 표적 DNA 서열의 부위에 통합된다. 예를 들어, 공여자 폴리뉴클레오타이드는 표적 DNA 서열 내의 파손부의 복구를 위해 사용될 수 있으며, 여기서 복구는 DNA 내의 파손 부위에서 또는 이와 매우 근접한 부위에서 공여자 폴리뉴클레오타이드로부터의 유전 정보 (예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열)의 전달을 초래한다. 따라서, 표적 DNA 서열에 새로운 유전 정보 (예를 들어, 폴리뉴클레오타이드 서열)가 삽입되거나 카피될 수 있다.

[0223] "게놈 영역"은 핵산 표적 서열 부위의 어느 한쪽에 존재하거나, 대안적으로 또한, 핵산 표적 서열 부위의 일부분을 포함하는 숙주 세포의 게놈 내의 염색체의 세그먼트이다. 공여자 폴리뉴클레오타이드의 상동성 아암은 상응하는 게놈 영역과 상동 재조합을 진행하기에 충분한 상동성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 공여자 폴리뉴클레오타이드의 상동성 아암은 핵산 표적 서열 부위를 바로 플랭킹하는 게놈 영역과 상당한 서열 상동성을 공유하며; 상동성 아암은 핵산 표적 서열 부위로부터 더 멀리 있는 게놈 영역에 대해 충분한 상동성을 갖도록 설계될 수 있는 것으로 인식된다.

[0224] 본원에 사용된 바와 같이, "비상동 단부 연결" (NHEJ)은 공여자 폴리뉴클레오타이드에 대한 요구사항 없이 파손부의 한 말단을 파손부의 다른 말단에 직접 라이게이션함으로써 DNA에서의 DSB의 복구를 지칭한다. NHEJ는 복구 템플릿을 사용하지 않고 DNA를 복구하기 위해 세포가 이용할 수 있는 DNA 복구 경로이다. 공여자 폴리뉴클레오타이드의 부재 하의 NHEJ는 종종 DSB 부위에서 무작위로 삽입되거나 결실되는 뉴클레오타이드를 초래한다.

[0225] "미세 상동성-매개 단부 연결" (MMEJ)은 DNA에서의 DSB를 복구하기 위한 경로이다. MMEJ는 연결하기 전에 DSB를 플랭킹하는 결실 및 파손 부위 내부의 미세 상동 서열의 정렬을 수반한다. MMEJ는 유전적으로 정의되며 예를 들어 CtIP, 폴리(ADP-리보스) 폴리머라제 1 (PARP1), DNA 폴리머라제 세타 (Pol θ), DNA 리가제 1 (Lig 1) 또는 DNA 리가제 3 (Lig 3)의 활성이 필요하다. 부가의 유전적 성분이 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Sfeir et al. (*Trends in Biochemical Sciences*, 2015, 40:701-714)]을 참조한다.

[0226] 본원에 사용된 바와 같은, "DNA 복구"는 세포 기구가 세포에 함유된 DNA 분자에 대한 손상을 복구하는 임의의 프로세스를 포괄한다. 복구된 손상은 단일 가닥 파손부 또는 이중 가닥 파손부 (DSB)를 포함할 수 있다. DSB를 복구하기 위해 HDR, NHEJ 및 MMEJ의 3가지 메커니즘이 있다. "DNA 복구"은 또한 인간 조작으로 인한 DNA 복구를 지칭하기 위해 본원에서 사용되며, 여기서 표적 로커스는, 예를 들어, 뉴클레오타이드를 삽입, 결실 또는 치환함으로써 변형되며, 이들 모두는 게놈 편집의 형태를 나타낸다.

[0227] 본원에 사용된 바와 같은 "재조합"은 2개의 폴리뉴클레오타이드 간의 유전 정보의 교환 프로세스를 지칭한다.

[0228] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "조절 서열", "조절 요소" 및 "제어 요소"는 상호교환 가능하고 발현될 폴리뉴클레오타이드 표적의 상류 (5' 비-코딩 서열), 내부 또는 하류 (3' 비-번역 서열)에 있는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 조절 서열은, 예를 들어, 전사 시기, 전사의 양 또는 수준, RNA 프로세싱 또는 안정성, 및/또는 관련된 구조적 뉴클레오타이드 서열의 번역에 영향을 미친다. 조절 서열은 활성화제 결합 서열, 인핸서, 인트론, 폴리아데닐화 인식 서열, 프로모터, 전사 시작 부위, 억제인자 결합 서열, 스템-루프 구조, 번역 개시 서열, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES), 번역 리더 서열, 전사 종결 서열 (예를 들어, 폴리아데닐화 신호 및 폴리-U 서

열), 번역 종료 서열, 프라이머 결합 부위 등을 포함할 수 있다.

- [0229] 조절 요소는 많은 유형의 숙주 세포에서 뉴클레오티드 서열의 구성적, 유도성 또는 억제성 발현을 지시하는 요소, 및 특정 숙주 세포에서만 뉴클레오티드 서열의 발현을 지시하는 요소 (예를 들어, 조직-특이적 조절 서열)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 pol III 프로모터, 하나 이상의 pol II 프로모터, 하나 이상의 pol I 프로모터, 또는 그의 조합을 포함한다. pol III 프로모터의 예는 U6 및 H1 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. pol II 프로모터의 예는 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스 (RSV) LTR 프로모터 (임의로 RSV 인핸서 수반), 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 (임의로 CMV 인핸서 수반; 예를 들어, 문헌 [Boshart et al. (*Cell*, 1985, 41:521-530)] 참조), SV40 프로모터, 디히드로폴레이트 리덕타제 프로모터, β -액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나제 (PGK) 프로모터 및 EF1 α 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 발현 벡터의 설계는 형질전환될 숙주 세포의 선택, 원하는 발현 수준 등과 같은 요인에 따라 달라질 수 있음을 관련 기술분야의 통상의 기술자는 인지할 것이다. 벡터는 숙주 세포에 도입됨으로써 본원에 기재된 바와 같은 핵산 서열에 의해 코딩되는 융합 단백질 또는 펩티드를 포함한 전사체, 단백질 또는 펩티드를 생산할 수 있다.
- [0230] 본원에 사용된 바와 같은 "유전자"는 엑손 및 관련 조절 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 유전자는 인트론 및/또는 비번역된 영역 (UTR)을 추가로 포함할 수 있다.
- [0231] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "작동 가능하게 연결된"은 서로 기능적 관계에 있는 폴리뉴클레오티드 서열 또는 아미노산 서열을 지칭한다. 예를 들어, 조절 서열 (예를 들어, 프로모터 또는 인핸서)은 이러한 조절 서열이 폴리뉴클레오티드의 전사를 조절하거나 전사의 조절에 기여하는 경우 유전자 산물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 "작동 가능하게 연결"된다. 작동 가능하게 연결된 조절 요소는 전형적으로 코딩 서열과 인접해 있다. 그러나, 인핸서는 프로모터로부터 최대 수 킬로염기 이상 떨어져 있는 경우에도 기능할 수 있다. 따라서, 일부 조절 요소는 폴리뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결될 수 있지만 폴리뉴클레오티드 서열과 인접하지는 않는다. 유사하게, 번역 조절 요소는 폴리뉴클레오티드로부터의 단백질 발현의 조절에 기여한다.
- [0232] 본원에 사용된 바와 같은, "발현"은, 예를 들어, 메신저 RNA (mRNA) 또는 다른 RNA 전사체 (예를 들어, 비-코딩, 예전대 구조적 또는 스캐폴딩 RNA)를 초래하는, DNA 템플릿으로부터의 폴리뉴클레오티드의 전사를 지칭한다. 이러한 용어는 추가로, 전사된 mRNA가 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질로 번역되는 프로세스를 지칭한다. 전사체 및 코딩된 폴리펩티드는 집합적으로 "유전자 산물"로서 지칭될 수 있다. 발현은 폴리뉴클레오티드가 게놈 DNA로부터 유래되는 경우, 진핵 세포에서 mRNA를 스플라이싱하는 것을 포함할 수 있다.
- [0233] "코딩 서열" 또는 선택된 폴리펩티드를 "코딩"하는 서열은 적절한 조절 서열의 제어 하에 놓일 때 시험관내 또는 생체내에서 폴리펩티드로 전사되고 (DNA의 경우) 번역되는 (mRNA의 경우) 핵산 분자이다. 코딩 서열의 경계는 5' 말단에서의 시작 코돈과 3' 말단에서의 번역 정지 코돈에 의해 결정된다. 전사 종결 서열은 코딩 서열에 대해 3'에 위치할 수 있다.
- [0234] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "조정하다"는 기능의 수량, 정도 또는 양에서의 변화를 지칭한다. 예를 들어, 본원에 개시된 바와 같은 Cas12-가이드/핵단백질 복합체는 프로모터에서 또는 그 근처에서 핵산 표적 서열과 결합함으로써 프로모터 서열의 활성을 조정할 수 있다. 결합 후 발생하는 작용에 따라, Cas12 가이드/핵단백질 복합체는 프로모터 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 전사를 유도, 증진, 저해 또는 억제할 수 있다. 따라서, 유전자 발현의 "조정"은 유전자 활성화와 유전자 억제 둘 다를 포함한다.
- [0235] 조정은 표적 유전자의 발현에 의해 직접 또는 간접적으로 영향을 받는 임의의 특징을 결정함으로써 검정될 수 있다. 이러한 특징은, 예를 들어, RNA 또는 단백질 수준, 단백질 활성, 산물 수준, 유전자의 발현 또는 리포터 유전자의 활성 수준에서의 변화를 포함한다. 따라서, 용어 유전자의 "발현 조정", "발현 억제" 및 "발현 활성화"는 유전자의 전사를 변화, 활성화 또는 억제할 수 있는 Cas12 가이드/핵단백질 복합체의 능력을 지칭할 수 있다.
- [0236] 본원에 사용된 바와 같은 "벡터" 및 "플라스미드"는 유전 물질을 세포에 도입하기 위한 폴리뉴클레오티드 비히클을 지칭한다. 벡터는 선형 또는 원형일 수 있다. 벡터는 적합한 숙주 세포에서 벡터의 복제에 영향을 미칠 수 있는 복제 서열 (예를 들어, 복제 기점)을 함유할 수 있다. 적합한 숙주의 형질전환 시, 벡터는 숙주 게놈과 독립적으로 복제 및 기능하거나 숙주 게놈에 통합될 수 있다. 벡터 설계는 무엇보다도 벡터에 대한 의도된 용도 및 숙주 세포에 의존하며, 특정한 용도 및 숙주 세포를 위한 벡터의 설계는 관련 기술분야의 기술 수준 내에 있다. 벡터의 4가지 주요 유형은 플라스미드, 바이러스 벡터, 코스미드 및 인공 염색체이다. 전형적으로, 벡터는 복제 기점, 멀티클로닝 부위 및/또는 선택 가능한 마커를 포함한다. 발현 벡터는 전형적으로 발현 카세

트를 포함한다. "재조합 바이러스"는, 예를 들어, 바이러스 게놈 또는 그의 일부분에 이중 핵산 구축물을 부가 또는 삽입함으로써 유전적으로 변경된 바이러스를 의미한다.

[0237] 본원에 사용된 바와 같은, "발현 카세트"는 재조합 방법을 사용하거나 또는 합성 수단에 의해 생성되고 숙주 세포에서 선택된 폴리뉴클레오티드의 발현을 용이하게 하기 위해 선택된 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 조절 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 구축물을 지칭한다. 예를 들어, 조절 서열은 숙주 세포에서 선택된 폴리뉴클레오티드의 전사, 또는 숙주 세포에서 선택된 폴리뉴클레오티드의 전사 및 번역을 용이하게 할 수 있다. 발현 카세트는, 예를 들어, 숙주 세포의 게놈에 통합되거나 벡터에 존재하여 발현 벡터를 형성할 수 있다.

[0238] 본원에 사용된 바와 같은, "표적화 벡터"는 표적 유전자 또는 핵산 표적 서열 (예를 들어, DSB)의 요소를 플랜킹하는, 게놈 DNA에 상동인 맞춤형 DNA 아암을 전형적으로 포함하는 재조합 DNA 구축물이다. 표적화 벡터는 공여자 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 표적 유전자의 요소는 결실 및/또는 삽입을 포함한 수많은 방식으로 변형될 수 있다. 결함이 있는 표적 유전자는 기능적 표적 유전자로 대체될 수 있거나, 또는 대안적으로 기능적 유전자가 녹아웃을 수 있다. 임의로, 표적화 벡터의 공여자 폴리뉴클레오티드는 표적 유전자에 도입되는 선택 가능한 마커를 포함하는 선택 카세트를 포함한다. 표적 유전자에 인접하거나 표적 유전자 내에 있는 표적화 영역을 사용하여 유전자 발현의 조절에 영향을 미칠 수 있다.

[0239] 본원에 사용된 바와 같은 "유전자 편집" 또는 "게놈 편집"은 세포 게놈 내의 특이적 부위에서 유전적 변형, 예컨대 뉴클레오티드 서열 또는 심지어 단일 염기의 삽입, 결실 또는 대체를 초래하는 일종의 유전 공학을 의미한다. 상기 용어는 본원에 정의된 바와 같은 이중 유전자 발현, 유전자 또는 프로모터 삽입 또는 결실, 핵산 돌연변이 및 파괴적 유전적 변형을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0240] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "내지"는 주어진 범위 내의 말단 값을 포함한다 (예를 들어, 약 1 내지 약 50개의 뉴클레오티드 길이는 1개의 뉴클레오티드 및 50개의 뉴클레오티드를 포함한다).

[0241] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "아미노산"은 아미노산 유사체, 변형된 아미노산, 펩티드 모방제, 글리신 및 D 또는 L 광학 이성질체를 포함한 자연 및 합성 (비자연) 아미노산을 지칭한다.

[0242] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "펩티드", "폴리펩티드" 및 "단백질"은 상호교환 가능하며 아미노산의 중합체를 지칭한다. 폴리펩티드는 임의의 길이일 수 있다. 이는 분지형 또는 선형일 수 있고, 비-아미노산에 의해 중단될 수 있으며, 변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 상기 용어는 또한 예를 들어, 아세틸화, 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 인산화, 폐길화, 비오틴화, 가교결합 및/또는 접합을 통해 변형된 아미노산 중합체를 지칭한다 (예를 들어, 표지화 성분 또는 리간드를 수반함). 폴리펩티드 서열은 달리 나타내지 않는 한, 본원에서 통상적인 N-말단에서 C-말단 배향으로 표시된다. 폴리펩티드 및 폴리뉴클레오티드는 분자 생물학 분야의 일상적인 기술을 사용하여 만들 수 있다. 더욱이, 본질적으로 임의의 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드는 상업적 공급원으로부터 입수 가능하다.

[0243] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "융합 단백질" 및 "키메라 단백질"은 단일 단백질에서 자연적으로 함께 발생하지 않는 2개 이상의 단백질, 단백질 도메인 또는 단백질 단편을 연결함으로써 생성된 단일 단백질을 지칭한다.

[0244] 융합 단백질은 또한 에피토프 태그 (예를 들어, 히스티딘 태그, FLAG® [시그마 알드리치 (Sigma Aldrich; 미국 미주리주 세인트 루이스)] 태그, Myc 태그), 리포터 단백질 서열 (예를 들어, 글루타티온-S-트랜스퍼라제, 베타-갈락토시다제, 루시페라제, 녹색 형광 단백질, 청록색 형광 단백질, 황색 형광 단백질) 및/또는 핵산 서열 결합 도메인 (예를 들어, DNA 결합 도메인 또는 RNA 결합 도메인)을 포함할 수 있다. 융합 단백질은 적어도 하나의 핵 국제화 서열 (NLS), 예컨대 유인원 바이러스 40 (SV40) NLS 또는 뉴클레오플라스민 NLS를 포함할 수 있다. 융합 단백질은 또한 활성화제 도메인 (예를 들어, 열 충격 전사 인자, NFκB 활성화제) 또는 억제인자 도메인 (예를 들어, KRAB 도메인)을 포함할 수 있다. 문헌 [Lupo et al. (*Current Genomics*, 2013, 14(4):268-278)]에 기재된 바와 같이, KRAB 도메인은 강력한 전사 억제 모듈이며 대부분의 C2H2 징크 핑거 단백질의 아미노-말단 서열에 위치한다. 예를 들어, 문헌 [Margolin et al. (*PNAS*, 1994, 91:4509-4513); and Witzgall et al. (*PNAS*, 1994, 91:4514-4518 (1994))]을 참조한다. KRAB 도메인은 전형적으로 단백질-단백질 상호작용을 통해 공동-억제 단백질 및/또는 전사 인자와 결합하여, KRAB 징크 핑거 단백질 (KRAB-ZFP)과 결합하는 유전자의 전사 억제를 유발한다. 예를 들어, 문헌 [Friedman et al. (*Genes & Development*, 1996, 10:2067-2078)]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 링커 핵산 서열은 2개 이상의 단백질, 단백질 도메인 또는 단백질 단편을 연결하는데 사용된다.

[0245] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "핵 국제화 서열" (NLS) 또는 "핵 국제화 신호"는 단백질의 세포 핵으로의 세포 하 국제화를 우선적으로 증가시키는 단백질의 폴리펩티드 서열을 지칭한다. NLS 서열은 전형적으로 단백질의 아미노-말단 ("N-말단"), 카르복실-말단 ("C-말단") 또는 단백질 내부에 위치하는 긍정적으로 변화된 아미노산 스트레치이다 (또는 그의 조합, 즉 N-말단에 하나 이상의 NLS가 있고 C-말단에 하나 이상의 NLS가 있다). NLS 서열은 단백질에 직접 공유 결합될 수 있거나 링커 폴리펩티드를 통해 연결될 수 있다. 링커 서열의 길이는 단백질의 구조적 특징 (예를 들어, 말단의 용매 접근성, 말단에 다른 중요한 기능적 펩티드 서열의 존재 등)에 근거하여 최적화되어 동족 임포트린 단백질 결합 및 트래피킹을 위한 NLS 서열의 접근성을 보장할 수 있다. 부가적으로, 최적의 링커 길이는 경험적으로 스크리닝될 수 있다 (예를 들어, 실시예 11 참조). NLS 서열은 완전히 합성되거나 내인성 또는 외인성 단백질 서열로부터 유래될 수 있다. 계산 도구를 사용하여 단백질 내의 NLS 서열을 예측할 수 있다 (예를 들어, moseslab.csb.utoronto.ca/NLSradamus/, 또는 nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi 참조). NLS 서열의 예가 표 2에 제시되어 있다.

표 2 예시적인 핵 국제화 서열		
공급원	서열	SEQ ID NO.
SV40 대형 T-항원	PKKKRKV	SEQ ID NO:04
뉴클레오폴라스민	KRPAATKKAGQAKKKK	SEQ ID NO:05
53BP1	GKRKLITSEEERSPAKRGRKS	SEQ ID NO:493
VACM-1/CUL5	PKLKRQ	SEQ ID NO:494
CXCR4	RPRK	SEQ ID NO:495
VP1	RRARRPRG	SEQ ID NO:496
ING4	KGKKGRTQKEKKAARARSKGKN	SEQ ID NO:497
IER5	RKRCAAGVGGGPAGCPAPGSTPLKKPRR	SEQ ID NO:498
ERK5	RKPVTAQERQREEREEKRRRRQERAKEREKRRQERER	SEQ ID NO:499
UL79	TLLLRETMNNLGVSDHAVLSRKTPQPY	SEQ ID NO:500
EWS	PGKMDKGEHRQERRDRPY	SEQ ID NO:501
Hrp1	RSGGNHRRNRGRGGGYNRRNNGYHPY	SEQ ID NO:502
cMyc (1)	PAAKRCKLD	SEQ ID NO:503
cMyc (2)	RQRRNELKRSP	SEQ ID NO:504
마우스 c-able IV	SALIKKKKKKNAP	SEQ ID NO:505
Matα2	KIPIK	SEQ ID NO:506
MINIYO	KSGSRK	SEQ ID NO:507

[0246]

[0247] 본원에 사용된 바와 같은 "모이어티"는 분자의 일부분을 지칭한다. 모이어티는 작용기이거나 다수의 작용기 (예를 들어, 공통 구조적 측면을 공유하는 것)이 있는 분자의 일부분을 설명할 수 있다. 용어 "모이어티" 및 "작용기"는 전형적으로 상호교환 가능하게 사용되지만; "작용기"는 보다 구체적으로, 일부 공통의 화학적 행위를 포함하는 분자의 일부분을 지칭할 수 있다. "모이어티"는 종종 구조적 설명으로서 사용된다. 일부 실시양태에서, 5' 말단, 3' 말단, 또는 5' 말단과 3' 말단 (예를 들어, 제1 스텝 요소 내의 비-천연 5' 말단 및/또는 비-천연 3' 말단)은 하나 이상의 모이어티를 포함할 수 있다.

[0248] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "변형된 단백질", "돌연변이된 단백질", "단백질 변이체" 및 "조작 단백질"은 전형적으로 비-천연 서열을 포함하도록 변형된 단백질을 지칭한다 (즉, 변형된 단백질은 비변형된 단백질과 비교하여 고유한 서열을 갖는다).

[0249] 본원에 사용된 바와 같은 "형질전환"은 삽입에 사용된 방법에 관계없이, 외인성 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포로 삽입하는 것을 지칭한다. 예를 들어, 형질전환은 직접적인 흡수, 형질감염, 감염 등에 의한 것일 수 있다. 외인성 폴리뉴클레오티드는 통합되지 않은 벡터, 예를 들어 에피솜으로서 유지될 수 있거나, 대안적으로 숙주 게놈으로 통합될 수 있다.

[0250] "숙주 세포"는 외인성 DNA 서열에 의해 형질전환되었거나 형질전환이 가능한 세포이다. 숙주 세포는 하나 이상의 세포를 갖는 임의의 유기체로부터 기원할 수 있다. 숙주 세포의 예는 원핵 세포, 진핵 세포, 박테리아 세포, 고세균 세포, 단세포 진핵 유기체의 세포, 원생동물 세포, 식물로부터의 세포, 조류 세포, 진균 세포 (예를 들어, 효모 세포, 버섯으로부터의 세포), 동물 세포, 무척추동물로부터의 세포, 척추동물로부터의 세포, 예컨대 포유동물 (예를 들어, 돼지, 소, 염소, 양, 설치류, 래트, 마우스, 비-인간 영장류, 인간 등)로부터의 세

포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 더욱이, 숙주 세포는 줄기 세포 또는 전구 세포, 또는 면역 체계의 세포, 예컨대 본원에 기재된 면역 체계의 세포 중 임의의 것일 수 있다. 숙주 세포는 인간 세포일 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포는 림프구 또는 줄기 세포, 예컨대 조혈 줄기 세포일 수 있다. 림프구는 세포-매개, 세포독성 적응 면역을 위한 T 세포, 예컨대 CD4+ 및/또는 CD8+ 세포독성 T 세포; 세포-매개, 세포독성 선천 면역에서 기능하는 자연 살해 (NK) 세포; 및 체액성 항체-구동 적응 면역을 위한 B 세포를 포함한다. 림프계 세포를 생성하는 조혈 줄기 세포가 또한 포함된다. 부가적으로, CAR-T 세포, TCR-조작된 CAR-T 세포를 포함한 T-세포 수용체 (TCR) 세포, 중앙 침윤 림프구 (TIL), CAR TIL, CAR-NK 세포 등은 본원의 기술을 사용하여 변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간 세포는 인체 외부에 있다. 일부 실시양태에서, 살아있는 유기체의 신체 (예를 들어, 인체)의 세포는 생체외에서 (즉, 생체 외부에서) 조작된다. 생체외는 종종 치료 또는 시술을 위해 생체 (예를 들어, 인체)로부터 장기, 세포 또는 조직을 채취한 다음, 이를 생체에 돌려주는 의료 시술을 지칭한다. 생체내의 종종 생체 (예를 들어, 인체) 내의 장기, 세포 또는 조직이 치료 또는 시술을 받는 의료 시술을 지칭한다.

[0251] 용어 "대상체", "개체" 또는 "환자"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용되며, 인간 및 기타 영장류, 예를 들어 비-인간 영장류, 예컨대 레서스 마카크, 침팬지, 및 기타 원숭이 및 유인원 종; 농장 동물, 예컨대 소, 양, 돼지, 염소 및 말; 가축 포유동물, 예컨대 개 및 고양이; 토끼, 마우스, 래트 및 기니피그를 포함한 실험실 동물; 가금류, 야생 및 사냥감 조류, 예컨대 닭, 칠면조 및 기타 순계류 조류, 오리 및 거위를 포함한 조류 등을 포함하며 이에 제한되지 않는 척삭동물 문의 임의의 구성원을 지칭한다. 이러한 용어는 특정한 연령이나 성별을 나타내지 않는다. 따라서, 상기 용어는 남성과 여성 뿐만 아니라 성인, 청소년 및 신생아 개체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 대상체로부터 유래된다 (예를 들어, 림프구, 줄기 세포, 전구 세포 또는 조직-특이적 세포). 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 대상체이다.

[0252] 본원에 제공된 바와 같은 유전적으로 조작된 입양 세포와 같은 조성물 또는 작용제의 "유효량" 또는 "치료상 유효량"이라는 용어는 원하는 반응을 제공하기에 충분한 양의 조성물 또는 작용제를 지칭한다. 바람직하게, 유효량은 하나 이상의 유해한 부작용을 방지, 회피 또는 제거할 것이다. 그러한 반응은 문제의 특정한 질환에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 입양 세포 요법을 사용하여 암 치료를 받고 있는 환자에서, 원하는 반응은 하기 중 하나 이상을 포함, 예방, 회피 또는 제거할 수 있다: 이식편 대 숙주 질환 (GvHD), 숙주 대 이식편 거부반응, 시토카인 방출 증후군 (CRS), 시토카인 폭풍 및 투여된 유전적으로 변형된 세포의 발암성 형질전환의 감소의 영향의 치료 또는 예방. 요구되는 정확한 치료량은 대상체의 종, 연령 및 일반적인 상태, 치료 중인 병태의 중증도, 및 사용된 특정한 변형된 림프구, 투여 방식 등에 따라 대상체마다 다를 것이다. 임의의 개별적인 경우에 적절한 "유효"량은 일상적인 실험을 사용하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다.

[0253] 특정한 질환, 예컨대 암성 병태 또는 GvHD를 "치료" 또는 "치료하는 것"은 하기를 포함한다: 질환을 예방하는 것, 예를 들어 질환의 발생을 예방하거나 질환에 걸리기 쉬울 수 있지만 질환의 증상을 아직 경험하거나 나타내지 않는 대상체에서 질환의 강도가 약하게 발생하도록 하는 것; 질환을 억제하는 것, 예를 들어 발생 비율을 감소시키는 것, 발생을 저지하는 것, 또는 질환 상태를 역전시키는 것; 및/또는 질환의 증상을 완화시키는 것, 예를 들어 대상체가 경험하는 증상의 수를 감소시키는 것.

[0254] Cas12 가이드

[0255] 본 개시내용의 Cas12 chrDNA 가이드 분자는 동족 Cas12 단백질, 예컨대 Cas12a 단백질과 핵단백질 복합체를 형성할 수 있으며, 여기서 상기 복합체는 표적화 영역에 상보적인 표적 서열 (스페이서 서열)을 표적화할 수 있다.

[0256] 도 1A는 하기를 포함하는 아시다미노코쿠스 종 BV316 Cas12a 가이드 분자의 예를 예시한다: 스템-루프 이중체 (도 1A, 102)를 포함하는 활성화 영역 (도 1A, 101); 및 표적 결합 서열 (도 1A, 104)을 포함하는 스페이서 서열 (도 1A, 103). 도 1B는 하기를 포함하는 대안적 Cas12a 가이드 분자를 예시한다: 스템-루프 이중체 (도 1B, 106)를 포함하는 활성화 영역 (도 1B, 105); 및 표적 결합 서열 (도 1B, 108) 및 3' 연장부 (도 1B, 109)를 포함하는 스페이서 서열 (도 1B, 107). 3' 연장부 (도 1B, 109)는 링커 서열을 통해 스페이서 서열 (도 1B, 107)에 연결될 수 있다. 도 1C는 하기를 포함하는 대안적 Cas12a 가이드 분자를 예시한다: 스템-루프 이중체 (도 1C, 111)를 포함하는 활성화 영역 (도 1C, 110) 및 링커 뉴클레오타이드 (도 1C, 114) 및 5' 연장부 (도 1C, 115); 및 표적 결합 서열 (도 1C, 113)을 포함하는 스페이서 서열 (도 1C, 112).

[0257] 본 개시내용의 Cas12 chrDNA 가이드 분자에서, 표적화 영역은 DNA, RNA, 또는 DNA와 RNA의 혼합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 DNA 및 RNA 둘 다를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 표적화 영

역은 또한 다른 염기 유사체, 변형된 뉴클레오타이드, 무염기 부위 등 뿐만 아니라 합성, 자연적으로 발생하는 및 비-자연적으로 발생하는 변형된 백본 잔기 또는 연결, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다.

[0258] 본 개시내용의 Cas12 chRNA 가이드 분자에서, 활성화 영역은 DNA, RNA, 또는 DNA와 RNA의 혼합물을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 활성화 영역은 DNA 및 RNA 둘 다를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 활성화 영역은 또한 다른 염기 유사체, 변형된 뉴클레오타이드, 무염기 부위 등 뿐만 아니라 합성, 자연적으로 발생하는 및 비-자연적으로 발생하는 변형된 백본 잔기 또는 연결, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 활성화 영역은 표적화 영역에 인접해 있다. 특정 실시양태에서, 활성화 영역은 표적화 영역으로부터의 하류에 있다. 특정 실시양태에서, 활성화 영역은 표적화 영역으로부터의 상류에 있다.

[0259] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 Cas12 chRNA 가이드 분자는 리보뉴클레오타이드 염기 및 약 2% 이하, 3% 이하, 4% 이하, 5% 이하, 6% 이하, 7% 이하, 8% 이하, 9% 이하, 10% 이하, 11% 이하, 12% 이하, 13% 이하, 14% 이하, 15% 이하, 16% 이하, 17% 이하, 18% 이하, 19% 이하, 20% 이하, 21% 이하, 22% 이하, 23% 이하, 24% 이하, 25% 이하, 26% 이하, 27% 이하, 28% 이하, 29% 이하, 30% 이하, 31% 이하, 32% 이하, 33% 이하, 34% 이하, 35% 이하, 36% 이하, 37% 이하, 38% 이하, 39% 이하, 40% 이하, 41% 이하, 42% 이하, 43% 이하, 44% 이하, 45% 이하, 46% 이하, 47% 이하, 48% 이하, 49% 이하, 50% 이하, 55% 이하, 60% 이하, 65% 이하, 70% 이하, 또는 75% 이하의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기, 또는 그의 변이체 또는 변형된 유도체를 포함하는 핵산 서열을 포함한다.

[0260] 본 개시내용의 Cas12 chRNA 가이드는, 예를 들어, 무염기 부위를 포함하여 길이가 30 내지 75개 염기일 수 있다. 일부 실시양태에서, Cas12 chRNA 가이드는 무염기 부위를 포함하여 길이가 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 또는 75개 염기이다. 일부 실시양태에서, Cas12 chRNA 가이드는 무염기 부위를 포함하여 길이가 40개 염기이다.

[0261] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 폴리뉴클레오타이드 서열, 예컨대 Cas12 chRNA 가이드, 활성화 영역 또는 표적화 영역의 "전체 길이의 백분율로서"는, 예를 들어, 무염기 부위, 및 변형된 및 변이체 염기를 포함한 폴리뉴클레오타이드 서열의 전체 길이를 지칭한다.

[0262] 일부 실시양태에서, 활성화 영역은 무염기 부위를 포함하여 길이가 10 내지 25개 염기이다. 일부 실시양태에서, 활성화 영역은 무염기 부위를 포함하여 길이가 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개 염기이다. 일부 실시양태에서, 활성화 영역은 무염기 부위를 포함하여 길이가 20개 염기이다.

[0263] 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 무염기 부위를 포함하여 길이가 10-30개 염기이다. 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 무염기 부위를 포함하여 길이가 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개 염기이다. 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 무염기 부위를 포함하여 길이가 20개 염기이다.

[0264] 본원의 실시양태에서, 활성화- 및/또는 표적화 영역은 리보뉴클레오타이드 염기 및 하나 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 포함한다. 활성화- 및/또는 표적화 영역은 또한 일부 실시양태에서, 염기 유사체, 변형된 뉴클레오타이드, 무염기 부위 또는 그의 조합을 포함한 부가의 변형을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 활성화- 및/또는 표적화 영역은 합성, 자연적으로 발생하는 또는 비-자연적으로 발생하는 변형된 백본 잔기 또는 연결, 또는 그의 조합을 함유할 수 있다.

[0265] 하나 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기는 표적화 영역 내의 임의의 하나 이상의 위치에 존재할 수 있다. 예를 들어, 무염기 부위를 포함하여 길이가 30개 염기인 표적화 영역의 경우, 하나 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기가 위치 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, 26, 27, 28, 29, 또는 30 중 하나 이상에 존재할 수 있다. 더 작은 표적화 영역의 경우, 그에 따라 위치가 감소될 것이다. 예를 들어, 무염기 부위를 포함하여 길이가 20개 염기인 표적화 영역의 경우, 하나 이상의 데옥시리보뉴클레오타이드 염기가 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 중 하나 이상에 존재할 수 있다.

[0266] 하나 이상의 부가의 변형 (예컨대 염기 유사체, 변형된 뉴클레오타이드, 무염기 부위, 변형된 백본 잔기 또는 연결, 또는 그의 조합)이 표적화 영역 내의 임의의 하나 이상의 위치에 존재할 수 있다. 예를 들어, 무염기 부위를 포함하여 길이가 30개 염기인 표적화 영역의 경우, 하나 이상의 부가의 변형이 위치 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, 26, 27, 28, 29, 또는 30 중 하나 이상에 존재할 수 있다. 더 작은 표적화 영역의 경우, 그에 따라 위치가 감소될 것이다. 예를 들어, 무염기 부위를 포함하여 길이가 20개 염기인 표적화 영역의 경우, 하나 이상의 부가의 변형이 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 중 하나 이상에 존재할 수 있다.

[0267] 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오타이드 염기는 활성화 영역 내의 임의의 하나 이상의 위치에 존재할 수 있다. 예를 들어, 무염기 부위를 포함하여 길이가 25개 염기인 활성화 영역의 경우, 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오타이드 염기가 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 중 하나 이상에 존재할 수 있다. 더 작은 활성화 영역의 경우, 그에 따라 위치가 감소될 것이다. 예를 들어, 무염기 부위를 포함하여 길이가 20개 염기인 활성화 영역의 경우, 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오타이드 염기가 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 중 하나 이상에 존재할 수 있다.

[0268] 하나 이상의 부가의 변형 (예컨대 염기 유사체, 변형된 뉴클레오타이드, 무염기 부위, 변형된 백본 잔기 또는 연결, 또는 그의 조합)이 활성화 영역 내의 임의의 하나 이상의 위치에 존재할 수 있다. 예를 들어, 무염기 부위를 포함하여 길이가 25개 염기인 활성화 영역의 경우, 하나 이상의 부가의 변형이 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25 중 하나 이상에 존재할 수 있다. 더 작은 활성화 영역의 경우, 그에 따라 위치가 감소될 것이다. 예를 들어, 무염기 부위를 포함하여 길이가 20개 염기인 활성화 영역의 경우, 하나 이상의 부가의 변형이 위치 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 중 하나 이상에 존재할 수 있다.

[0269] 일부 실시양태에서, 무염기 부위를 포함하여 Cas12 chRDNA 가이드의 전체 크기의 백분율로서 테옥시리보뉴클레오타이드 염기의 양은 바람직하게 75% 이하이다. 일부 실시양태에서, 무염기 부위를 포함하여 Cas12 chRDNA 가이드의 전체 크기의 백분율로서 테옥시리보뉴클레오타이드 염기의 양은 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 24% 이하, 23% 이하, 22% 이하, 21% 이하, 20% 이하, 19% 이하, 18% 이하, 17% 이하, 16% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 또는 5% 이하이다.

[0270] 일부 실시양태에서, 무염기 부위를 포함하여 Cas12 chRDNA 가이드의 전체 크기의 백분율로서, 부가의 변형 (예컨대 염기 유사체, 변형된 뉴클레오타이드, 무염기 부위, 변형된 백본 잔기 또는 연결, 또는 그의 조합)의 양은 바람직하게 75% 이하이다. 일부 실시양태에서, 무염기 부위를 포함하여 Cas12 chRDNA 가이드의 전체 크기의 백분율로서, 부가의 변형의 양은 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 24% 이하, 23% 이하, 22% 이하, 21% 이하, 20% 이하, 19% 이하, 18% 이하, 17% 이하, 16% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 또는 5% 이하이다.

[0271] 일부 실시양태에서, 무염기 부위를 포함하여 표적화 영역의 전체 크기의 백분율로서, 테옥시리보뉴클레오타이드 염기의 양은 바람직하게 75% 이하이다. 일부 실시양태에서, 무염기 부위를 포함하여 표적화 영역의 전체 크기의 백분율로서, 테옥시리보뉴클레오타이드 염기의 양은 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 24% 이하, 23% 이하, 22% 이하, 21% 이하, 20% 이하, 19% 이하, 18% 이하, 17% 이하, 16% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 또는 5% 이하이다.

[0272] 일부 실시양태에서, 무염기 부위를 포함하여 표적화 영역의 전체 크기의 백분율로서, 부가의 변형 (예컨대 염기 유사체, 변형된 뉴클레오타이드, 무염기 부위, 변형된 백본 잔기 또는 연결, 또는 그의 조합)의 양은 바람직하게 75% 이하이다. 일부 실시양태에서, 무염기 부위를 포함하여 표적화 영역의 전체 크기의 백분율로서, 부가의 변형의 양은 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 24% 이하, 23% 이하, 22% 이하, 21% 이하, 20% 이하, 19% 이하, 18% 이하, 17% 이하, 16% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 또는 5% 이하이다.

[0273] 일부 실시양태에서, 무염기 부위를 포함하여 활성화 영역의 전체 크기의 백분율로서, 테옥시리보뉴클레오타이드 염기의 양은 바람직하게 75% 이하이다. 일부 실시양태에서, 무염기 부위를 포함하여 활성화 영역의 전체 크기의 백분율로서, 테옥시리보뉴클레오타이드 염기의 양은 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 24% 이하, 23% 이하, 22% 이하, 21% 이하, 20% 이하, 19% 이하, 18% 이하, 17% 이하, 16% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 또는 5% 이하이다.

- [0274] 일부 실시양태에서, 무염기 부위를 포함하여 활성화 영역의 전체 크기의 백분율로서, 부가의 변형 (예컨대 염기 유사체, 변형된 뉴클레오티드, 무염기 부위, 변형된 백본 잔기 또는 연결, 또는 그의 조합)의 양은 바람직하게 75% 이하이다. 일부 실시양태에서, 무염기 부위를 포함하여 활성화 영역의 전체 크기의 백분율로서, 부가의 변형의 양은 50% 이하, 45% 이하, 40% 이하, 35% 이하, 30% 이하, 25% 이하, 24% 이하, 23% 이하, 22% 이하, 21% 이하, 20% 이하, 19% 이하, 18% 이하, 17% 이하, 16% 이하, 15% 이하, 14% 이하, 13% 이하, 12% 이하, 11% 이하, 10% 이하, 9% 이하, 8% 이하, 7% 이하, 6% 이하, 또는 5% 이하이다.
- [0275] 일부 실시양태에서, 활성화 영역 및/또는 표적화 영역 내의 테옥시리보뉴클레오티드 염기의 양은, 예를 들어 테옥시리보뉴클레오티드 염기가 없는 상응하는 활성화 영역 및/또는 표적화 영역과 비교 시 통계적으로 유의미한 차이를 제공하도록 조정된다. 일부 실시양태에서, 통계적으로 유의미한 차이는 온-표적 또는 오프-표적 편집에서의 차이이다.
- [0276] 일부 실시양태에서, 활성화 영역 및 표적화 영역은 각각 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 활성화 영역은 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 함유하고, 표적화 영역은 임의의 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 함유하지 않는다 (예를 들어, RNA 및/또는 변형된 리보뉴클레오티드만을 함유한다). 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 함유하고, 활성화 영역은 임의의 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 함유하지 않는다 (예를 들어, RNA 및/또는 변형된 리보뉴클레오티드만을 함유한다).
- [0277] 일부 실시양태에서, 활성화 영역 및 표적화 영역은 각각 하나 이상의 부가의 변형 (예컨대 염기 유사체, 변형된 뉴클레오티드, 무염기 부위, 변형된 백본 잔기 또는 연결, 또는 그의 조합)을 함유한다. 일부 실시양태에서, 활성화 영역은 하나 이상의 부가의 변형 (예컨대 염기 유사체, 변형된 뉴클레오티드, 무염기 부위, 변형된 백본 잔기 또는 연결, 또는 그의 조합)을 함유하고, 표적화 영역은 임의의 부가의 변형을 함유하지 않는다 (즉, RNA 또는 DNA만을 함유한다). 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 하나 이상의 부가의 변형 (예컨대 염기 유사체, 변형된 뉴클레오티드, 무염기 부위, 변형된 백본 잔기 또는 연결, 또는 그의 조합)을 함유하고, 활성화 영역은 임의의 부가의 변형을 함유하지 않는다 (즉, RNA 또는 DNA만을 함유한다).
- [0278] 도 2는 표적 결합 서열 (도 2, 205)을 포함하는 동족 Cas12a chRDNA 가이드 분자 (도 2, 204)와 결합된 Cas12a 단백질 (도 2, 206)을 예시한다. Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 표적 서열을 포함하는 표적 폴리뉴클레오티드를 풀고, Cas12 chRDNA 가이드 분자의 표적 결합 서열 (도 2, 205)은 수소 결합 (도 2, 폴리뉴클레오티드 사이의 수직선으로써 표시됨)을 통해 표적 서열 (도 2, 207)에 연결된다. 도 2에서, 표적 폴리뉴클레오티드는 표적 서열 (도 2, 207)을 포함하는 표적 가닥 (도 2, 201) 및 PAM 서열 (도 2, 203)을 포함하는 비-표적 가닥 (도 2, 202)을 포함한다. PAM 서열 (도 2, 203)은 전형적으로 비-표적 가닥 (도 2, 202) 상의 표적 서열 (도 2, 207)의 상류 (즉, 5' 방향)에서 발생한다. Cas12a chRDNA 가이드 분자의 표적 결합 서열 (도 2, 205)과 표적 서열 (도 2, 207) 간의 수소 결합의 형성은 표적 가닥 (도 2, 201)과 비-표적 가닥 (도 2, 202)의 엇갈린 절단 (도 2, 208)을 초래한다.
- [0279] 도 3A-도 3I는 본 개시내용의 Cas12 chRDNA 가이드 분자에 사용하기 위한 다양한 정규 및 비-정규 뉴클레오티드를 예시한다. 표 3은 도 3A-도 3I에 사용된 일련의 지표를 나타낸다.

표 3 Cas12 crRNA 및 chRDNA 가이드에 사용하기 위한 정규 및 비-정규 뉴클레오티드의 수치 지표		
도	지표	설명
도 3A	301	리보스 당
	302	질소 염기
	303	포스페이트 백본
	304	2'히드록실 기
도 3B	305	데옥시리보스 당
	306	질소 염기
	307	포스페이트 백본
	308	2'히드록실 기의 결여
도 3C	309	리보스 당
	310	포스페이트 백본
	311	2'히드록실 기
도 3D	312	데옥시리보스 당
	313	포스페이트 백본
	314	2'히드록실 기의 결여
도 3E	315	리보스 당
	316	비-정규 질소 염기 또는 염기 모방체
	317	포스페이트 백본
	318	2'히드록실 기
도 3F	319	데옥시리보스 당
	320	비-정규 염기 또는 염기 모방체
	321	포스페이트 백본
	322	2'히드록실 기의 결여
도 3G	323	리보스 당
	324	질소 염기
	325	화학적으로 변형된 백본
	326	2'히드록실 기
도 3H	327	데옥시리보스 당
	328	질소 염기
	329	화학적으로 변형된 백본
	330	2'히드록실 기의 결여
도 3I	331	비-정규 또는 화학적으로 변형된 당
	332	질소 염기
	333	포스페이트 백본

[0280]

[0281]

도 4는 표적 결합 서열 (도 4, 405)을 포함하는 동족 Cas12a chRDNA 가이드 분자 (도 4, 404)와 결합된 Cas12a 단백질 (도 4, 406)을 예시하며, 여기서 표적 결합 서열 (도 4, 405)은 비-RNA 뉴클레오티드 (도 4, 409), 예컨대 도 3B-도 3I에 제시된 정규 및 비-정규 뉴클레오티드를 포함한다. Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 표적 서열을 포함하는 표적 폴리뉴클레오티드를 풀고, Cas12 chRDNA 가이드 분자의 표적 결합 서열 (도 4, 405)은 수소 결합 (도 4, 폴리뉴클레오티드 사이의 수직선으로써 표시됨)을 통해 표적 서열 (도 4, 407)에 연결된다. 도 4에서, 표적 폴리뉴클레오티드는 표적 서열 (도 4, 407)을 포함하는 표적 가닥 (도 4, 401), 및 PAM 서열 (도 4, 403)을 포함하는 비-표적 가닥 (도 4, 402)을 포함한다. PAM 서열 (도 4, 403)은 전형적으로 비-표적 가닥 (도 4, 402) 상의 표적 서열 (도 4, 407)의 상류 (즉, 5' 방향)에서 발생한다. chRDNA 가이드 분자의 표적 결합 서열 (도 4, 405)과 표적 서열 (도 4, 407) 간의 수소 결합의 형성은 표적 가닥 (도 4, 401)과 비-표적 가닥 (도 4, 402)의 엇갈린 절단 (도 4, 408)을 초래한다.

[0282]

도 5는 하기를 포함하는 아시다미노코쿠스 종 (균주 BV3L6) Cas12a crRNA 가이드 분자의 예를 예시한다: 스템-루프 이중체 (도 5, 502)를 포함하는 활성화 영역 (도 5, 501); 및 표적 결합 서열 (도 5, 504)을 포함하는 스페이서 (도 5, 503). 활성화 영역 (도 5, 501) 및 스페이서 (도 5, 503) 내의 각각의 뉴클레오티드 위치는 가

이드 분자의 5' 단부에서 시작하여 표지되며, 여기서 활성화 영역 및 표적 결합 영역은 각각 RNA를 포함한다.

[0283] 도 6은 하기를 포함하는 아시다미노코쿠스 종 (균주 BV3L6) Cas12a chRNA 가이드 분자의 예를 예시한다: 스템-루프 이중체 (도 6, 602)를 포함하는 활성화 영역 (도 6, 601); 및 표적 결합 서열 (도 6, 604)을 포함하는 스페이서 (도 6, 603). 활성화 영역 (도 6, 601) 및 스페이서 (도 6, 603) 내의 각각의 뉴클레오타이드 위치는 가이드 분자의 5' 단부에서 시작하여 표지되며, 여기서 활성화 영역은 RNA (흰색 채우기) 및 DNA (회색 채우기)의 혼합물을 포함하고 표적 결합 서열은 RNA (흰색 채우기) 및 DNA (회색 채우기)의 혼합물을 포함한다.

[0284] 도 7은 하기를 포함하는 아시다미노코쿠스 종 (균주 BV3L6) Cas12a chRNA 가이드 분자의 예를 예시한다: 스템-루프 이중체 (도 7, 702)를 포함하는 활성화 영역 (도 7, 701) 및 표적 결합 서열 (도 7, 704)을 포함하는 스페이서 (도 7, 703). 활성화 영역 (도 7, 701) 및 스페이서 (도 7, 703) 내의 각각의 뉴클레오타이드 위치는 가이드 분자의 5' 단부에서 시작하여 표지되며, 여기서 활성화 영역은 RNA (흰색 채우기) 및 DNA (회색 채우기)의 혼합물을 포함한다. Cas12a chRNA 가이드 분자는 다른 비-정규 뉴클레오타이드, 예컨대 화학적으로 변형된 당 뉴클레오타이드 (도 7, 705), 무염기 리보뉴클레오타이드 (도 7, 706), 화학적으로 변형된 백본을 갖는 테옥시리보 뉴클레오타이드 (도 7, 707), 화학적으로 변형된 백본을 갖는 리보뉴클레오타이드 (도 7, 708) 및 무염기 테옥시-리보뉴클레오타이드 (도 7, 709)를 추가로 포함한다.

[0285] 도 8은 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체의 형성을 예시하며, 여기서 Cas12 단백질 (도 8, 801)은 Cas12 chRNA 가이드 분자 (도 8, 802)와 결합하여 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체 (도 8, 803)를 형성한다. Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체 (도 8, 803)는 표적 폴리뉴클레오타이드 (도 8, 804)와 결합하며, 여기서 표적 폴리뉴클레오타이드는 Cas12 chRNA 가이드 분자의 표적 결합 서열에 상보적인 표적 서열을 함유하고, Cas12 chRNA 가이드 분자의 표적 결합 서열과 표적 서열 (도 8, 805) 간에 수소 결합이 형성된다.

[0286] 도 9는 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체에 의한 표적 폴리뉴클레오타이드에서의 삽입 또는 결실 (indel)의 생성을 예시하며, 여기서 Cas12 chRNA 가이드 분자 (도 9, 902)와 복합체 형성된 Cas12 단백질 (도 9, 901)은 PAM (도 9, 904)을 포함하는 표적 폴리뉴클레오타이드 (도 9, 903)와 결합하고, 표적 폴리뉴클레오타이드는 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체에 의해 절단된다 (도 9, 905). 표적화가 발생한 후, Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 표적 폴리뉴클레오타이드 (도 9, 906)로부터 해리되며, 여기서 표적 폴리뉴클레오타이드는 PAM (도 9, 904)에 비해 상류 (즉, 5' 방향으로) 가닥 (도 9, 907) 및 하류 (즉, 3' 방향으로) 가닥 (도 9, 908)을 포함한다. 세포 DNA 복구 기구는 표적 폴리뉴클레오타이드 내의 절단 부위 주위의 서열의 삽입 또는 결실 (도 9, 910)을 통해 표적 폴리뉴클레오타이드를 복구한다. 상류 가닥 (도 9, 911) 및 하류 가닥 (도 9, 912)은 재연결되고 편집된 표적 폴리뉴클레오타이드 (도 9, 914)는 절단 부위에서 indel (도 9, 913)을 포함하며, 여기서 편집된 표적 폴리뉴클레오타이드는 편집되지 않은 표적 폴리뉴클레오타이드에 비해 상이한 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체에 의한 표적 폴리뉴클레오타이드에서의 삽입 또는 결실 (indel)의 생성은 세포 내부에서 발생한다.

[0287] 도 10은 표적 폴리뉴클레오타이드 내의 공여자 폴리뉴클레오타이드 서열의 혼입을 예시하며, 여기서 Cas12 chRNA 가이드 분자 (도 10, 1002)와 복합체 형성된 Cas12 단백질 (도 10, 1001)은 PAM (도 10, 1004)을 포함하는 표적 폴리뉴클레오타이드 (도 10, 1003)와 결합하고, 표적 폴리뉴클레오타이드는 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체에 의해 절단된다 (도 10, 1005). 표적화가 발생한 후, Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 표적 폴리뉴클레오타이드 (도 10, 1006)로부터 해리되며, 여기서 표적 폴리뉴클레오타이드는 PAM (도 10, 1004)에 비해 상류 (즉, 5' 방향으로) 가닥 (도 10, 1007) 및 하류 (즉, 3' 방향으로) 가닥 (도 10, 1008)을 포함하고, 공여자 폴리뉴클레오타이드가 제공된다 (도 10, 1009). 세포 DNA 복구 기구는 공여자 폴리뉴클레오타이드 (도 10, 1011)를 사용하여 표적 폴리뉴클레오타이드 (도 10, 1010)를 복구한다. 그 결과로 생성된 편집된 표적 폴리뉴클레오타이드 (도 10, 1010)는 표적 부위에 공여자 서열 (도 10, 1011)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 폴리뉴클레오타이드 내의 공여자 폴리뉴클레오타이드 서열의 혼입은 세포 내부에서 발생한다.

[0288] 도 11은 표적 폴리뉴클레오타이드의 니킹을 예시하며, 여기서 표적 결합 서열 (도 11, 1106) 내의 DNA 염기를 포함하는, Cas12 chRNA 가이드 분자 (도 11, 1102)와 복합체 형성된 Cas12 단백질 (도 11, 1101)은 PAM (도 11, 1104)을 포함하는 표적 폴리뉴클레오타이드 (도 11, 1103)와 결합하고, 표적 폴리뉴클레오타이드는 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체에 의해 표적 폴리뉴클레오타이드의 한 가닥에서만 니킹된다 (도 11, 1105).

[0289] 도 12는 표적 폴리뉴클레오타이드에서 엇갈린 이중 가닥 파손부를 생성하기 위한 2개의 니킹 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체의 사용을 예시하며, 여기서 제1 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 표적 폴리뉴클레오타이드 (도 12, 1201)의 상류 (즉, 5' 방향으로) 표적 서열과 결합하여 표적 폴리뉴클레오타이드 내에 제1 니크를 생성

하고 (도 12, 1202), 제2 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 표적 폴리뉴클레오티드 (도 12, 1203)의 하류 (즉, 3' 방향으로) 표적 서열과 결합하여 표적 폴리뉴클레오티드 내에 제2 Nick을 생성한다 (도 12, 1204). 탠덤 Nicking이 발생한 후, 절단 후 표적 폴리뉴클레오티드는 5' 오버행을 갖는 상류 (즉, 5' 방향으로) 가닥 (도 12, 1205) 및 하류 (즉, 3' 방향으로) 가닥 (도 12, 1206)을 포함한다. 공여자 폴리뉴클레오티드가 제공되고, 세포 DNA 복구 기구는 공여자 폴리뉴클레오티드 (도 12, 1208)를 사용하여 표적 폴리뉴클레오티드 (도 12, 1207)를 복구한다. 그 결과로 생성된 편집된 표적 폴리뉴클레오티드 (도 12, 1209)는 탠덤 Nick된 부위에 공여자 서열 (도 12, 1210)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적 폴리뉴클레오티드에서 엇갈린 DSB를 생성하기 위한 2개의 Nicking Cas12chRDNA 가이드/핵단백질 복합체의 사용은 세포 내부에서 발생한다.

[0290] 도 13은 DNA 염기에 순응하는 아시다미노코쿠스 종 (균주 BV3L6) Cas12a chRDNA 가이드 분자의 표적 결합 서열에서의 위치를 예시한다. y축은 표적 결합 서열 내의 단일 위치에서 DNA가 있는 다중 표적의 정규화된 퍼센트 편집 (실시에 5 참조)을 나타낸다 (오차 막대는 표준 편차를 나타낸다). x축은 표적 결합 서열 내의 각각의 위치의 위치 (5'에서 3')를 나타낸다. 표적 결합 서열은 그래프 위에 예시되며 (도 13, 1301), DNA 염기 활용의 바람직한 위치 (즉, 70% 초과)의 평균 정규화된 편집)는 회색으로 채워져 표시된다. Cas12a chRDNA 활성화 영역의 위치가 또한 표시된다 (도 13, 1302).

[0291] 도 14는 DNA 염기에 순응하는 아시다미노코쿠스 종 (균주 BV3L6) Cas12a chRDNA 가이드 분자의 활성화 영역에서의 위치를 예시한다 (실시에 8 참조). y축은 활성화 영역 내의 단일 위치에서 DNA가 있는 가이드 분자의 정규화된 퍼센트 편집을 나타낸다. x축은 활성화 영역 내의 각각의 위치의 위치 (5'에서 3')를 나타낸다. 활성화 영역은 그래프의 왼쪽에 예시되어 있으며 (도 14, 1401), DNA 염기 활용의 바람직한 위치 (즉, 70% 초과)의 평균 정규화된 편집)는 회색으로 채워져 표시된다. Cas12a chRDNA 가이드 표적 결합 서열의 위치가 또한 표시된다 (도 14, 1402).

[0292] 도 15A 및 도 15B는 Cas12a/chRDNA 핵단백질 복합체를 사용하여 조작된 CAR-T 세포의 유동 세포계수법 분석을 예시한다. 도 15A는 항-BCMA CAR (도 15A, 1501), TRAC 단백질 (도 15A, 1502) 및 B2M 단백질 (도 15A, 1503)을 발현하는 세포의 퍼센트를 보여준다. x축은 미처리된 세포 (도 15A, 1504), TRAC 및 B2M 유전자 둘 다를 표적으로 하는 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체로 형질감염된 세포 (도 15A, 1505), 및 TRAC 및 B2M 유전자 둘 다를 표적으로 하는 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체 둘 다로 형질감염되고 각각 항-BCMA CAR 및 B2M-HLA-E 융합 유전자를 코딩하는 DNA 공여자를 함유하는 2개의 바이러스로 형질도입된 세포 (도 15A, 1506)를 나타낸다. y축은 다양한 세포 표면 마커에 대해 유동 세포계수법을 통해 측정된 바와 같은 양성 세포 퍼센트를 나타낸다. 도 15B는 BCMA-양성 표적 세포주에 대한 항-BCMA, B2M-HLA-E CAR-T 세포 (회색 원) 및 대조군 TRAC KO T 세포 (흑색 원)에 대한 시험관내 세포독성 검정으로부터의 결과를 예시한다. y축은 표적 세포 사멸의 퍼센트를 나타내고, x축은 사용된 E:T 비율을 나타낸다. 각각의 데이터 포인트는 각각의 E:T 비율에서 3개의 공동-배양 웰의 평균을 나타낸다.

[0293] 도 16A 및 도 16B는 다중 링커 및 핵 국제화 서열 (NLS) 구성을 포함하는 Cas12a/chRDNA 핵단백질 복합체의 세포 편집 활성을 예시한다. 도 16A 및 도 16B 내의 그래프의 y축은 차세대 시퀀싱에 의해 측정된 바와 같은 편집 퍼센트를 나타낸다. 도 16A에서, x축은 각각의 링커-NLS 구성을 나타내며, 여기서 각각의 데이터 포인트는 반복 측정을 나타낸다. 도 16B에서, x축은 '비최적화된' 링커-NLS 구성 (도 16B, 1613) 뿐만 아니라 도 16A에 나타난 상위 4개의 링커-NLS 설계의 Cas12a 및 chRDNA 가이드의 pmol 농도 (20:60 또는 80:240 pmol)를 나타낸다. 각각의 데이터 포인트는 고유한 가이드 표적 서열을 나타내며 데이터 포인트당 3회 반복실험 측정의 평균이다.

[0294] 도 17은 단일 형질감염 반응에서 다중 Cas12a 가이드를 공동-전달할 때 GS-SV40 (도 7, 1708; 서열식별번호: 479) 및 (G4S)2-NPL (도 7, 1712; 서열식별번호: 489)과의 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체의 세포 편집 활성을 예시한다. 도 17의 y축은 차세대 시퀀싱에 의해 측정된 바와 같은 편집 퍼센트를 나타낸다. 도 17에서, x축은 표적 유전자를 TRAC 유전자 (도 17, 1701; 서열식별번호: 36), B2M 유전자 (도 17, 1702; 서열식별번호: 62), CISH 유전자 (도 17, 1703; 서열식별번호: 158) 또는 CBLB 유전자 (도 17, 1704; 서열식별번호: 171)로서 나타낸다. Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 형질감염당 단일 표적화 복합체 (도 17, 1705 및 도 17, 1709), 형질감염당 2개의 표적화 복합체 (도 17, 1706 및 도 17, 1710) 또는 형질감염당 4개의 표적 복합체 (도 17, 1707 및 도 17, 1711)로서 사용되었다. 각각의 막대는 2 내지 3회 반복실험의 평균을 나타낸다.

[0295] 테옥시리보뉴클레오티드 염기 및 임의로 부가의 변형 (예컨대 염기 유사체, 변형된 뉴클레오티드, 무염기 부위,

변형된 백본 잔기 또는 연결, 또는 그의 조합)이 설계될 수 있는 특정한 Cas12 chRDNA 가이드 분자를 설계하는 방법이 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Briner et al. (*Molecular Cell*, 2014, 56:333-339)]을 참조한다. 이를 위해, 표적화될 유전자에 대한 게놈 서열을 먼저 확인한다. 표적으로 하기 위해 선택한 유전자의 정확한 영역은 구체적 적용에 따라 다를 것이다. 예를 들어, CRISPR 활성화 또는 CRISPR 억제제를 사용하여 표적 유전자를 활성화 또는 억제하기 위해, Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 관심 유전자의 발현을 구동하는 프로모터에 표적화될 수 있다. 유전적 녹아웃의 경우, Cas12 chRDNA 가이드 분자는 대안적 스플라이싱으로 인해 mRNA로부터 표적화된 영역이 제거될 가능성을 감소시키기 위해, 5' 구성적으로 발현된 엑손을 표적으로 하도록 설계될 수 있다. N-말단 근처의 엑손은, 여기서 프레임시프트 돌연변이가 비기능적 단백질 산물의 생산 가능성을 증가시킬 것이기 때문에 표적이 될 수 있다. 대안적으로, 동족 Cas12 chRDNA 가이드 분자는 공지된 필수 단백질 도메인을 코딩하는 엑손을 표적으로 하도록 설계될 수 있다. 이와 관련하여, 비-프레임시프트 돌연변이, 예컨대 삽입 또는 결실은, 단백질 기능에 필수적인 단백질 도메인에서 발생할 때 단백질 기능을 변경시킬 가능성이 더 크다. HDR을 사용한 유전자 편집의 경우, 표적 서열이 원하는 편집 위치에 가까워야 한다. 이러한 경우, 편집이 필요한 위치를 확인하고 근처의 표적 서열을 선택한다.

[0296] 일부 실시양태에서, Cas12 chRDNA 가이드 분자는 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체가 Cas12 단백질의 절단 부위 외부와 결합할 수 있도록 설계될 수 있다. 이러한 경우, 표적 핵산은 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체와 상호작용하지 않을 수 있으며 표적 핵산을 절제할 수 있다 (예를 들어, Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체가 없음). 일부 실시양태에서, Cas12 chRDNA 가이드 분자는 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체가 Cas12 단백질의 절단 부위 내부와 결합할 수 있도록 설계될 수 있다. 이러한 경우, 표적 핵산은 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체와 상호작용할 수 있고 표적 핵산은 결합될 수 있다 (예를 들어, Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체와 결합된다).

[0297] Cas12 chRDNA 가이드 분자는 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체가 핵산 샘플 내의 복수 개의 위치와 혼성화할 수 있는 방식으로 설계될 수 있다. 복수 개의 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체가 핵산 샘플에 접촉될 수 있다. 복수 개의 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 동일한 서열과 혼성화하도록 설계된 Cas12 chRDNA 가이드 분자를 포함할 수 있다. 복수 개의 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 상이한 표적 서열과 혼성화하도록 설계된 Cas12 chRDNA 가이드 분자를 포함할 수 있다.

[0298] 표적 서열은 표적 핵산 내의 상이한 위치에 있을 수 있다. 위치는 동일하거나 유사한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 위치는 상이한 표적 핵산 서열을 포함할 수 있다. 위치는 서로의 거리에 따라 정의될 수 있다. 위치는 10 킬로염기 (Kb) 미만의 간격, 8 Kb 미만의 간격, 6 Kb 미만의 간격, 4 Kb 미만의 간격, 2 Kb 미만의 간격, 1 Kb 미만의 간격, 900개 뉴클레오타이드 미만의 간격, 800개 뉴클레오타이드 미만의 간격, 700개 뉴클레오타이드 미만의 간격, 600개 뉴클레오타이드 미만의 간격, 500개 뉴클레오타이드 미만의 간격, 400개 뉴클레오타이드 미만의 간격, 300개 뉴클레오타이드 미만의 간격, 200개 뉴클레오타이드 미만의 간격 또는 100개 뉴클레오타이드 미만의 간격 일 수 있다.

[0299] Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 표적 핵산을 절단할 수 있으며, 이로 인해 10 킬로염기 (Kb) 미만 길이, 8 Kb 미만 길이, 6 Kb 미만 길이, 4 Kb 미만 길이, 2 Kb 미만 길이, 1 Kb 미만 길이, 900개 뉴클레오타이드 미만 길이, 800개 뉴클레오타이드 미만 길이, 700개 뉴클레오타이드 미만 길이, 600개 뉴클레오타이드 미만 길이, 500개 뉴클레오타이드 미만 길이, 400개 뉴클레오타이드 미만 길이, 300개 뉴클레오타이드 미만 길이, 200개 뉴클레오타이드 미만 길이, 또는 100개 뉴클레오타이드 미만 길이일 수 있는 절제된 표적 핵산이 초래될 수 있다.

[0300] Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 10 킬로염기 (Kb) 미만 길이, 8 Kb 미만 길이, 6 Kb 미만 길이, 4 Kb 미만 길이, 2 Kb 미만 길이, 1 Kb 미만 길이, 900개 뉴클레오타이드 미만 길이, 800개 뉴클레오타이드 미만 길이, 700개 뉴클레오타이드 미만 길이, 600개 뉴클레오타이드 미만 길이, 500개 뉴클레오타이드 미만 길이, 400개 뉴클레오타이드 미만 길이, 300개 뉴클레오타이드 미만 길이, 200개 뉴클레오타이드 미만 길이, 또는 100개 뉴클레오타이드 미만 길이일 수 있는 단편화된 표적 핵산과 결합될 수 있다.

[0301] 본 개시내용의 Cas12 chRDNA 가이드 분자는 공지된 방법에 의해, 예컨대 용액 중에서 또는 고체 지지체 상에서 화학적으로 시험관내에서 합성될 수 있거나, 또는 일부 경우에, 재조합적으로 생산될 수 있다. 테옥시리보뉴클레오타이드 염기 및/또는 변형이 서열 길이 전체에 걸쳐 하나 이상의 위치에 도입될 수 있는 단일 생산 또는 합성 기술, 또는 생산 및 합성 기술의 조합이 이용될 수 있다.

[0302] 일부 실시양태에서, Cas12 chRDNA 가이드 분자, 그의 표적화 영역, 또는 그의 활성화 영역은 각각 리보뉴클레오타이드 염기로 구성된, 참조 Cas12 chRDNA 가이드 분자, 참조 표적화 영역 또는 참조 활성화 영역과 비교 시 특정

위치에서 테옥시리보뉴클레오티드 염기(들) (및/또는 변형된 테옥시리보뉴클레오티드 염기(들))를 함유하도록 설계된다.

[0303] 일부 실시양태에서, 참조 Cas12a chRDNA 가이드 분자는 하기 RNA 서열: UAAUUUCUACUCUUGUAGAGUCUCUCAGCUGGUACAC를 함유한다. 이러한 참조 RNA 서열에 기초하여 설계된, 본 개시내용의 Cas12a chRDNA 가이드 분자는 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40 중 하나 이상에 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 갖는 Cas12 chRDNA 가이드 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이들 열거된 위치 중 23개 이하, 22개 이하, 21개 이하, 20개 이하, 19개 이하, 18개 이하, 17개 이하, 16개 이하, 15개 이하, 14개 이하, 13개 이하, 12개 이하, 11개 이하, 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하 또는 1개는 테옥시리보뉴클레오티드 염기이다. 일부 실시양태에서, 표적화 영역 내의 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드 염기 모두는 표적 서열과 정규 염기쌍을 형성한다. 일부 실시양태에서, 표적화 영역 내의 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드 염기 중 적어도 하나는 표적 서열과 정규 염기쌍을 형성하지 않는다.

[0304] 일부 실시양태에서, 참조 Cas12a chRDNA 가이드 분자는 하기 RNA 서열: UAAUUUCUACUCUUGUAGAUAGUGGGGUGAAUUCAGUGU를 함유한다. 이러한 참조 RNA 서열에 기초하여 설계된, 본 개시내용의 Cas12 chRDNA 가이드 분자는 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 28, 29, 30, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 및 40 중 하나 이상에 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 갖는 Cas12a chRDNA 가이드 분자를 포함한다. 일부 실시양태에서, 이들 열거된 위치 중 23개 이하, 22개 이하, 21개 이하, 20개 이하, 19개 이하, 18개 이하, 17개 이하, 16개 이하, 15개 이하, 14개 이하, 13개 이하, 12개 이하, 11개 이하, 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하 또는 1개는 테옥시리보뉴클레오티드 염기이다. 일부 실시양태에서, 표적화 영역 내의 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드 염기 모두는 표적 서열과 정규 염기쌍을 형성한다. 일부 실시양태에서, 표적화 영역 내의 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드 염기 중 적어도 하나는 표적 서열과 정규 염기쌍을 형성하지 않는다.

[0305] 일부 실시양태에서, 참조 활성화 영역은 하기 RNA 서열: UAAUUUCUACUCUUGUAGAU를 함유한다. 이러한 참조 RNA 서열에 기초하여 설계된, 본 개시내용의 테옥시리보뉴클레오티드 염기-함유 활성화 영역은 위치 1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 및 19 중 하나 이상에 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 갖는 활성화 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이들 열거된 위치 중 11개 이하, 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개는 테옥시리보뉴클레오티드 염기이다.

[0306] 일부 실시양태에서, 참조 표적화 영역은 하기 RNA 서열: GAGUCUCUCAGCUGGUACAC를 함유한다. 이러한 참조 RNA 서열에 기초하여 설계된, 본 개시내용의 테옥시리보뉴클레오티드 염기-함유 표적화 영역은 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 하나 이상에 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 갖는 표적화 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이들 열거된 위치 중 12개 이하, 11개 이하, 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하 또는 1개는 테옥시리보뉴클레오티드 염기이다.

[0307] 일부 실시양태에서, 참조 표적화 영역은 하기 RNA 서열: AGUGGGGUGAAUUCAGUGU를 함유한다. 이러한 참조 RNA 서열에 기초하여 설계된, 본 개시내용의 테옥시리보뉴클레오티드 염기-함유 표적화 영역은 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20 중 하나 이상에 하나 이상의 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 갖는 표적화 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이들 열거된 위치 중 12개 이하, 11개 이하, 10개 이하, 9개 이하, 8개 이하, 7개 이하, 6개 이하, 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하, 또는 1개는 테옥시리보뉴클레오티드 염기이다.

[0308] 일부 실시양태에서, 활성화 영역은 서열 TrAArUrUrUCrUrACrUCrUTGrUrArGrArU (여기서 "r"은 리보뉴클레오티드 염기에 선행하고, 염기 앞에 "r"이 없으면 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 나타냄)를 갖는다.

[0309] 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 서열 GrArGrUrCrUrCrUrCrAGrCrUrGrGrUrArCrAC (여기서 "r"은 리보뉴클레오티드 염기에 선행하고, 염기 앞에 "r"이 없으면 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 나타냄)를 갖는다.

[0310] 일부 실시양태에서, 표적화 영역은 서열 ArGrUrGrGrGrGrUrGrArArUrUrCrArGrUrGT (여기서 "r"은 리보뉴클레오티드 염기에 선행하고, 염기 앞에 "r"이 없으면 테옥시리보뉴클레오티드 염기를 나타냄)를 갖는다.

[0311] 일부 실시양태에서, Cas12a chRDNA 가이드는 서열 TrAArUrUrUCrUrACrUCrUTGrUrArGrArUGrArGrUrCrUrCrUrCrAGrCrUrGrGrUrArCrAC (여기서 "r"은 리보뉴클레오티드 염

기에 선행하고, 염기 앞에 "r"이 없으면 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 나타냄)를 갖는다.

[0312] 일부 실시양태에서, Cas12a chRDNA 가이드는 서열 TrAArUrUrUCrUrACrUCrUTGrUrArGrArUArGrUrGrGrGrGrGrUrGrArArUrUrCrArGrUrGT (여기서 "r"은 리보뉴클레오타이드 염기에 선행하고, 염기 앞에 "r"이 없으면 데옥시리보뉴클레오타이드 염기를 나타냄)를 갖는다.

[0313] Cas12 단백질

[0314] 본 개시내용의 Cas12 단백질은 유형 V CRISPR-Cas 시스템으로부터 유래된 Cas12 야생형 단백질, 변형된 Cas12 단백질, Cas12 단백질의 변이체, Cas12 오르토로그, 및 그의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, Cas12 단백질은 야생형 Cas12a 단백질, 변형된 Cas12a 단백질, Cas12a 단백질의 변이체, Cas12a 오르토로그 또는 그의 조합이다.

[0315] Cas12 단백질은 변형될 수 있다. 변형은 아미노산에 대한 변형을 포함할 수 있다. 변형은 또한 1차 아미노산 서열 및/또는 2차, 3차 및/또는 4차 아미노산 구조를 변경할 수 있다. 일부 실시양태에서, Cas12 단백질의 하나 이상의 아미노산 서열은 Cas12 단백질의 구조 또는 기능에 상당한 영향을 미치지 않으면서 변할 수 있다. 단백질의 일부 영역 (예를 들어, 중요하지 않은 영역)에서 변경이 발생하는 경우 돌연변이의 유형은 관련이 없을 수 있다. 대체 위치에 따라, 돌연변이는 그 결과로 생성되는 변이체의 생물학적 특성에 큰 영향을 미치지 않을 수 있다. 예를 들어, 특정 Cas12 변이체의 특성 및 기능은 야생형 Cas12의 특성 및 기능과 동일한 유형일 수 있다.

[0316] 일부 경우에, 돌연변이가 Cas12 단백질의 구조 및/또는 기능에 결정적으로 영향을 미칠 수 있는지 여부는 서열 및/또는 구조적 정렬을 사용하여 결정될 수 있다. 서열 정렬은 유사하고/하거나 상이한 (예를 들어, 보존된, 보존되지 않은, 소수성, 친수성 등) 폴리펩티드의 영역을 확인할 수 있다. 일부 경우에, 다른 서열과 유사한 관심 서열 내의 영역이 변형에 적합하다. 다른 경우에, 다른 서열과 상이한 관심 서열 내의 영역이 변형에 적합하다. 예를 들어, 서열 정렬은 데이터베이스 검색, 쌍별 정렬, 다중 서열 정렬, 계통 분석, 모티프 찾기, 벤치마킹, 및/또는 BLAST, CS-BLAST, HHPRED, psi-BLAST, LALIGN, PyMOL, 및 SEQALIGN과 같은 프로그램에 의해 수행될 수 있다. 구조적 정렬은 Dali, PHYRE, 키메라, COOT, O 및 PyMOL과 같은 프로그램에 의해 수행될 수 있다. 정렬은 데이터베이스 검색, 쌍별 정렬, 다중 서열 정렬, 계통 분석, 모티프 찾기 또는 벤치마킹, 또는 그의 임의의 조합에 의해 수행될 수 있다.

[0317] Cas12 단백질은 전형적으로 REC1, REC2, PAM 상호작용 (PI), 뉴클레아제 (Nuc), 웨지 (WED) 및 RuvC 도메인에 상응하는 6개의 도메인으로 이루어진다. 예를 들어, 문헌 [Yamano et al. (*Cell*, 2016, 165(4):949-962)]을 참조한다. WED 도메인 및 RuvC 도메인은 다른 도메인으로부터의 서열에 의해 중단되는 3자 서열 아키텍처를 가질 수 있다. 예를 들어, 아시다미노코쿠스 중 Cas12a WED 도메인 서열은 REC1, REC2 및 PI 도메인 서열에 의해 중단된다. 부가적으로, Cas12 단백질의 특정 하위유형은 RuvC 도메인 서열에 인접하거나 그 사이에 발생하는 브릿지 나선 도메인을 함유한다.

[0318] Cas12 단백질의 영역은 이러한 Cas12 단백질의 활성을 조정하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, PI 도메인 (598-718) 및 WED 도메인 (526-597 및 719-883)의 잔기에 상응하는 아시다미노코쿠스 중 (균주 BV3L6) Cas12a 단백질의 영역을 변형시켜 PAM 특이성을 변경할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Toth et al. (*Nucleic Acid Research*, 2020, 48(7):3722-3733)]을 참조한다. REC1 (24-319) 및 REC2 (320-526) 도메인의 잔기에 상응하는 아시다미노코쿠스 중 (균주 BV3L6) Cas12a 단백질의 영역을 변형시켜 표적 개입 및 절단 동역학을 변경할 수 있다. REC1 (226-304) 및 REC2 (368-435) 도메인의 영역은 표적 결합 서열 및 표적 서열의 PAM 원위 단부와 직접 상호작용하고, 표적 서열 절단의 효율을 변형하도록 조작될 수 있다. Nuc 도메인 (1066-1261) 및 RuvC 도메인 (940-956, 957-1065 및 1261-1307)의 영역을 변형시켜 표적 서열의 표적 가닥, 비-표적 가닥, 또는 표적 가닥과 비-표적 가닥의 절단 효율을 변경할 수 있다. 이러한 영역을 조작하는 것은 돌연변이를 도입하는 것, 다른 Cas12 오르토로그로부터의 상응하는 영역으로 대체하는 것, 결실, 삽입 등을 포함할 수 있다.

[0319] 변형된 Cas12 단백질은 Cas12 단백질의 활성 또는 특이성을 변경하기 위해 Cas12 chRDNA 가이드 분자와 조합하여 사용될 수 있다. 일부 경우에, Cas12 단백질은 Cas12 chRDNA 가이드 분자와 복합체 형성될 때 증진된 활성 또는 특이성을 제공하도록 변형될 수 있으며, 여기서 Cas12 변형은 REC1, REC2, RuvC, WED 및/또는 Nuc 도메인 (들)에서 발생한다. 일부 경우에, Cas12 단백질은 Cas12 chRDNA 가이드 분자와 복합체 형성될 때 증진된 활성 또는 특이성을 제공하도록 변형될 수 있으며, 여기서 Cas12a 변형은 영역 226-304, 368-435, 940-956, 978-1158, 1159-1180, 및 1181-1298 (아시다미노코쿠스 중 Cas12a 서열을 기반으로 한 numbering)에서 발생한다.

- [0320] 그러한 돌연변이는 부위-지정 돌연변이 유발에 의해 생산될 수 있다. 돌연변이는 치환, 부가, 결실 또는 그의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 돌연변이는 돌연변이된 아미노산을 알라닌으로 전환시킨다. 다른 경우에, 돌연변이는 돌연변이된 아미노산을 또 다른 아미노산 (예를 들어, 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 발린, 류신, 이소류신, 메티오닌, 프롤린, 페닐알라닌, 티로신, 트립토판, 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴, 글루타민, 히스티딘, 리신 또는 아르기닌)으로 전환시킨다. 돌연변이는 돌연변이된 아미노산을 비-자연 아미노산 (예를 들어, 셀레노메티오닌)으로 전환시킬 수 있다. 돌연변이는 돌연변이된 아미노산을 아미노산 모방체 (예를 들어, 포스포모방체)로 전환시킬 수 있다. 돌연변이는 보존적 돌연변이일 수 있다. 예를 들어, 돌연변이는 돌연변이된 아미노산을, 이러한 돌연변이된 아미노산의 크기, 모양, 전하, 극성, 입체형태 및/또는 로타머가 유사한 아미노산으로 전환시킬 수 있다 (예를 들어, 시스테인/세린 돌연변이, 리신/아스파라긴 돌연변이, 히스티딘/페닐알라닌 돌연변이).
- [0321] 일부 실시양태에서, Cas12 단백질은 nCas12 단백질이다. nCas12 단백질은 "닉킹 Cas12" 또는 "Cas12-니카제"라고도 하는 뉴클레아제 결핍인 Cas12 단백질의 변이체이다. 이러한 분자는 엔도뉴클레아제 활성의 일부분이 결여되므로, 표적 핵산의 한 가닥만 닉킹할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Jinek et al. (*Science*, 2012, 337:816-821)]을 참조한다. 이는, 예를 들어, RuvC 뉴클레아제 도메인에 돌연변이(들)를 도입함으로써 달성될 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적 예는 예프. 노비시다(*F. novicida*) Cas12a 단백질의 RuvC 뉴클레아제 도메인에 대한 D917A, E1006A 및 D1225A를 포함할 수 있다. RuvC 뉴클레아제 도메인의 활성을 감소시키기 위한 다른 촉매 잔기의 돌연변이가 또한 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 수행될 수 있는 것으로 이해된다. 그 결과로 생성된 nCas12 단백질은 이중 가닥 DNA를 절단할 수 없지만 가이드 분자와 복합체를 형성하고, 표적 DNA 서열과 결합하며 표적 DNA의 한 가닥만 닉킹할 수 있는 능력은 유지한다. 표적화 특이성은 PAM 서열에 대한 Cas12 단백질 결합 및 게놈 로커스에 대한 가이드 분자의 상보적 염기쌍 형성에 의해 결정된다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서, nCas12 단백질은 nCas12a 단백질이다.
- [0322] 일부 실시양태에서, Cas12 단백질은 dCas12 단백질이다. dCas12 단백질은 "촉매적으로 불활성인 Cas12 단백질", "효소적으로 불활성인 Cas12", "촉매적으로 죽은 Cas12" 또는 "죽은 Cas12"라고도 하는, 뉴클레아제-불활성화된 Cas12 단백질의 변이체이다. 이러한 분자는 엔도뉴클레아제 활성이 결여되므로, RNA-가이드된 방식으로 유전자를 조절하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Jinek et al. (*Science*, 2012, 337:816-821)]을 참조한다. RuvC 도메인의 활성을 제거하기 위한 촉매 잔기의 돌연변이는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 수행될 수 있다. 그 결과로 생성된 dCas12 단백질은 이중 가닥 DNA를 절단할 수 없지만 가이드 분자와 복합체를 형성하고 표적 DNA 서열과 결합할 수 있는 능력은 유지한다. 표적화 특이성은 PAM 서열에 대한 Cas12 단백질 결합 및 게놈 로커스에 대한 가이드 분자의 상보적 염기쌍 형성에 의해 결정된다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서, dCas12 단백질은 dCas12a 단백질이다.
- [0323] 특정 Cas12 단백질 하위유형은 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인의 불활성화 또는 RuvC-유사 뉴클레아제 도메인의 일부 또는 전부의 부재로 인해 뉴클레아제 활성이 결여된다. 이러한 하위유형 중 하나인 유형 V-K 및 연관 단백질 Cas12k는 대신, Tn7-유사 전이 요소인 *tnsB*, *tnsC*, *tniQ*와 연합된다. 예를 들어, 문헌 [Strecker et al. (*Science*, 2019, 364(6448):48-53)]을 참조한다. Cas12k는 가이드 분자와 복합체를 형성하고 표적 DNA 서열과 결합할 수 있는 능력을 보유하고 있으며, 연관된 Tn7-유사 단백질은 DNA 서열의 RNA-가이드된 전위를 용이하게 한다. 본 개시내용의 일부 실시양태에서, Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 Cas12k chRDNA 가이드/핵단백질 복합체이다.
- [0324] 다른 아미노산 변경은 글리코실화된 형태를 갖는 아미노산, 다른 분자와의 집합적 접합체, 및 관련되지 않은 화학적 모이어티 (예를 들어, 페길화된 분자)를 갖는 공유 접합체를 포함할 수 있다. 공유 변이체는 아미노산 쇄 또는 N- 또는 C-말단 잔기에서 발견되는 기에 기능을 연결함으로써 제조될 수 있다. 일부 경우에, 돌연변이된 부위-지정 폴리펩티드는 또한 대립유전자 변이체 및 중 변이체를 포함할 수 있다.
- [0325] 특정 실시양태에서, Cas12 단백질은 Cas12 단백질로부터의 제1 도메인, 및 상이한 단백질, 예컨대 Csy4 단백질로부터의 제2 도메인을 함유하는 융합 또는 키메라 단백질일 수 있다. Cas12 단백질에 대한 융합 변형은 변형된 Cas12 단백질에 부가의 활성을 부여할 수 있다. 이러한 활성은 뉴클레아제 활성, 메틸트랜스퍼라제 활성, 데메틸라제 활성, DNA 복구 활성, DNA 손상 활성, 탈아미노화 활성, 디스뮤타제 활성, 알킬화 활성, 탈퓨린화 활성, 산화 활성, 피리미딘 이량체 형성 활성, 인테그라제 활성, 트랜스포사제 활성, 리컴비나제 활성, 폴리머라제 활성, 리가제 활성, 헬리카제 활성, 포토리아제 활성, 글리코실라제 활성, 아세틸트랜스퍼라제 활성, 데아세틸라제 활성, 키나제 활성, 포스포타제 활성, 유비퀴틴 리가제 활성, 역전사효소 활성, 탈유비퀴틴화 활성, 아데닐화 활성, 탈아데닐화 활성, SUMO화 활성, 탈SUMO화 활성, 리보실화 활성, 탈리보실화 활성, 및/또는 핵산

표적 서열과 연합된 폴리펩티드 (예를 들어, 히스톤)를 변형시키는 미리스토일화 활성 또는 탈미리스토일화 활성을 포함할 수 있다.

- [0326] 특정 실시양태에서, Cas12 단백질은 하나 이상의 NLS 서열 (예를 들어, Cas12 단백질 서열에 부속되고/되거나 이러한 서열 내에 삽입됨)을 함유할 수 있다. NLS 서열은, 예를 들어, Cas12 단백질 (예컨대 Cas12a 단백질)의 N-말단, C-말단, 또는 그 안에 내부적으로 위치할 수 있으며, 그의 조합 (예를 들어, N-말단에 하나 이상의 NLS가 위치하고 C-말단에 하나 이상의 NLS가 위치함)을 포함한다.
- [0327] 특정 실시양태에서, Cas12a 단백질을 포함한 Cas12 단백질은 복수 개의 NLS 서열, 예컨대 예를 들어, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개 또는 적어도 5개의 NLS 서열을 함유할 수 있다. 복수 개의 NLS 서열은 Cas12a 단백질의 단일 말단에 존재할 수 있거나 (예를 들어, NLS 서열은 N-말단에만 존재하거나 C-말단에만 존재함), 양쪽 말단에 존재할 수 있다 (예를 들어, N-말단에 하나 이상의 NLS 서열이 존재하고 C-말단에 하나 이상의 NLS 서열이 존재함). NLS 서열은 완전히 합성되거나, 변형되거나, 또는 내인성 또는 외인성 단백질 서열로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, Cas12a 단백질을 포함한 Cas12 단백질은 SV40 대형 T-항원, 뉴클레오플라스민, 53BP1, VACM-1/CUL5, CXCR4, VP1, ING4, IER5, ERK5, UL79, EWS, Hrp1, cMyc (1), cMyc (2), 마우스 c-able IV, Mat α2 및 MINIYO로부터 선택된 NLS 서열, 또는 이러한 NLS 서열로부터 변형되거나 유래된 NLS 서열을 함유할 수 있다.
- [0328] 일부 실시양태에서, Cas12a 단백질을 포함한 Cas12 단백질은 서열식별번호: 04, 05, 및 493-507 중 임의의 것으로부터 선택된 NLS 서열, 또는 이러한 NLS 서열로부터 변형되거나 유래된 NLS 서열을 함유할 수 있다. 변형되거나 유래된 NLS 서열은 참조 NLS 서열 (예를 들어, 서열식별번호: 04, 05 및 493-507 중 임의의 것으로부터 선택된 NLS 서열)과 관련하여, 예를 들어: 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하 또는 1개의 아미노산 치환; 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하 또는 1개의 아미노산 결실; 및/또는 5개 이하, 4개 이하, 3개 이하, 2개 이하 또는 1개의 아미노산 부가를 함유할 수 있다.
- [0329] 일부 실시양태에서, NLS 서열은, 예를 들어, 서열식별번호: 04, 05 및 493-507 중 임의의 것으로부터 선택된 NLS 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 가질 수 있다.
- [0330] NLS 서열은 직접적으로 또는 링커 폴리펩티드를 통해 (예를 들어, Cas12 단백질에, 또 다른 NLS 서열(들)에, 또는 Cas12 단백질에 부착된 융합 펩티드 서열에) 공유 부착될 수 있다. 링커 서열의 길이는 특정한 Cas12 단백질의 구조적 특징 (예를 들어, 말단의 용매 접근성, 말단에 다른 중요한 기능적 펩티드 서열의 존재 등)에 따라 최적화되어 동족 임포트인 단백질 결합 및 트래피킹을 위한 NLS 서열의 접근성을 보장할 수 있다. 부가적으로, 본원의 실시예 11에 기재된 바와 같이, 바람직한 링커 길이에 대해 경험적으로 스크리닝하는 것이 가능하다.
- [0331] 일부 실시양태에서, NLS 서열은 하나 이상의 아미노산을 포함하는 링커 서열을 통해 (예를 들어, Cas12 단백질에, 또 다른 NLS 서열(들)에, 또는 Cas12 단백질에 부착된 융합 펩티드 서열에) 공유 부착된다. 일부 실시양태에서, 링커 서열은 적어도 하나의 글리신, 세린 및/또는 트레오닌 잔기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 링커 서열은 적어도 하나의 글리신 잔기 및 적어도 하나의 세린 잔기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 링커 서열은 복수 개의 글리신 잔기 및 적어도 하나의 세린 잔기를 함유한다. 일부 실시양태에서, 링커 서열은 GS 서열로 이루어지거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커 서열은 GGGGS 서열로 이루어지거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커 서열은 GGGSGGGGS 서열로 이루어지거나 또는 이를 포함한다.
- [0332] 일부 실시양태에서, Cas12a 단백질은 C-말단에 적어도 하나의 링커 서열 및 적어도 하나의 NLS 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 NLS 서열은 SV40 대형 T-항원 및 뉴클레오플라스민, 또는 그로부터 변형되거나 유래된 서열로부터 선택된다.
- [0333] 특정 실시양태에서, Cas12a 단백질은 C-말단에 GGGSGGGGS 링커 서열 및 뉴클레오플라스민 NLS 서열을 포함하며, 여기서 뉴클레오플라스민 NLS 서열은 GGGSGGGGS 링커 서열의 C-말단 측에 위치한다.
- [0334] 특정 실시양태에서, Cas12a 단백질은 C-말단에 적어도 하나의 GS 링커 서열, SV40 대형 T-항원 NLS 서열, 및 뉴클레오플라스민 NLS 서열을 포함하며, 여기서 뉴클레오플라스민 NLS 서열은 SV40 대형 T-항원 NLS 서열의 C-말단 측에 위치한다. 그의 일부 실시양태에서, 제1 GS 링커 서열은 SV40 대형 T-항원 NLS 서열의 N-말단 측에 존재하고, 제2 GS 링커 서열은 SV40 대형 T-항원 NLS 서열과 뉴클레오플라스민 NLS 서열 사이에 존재한다.
- [0335] 특정 실시양태에서, Cas12a 단백질은 C-말단에 GS 링커 서열, GGGSGGGGS 링커 서열, SV40 대형 T-항원 NLS 서열, 및 뉴클레오플라스민 NLS 서열을 포함하며, 여기서 뉴클레오플라스민 NLS 서열은 SV40 대형 T-항원 NLS 서

열의 C-말단 측에 위치한다. 그의 일부 실시양태에서, GGGGSGGGGS 링커 서열은 SV40 대형 T-항원 NLS 서열의 N-말단 측에 존재하고, GS 링커 서열은 SV40 대형 T-항원 NLS 서열과 뉴클레오플라스민 NLS 서열 사이에 존재한다.

[0336] 특정 실시양태에서, Cas12a 단백질은 C-말단에 GGGGSGGGGS 링커 서열 및 SV40 대형 T-항원 NLS 서열을 포함하며, 여기서 SV40 대형 T-항원 NLS 서열은 GGGGSGGGGS 링커 서열의 C-말단 측에 위치한다.

[0337] 일부 실시양태에서, Cas12a 단백질은 C-말단에 링커- 및 NLS-함유 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 이러한 링커- 및 NLS-함유 서열은 서열식별번호: 479-490으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 링커- 및 NLS-함유 서열은 서열식별번호: 479-490으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0338] 동족 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 또한 관련 기술분야에 널리 공지된 방법을 사용하여 생산될 수 있다. Cas12 단백질 성분은 재조합적으로 생산될 수 있으며, 이후 Cas12 chRDNA 가이드 분자 및 Cas12 단백질은 관련 기술분야에 공지된 방법을 사용하여 함께 복합체 형성될 수 있다. 예를 들어, 가이드 분자/Cas12 단백질을 포함하는 핵단백질 복합체를 어셈블리하는 방법의 비-제한적인 예를 제공하는 실시예 2를 참조한다.

[0339] 부가적으로, Cas12 단백질을 구성적으로 발현하는 세포주가 개발될 수 있고 Cas12 chRDNA 가이드 성분으로 형질 감염될 수 있으며, 복합체는 표준 정제 기술, 예컨대 친화도, 이온 교환 및 크기 배제 크로마토그래피 (단, 이에 제한되지는 않음)를 사용하여 세포로부터 정제될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Jinek et al. (*Science*, 2012, 337:816-821)]을 참조한다.

[0340] 공지된 방법에 따르면, Cas12 단백질을 코딩하는 발현 카세트를 사용하여 Cas12 단백질을 생산할 수 있다. 발현 카세트는 전형적으로 이들이 도입되는 숙주 세포에서 기능적인 조절 서열을 포함한다. 조절 서열은 하기: 전사의 조절, 전사 후 조절 및 번역의 조절 중 하나 이상에 관여한다. 발현 카세트는 발현 벡터에 존재할 수 있으며, 박테리아 세포, 효모 세포, 식물 세포 및 포유동물 세포를 포함한 매우 다양한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.

[0341] Cas12 단백질은 Cas12 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 (발현 벡터 포함)에서 생산될 수 있다. Cas12 단백질 생산에 유용한 벡터는 플라스미드, 바이러스 (파지 포함) 및 통합 가능한 핵산 단편 (즉, 상동 재조합에 의해 숙주 게놈에 통합될 수 있는 단편)을 포함한다. 벡터는 숙주 게놈과 독립적으로 복제 및 기능하거나, 일부 경우에 게놈 자체에 통합될 수 있다. 적합한 복제 벡터는 의도된 발현 숙주 세포와 양립되는 종으로부터 유래된 레플리콘 및 제어 서열을 함유할 것이다. 일부 실시양태에서, Cas12 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 유도성 프로모터, 억제성 프로모터 또는 구성적 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 발현 벡터는 또한 단백질 태그 (예를 들어, 폴리-His 태그, 헤마글루티닌 태그, 형광 단백질 태그, 생물발광 태그, 핵 국재화 태그)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 이러한 단백질 태그에 대한 코딩 서열은 코딩 서열에 융합될 수 있거나, 또는 발현 카세트, 예를 들어 표적화 벡터에 포함될 수 있다.

[0342] 발현 벡터의 구축을 위한 일반적인 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 대부분의 숙주 세포에 대한 발현 벡터는 상업적으로 입수 가능하다. 적절한 벡터의 선택 및 그의 구축, 예컨대 곤충 세포에서 곤충 세포 형질전환 및 유전자 발현을 위한 곤충 세포 벡터, 박테리아 세포에서 박테리아 형질전환 및 유전자 발현을 위한 박테리아 플라스미드, 효모 및 기타 진균에서 세포 형질전환 및 유전자 발현을 위한 효모 플라스미드, 포유동물 세포 또는 포유동물에서 포유동물 세포 형질전환 및 유전자 발현을 위한 포유동물 벡터, 세포 형질전환 및 유전자 발현을 위한 바이러스 벡터 (레트로바이러스, 렌티바이러스 및 아데노바이러스 벡터 포함), 및 그러한 폴리뉴클레오티드의 클로닝을 쉽게 가능하게 하는 방법을 용이하게 하도록 설계된 몇 가지 상업적 소프트웨어 제품이 있다. 예를 들어 스냅진(SnapGene)TM [GSL 바이오텍(Biotech) LLC; 미국 일리노이주 시카고; snapgene.com/resources/plasmid_files/your_time_is_valuable/]은 벡터, 개별 벡터 서열 및 벡터 맵의 광범위한 목록 뿐만 아니라 많은 벡터에 대한 상업적 공급원을 제공한다. 사용하기에 적합한 다수의 포유동물 벡터가 상업적으로 입수 가능하다 [예를 들어, 라이프 테크놀로지스 (Life Technologies; 미국 뉴욕주 그랜다아일랜드); 네오바이오랩 (NeoBiolab; 미국 매사추세츠주 케임브리지); 프로메가 (Promega; 미국 위스콘신주 매디슨); ATUM (미국 캘리포니아주 멘로 파크); 애드젠 (Addgene; 미국 매사추세츠주 케임브리지)로부터 입수 가능함].

[0343] 포유동물 바이러스로부터 유래된 벡터는 또한 포유동물 세포에서 본 방법의 Cas12 단백질 성분을 발현하기 위해

사용될 수 있다. 이는 바이러스, 예컨대 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스, 파코바이러스, 헤르페스바이러스, 폴리오마바이러스, 시토크로바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 백시니아 및 유인원 바이러스 40 (SV40)으로부터 유래된 벡터를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Kaufman et al. (*Mol. Biotech.*, 2000, 16:151-160); and Cooray et al. (*Methods Enzymol.*, 2012, 507:29-57)]을 참조한다. Cas12 단백질-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 서열은 활성화제 결합 서열, 인핸서, 인트론, 폴리아데닐화 인식 서열, 프로모터, 억제인자 결합 서열, 스템-루프 구조, 번역 개시 서열, 번역 리더 서열, 전사 종결 서열, 번역 종결 서열, 프라이머 결합 부위 등을 포함할 수 있다. 통상적으로 사용되는 프로모터는 구성적 포유동물 프로모터 CMV, MND, EF1a, SV40, PGK1 (마우스 또는 인간), Ubc, CAG, CaMKIIa 및 베타-Act이며, 또한 기타 프로모터가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Khan et al. (*Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2013, 3:257-263)]을 참조한다. 더욱이, H1 및 U6을 포함한 포유동물 RNA 폴리머라제 III 프로모터가 사용될 수 있다.

[0344] HEK 293 (인간 배아 신장) 및 CHO (차이니스 햄스터 난소)를 포함한 수많은 포유동물 세포주가 유전자 산물의 발현에 활용되었다. 이들 세포주는 표준 방법 (예를 들어, 인산칼슘 또는 폴리에틸렌이민 (PEI) 또는 전기천공 사용)에 의해 형질감염될 수 있다. 다른 전형적인 포유동물 세포주는 HeLa, U2OS, 549, HT1080, CAD, P19, NIH 3T3, L929, N2a, 인간 배아 신장 293 세포, MCF-7, Y79, SO-Rb50, Hep G2, DUKX-X11, J558L, 및 새끼 햄스터 신장 (BHK) 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 이러한 세포는 Cas12 단백질을 생산하는데 사용될 수 있는 세포의 예이다.

[0345] 벡터는 원핵생물에 도입되어 전파될 수 있다. 원핵 벡터는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 전형적으로, 원핵 벡터는 표적 숙주 세포에 적합한 복제 기점 [예를 들어, 이. 콜라이(*E. coli*)로부터 유래된 oriC, pBR322로부터 유래된 pUC, 살모넬라(*Salmonella*)로부터 유래된 pSC101], 15A 기원 (p15A로부터 유래됨) 및 박테리아 인공 염색체를 포함한다. 벡터는 선택 가능한 마커 (예를 들어, 암피실린, 클로람페니콜, 겐타마이신 및 카나마이신에 대한 내성을 코딩하는 유전자)를 포함할 수 있다. 제오신(Zeocin)TM (라이프 테크놀로지스; 미국 뉴욕주 그랜다일랜드)이 박테리아, 진균 (효모 포함), 식물 및 포유동물 세포주에서의 선별에 사용될 수 있다. 따라서, 다수의 유기체에서 선택 작업을 위해 제오신TM에 대한 단 하나의 약물 내성 유전자를 보유하는 벡터를 설계할 수 있다. 원핵생물에서 단백질 발현에 유용한 프로모터, 예를 들어 T5, T7, 람노스 (유도성), 아라비노스 (유도성) 및 PhoA (유도성)가 공지되어 있다. 더욱이, T7 프로모터는 T7 RNA 폴리머라제를 코딩하는 벡터에도 널리 사용된다. 원핵 벡터는 또한 다양한 강도의 리보솜 결합 부위 및 분비 신호 (예를 들어, mal, sec, tat, ompC 및 pelB)를 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 NATNA의 발현을 위한 RNA 폴리머라제 프로모터를 포함할 수 있다. 원핵 RNA 폴리머라제 전사 종결 서열이 또한 널리 공지되어 있다 [예를 들어, 에스. 피오게네스(*S. pyogenes*)로부터의 전사 종결 서열].

[0346] 원핵생물에서의 단백질의 발현은 융합 또는 비-융합 단백질의 발현을 지시하는 구성적 또는 유도성 프로모터를 함유하는 벡터를 사용하여 이. 콜라이에서 자주 수행된다. 그러나, 다른 원핵 시스템을 사용한 단백질 발현이 본 개시내용의 범주 내에 있다.

[0347] 일부 실시양태에서, 벡터는 효모 발현 벡터이다. 사카로미세스 세레비지아에(*Saccharomyces cerevisiae*)에서 발현하기 위한 벡터의 예는 하기를 포함하나, 그에 제한되지는 않는다: pYepSec1, pMfa, pJRY88, pYES2, 및 picZ. 효모 세포에서의 유전자 발현을 위한 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Christine Guthrie and Gerald R. Fink ("Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part A" in *Methods in Enzymology*, 2004, Volume 194, Elsevier Academic Press, San Diego, CA)]을 참조한다. 전형적으로, 효모에서의 단백질-코딩 유전자의 발현은 관심 코딩 영역 및 전사 종결인자에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 필요로 한다. 다양한 효모 프로모터를 사용하여 효모에서의 유전자 발현을 위한 발현 카세트를 구축할 수 있다.

[0348] **Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용한 세포의 개능 편집**

[0349] 본 개시내용의 Cas12 chRNA 가이드 분자, Cas12 단백질 및 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체의 세포로의 시험관내, 생체의 또는 생체내 전달은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다수의 방법에 의해 달성될 수 있다. 이들 성분을 세포에 도입하는 비-제한적 방법은 바이러스 벡터 전달, 초음파천공, 세포 압착, 전기천공, 뉴클레오펙션, 리포펙션, 입자 총 기술, 미세발사체 충격 또는 화학물질 (예를 들어, 세포 투과 펩티드)을 포함한다.

[0350] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 Cas12 chRNA 가이드 분자를 세포에 전달하기 위해 전기천공이 사용될 수 있다. 전기천공은 또한 본 개시내용의 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체를 전달하기 위해 사용될 수 있다.

이러한 방법에서, chRNA 가이드 분자 또는 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 표적 세포와 함께 전기천공 완충액에서 혼합되어 현탁액을 형성한다. 그런 다음 이러한 현탁액에 최적화된 전압의 전기 펄스를 가하여, 세포막의 인지질 이중 층에 일시적인 기공을 생성하여 하전된 분자 (예컨대 핵산 및 단백질)가 기공을 통해 구동되어 세포 내로 유입되도록 한다. 전기천공을 수행하기 위한 시약 및 장비는 상업적으로 판매된다.

[0351] 실시예 3은 Cas12 가이드/핵단백질 복합체를 사용한 활성화된 T 세포의 뉴클레오펙션을 예시한다. 실시예 5는 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용한 활성화된 T 세포의 뉴클레오펙션을 예시한다.

[0352] Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 표적 핵산을 절단하거나 그와 결합하는데 사용될 수 있다. Cas12 chRNA 가이드 분자는 Cas12 단백질과 함께 세포에 도입됨으로써, Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체를 형성할 수 있다. Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 표적 핵산과 혼성화할 수 있으며, 여기서 표적 핵산은 PAM을 포함한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 세포 내로의 도입을 위한 하나 이상의 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체를 제공하는 단계, 및 Cas12 핵단백질 복합체(들)를 세포 내로 전달함으로써, Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체(들)와 표적 폴리뉴클레오티드 서열의 접촉을 용이하게 하는 단계를 포함하는, 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 이중 가닥 DNA (dsDNA)) 내의 핵산 표적 서열을 결합시키는 방법을 포괄한다. 한 실시양태에서, 제1 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 폴리뉴클레오티드 내의 제1 핵산 표적 서열에 상보적인 제1 표적화 영역 요소를 갖는 Cas12 chRNA 가이드 분자를 포함하며; 제2 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 폴리뉴클레오티드 내의 제2 핵산 표적 서열에 상보적인 제2 표적화 영역을 갖는 Cas12 chRNA 가이드 분자를 포함한다. Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체와 폴리뉴클레오티드의 접촉은 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체를 폴리뉴클레오티드 내의 핵산 표적 서열과 결합시킨다. 한 실시양태에서, 제1 Cas12a chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 제1 핵산 표적 서열과 결합하며; 제2 Cas12a chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 폴리뉴클레오티드 내의 제2 핵산 표적 서열과 결합한다.

[0353] 핵산 표적 서열을 결합시키는 이러한 방법은 시험관내 (예를 들어, 생화학적 반응에서 또는 배양된 세포에서; 일부 실시양태에서, 배양된 세포는 배양액에 남아 있고 인간에게 도입되지 않은 인간 배양된 세포임); 생체내 (예를 들어, 살아있는 유기체의 세포 내에서, 단 일부 실시양태에서, 유기체는 비-인간 유기체임); 또는 생체외 (예를 들어, 대상체로부터 제거된 세포, 단 일부 실시양태에서 대상체는 비-인간 대상체임)에서 수행될 수 있다.

[0354] 본 개시내용의 Cas12 chRNA 가이드 분자, Cas12 단백질 및 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체의 세포로의 전달은 이들 성분을 생물학적 구획으로 패키징함으로써 달성될 수 있다. 성분을 포함하는 생물학적 구획은 생체내 (예를 들어, 살아있는 유기체의 세포에서, 단 일부 실시양태에서, 유기체는 비-인간 유기체임) 투여될 수 있다. 생물학적 구획은 바이러스 (렌티바이러스, 아데노바이러스), 나노구, 리포솜, 양자점, 나노입자, 마이크로입자, 나노캡슐, 소포, 폴리에틸렌 글리콜 입자, 히드로겔 및 미셀을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0355] 예를 들어, 생물학적 구획은 리포솜을 포함할 수 있다. 리포솜은 하나 이상의 지질 이중 층을 포함하는 자기-어셈블리 구조일 수 있으며, 이들 각각은 반대 방향으로 배향된 양친매성 지질 분자를 함유하는 2개의 단일층을 포함할 수 있다. 양친매성 지질은 하나 또는 둘 이상의 비-극성 (소수성) 아실 또는 알킬 쇠에 공유 연결된 극성 (친수성) 헤드를 포함할 수 있다. 소수성 아실 쇠와 주변 수성 매질 간의 에너지적으로 불안정한 접촉은 극성 헤드가 이중 층의 표면을 향하고 아실 쇠가 이중 층의 내부를 향하도록 배열하기 위해 양친매성 지질 분자를 유도하여, 수성 환경과의 접촉으로부터 아실 쇠를 효과적으로 보호한다.

[0356] 리포솜에 사용되는 바람직한 양친매성 화합물의 예는 포스포글리세리드 및 스펅고지질을 포함할 수 있으며, 그의 대표적인 예는 포스파티딜콜린, 포스파티딜에탄올아민, 포스파티딜세린, 포스파티딜이노시톨, 포스파티딘산, 포스파티딜글리세롤, 팔미토일올레오일 포스파티딜콜린, 리소포스파티딜콜린, 리소포스파티딜에탄올아민, 디미리스토일포스파티딜콜린 (DMPC), 디팔미토일포스파티딜콜린 (DPPC), 디올레오일포스파티딜콜린, 디스테아로일포스파티딜콜린 (DSPC), 디리놀레오일포스파티딜콜린, 에그 스펅고미엘린, 또는 그의 임의의 조합을 포함한다.

[0357] 생물학적 구획은 나노입자를 포함할 수 있다. 나노입자는 약 40나노미터 내지 약 1.5마이크로미터, 약 50나노미터 내지 약 1.2마이크로미터, 약 60나노미터 내지 약 1마이크로미터, 약 70나노미터 내지 약 800나노미터, 약 80나노미터 내지 약 600나노미터, 약 90나노미터 내지 약 400나노미터, 또는 약 100나노미터 내지 약 200나노미터의 직경을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 나노입자의 크기가 증가함에 따라 방출 속도가 느려지거나 연장될 수 있고, 나노입자의 크기가 감소함에 따라 방출 속도가 증가될 수 있다.

- [0358] 특정 실시양태에서, Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 생물학적 구획으로 패키징된다. 일부 경우에, Cas12를 코딩하는 핵산과 화학적으로 합성된 chRNA 가이드가 생물학적 구획으로 패키징된다. 일부 경우에, Cas12를 코딩하는 mRNA와 화학적으로 합성된 chRNA 가이드가 생물학적 구획으로 패키징된다.
- [0359] 핵산 서열과 폴리펩티드 간의 상호작용을 평가 및/또는 정량화하기 위한 다양한 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 이는 하기를 포함하나 그에 제한되지는 않는다: 면역침전 (ChIP) 검정, DNA 전기영동 이동성 변화 검정 (EMSA), DNA 풀다운 검정, 및 마이크로플레이트 캡처 및 검출 검정. 상업용 키트, 재료 및 시약은 이러한 많은 방법을 실행하는데 이용 가능하며, 예를 들어 하기 공급업체로부터 취득될 수 있다: 써모 사이언티픽 (Thermo Scientific; 미국 텔라웨어주 월링톤), 시그노시스 (Signosis; 미국 캘리포니아주 산타 클라라), 바이오-래드 (Bio-Rad; 미국 캘리포니아주 헤라클레스), 및 프로메가 (미국 위스콘신주 매디슨). 폴리펩티드와 핵산 서열 간의 상호작용을 검출하기 위한 통상적인 접근 방식은 EMSA이다 (예를 들어, 문헌 [Hellman L. M., et al., Nature Protocols 2(8):1849-1861 (2007)] 참조).
- [0360] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 세포로의 도입을 위한 하나 이상의 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체를 제공하는 단계, 및 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체(들)를 세포로 전달함으로써, Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체(들)와 폴리뉴클레오티드의 접촉을 촉진시키는 단계를 포함하는, 폴리뉴클레오티드 내의 핵산 표적 서열을 커팅하는 (예를 들어, dsDNA에서의 단일 가닥 커팅, 또는 dsDNA에서의 이중 가닥 커팅) 방법을 포괄한다. 한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 내의 제1 핵산 표적 서열에 상보적인 제1 표적화 영역을 갖는 제1 Cas12 chRNA 가이드 분자를 포함하는 제1 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체; 및 폴리뉴클레오티드 내의 제2 핵산 표적 서열에 상보적인 제2 표적화 영역을 갖는 제2 Cas12 chRNA 가이드 분자를 포함하는 제2 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체가 세포 내로 도입된다. 접촉은 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체(들)에 의해 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, dsDNA) 내의 핵산 표적 서열의 커팅을 초래한다. 한 실시양태에서, 제1 Cas12a chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 dsDNA 내의 제1 핵산 표적 서열과 결합하고 dsDNA의 제1 가닥을 절단하며; 제2 Cas12a chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 dsDNA 내의 제2 핵산 표적 서열과 결합하고 dsDNA의 제2 가닥을 절단한다. 일부 실시양태에서, 핵산 표적 서열은 DNA 또는 게놈 DNA이다. 핵산 표적 서열을 결합시키는 이러한 방법은 시험관내, 세포내 (예를 들어, 배양된 세포내), 및 생체외 (예를 들어, 대상체로부터 제거된 줄기 세포) 및 생체내에서 수행된다.
- [0361] 표적 핵산 서열(들)은, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 서열 또는 게놈 내의 원하는 위치; 및/또는 결실되거나 파괴된 폴리뉴클레오티드 서열 또는 게놈 내의 원하는 유전자 서열에 기초하여 적절하게 선택될 수 있다.
- [0362] 폴리뉴클레오티드 내의 핵산 표적 서열을 커팅하는 부가의 실시양태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드가 또한 세포 내로 도입되어, 공여자 폴리뉴클레오티드의 적어도 일부분이 세포의 게놈 DNA로 혼입되는 것을 용이하게 할 수 있다. 전형적으로, 공여자 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥 파손 부위로의 공여자 폴리뉴클레오티드의 삽입 (예를 들어, 상동 재조합)을 증진시키기 위해 부위-지정 표적 핵산 파손부에 근접하게 된다. 일부 경우에, 공여자 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥 파손부를 생성하는 Cas12 단백질 (예를 들어, Cas12a)과 결합함으로써, 표적 핵산 내의 이중 가닥 파손 부위에 근접하게 된다.
- [0363] 공여자 폴리뉴클레오티드 서열(들)은, 예를 들어, 추구되는 원하는 변형에 기초하여 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 공여자 폴리뉴클레오티드는 관심 단백질의 전부 또는 일부를 코딩할 수 있다. 일부 실시양태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드는 CAR을 코딩할 수 있다.
- [0364] 본 개시내용은 바이러스를 통한 세포로의 공여자 폴리뉴클레오티드의 전달을 추가로 포괄하며, 여기서 공여자 폴리뉴클레오티드는 CAR을 코딩한다.
- [0365] 일부 실시양태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥일 수 있다. 일부 실시양태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥일 수 있다. 일부 실시양태에서, 공여자 DNA는 미니서클일 수 있다. 일부 실시양태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드는 플라스미드일 수 있다. 일부 실시양태에서, 플라스미드는 슈퍼코일될 수 있다. 일부 실시양태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드는 메틸화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 공여자 폴리뉴클레오티드는 메틸화되지 않을 수 있다. 공여자 폴리뉴클레오티드는 변형을 포함할 수 있다. 변형은 비오티닐화, 화학적 접합 및 합성 뉴클레오티드를 포함하나 이에 제한되지는 않는, 본원에 기재된 것을 포함할 수 있다.
- [0366] **치료 조성물, 적용 및 방법**
- [0367] 본 개시내용의 Cas12 chRNA 가이드 분자 및 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 변형된 세포 (예컨대 CAR-발현 세포)의 생산에 사용될 수 있다. 이러한 변형된 세포는, 예를 들어, 세포 요법 (예를 들어, 세포의 투여

를 통한 질환의 치료 또는 예방) 분야, 특히 입양 세포 요법에 사용될 수 있다. 이러한 투여된 세포는, 예를 들어, 유전적으로 변형된 입양 세포일 수 있다. 유전적 변형은 하나 이상의 전달 기술을 사용하여 본원에 개시된 Cas12 chRNA 가이드 분자 및 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체를 통해 입양 세포 내로 도입될 수 있다. 본 개시내용은, 예를 들어, 투여될 수용자에 대해 자가 또는 동종이계인 세포의 변형 및 투여를 포괄한다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "동종이계"는 동일한 종의 상이한, 유전적으로 동일하지 않은 개체를 지칭한다. 예를 들어, 동종이계 세포는 (세포가 투여되는 수용자와 관련하여) 동일한 종의 상이한, 유전적으로 동일하지 않은 개체로부터 유래된 세포를 지칭한다. 대조적으로, 용어 "자가"는 동일한 개체를 지칭한다. 예를 들어, 개체에게 투여된 자가 세포는 동일한 개체로부터 유래되는 세포 (변형 또는 비변형, 또는 그의 변형 또는 비변형 자손)를 지칭한다.

[0368] "입양 세포"는 세포 요법 치료에 사용하기 위해 유전적으로 변형될 수 있는 세포를 지칭한다. 입양 세포는 줄기 세포, 유도 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 체대혈 줄기 세포, 림프구, 자연 살해 세포, 섬유모세포, 내피 세포, 상피 세포, 췌장 전구 세포 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0369] "줄기 세포"는 자기 재생 능력, 즉 미분화 상태를 유지하면서 수많은 세포 분열 주기를 거칠 수 있는 능력을 가진 세포를 지칭한다. 줄기 세포는 전능성, 다능성, 다분화능, 과분화능 또는 단분화능일 수 있다. 줄기 세포는 배아, 태아, 양막, 성체 또는 유도 다능성 줄기 세포이다.

[0370] "유도 다능성 줄기 세포" (iPSC)는 비-다능성 세포, 전형적으로 체세포로부터 인위적으로 유래되는 다능성 줄기 세포의 유형을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 체세포는 인간 체세포이다. 체세포의 예는 진피 섬유모세포, 골수 유래 중간엽 세포, 심근 세포, 각질세포, 간 세포, 위 세포, 신경 줄기 세포, 폐 세포, 신장 세포, 비장 세포 및 췌장 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 체세포의 부가의 예는 B 세포, 수지상 세포, 과립구, 선천 림프계 세포, 거핵구, 단핵구/대식세포, 골수 유래 억제 세포, NK 세포, T 세포, 흉선 세포 및 조혈 줄기 세포를 포함하나 이에 제한되지는 않는 면역 체계의 세포를 포함한다. 다능성 줄기 세포는 체세포, NK 세포, NK-유사 세포, T 세포, T 세포-유사 세포, NK-T 세포, NK-T 세포-유사 세포, 수지상 세포, 수지상-유사 세포, 대식세포 및 대식세포-유사 세포를 포함한 복수 개의 세포 유형으로 분화될 수 있다. 다능성 줄기 세포는 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용하여 분화 전 또는 후에 편집될 수 있다. iPSC는 외인성 유전자 또는 서열, 예컨대 CAR을 코딩하는 서열을 게놈 내로 도입함으로써, 분화 전 또는 후에 추가로 변형될 수 있다.

[0371] "조혈 줄기 세포"는 조혈 세포, 예컨대 림프구로 분화할 수 있는 능력을 갖는 미분화 세포를 지칭한다.

[0372] "림프구"는 척추동물 면역 체계의 일부인 백혈구 (백혈구)를 지칭한다. 또한 용어 "림프구"는 림프계 세포를 발생시키는 조혈 줄기 세포를 포괄한다. 림프구는 세포-매개, 세포독성 적응 면역을 위한 T 세포, 예컨대 CD4+ 및/또는 CD8+ 세포독성 T 세포; 알파/베타 T 세포 및 감마/델타 T 세포; 조절 T 세포, 예컨대 Treg 세포; 세포-매개, 세포독성 선천 면역에서 기능하는 자연 살해 (NK) 세포; 및 체액성, 항체-구동 적응 면역을 위한 B 세포; NK/T 세포; 시토카인 유도 살해 세포 (CIK 세포); 및 항원 제시 세포 (APC), 예컨대 수지상 세포를 포함한다. 림프구는 포유동물 세포, 예컨대 인간 세포일 수 있다.

[0373] 또한 본원에 사용된 바와 같은 용어 "림프구"는 표적 세포의 단백질 또는 (당)지질 항원을 인식할 수 있는 하나 이상의 특이적, 자연적으로 발생하거나 또는 조작된 T-세포 수용체(들)를 발현하도록 유전적으로 조작된 T 세포 수용체 조작된 T 세포 (TCR)를 포괄한다. 이러한 항원의 작은 조각, 예컨대 펩티드 또는 지방산은 표적 세포 표면으로 이동하여 주요 조직적합성 복합체 (MHC)의 일부로서 T 세포 수용체에 제시된다. 항원-로딩된 MHC와 결합하는 T 세포 수용체는 림프구를 활성화시킨다.

[0374] 종양 침윤 림프구 (TIL)은 또한 본원에 사용된 바와 같은 용어 "림프구"에 포괄된다. TIL은 종양 내부 및 주변 환경 ("종양 미세환경")에 침투한 면역 세포이다. TIL은 전형적으로 종양 세포 및 종양 미세 환경으로부터 단리되며, 종양 항원에 대항한 높은 반응성을 위해 시험관 내에서 선택된다. TIL은 생체내 존재하는 관용화 영향을 극복하는 조건하에 시험관 내에서 성장한 다음, 치료를 위해 대상체 내로 도입된다.

[0375] 용어 "림프구"는 또한 유전적으로 변형된 T 세포 및 NK 세포, 예컨대 T 또는 NK 세포 표면 상에 키메라 항원 수용체 (CAR)를 생산하도록 변형된 것 (CAR-T 세포 및 CAR-NK 세포)을 포괄한다.

[0376] 림프구는 대상체, 예컨대 인간 대상체, 예를 들어 혈액 또는 고형 종양 (TIL의 경우와 같음), 또는 림프 기관, 예컨대 흉선, 골수, 림프절 및 점막-연관 림프 조직으로부터 단리될 수 있다. 림프구를 단리하는 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예를 들어, 혈액 층을 분리하는 친수성 폴리사카라이드인 피콜, 및 밀도 구배 원심분리를 사용하여 전혈로부터 분리되는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 림프구를 단리할 수 있다. 일반

적으로, 항응고제 또는 섬유소 제거 혈액 표본은 피콜 용액 위에 층을 이루고 원심분리하여 상이한 세포 층을 형성한다. 바닥 층은 적혈 세포 (적혈구)를 포함하며, 이는 피콜 배지에 의해 수집 또는 응집되어 바닥으로 완전히 가라앉는다. 그 다음 층은 주로, 피콜-파크 용액을 통해 아래로 이동하는 과립구를 함유한다. 그 다음 층은 전형적으로 단핵구 및 혈소판과 함께 혈장과 피콜 용액 사이의 경계면에 있는 림프구를 포함한다. 림프구를 분리하기 위해, 이러한 층을 회수하고, 염 용액으로 세척하여 혈소판, 피콜 및 혈장을 제거한 다음 다시 원심분리한다.

- [0377] 림프구를 분리하기 위한 다른 기술은 관심 세포를 항체-코팅된 플라스틱 표면과 결합함으로써 용액으로부터 세포 집단을 분리하는 바이오패닝을 포함한다. 이어서, 원하지 않는 세포는 특이적 항체 및 보체로 처리함으로써 제거한다. 부가적으로, 형광 활성화 세포 분류기 (FACS) 분석을 사용하여 림프구를 검출하고 계수할 수 있다. FACS 분석은 광 산란과 형광에서의 차이에 근거하여 표지된 세포를 분리하는 유동 세포계수기를 사용한다.
- [0378] TIL의 경우, 림프구는 종양으로부터 분리되고, 예를 들어 고용량 IL-2에서 성장하고 자가 종양 또는 HLA-매칭 종양 세포주에 대한 시토킨 발출 공동-배양 검정을 사용하여 선택된다. 동종이계 비-MHC 매칭 대조군과 비교하여 증가된 특이적 반응성의 증거가 있는 배양물은 신속한 확장을 위해 선택될 수 있고, 이어서 암을 치료하기 위해 대상체 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Rosenberg et al. (*Clin. Cancer Res.*, 2011, 17:4550-4557); Dudley et al. (*Science*, 2002, 298:850-854); Dudley et al. (*J. Clin. Oncol.*, 2008, 26:5233-5239); and Dudley et al. (*J. Immunother.*, 2003, 26:332-342)]을 참조한다.
- [0379] 분리 시, 림프구는 특이성, 빈도 및 기능의 관점에서 명확히 규명될 수 있다. 자주 사용되는 검정은 T 세포 반응의 빈도를 측정하는 ELISPOT 검정을 포함한다.
- [0380] 분리 후, 림프구는 전문화된 이펙터 림프구로의 증식 및 분화를 촉진하기 위해 관련 기술분야에 널리 공지된 기술을 사용하여 활성화될 수 있다. 활성화된 T 세포에 대한 표면 마커는, 예를 들어, CD3, CD4, CD8, PD1, IL2R 등을 포함한다. 활성화된 세포독성 림프구는 표적 세포의 표면 상의 동족 수용체와 결합한 후 표적 세포를 사멸시킬 수 있다. NK 세포에 대한 표면 마커는, 예를 들어, CD16, CD56 등을 포함한다.
- [0381] 분리 및 임의로 활성화 후, 림프구는 입양 T 세포 면역요법에 사용하기 위해 본 개시내용의 Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용하여 변형될 수 있다. 입양 면역요법은 전형적으로 환자의 면역 세포 (자가 세포)를 활용하여 암을 치료한다. 그러나, 입양 면역요법의 생성을 위한 본 방법은 또한 제3자 공여자 세포 (동종이계 세포)의 사용을 허용하여, "쉽게 사용할 수 있는" 요법을 초래한다.
- [0382] 따라서, 일부 실시양태에서, 입양 면역요법에 사용하기 위한 림프구는 대상체로부터 분리되고, 생체외에서 변형된 다음, 동일한 대상체 내로 재도입된다. 이러한 기술은 "자가 림프구 요법"으로서 공지되어 있다.
- [0383] 대안적으로, 림프구는 분리되고, 생체외에서 변형되며, 상이한 대상체 내로 도입될 수 있다. 이러한 기술은 "동종이계 림프구 요법"으로서 공지되어 있다.
- [0384] 특정 실시양태에서, Cas12 chRNA 가이드/핵단백질 복합체는 동종이계 세포를 포함하는 치료 조성물의 생산에 사용된다. 바람직한 실시양태에서, 동종이계 세포는 T-세포이다. 보다 바람직한 실시양태에서, T-세포는 CAR을 발현한다. 보다 더 바람직한 실시양태에서, CAR은 암과 연관된 항원을 표적으로 한다.
- [0385] 일부 실시양태에서, T 세포는 더 안전하고 더 효율적인 동종이계 요법을 허용하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, T 세포 수용체 α 상수 (TRAC)는 $\alpha\beta$ TCR의 일부를 형성하는 단백질-코딩 유전자이다. 따라서 TRAC에서의 선택된 돌연변이 뿐만 아니라 TRAC의 녹아웃 발현은 동종이계 세포 요법 동안 GvHD를 제거하는데 도움이 될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Poirot et al. (*Cancer Res.*, 2015, 75:3853-3864)]을 참조한다. CRISPR-Cas9 시스템을 사용하여 CD19-특이적 CAR을 TRAC 로커스로 유도하면 종양 거부가 발생할 수 있는 것으로 나타났다. 예를 들어, 문헌 [Eyquem et al. (*Nature*, 2017, 543:113)]을 참조한다. 유사하게, $\alpha\beta$ TCR의 발현을 방지하기 위해 T 세포 수용체 β 상수 (TRBC)가 또한 표적화될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Ren et al. (*Clin. Cancer Res.*, 2017, 23:2255-2266)]을 참조한다.
- [0386] PD1, PDCD1 및 CD279로서 공지되기도 한 프로그램된 세포 사멸 단백질 1은 면역 체계를 하향 조절하고 T 세포 염증 활동을 억제함으로써 자기-관용을 촉진시키는데 중요한 역할을 하는 세포 표면 수용체이다. PDCD1은 PD-L1, CD274 및 B7 동족체 1 (B7-H1)로서 공지되기도 한 동족 리간드인 "프로그램된 사멸-리간드 1"과 결합한다. PD1은 림프절의 항원-특이적 T 세포에서 프로그램된 세포 사멸 (아포토시스)을 촉진하는 동시에 항염증 억제 T 세포 (조절 T 세포)에서 아포토시스를 감소시키는 이중 메커니즘을 통해 자가면역을 방지한다. 이러한 메커니즘을 통해, PD-L1의 PD1 결합은 면역 체계를 억제하므로, 자가면역 장애를 예방할 뿐만 아니라 면역 체계가 암

세포를 사멸시키는 것도 방지한다. 따라서, PD1의 생산을 돌연변이시키거나 녹아웃시키는 것은 T 세포 요법에 서 유익할 수 있다.

[0387] PD1은 "면역 체크포인트" 분자의 한 예이다. 면역 체크포인트 분자는 면역 반응을 하향 조정하거나 억제하는 역할을 한다. 면역 체크포인트 분자는 PD1, 세포독성 T-림프구 항원 4 (CTLA-4; CD152로서 공지되기도 함), LAG3 (CD223으로서 공지되기도 함), Tim3 (HAVCR2로서 공지되기도 함), BTLA (CD272로서 공지되기도 함), BY55 (CD160으로서 공지되기도 함), TIGIT (IVSTM3으로서 공지되기도 함), LAIR1 (CD305로서 공지되기도 함), SIGLEC10, 2B4 (CD244로서 공지되기도 함), PPP2CA, PPP2CB, PTPN6, PTPN22, CD96, CRTAM, SIGLEC7, SIGLEC9, TNFRSF10B, TNFRSF10A, CASP8, CASP10, CASP3, CASP6, CASP7, FADD, FAS, TGFBR11, TGFBR1, SMAD2, SMAD3, SMAD4, SMAD10, SKI, SKIL, TGIF1, IL10RA, IL10RB, HMOX2, IL6R, IL6ST, EIF2AK4, CSK, PAG1, SIT1, FOXP3, PRDM1, BATF, GUCY1A2, GUCY1A3, GUCY1B2, 및 GUCY1B3을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 면역 체크포인트 분자는 본 개시내용의 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용하여 불활성화된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 면역 체크포인트 분자의 불활성화는 상기 기재된 바와 같이 하나 이상의 TCR 성분의 불활성화와 조합된다.

[0388] 베타-2 마이크로글로불린 (B2M)은 유핵 세포에 존재하는 MHC 클래스 I 분자의 성분이다. 베타-2 마이크로글로불린은 중앙 세포를 포함한 세포에 의해 혈액으로 배출되며, HLA I 복합체의 어셈블리 및 발현에 필수적이다. 그러나, 동종이계 T 세포의 표면 상에서의 HLA 발현은 숙주 면역 체계의 T 세포에 의한 신속한 거부를 유발한다. 따라서, 베타-2 마이크로글로불린의 발현을 방해하는 것은 또한 동종이계 T 세포 요법 효율을 증가시키는데 바람직하다. 부가적으로, 동종이계 T 세포 상에서의 MHC 클래스 I 분자의 발현 결여는 숙주 면역 체계에 의한 제거를 유발한다. 따라서, HLA 분자의 서브세트, 바람직하게 HLA-E만이 세포 표면에 제시되는 것이 바람직하다.

[0389] 부가의 유전자는 입양 면역 세포 요법의 효능을 증진시키기 위해 본원에 개시된 Cas12 chRDNA 가이드로 유사하게 표적화될 수 있다. 바람직한 유전자 및 염색체 위치 (hg38 게놈 어셈블리)의 비-제한적 예가 표 4에 제공된다.

표 4 입양 세포 요법 표적	
코딩된 단백질/대안적 명칭	로커스 좌표
TRAC	chr14:22,509,239-22,552,153
TRBV 단백질	TRBV 로커스 chr7
베타-2 마이크로글로불린 (B2M)	chr15:44,711,477-44,718,877
PDCD1/PD1/CD279	chr2:241,849,881-241,858,908
PD-L1	chr9:5,450,525-5,470,547
CTLA-4/CD152	chr2:203,867,786-203,873,960
LAG-3/CD223	chr12:6,772,520-6,778,453
TIGIT/IVSTM3	chr3:114,291,059-114,308,290
TIM3/HAVCR2	chr5:157,085,832-157,109,714
HLA-E	HLA-E 로커스 chr6
HLA-A	HLA-A 로커스 chr6
ROR1	chr1:63,774,017-64,181,498
CD47	chr3:108,043,091-108,094,200
HLA-B	HLA-B 로커스 chr6
HLA-C	HLA-C 로커스 chr6
HLA-DRA	HLA-DRA 로커스 chr6
ADAM17	chr2:9,488,486-9,555,788
BTLA/CD272	chr3:112,463,968-112,499,561
P2X7	chr12:121,132,819-121,188,032
CD160	chr1:145,719,520-145,739,153

[0390]

표 4 입양 세포 요법 표적	
코딩된 단백질/대안적 명칭	로커스 좌표
ADORA2A	chr22:24,417,879-24,442,357
SIGLEC10	chr19:51,411,054-51,417,698
2B4/CD244	chr1:160,830,160-160,862,855
LAIR1/CD305	chr19_KI270938v1_alt:337,398-347,586
CD52	chr1:26,317,957-26,320,523
CD96	chr3:111,542,118-111,652,241
VSIR 또는 C10orf54/VISTA	chr10:71,747,559-71,773,498
KIR2DL1	chr19_KI270933v1_alt:71,449-85,961
KIR2DL2	chr19_KI270932v1_alt:56,346-70,673
KIR2DL3	chr19:54,738,515-54,753,052
CEACAM1	chr19:42,507,306-42,528,509
CBLB	chr3:105,655,461-105,869,043
CISH	chr3:50,606,522-50,611,831
IL-1R8/TIR8/SIGIRR	chr11:405,716-417,397
AHR	chr7:17,298,622-17,346,150
아데노신 2A 수용체/ADORA2A	chr22:24,423,597-24,442,356
GMCSF/CSF2	chr5:132,073,789-132,076,170
VISTA/VSIR	chr10:71,747,556-71,773,520
CII2A	chr16:10,877,198-10,936,388
NKG2A	chr12:10,446,041-10,454,616

[0391]

[0392]

일부 실시양태에서, TRAC를 코딩하는 유전자는 본원에 개시된 바와 같은 Cas12 chRDNA 가이드를 사용하여 세포 내에서 표적화된다. 일부 실시양태에서, PD1을 코딩하는 유전자는 본원에 개시된 바와 같은 Cas12 chRDNA 가이드를 사용하여 세포 내에서 표적화된다. 일부 실시양태에서, B2M을 코딩하는 유전자는 본원에 개시된 바와 같은 Cas12 chRDNA 가이드를 사용하여 세포 내에서 표적화된다. 일부 실시양태에서, TRAC를 코딩하는 유전자 및 B2M을 코딩하는 유전자는 본원에 개시된 바와 같은 Cas12 chRDNA 가이드를 사용하여 세포 내에서 표적화된다.

[0393]

본 개시내용의 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용하여 변형된 세포는, 예를 들어, 암 치료를 위한 입양 세포 요법에 사용될 수 있다. 그의 일부 실시양태에서, 변형된 세포는 유전적으로 변형된 림프구이다. 이러한 유전적으로 변형된 림프구, 예컨대 CAR-T 세포는 전립선암; 난소암; 자궁경부암; 결장직장암; 장암; 고환암; 피부암; 폐암; 갑상선암; 골암; 유방암; 방광암; 자궁암; 질암; 췌장암; 간암; 신장암; 뇌암; 척수암; 구강암; 이하선 종양; 혈액암; 림프종, 예컨대 B 세포 림프종; 및 백혈병 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는, 대상체에서 다양한 유형의 암을 치료하는데 사용될 수 있다. 바람직하게, 변형된 세포의 유효량이 이러한 치료에 사용된다.

[0394]

표 5는 본 개시내용의 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용하여 생산된 입양 세포 (예컨대 CAR-T 세포)를 사용하여 치료할 수 있는 대표적인 B 세포 백혈병 및 림프종을 열거한다. 본원에 개시된 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체에 의해 변형된 림프구는 표 5에 열거된 질환의 치료에 제한되지 않는 것으로 이해되어야 한다.

표 5 B-세포 백혈병/림프종 및 그의 두문자어	
B-세포 백혈병/림프종	두문자어
급성 림프모구성 백혈병	B-ALL
급성 골수성 백혈병	AML
전구체 B 림프모구성 백혈병	LBL
유모 세포 백혈병	HCL
B-세포 전림프구성 백혈병	B-PLL
만성 림프구성 백혈병/작은 림프구성 백혈병	CLL/SLL
미만성 거대 B-세포 림프종	DLBCL
ALK-양성 거대 B-세포 림프종	ALK+LBCL
T-세포/조직구-풍부 거대 B-세포 림프종	T/HRBCL
여포성 림프종	FL
맨틀 세포 림프종	MCL
버킷 림프종 (EBV)	BL
다발성 골수종	MM
림프형질세포성 림프종/발덴스트롬 마크로글로불린혈증	MG
점막-연관 림프성 조직 림프종	MALT
결절 변연부 B-세포 림프종	NMZL
비장 변연부 B-세포 림프종	SMZL
원발성 중추 신경계 림프종	PCNSL
원발성 피부 여포 중심세포 림프종	PCFCL
원발성 종격 거대 B-세포 림프종	PMLBCL

[0395]

표 5 B-세포 백혈병/림프종 및 그의 두문자어	
B-세포 백혈병/림프종	두문자어
혈관내 거대 B-세포 림프종	ILBCL
림프종성 육아종증 (EBV)	LYG
형질모세포성 림프종 (ARL)	PBL
원발성 삼출 림프종	PEL

[0396]

[0397]

다른 실시양태에서, 전암성 병태; 혈액 장애; 및 면역 장애, 예컨대 에디슨병, 셀리악병, 유형 1 진성 당뇨병, 그레이브스병, 하시모토병, 염증성 장 질환, 다발성 경화증, 건선, 류마티스성 관절염, 경피증 및 전신성 홍반성 루푸스를 포함하나 이에 제한되지는 않는 자가면역 장애를 포함한, 다른 세포 증식성 장애는 본 개시내용의 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용하여 생산된 입양 세포 (예컨대 CAR-T 세포)를 사용하여 치료될 수 있다.

[0398]

본원에 기재된 입양 세포 요법 치료는 항체 요법, 화학요법, 시토키인 요법, 수지상 세포 요법, 유전자 요법, 호르몬 요법, 레이저 광 요법 및 방사선 요법으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 부가의 요법과 동시에 또는 상이한 시간에 조합될 수 있다.

[0399]

대상체에 대한 본 개시내용의 변형된 세포의 투여는 에어로졸 흡입, 주사, 섭취, 수혈, 체내이식 또는 이식을 포함한 임의의 편리한 방식으로 수행될 수 있다. 본원에 기재된 조성물은 환자에게 피하, 피내, 종양내, 결절내, 골수내, 근육내, 정맥내 또는 림프내 주사에 의해, 또는 복강내로 투여될 수 있다.

- [0400] 한 실시양태에서, 본 개시내용의 변형된 세포 조성물은 바람직하게 정맥내 주사에 의해 투여된다. 투여는 체중 kg당 10^4 - 10^9 개 세포, 바람직하게 체중 kg당 10^5 내지 10^6 개 세포의 투여를 포함할 수 있다. 세포는 1회 이상의 용량으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 세포의 유효량이 단일 용량으로서 투여된다. 다른 실시양태에서, 세포의 유효량이 일정 기간에 걸쳐 1회 초과 용량으로서 투여된다. 특정한 질환 또는 병태에 대해 주어진 세포 유형의 유효량의 최적 범위를 결정하는 것은 관련 기술분야의 통상의 기술자의 기술 내에 있다.
- [0401] **키메라 항원 수용체 (CAR) 세포**
- [0402] 일부 실시양태에서, 입양 세포는 CAR-발현 세포이다. CAR은 특이적 항원 또는 에피토프를 인식하고 그와 결합하도록 조작된 수용체이다. 수용체는 항원-결합 및 T-세포 활성화 기능 둘 다를 단일 수용체로 조합하기 때문에 키메라이다. CAR은 전형적으로 항원과 결합할 수 있는 세포의 리간드-결합 도메인, 막횡단 도메인 및 적어도 하나의 세포내 신호전달 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 세포의 리간드-결합 도메인은 하나 이상의 링커에 의해 연결된 2개 이상의 가변 영역의 융합을 포함하는 단일-쇄 가변 단편 (scFv)을 포함할 수 있다. CAR은 힌지 영역을 추가로 포함할 수 있다. CAR은 종종 "키메라 수용체", "T-바디" 또는 "키메라 면역 수용체 (CIR)"로 불린다.
- [0403] 일부 실시양태에서, CAR은 TRUCK, 범용 CAR, 자기-구동 CAR, TanCAR, 무장 CAR, 자기-파괴 CAR, 조건부 CAR, 표시된 CAR, TenCAR, 이중 CAR, 또는 sCAR일 수 있다.
- [0404] TRUCK (범용 시토카인 살해를 위해 재지정된 T 세포)는 키메라 항원 수용체 (CAR)와 항종양 시토카인을 공동-발현한다. 시토카인 발현은 구성적이거나 또는 T 세포 활성화에 의해 유도될 수 있다. CAR 특이성에 의해 표적화된, 염증 유발성 시토카인의 국제된 생산은 내인성 면역 세포를 종양 부위로 동원하고 항종양 반응을 강화할 수 있다.
- [0405] 범용 동종이계 CAR-T 세포는 내인성 T 세포 수용체 (TCR) 및/또는 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자를 더 이상 발현하지 않도록 조작됨으로써, 각각 이식편 대 숙주 질환 (GVHD) 또는 거부반응을 방지한다.
- [0406] 자기-구동 CAR은 종양 리간드와 결합하는 케모카인 수용체와 CAR을 공동-발현함으로써, 종양 귀소를 증진시킨다.
- [0407] 면역억제에 내성이 있도록 조작된 CAR-T 세포 (무장 CAR)는 면역 체크포인트 스위치 수용체를 사용하여 다양한 면역 체크포인트 분자 (예를 들어, 세포독성 T 림프구-연관 항원 4 (CTLA4) 또는 프로그램된 세포 사멸 단백질 1 (PD1))를 더 이상 발현하지 않도록 유전적으로 변형될 수 있거나, 또는 면역 체크포인트 신호전달을 차단하는 모노클로날 항체와 함께 투여될 수 있다.
- [0408] 자기-파괴 CAR은 CAR을 코딩하기 위해 전기천공에 의해 전달된 RNA를 사용하여 설계될 수 있다. 대안적으로, T 세포의 유도성 아포토시스는 유전자-변형된 림프구에서 티미딘 키나제와 결합하는 간시클로비르 또는 보다 최근에 기재된 소분자 이량체에 의한 인간 카스파제 9의 활성화 시스템에 기초하여 달성될 수 있다.
- [0409] 조건부 CAR-T 세포는 작은 분자가 부가되어 회로를 완성하여, 신호 1과 신호 2 둘 다의 완전한 변환을 가능하게 함으로써, CAR-T 세포를 활성화할 때까지 기본적으로 반응하지 않거나 '꺼짐'으로 전환된다. 대안적으로, T 세포는 표적 항원을 대상으로 한 후속 투여된 이차 항체에 대한 친화성을 갖는 어댑터-특이적 수용체를 발현하도록 조작될 수 있다.
- [0410] 표시된 CAR-T 세포는 기존 모노클로날 항체 작용제가 결합하는 종양 에피토프 및 CAR을 발현한다. 견딜 수 없는 부작용이 있는 상황에서, 모노클로날 항체를 투여하면 CAR-T 세포가 제거되고 부가의 오프-종양 효과 없이 증상이 완화된다.
- [0411] 탠덤 CAR (TanCAR) T 세포는 상이한 친화도를 갖고 하나 이상의 세포내 공동-자극 도메인(들) 및 CD3 ζ 신호전달 도메인과 융합되는 2개의 연결된 scFv를 포함하는 단일 CAR을 발현한다. TanCAR-T 세포 활성화를 위해서는, 표적 세포 상에 하나의 항원만 존재해야 하지만; 항원 둘 다의 존재가 상승작용적 활성화를 용이하게 한다. 특정 실시양태에서, TanCAR의 scFv는 중쇄 가변 영역 (VH) 및 경쇄 가변 영역 (VL), 한 쌍의 2개의 중쇄 가변 영역 (VH), 또는 한 쌍의 2개의 경쇄 가변 영역 (VL)을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, TanCAR의 2개의 scFv는 적층된 구성으로 발생할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, TanCAR의 2개의 scFv는 일련으로, 또는 루프 구성으로 발생할 수 있다. 구체적 실시양태에서, 탠덤 CAR의 scFv 중 적어도 하나는 항-CD20 scFv이며, 제2 scFv는 암 세포 상의 특이적 항원을 표적으로 하도록 선택되며, 예컨대 항-BCMA scFv, 항-CD19 scFv, 항-CD30 scFv,

항-CD22 scFv, 항-CD70 scFv, 항-ROR1 scFv, 또는 항-카파 경쇄 scFv이다.

- [0412] 이중 CAR-T 세포는 상이한 리간드 결합 표적을 갖는 2개의 별도의 CAR을 발현하며; 하나의 CAR은 CD3 ζ 도메인을 포함하고 다른 CAR은 공동-자극 도메인(들)만을 포함한다. 이중 CAR-T 세포 활성화는 종양 상에서의 표적들 다의 공동-발현을 필요로 한다.
- [0413] 안전성 CAR (sCAR)은 세포내 억제 도메인과 융합된 세포외 scFv로 이루어지며, 표준 CAR을 공동-발현하는 sCAR-T 세포는, 표준 CAR 표적을 보유하지만 sCAR 표적이 결합된 표적 세포를 만날 때만 활성화된다.
- [0414] CAR의 세포외 (항원 인식) 도메인은 바람직하게 단일쇄 항체, 보다 바람직하게 scFv이다. 한 실시양태에서, 항원-결합 도메인은 scFv를 포함한다. 그러나, 높은 친화도로 주어진 표적과 결합하는 임의의 적합한 모이어티가 항원 인식 영역으로서 사용될 수 있다. 항원과 결합할 수 있는 CAR의 세포외 도메인은, 예를 들어, 특정 항원과 결합할 수 있는 임의의 올리고펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다.
- [0415] 표적화되길 원하는 항원에 따라, 본 개시내용의 CAR은 원하는 항원 표적에 특이적인 적절한 항원-결합 모이어티를 포함하도록 조작될 수 있다. 예를 들어, BCMA가 표적화되길 원하는 항원인 경우, BCMA를 표적으로 하는 항체 또는 항체 단편 (예를 들어 scFv)은 본 개시내용의 CAR 내로 혼입하기 위한 항원-결합 모이어티로서 사용될 수 있다.

[0416] 바람직한 세포 표적 및 이를 표적으로 하는 CAR scFv/결합 단백질이 표 6에 제시되어 있다.

표 6 예시적인 세포 표적 및 CAR scFv의 목록	
세포 표적	CAR scFv/결합 부분
B7-H3	항-B7-H3
B7-H6	항-B7-H6
B-세포 성숙 항원 (BCMA)	항-BCMA
CD123	항-CD123
CD138	항-CD138
CD171/L1CAM	항-CD171
CD19	항-CD19
CD20	항-CD20
CD22	항-CD22
CD30	항-CD30
CD33	항-CD33
CD37	항-CD37
CD38	항-CD38
CD4	항-CD4
CD47	항-CD47
CD70	항-CD70
CD73	항-CD73
CD79b	항-CD79b
CD371	항-CD371
CEA	항-CEA
클라우딘 18.1	항-CLDN 18.1
클라우딘 18.2	항-CLDN 18.2
CS-1	항-CS1
CSPG4	항-CSPG4

[0417]

표 6 예시적인 세포 표적 및 CAR scFv의 목록	
세포 표적	CAR scFv/결합 부분
EGFRvIII	항-EGFRvIII
ENPP3	항-ENPP3
EpCAM	항-EpCAM
EphA2	항-EphA2
표피 성장 인자 수용체	항-표피 성장 인자 수용체
ErbB	항-ErbB
ErbB2 (HER2)	항-ErbB2 (HER2)
FAP	항-FAP
FR α	항-FR α
GD2	항-GD2
GD3	항-GD3
글리피칸 3	항-글리피칸 3
Her2	항-Her2
IL-11R α	항-IL-11R α
IL-13R α 2	항-IL-13R α 2
IL13 수용체 알파	IL13
카파 경쇄	항-카파 경쇄
루이스Y/LeY	항-LeY
메소텔린	항-메소텔린
MUC1	항-MUC1
MUC16	항-MUC16
NGFR	항-NGFR
NKG2D 리간드	항-NKG2D 리간드
PD1	항-PD1
PD-L1	항-PD-L1

[0418]

표 6 예시적인 세포 표적 및 CAR scFv의 목록	
세포 표적	CAR scFv/결합 부분
EGFRvIII	항-EGFRvIII
ENPP3	항-ENPP3
EpCAM	항-EpCAM
EphA2	항-EphA2
표피 성장 인자 수용체	항-표피 성장 인자 수용체
ErbB	항-ErbB
ErbB2 (HER2)	항-ErbB2 (HER2)
FAP	항-FAP
FR α	항-FR α
GD2	항-GD2
GD3	항-GD3
글리피칸 3	항-글리피칸 3
Her2	항-Her2
IL-11R α	항-IL-11R α
IL-13R α 2	항-IL-13R α 2
IL13 수용체 알파	IL13
카파 경쇄	항-카파 경쇄
루이스Y/LeY	항-LeY
메소텔린	항-메소텔린
MUC1	항-MUC1
MUC16	항-MUC16
NGFR	항-NGFR
NKG2D 리간드	항-NKG2D 리간드
PD1	항-PD1
PD-L1	항-PD-L1

[0419]

표 6 예시적인 세포 표적 및 CAR scFv의 목록	
세포 표적	CAR scFv/결합 부분
PSCA	항-PSCA
PSMA	항-PSMA
ROR-1	항-ROR-1
SLAMF7	항-SLAMF7
TACI	항-TACI
TAG72	항-TAG72
ULBP 및 MICA/B 단백질	NKG2D
VEGF2	항-VEGF2
VEGFR2	항-VEGFR2
WT1	항-WT1

[0420]

[0421]

특정 실시양태에서, CAR이 결합하는 세포 표적은 보다 바람직하게 BCMA, CD19, CD20, CD22, CD47, CD79b, CD371, ROR-1, EphA2, MUC16, 글리피칸 3, PSCA, 및 클라우딘 18.2로부터 선택된다.

[0422]

보다 더 바람직한 실시양태에서, CAR이 결합하는 세포 표적은 BCMA이다.

[0423]

보다 더 바람직한 실시양태에서, CAR이 결합하는 세포 표적은 CD371이다.

[0424]

CAR의 세포내 도메인은 세포에서 생물학적 프로세스의 활성화 또는 억제를 유발하는 신호를 전달하는 도메인으로 기능하는 것으로 공지된 올리고펩티드 또는 폴리펩티드일 수 있다. 세포내 도메인은 이펙터 기능 신호를 전달하는 한, T-세포 수용체 (TCR) 및/또는 공동-수용체의 세포내 신호전달 도메인의 전부 또는 일부분을 포함하는 활성화 도메인을 포함할 수 있다. 자극 방식으로 작용하는 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절하는 세포질 신호전달 서열은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)로서 공지되는 신호전달 모티프를 함유할 수 있다. ITAM 함유 세포질 신호전달 서열의 예는 CD8, CD3 ζ , CD3 δ , CD3 γ , CD3 ϵ , CD32 (Fc γ RIIa), DAP10, DAP12, CD79a, CD79b, Fc γ RI γ , Fc γ RIII γ , Fc ϵ RI β (FCERIB), 및 Fc ϵ RI γ (FCERIG)로부터 유래된 것을 포함한다.

[0425]

바람직한 실시양태에서, 세포내 신호전달 도메인의 활성화 도메인은 CD3 ζ 로부터 유래된다.

[0426]

본 개시내용의 CAR의 세포내 신호전달 도메인은 활성화 도메인, 예컨대 CD3 ζ 신호전달 도메인을 그 자체로 또는 본 개시내용의 CAR의 맥락에서 유용한 임의의 다른 원하는 세포질 도메인(들)과 조합하여 포함하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, CAR의 세포내 신호전달 도메인은 공동-자극 도메인에 더하여, 활성화 도메인, 예컨대 CD3 ζ 채 부분을 포함할 수 있다. 공동-자극 도메인은 공동자극 분자의 세포내 도메인을 포함하는 CAR의 일부분을 지칭한다.

[0427]

공동-자극 분자는 항원에 대한 림프구의 효율적인 반응에 필요한 항원 수용체 또는 그의 리간드 이외의 분자이다. 그의 전부 또는 일부가 본 개시내용의 CAR의 공동-자극 도메인에 사용될 수 있는 이러한 공동-자극 분자의 예는 CD27, CD28, 4-1BB (CD137), OX40, CD30, CD40, ICOS-1, GITR, 림프구 기능-연관 항원-1 (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C 및 B7-H3을 포함한다.

[0428]

바람직한 실시양태에서, CAR은 적어도 4-1BB로부터 유래된 공동-자극 도메인을 함유한다.

[0429]

막횡단 도메인은 자연 또는 합성 공급원으로부터 유래될 수 있다. 공급원이 자연인 경우, 도메인은 임의의 막-결합 또는 막횡단 단백질로부터 유래될 수 있다. 예를 들어, 막횡단 영역은 T-세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 채의 막횡단 영역(들), CD28, CD3 ζ , CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8 (예를 들어, CD8 α , CD8 β), CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, 또는 CD154, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, IL2R β , IL2R γ , IL7R α , ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f,

ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, 및 PAG/Cbp로부터 유래될 수 있다 (즉, 그의 적어도 일부를 포함한다).

- [0430] 대안적으로 막횡단 도메인은 합성일 수 있으며, 이러한 경우 그것은 주로 소수성 잔기, 예컨대 류신 및 발린을 포함할 것이다. 일부 경우에, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 삼중자가 합성 막횡단 도메인의 각각의 단부에서 발견될 것이다. 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 예컨대 2 내지 10개 아미노산 길이는 CAR의 막횡단 도메인과 소포질 도메인 간의 연결을 형성할 수 있다.
- [0431] 바람직한 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD8로부터 유래된다.
- [0432] 일부 실시양태에서, CAR은 동일한 막횡단 도메인의 반복부일 수 있거나 상이한 막횡단 도메인일 수 있는 1개 초과 막횡단 도메인을 갖는다.
- [0433] 힌지 영역은 가변 길이의 폴리펩티드 힌지, 예컨대 하나 이상의 아미노산, CD8 부분, 또는 IgG4 영역, 및 그의 조합을 포함할 수 있다.
- [0434] 바람직한 실시양태에서, 힌지 영역은 CD8로부터 유래된다.
- [0435] CAR은 또한 TIL, NK 세포, 대식세포, 수지상 세포, 유도 다능성 줄기 세포 (iPSC) 또는 TCR에 혼입되어 각각 CAR-TIL, CAR-NK 세포, CAR-M, CAR-DC 및 TCR 조작된 CAR-T 세포를 생성할 수 있다. CAR-T 세포, CAR-T 세포를 만드는 방법, 및 그의 용도에 대한 설명은, 예를 들어, 문헌 [Brudno et al. (*Nature Rev. Clin. Oncol.*, 2018, 15:31-46); Maude et al. (*N. Engl. J. Med.*, 2014, 371:1507-1517); and Sadelain et al. (*Cancer Disc.*, 2013, 3:388-398)]을 참조한다.
- [0436] 일부 실시양태에서, CAR 발현 카세트는 입양 세포 내로 형질도입되고, 카세트는 Cas12 단백질-매개 파손 부위 내로 통합된다. 본원의 실시예 9는 CAR 카세트를 포함하는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터로 1차 세포를 형질도입하는 것을 예시한다.
- [0437] 일부 실시양태에서, CAR 발현 카세트는 CAR 발현을 구동하기 위한 프로모터를 포함한다. 통상적으로 사용되는 프로모터는 구성적 포유동물 프로모터 CMV, MND, EF1a, SV40, PGK1 (마우스 또는 인간), Ubc, CAG, CaMKIIa 및 베타-Act를 포함하고, 기타는 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Khan et al. (*Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2013, 3:257-263)]을 참조한다. 대안적으로, CAR 발현 카세트는 리보솜 스킵핑 서열 (자기-절단 펩티드라고도 함)을 포함할 수 있고 내인성으로 발현된 유전자의 프레임 내로 도입될 수 있다. 통상적으로 사용되는 리보솜 스킵핑 서열은 T2A, P2A, E2A 및 F2A를 포함한다. 리보솜 스킵핑 서열 및 그의 용도에 대한 설명은, 예를 들어, 문헌 [Chng et al. (*MAbs*, 2015, 7(2):403-412)]을 참조한다. 유사하게, 비-CAR 발현 카세트는 유사한 프로모터 또는 리보솜 스킵핑 서열을 포함할 수 있다.
- [0438] 특정 실시양태에서, Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 환자의 단일 대립유전자에 존재하는 병원성의 상염색체 "우성 음성" 돌연변이에 의해 유발되는 유전적 장애를 치료하는데 사용된다. 일부 경우에, 근본적인 유전적 돌연변이가 대립유전자 중 하나에 대한 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)일 수 있다. chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 SNP 대립유전자를 표적으로 하도록 조작될 수 있지만, 야생형 대립유전자를 표적으로 하지 않으므로 SNP 대립유전자만 방해할 수 있다. 예를 들어, SNP를 포함하는 오프-표적 서열에서 감소된 편집이 가능한 야생형 서열을 표적으로 하기 위해 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체를 설계하는 방법의 비-제한적 예를 제공하는 실시예 7을 참조한다.
- [0439] 일부 실시양태에서, Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 야생형 대립유전자를 변형시키지 않으면서 SNP-함유 대립유전자를 선택적으로 편집 (예를 들어, 녹아웃, 또는 상동성 지향 복구를 통해 야생형으로 되돌리기)하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 편집은 유전자 파괴를 초래할 수 있다. 다른 실시양태에서, 이러한 편집은 대립유전자를 예컨대 상동성 지향 복구를 통해 "야생형" 상태로 복원할 수 있다. 예를 들어, 진행성 시력 상실을 초래하는 많은 유전 질환은 병원성의 상염색체 "우성-음성" 돌연변이로 인한 것이다. 우성 음성 질환의 SNP 교정 전략의 예는 색소성 망막염을 유발하는 로돕신 유전자에서의 SNP 돌연변이의 표적화 (예를 들어, 문헌 [Li et al. (*CRISPR J.*, 2018, 1(1):55-64)] 참조); 각막 이영양증을 유발하는 전환 성장 인자, 베타-유도 (*TGFB1*) 유전자에서의 SNP 돌연변이의 표적화 (예를 들어, 문헌 [Christie et al. (*Scientific*

Reports, 2017, 7(1):16174)] 참조)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0440] 본 개시내용의 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는, 예를 들어, 상업색체의 병원성 "우성-음성" 유전적 돌연변이에 의해 영향을 받는 안구 조직으로 전달될 수 있다. 그의 일부 실시양태에서, chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 근본적인 병리학을 치료하기 위해 야생형 대립유전자를 표적으로 하지 않으면서 질환 대립유전자를 선택적으로 파괴하도록 설계된다. 그러한 질환은 황반 이영양증, 간상체-추상체 이영양증, 추상체-간상체 이영양증 또는 맥락망막병증을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 본원에 개시된 Cas12 chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 진행성 시력 상실을 유발하는 유전 질환의 치료에 제한되지는 않는 것으로 이해된다.

[0441] **실험**

[0442] 본 개시내용의 비-제한적 실시양태는 하기 실시예에 예시된다. 사용된 숫자 (예를 들어, 양, 농도, 변화 퍼센트 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해 노력했지만, 일부 실험 오류 및 편차를 고려해야 한다. 달리 표시되지 않는 한, 온도는 °C이고 압력은 대기압이거나 대기압에 가깝다. 이들 실시예는 단지 예시로서 제공되며 본 발명자가 본 개시내용의 다양한 실시양태로서 간주하는 것의 범주를 제한하려는 의도가 아님을 이해해야 한다. 각각의 실시예에 제시된 하기 단계가 모두 필요한 것은 아니며 각각의 실시예에서의 단계 순서가 반드시 제시된 바와 같은 것은 아니다. 본원에 사용된 바와 같은, 뉴클레오티드 앞의 "r"은 RNA를 나타내며; 다른 모든 뉴클레오티드는 달리 언급되지 않는 한 DNA이다 (예를 들어, 표 15 및 17 참조). 포스포로티오에이트 결합은 인접한 염기 사이에 "*"로 표시된다.

[0443] 실시예 1

[0444] PBMC로부터의 세포독성 T 세포 (CD4+ 및 CD8+)의 제조 및 1차 세포의 배양

[0445] 본 실시예는 공여자 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터의 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 제조를 예시한다.

[0446] CD4+ 및 CD8+ T 세포는 본질적으로 하기와 같이 공여자 PBMC로부터 제조되었다. RoboSep-S [스템셀 테크놀로지 (STEMCELL Technologies; 미국 매사추세츠주 케임브리지)] 및 EasySep™ 인간 T 세포 분리 키트 (스템셀 테크놀로지; 미국 매사추세츠주 케임브리지)를 사용하여 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 T 세포를 분리하고, 제조한 인간 (rh) IL-2 (100 단위/mL)가 보충된 ImmunoCult-XF 완전 배지 [ImmunoCult-XF T 세포 확장 배지 (스템셀 테크놀로지; 미국 매사추세츠주 케임브리지), CTS 면역 세포 SR (깁코(Gibco) A2596102), 항생제-항진균제 (100X, 코닝(Corning) 30-004-C1)]에서 항-CD3/CD28 비드 (Dynabeads™; 깁코 11132D)의 존재 하에 3일 동안 활성화하였다. 3일 후, 자기 분리를 통해 비드를 제거하고 IL-2 (100 단위/mL)가 보충된 ImmunoCult-XF 완전 배지에서 1일 동안 세포를 확장하였다.

[0447] 실시예 2

[0448] Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 클로닝, 발현, 생산 및 어셈블리

[0449] 본 실시예는 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체를 클로닝, 발현 및 정제하는 방법 뿐만 아니라 Cas12a 가이드 성분을 생산하는 방법을 설명한다.

[0450] A. Cas12 단백질의 클로닝

[0451] 아시다미노코쿠스 종 (균주 BV3L6) 촉매적으로 활성인 Cas12a 단백질 서열 (서열식별번호: 1)은 이. 콜라이 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화되었다. C-말단에, 글리신-세린 링커와 하나의 핵 국재화 서열 (NLS) (서열식별번호: 4)을 추가하였다. Cas12a-NLS 단백질 (하기 실시예에서 AsCas12a 및 Cas12a 단백질로서 지칭됨)을 코딩하는 올리고뉴클레오티드 서열은 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다. 그런 다음 DNA 서열을 표준 클로닝 방법을 사용하여 적합한 박테리아 발현 벡터로 클로닝하였다.

[0452] B. Cas12a 단백질의 발현 및 정제

[0453] AsCas12a 단백질은 발현 벡터를 사용하여 이. 콜라이에서 발현되었고 본질적으로 예를 들어, 문헌 [Swartz et al. (*Molecular Cell*, 2017, 66:221-233)]에 기재된 바와 같이 친화성 크로마토그래피, 이온 교환 및 크기 배제 크로마토그래피를 사용하여 정제되었다.

[0454] C. Cas12a 가이드 성분의 생산

[0455] 특정한 Cas12a 가이드 활성화 영역에 표적화 영역을 연결함으로써 Cas12a 가이드를 생산하였다. 표적화 영역 또는 스페이서는 바람직하게 20개 뉴클레오티드 표적 결합 서열을 포함하였다. 표적 결합 서열은 5'-TTTV 또는

5'-TTTN PAM의 하류 (3' 방향)에서 발생하는 표적 서열에 대해 상보적이었다. 예시적인 Cas12a 가이드 활성화 영역 서열은 아시다미노코쿠스 종, 엘. 박테리움(*L. bacterium*) 및 에프. 노비시다 Cas12a 종에 대해 각각 서열 식별번호: 6, 서열식별번호: 8 및 서열식별번호: 10이다.

[0456] Cas 12a 가이드 서열 (예컨대 crRNA 및 chRDNA)은 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다.

[0457] 가이드 RNA 성분 (예컨대 crRNA)은 dsDNA 템플릿 서열의 5' 단부에 T7 프로모터를 혼입함으로써 이중 가닥 (ds) DNA 템플릿으로부터 시험관내 전사 [예를 들어, T7 신속 고수율 RNA 합성 키트; 뉴잉글랜드 바이오랩스 (New England Biolabs; 미국 매사추세츠주 Ipswich)]에 의해 생산될 수 있다.

[0458] D. Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 어셈블리

[0459] C-말단 핵 국재화 서열 (NLS)로 태그부착된 아시다미노코쿠스 종 Cas12a (AsCas12a)를 이. 콜라이에서 재조합적으로 발현하고 크로마토그래피 방법을 사용하여 정제하였다. 달리 명시되지 않는 한, 핵단백질 복합체는 80 pmol Cas12a 단백질:240 pmol 가이드의 농도에서 형성되었다. Cas12a 단백질로 어셈블리하기 전에, 각각의 가이드 성분 (예를 들어, crRNA 또는 chRDNA)은 최종 용적 1 μ l에서 원하는 총 농도 (240 pmol)로 조정하고, 95 °C에서 2분 동안 인큐베이션한 다음, 씨모사이클러로부터 제거하고, 실온으로 평형화되도록 하였다. Cas12a 단백질을 결합 완충액 (60 mM TRIS-아세테이트, 150 mM 아세트산칼륨, 30 mM 아세트산마그네슘, pH 7.9) 중 적절한 농도로 최종 용적 1.5 μ l로 희석하고 가이드 성분 1 μ l와 혼합한 후, 37°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다.

[0460] 실시예 3

[0461] Cas12a 가이드/핵단백질 복합체를 사용한 PBMC로부터의 T 세포 (CD4+ 및 CD8+)의 뉴클레오펙션

[0462] 본 실시예는 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체를 사용한 활성화된 T 세포의 뉴클레오펙션을 설명한다.

[0463] 실시예 2의 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체를 뉴클레오펙터(Nucleofector)TM 96-웰 서플 시스템 [론자 (Lonza; 미국 뉴저지주 앨런데일)]을 사용하여 1차 활성화된 T 세포 (CD4+ 및 CD8+) (실시예 1에 기재된 바와 같이 제조됨)로 형질감염시켰다. Cas12a 가이드/핵단백질 복합체를 96-웰 플레이트의 개별 웰에 최종 용적 2.5 μ l로 분배하였다. 현탁된 T 세포를 200 x g에서 10분 동안 원심분리하여 펠릿화하고, 칼슘 및 마그네슘이 없는 인산염 완충 식염수 (PBS)로 세척하고, 세포 펠릿을 10 ml의 칼슘 및 마그네슘이 없는 PBS에 재현탁시켰다. 세포를 카운티스(Countess)[®] II 자동화 세포 계수기 (라이프 테크놀로지스; 미국 뉴욕주 그랜드아일랜드)를 사용하여 계수하였다.

[0464] 2.2e7개의 세포를 15 ml 원추형 튜브에 옮기고 펠릿화하였다. PBS를 흡인하고, 세포를 뉴클레오펙터TM P4 또는 P3 (론자; 미국 뉴저지주 앨런데일) 용액에 샘플당 2e5-1e6개 세포/ml의 밀도로 재현탁하였다. 그런 다음 세포 현탁액 20 μ l를 2.5 μ l의 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체를 함유하는 각각의 웰에 부가하고, 각각의 웰로부터의 전체 용적을 96-웰 뉴클레오펙터(Nucleocuvette)TM 플레이트 (론자; 미국 뉴저지주 앨런데일)의 웰로 옮겼다. 플레이트를 뉴클레오펙터TM 96-웰 서플 (론자; 미국 뉴저지주 앨런데일)에 로딩하고 CA137 뉴클레오펙터TM 프로그램 (론자; 미국 뉴저지주 앨런데일)을 사용하여 세포를 뉴클레오펙션하였다. 뉴클레오펙션 후, IL-2 (100 단위/mL)가 보충된 ImmunoCult-XF 완전 배지 77.5 μ l를 각각의 웰에 부가하였으며, 형질감염된 세포 현탁액의 전체 용적을 IL-2 (100 단위/mL)가 보충된 100 μ l의 미리-가온된 ImmunoCult-XF 완전 배지를 함유하는 96-웰 세포 배양 플레이트로 옮겼다. 플레이트를 조직 배양 인큐베이터로 옮기고 하류 분석 전에 48시간 동안 5% CO₂에서 37°C로 유지하였다.

[0465] 실시예 4

[0466] Cas12a 가이드/핵단백질 복합체를 사용한 인간 유전자의 타일링

[0467] 본 실시예는 인간 T 세포에서, 인간 T 세포 알파 불변 영역 (TRAC), 베타-2-마이크로글로불린 (B2M), 프로그램된 세포 사멸 1 (PDCD1), 시토카인-유도성 SH2-함유 단백질 (CISH) 및 Cbl-원종양형성 유전자 B (CBL-B)를 코딩하는 유전자를 표적으로 하기 위한 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 설계 및 용도를 설명한다.

[0468] A. AsCas12a crRNA 가이드의 설계

[0469] 인간 TRAC, B2M, PDCD1, CISH 및 CBL-B를 코딩하는 유전자의 코딩 영역에서 5'-TTTV PAM 모티프의 하류 (3' 방향)의 모든 20개 뉴클레오타이드 서열은 표적화를 위해 선택되었다 (서열식별번호: 12-189). 표적 선택 기준은 게놈 내의 다른 영역에 대한 상동성; GC 함량 퍼센트; 용융 온도; 및 스페이서 내의 동종중합체의 존재를 포함

하나 이에 제한되지는 않는다.

- [0470] 확인된 20개-뉴클레오티드 서열은 AsCas12a 활성화 영역 서열 (서열식별번호: 6)에 하류 (3' 방향으로) 첨부되었다.
- [0471] 서열은 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다. 그런 다음, 개별 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체를 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조하고 실시예 3에 기재된 바와 같이 1차 T 세포로 형질감염시켰다.
- [0472] B. 게놈 편집 효율 결정
- [0473] (1) 심층 시퀀싱을 위한 표적 dsDNA 서열 생성
- [0474] 웰당 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체 및 50 μ L 퀵익스트랙트(QuickExtract)TM DNA 추출 용액 [에피센터 (Epicentre; 미국 위스콘신주 매디슨)]을 사용하여 형질감염시킨 후 48시간에 뉴클레오펙션된 1차 T 세포로부터 gDNA를 단리한 후, 37°C에서 10분, 65°C에서 30분, 및 95°C에서 3분 동안 인큐베이션하여 반응을 정지시켰다. 단리된 gDNA는 50 μ L 멸균수로 희석하였고 샘플은 -80°C에서 저장하였다.
- [0475] 단리된 gDNA를 사용하여, 1x 농도의 Q5 핫 스타트 고-충실도 2X 마스터 믹스 (뉴잉글랜드 바이오랩스; 미국 매사추세츠주 입스위치)를 사용하여 제1 PCR을 수행하였고, Cas12a 표적 주변 영역을 증폭하도록 설계된 프라이머를 각각 0.5 μ M로 사용하였으며, 3.75 μ L의 gDNA를 최종 용적 10 μ L로 사용하였다. 증폭은 98°C에서 1분 동안의 초기 사이클, 98°C에서 10초, 및 60°C에서 20초, 72°C에서 30초의 35 사이클; 및 72°C에서 2분 동안 최종 연장을 시행하였다. PCR 반응물을 물에 1:100으로 희석하였다.
- [0476] 바코딩 PCR을 위한 고유한 인덱스 프라이머 세트를 사용하여 각각의 샘플에 대한 멀티플렉스 시퀀싱을 용이하게 하였다. 바코딩 PCR은 1x 농도의 Q5 핫 스타트 고-충실도 2X 마스터 믹스 (뉴잉글랜드 바이오랩스; 미국 매사추세츠주 입스위치), 각각 0.5 μ M의 프라이머, 및 10 μ L의 최종 용적에서 1:100으로 희석된 제1 PCR 1 μ L를 포함하는 반응 혼합물을 사용하여 수행되었다. 반응 혼합물을 하기와 같이 증폭시켰다: 98°C에서 1분 동안; 이어서 98°C에서 10초, 60°C에서 20초, 및 72°C에서 30초의 12 사이클; 최종 연장 반응은 72°C에서 2분 동안 수행되었다.
- [0477] (2) SPRIselect 클린-업
- [0478] PCR 반응물을 풀링하고 SPRIselect [베크만 쿨터 (Beckman Coulter; 미국 캘리포니아주 파사데나)] 비드-기반 애플리곤 클린업을 위한 단일 마이크로퓨즈 튜브로 옮겨 시퀀싱하였다.
- [0479] 애플리곤에 0.9x 용적의 SPRIselect 비드를 부가하고, 혼합하며, 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 마이크로퓨즈 튜브는 용액이 청정해질 때까지 자석 튜브 스탠드에 놓아두었다. 상청액을 제거하고 버리며, 잔여 비드를 1 용적의 85% 에탄올로 세척하고, 비드를 실온에서 30초 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 에탄올을 흡인하고, 비드를 실온에서 10분 동안 공기 건조시켰다. 자석 스탠드로부터 마이크로퓨즈 튜브를 제거하고 0.25x 용적의 퀴아젠(Qiagen) EB 완충액 (퀴아젠; 네덜란드 베로)을 비드에 부가하고 격렬하게 혼합하며, 실온에서 2분 동안 인큐베이션하였다. 마이크로퓨즈 튜브를 자석으로 되돌리고, 용액이 청정해질 때까지 인큐베이션하고, 정제된 애플리곤을 함유하는 상청액을 깨끗한 마이크로퓨즈 튜브에 분배하였다. 정제된 애플리곤은 나노드롭(Nanodrop)TM 2000 시스템 (써모 사이언티픽; 미국 델라웨어주 윌밍턴)을 사용하여 정량화하고, 단편 분석기TM 시스템 [어드밴스드 아날리티칼 테크놀로지 (Advanced Analytical Technologies; 미국 아이오와주 에임즈)] 및 DNF-910 dsDNA 시약 키트 (어드밴스드 아날리티칼 테크놀로지; 미국 아이오와주 에임즈)을 사용하여 라이브러리 품질을 분석하였다.
- [0480] (3) 심층 시퀀싱 설정
- [0481] 풀링된 애플리곤은 나노드롭TM 2000 시스템 값 및 애플리곤의 평균 크기로부터 계산된 바와 같은 4 nM 농도로 정규화되었다. 라이브러리는 MiSeq 시약 키트 v2 [일루미나 (Illumina; 미국 캘리포니아주 샌디에이고)]가 포함된 MiSeq 시퀀서 (일루미나; 미국 캘리포니아주 샌디에이고)에서 300 사이클 동안 2회의 151-사이클 페어드 엔드 실행 및 2회의 8-사이클 인덱스 판독값으로 분석되었다.
- [0482] (4) 심층 시퀀싱 데이터 분석
- [0483] 시퀀싱 데이터에서 제품의 신원은 바코딩 PCR에서 애플리곤에 적응된 인덱스 바코드 서열을 기반으로 결정되었다. 예를 들어, 하기 작업을 실행하는 MiSeq 데이터를 처리하기 위해 계산 스크립트가 사용되었다:

- [0484] a. 보타이(Bowtie) (bowtie-bio.sourceforge.net/index.shtml) 소프트웨어를 사용하여 판독값을 인간 게놈 (빌드 GRCh38/38)에 정렬하였고;
- [0485] b. 정렬된 판독값을 예상된 야생형 게놈 로커스 서열과 비교하였고, 야생형 로커스의 임의의 부분과 정렬되지 않은 판독값은 폐기하였으며;
- [0486] c. 야생형 서열과 매칭하는 판독값이 집계되었고;
- [0487] d. indel (염기의 삽입 또는 결실)이 있는 판독값은 indel 유형별로 분류하고 집계하였으며;
- [0488] e. 총 indel 판독값을 야생형 판독값과 indel 판독값의 합으로 나누어 돌연변이된 판독값 퍼센트를 제공하였다.
- [0489] Cas12a 가이드/핵단백질 복합체에 의해 표적화된 영역에서 indel 서열의 확인을 통해, 그 결과로 생성된 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 게놈 편집 효율을 결정하였다. 세포내 편집 실험의 결과가 표 7에 제시되어 있다.

표 7 Cas12a crRNA/핵단백질 복합체로 검출된 indel 퍼센트							
SEQ ID NO:	표적 ID	% 편집	StDev	SEQ ID NO:	표적 ID	% 편집	StDev
SEQ ID NO:12	TRAC-tgt1	4.1%	0.7%	SEQ ID NO:101	B2M-tgt51	87.6%	1.3%
SEQ ID NO:13	TRAC-tgt2	9.7%	1.9%	SEQ ID NO:102	B2M-tgt52	88.7%	0.9%
SEQ ID NO:14	TRAC-tgt3	89.6%	1.0%	SEQ ID NO:103	B2M-tgt53	50.1%	4.2%
SEQ ID NO:15	TRAC-tgt4	42.5%	4.4%	SEQ ID NO:104	B2M-tgt54	94.7%	0.2%
SEQ ID NO:16	TRAC-tgt5	4.6%	0.8%	SEQ ID NO:105	B2M-tgt55	88.0%	0.8%
SEQ ID NO:17	TRAC-tgt6	87.3%	0.9%	SEQ ID NO:106	B2M-tgt56	1.9%	0.2%
SEQ ID NO:18	TRAC-tgt7	43.8%	2.9%	SEQ ID NO:107	B2M-tgt57	1.8%	0.4%
SEQ ID NO:19	TRAC-tgt8	1.0%	0.9%	SEQ ID NO:108	B2M-tgt58	75.6%	1.5%
SEQ ID NO:20	TRAC-tgt9	32.5%	4.1%	SEQ ID NO:109	B2M-tgt59	42.8%	0.9%
SEQ ID NO:21	TRAC-tgt10	32.3%	2.2%	SEQ ID NO:110	B2M-tgt60	21.5%	0.3%
SEQ ID NO:22	TRAC-tgt11	26.3%	2.6%	SEQ ID NO:111	B2M-tgt61	7.1%	0.5%
SEQ ID NO:23	TRAC-tgt12	94.3%	0.6%	SEQ ID NO:112	B2M-tgt62	38.6%	0.8%
SEQ ID NO:24	TRAC-tgt13	4.6%	0.5%	SEQ ID NO:113	B2M-tgt63	85.6%	3.7%
SEQ ID NO:25	TRAC-tgt14	5.4%	1.1%	SEQ ID NO:114	B2M-tgt64	91.5%	2.4%
SEQ ID NO:26	TRAC-tgt15	42.2%	1.7%	SEQ ID NO:115	B2M-tgt65	79.7%	2.3%

[0490]

표 7 Cas12a crRNA/핵단백질 복합체로 검출된 indel 퍼센트								
SEQ ID NO:	표적 ID	% 편집	StDev		SEQ ID NO:	표적 ID	% 편집	StDev
SEQ ID NO:27	TRAC-tgt16	0.5%	0.1%		SEQ ID NO:116	B2M-tgt66	35.9%	1.5%
SEQ ID NO:28	TRAC-tgt17	90.6%	0.9%		SEQ ID NO:117	B2M-tgt67	75.5%	1.4%
SEQ ID NO:29	TRAC-tgt18	7.2%	0.6%		SEQ ID NO:118	B2M-tgt68	55.9%	1.5%
SEQ ID NO:30	TRAC-tgt19	27.1%	3.9%		SEQ ID NO:119	B2M-tgt69	0.6%	0.1%
SEQ ID NO:31	TRAC-tgt20	53.1%	3.0%		SEQ ID NO:120	B2M-tgt70	9.8%	0.4%
SEQ ID NO:32	TRAC-tgt21	57.3%	3.4%		SEQ ID NO:121	B2M-tgt71	50.8%	1.2%
SEQ ID NO:33	TRAC-tgt22	51.8%	2.4%		SEQ ID NO:122	B2M-tgt72	5.2%	0.5%
SEQ ID NO:34	TRAC-tgt23	64.2%	4.5%		SEQ ID NO:123	B2M-tgt73	29.7%	1.4%
SEQ ID NO:35	TRAC-tgt24	5.7%	1.0%		SEQ ID NO:124	B2M-tgt74	71.0%	1.1%
SEQ ID NO:36	TRAC-tgt25	96.9%	0.7%		SEQ ID NO:125	B2M-tgt75	4.0%	0.5%
SEQ ID NO:37	TRAC-tgt26	42.3%	2.6%		SEQ ID NO:126	B2M-tgt76	14.1%	1.1%
SEQ ID NO:38	TRAC-tgt27	19.4%	1.4%		SEQ ID NO:127	B2M-tgt77	16.6%	0.5%
SEQ ID NO:39	TRAC-tgt28	95.2%	0.3%		SEQ ID NO:128	B2M-tgt78	8.3%	1.1%
SEQ ID NO:40	TRAC-tgt29	72.8%	0.9%		SEQ ID NO:129	B2M-tgt79	3.4%	0.7%
SEQ ID NO:41	TRAC-tgt30	94.9%	0.6%		SEQ ID NO:130	B2M-tgt80	13.7%	2.0%

[0491]

표 7 Cas12a crRNA/핵단백질 복합체로 검출된 indel 퍼센트							
SEQ ID NO:	표적 ID	% 편집	StDev	SEQ ID NO:	표적 ID	% 편집	StDev
SEQ ID NO:42	TRAC-tgt31	16.4%	2.6%	SEQ ID NO:131	B2M-tgt81	7.2%	1.0%
SEQ ID NO:43	TRAC-tgt32	63.5%	7.4%	SEQ ID NO:132	B2M-tgt82	1.6%	0.2%
SEQ ID NO:44	TRAC-tgt33	81.4%	2.2%	SEQ ID NO:133	B2M-tgt83	83.6%	1.0%
SEQ ID NO:45	TRAC-tgt34	0.1%	0.0%	SEQ ID NO:134	PDCD1-tgt1	75.3%	4.0%
SEQ ID NO:46	TRAC-tgt35	0.4%	0.0%	SEQ ID NO:135	PDCD1-tgt2	19.2%	1.1%
SEQ ID NO:47	TRAC-tgt36	21.7%	1.7%	SEQ ID NO:136	PDCD1-tgt3	0.0%	0.0%
SEQ ID NO:48	TRAC-tgt37	33.2%	2.6%	SEQ ID NO:137	PDCD1-tgt4	35.6%	1.7%
SEQ ID NO:49	TRAC-tgt38	95.6%	0.6%	SEQ ID NO:138	PDCD1-tgt5	25.6%	2.6%
SEQ ID NO:50	TRAC-tgt39	72.8%	2.5%	SEQ ID NO:139	PDCD1-tgt6	22.5%	0.7%
SEQ ID NO:51	B2M-tgt1	98.0%	0.8%	SEQ ID NO:140	PDCD1-tgt7	6.4%	0.3%
SEQ ID NO:52	B2M-tgt2	39.0%	2.5%	SEQ ID NO:141	PDCD1-tgt8	14.7%	1.0%
SEQ ID NO:53	B2M-tgt3	68.3%	2.4%	SEQ ID NO:142	PDCD1-tgt9	90.0%	1.5%
SEQ ID NO:54	B2M-tgt4	18.4%	1.2%	SEQ ID NO:143	PDCD1-tgt10	52.6%	4.3%
SEQ ID NO:55	B2M-tgt5	34.0%	3.9%	SEQ ID NO:144	PDCD1-tgt11	32.6%	2.6%
SEQ ID NO:56	B2M-tgt6	33.2%	3.6%	SEQ ID NO:145	PDCD1-tgt12	8.3%	0.6%

[0492]

표 7 Cas12a crRNA/핵단백질 복합체로 검출된 indel 퍼센트							
SEQ ID NO:	표적 ID	% 편집	StDev	SEQ ID NO:	표적 ID	% 편집	StDev
SEQ ID NO:57	B2M-tgt7	42.0%	1.8%	SEQ ID NO:146	PDCD1-tgt13	10.9%	2.1%
SEQ ID NO:58	B2M-tgt8	32.4%	1.0%	SEQ ID NO:147	PDCD1-tgt14	7.4%	0.4%
SEQ ID NO:59	B2M-tgt9	22.6%	1.6%	SEQ ID NO:148	PDCD1-tgt15	83.0%	1.0%
SEQ ID NO:60	B2M-tgt10	40.6%	4.4%	SEQ ID NO:149	PDCD1-tgt16	0.2%	0.0%
SEQ ID NO:61	B2M-tgt11	21.5%	2.2%	SEQ ID NO:150	PDCD1-tgt17	0.1%	0.1%
SEQ ID NO:62	B2M-tgt12	95.8%	0.7%	SEQ ID NO:151	PDCD1-tgt18	0.3%	0.1%
SEQ ID NO:63	B2M-tgt13	17.3%	1.3%	SEQ ID NO:152	PDCD1-tgt19	87.7%	1.0%
SEQ ID NO:64	B2M-tgt14	3.9%	0.5%	SEQ ID NO:153	PDCD1-tgt20	92.8%	0.8%
SEQ ID NO:65	B2M-tgt15	69.4%	3.7%	SEQ ID NO:154	PDCD1-tgt21	0.9%	0.0%
SEQ ID NO:66	B2M-tgt16	12.2%	1.7%	SEQ ID NO:155	PDCD1-tgt22	0.1%	0.1%
SEQ ID NO:67	B2M-tgt17	1.5%	0.5%	SEQ ID NO:156	CISH-tgt1	56.0%	1.4%
SEQ ID NO:68	B2M-tgt18	25.4%	1.3%	SEQ ID NO:157	CISH-tgt2	20.0%	0.9%
SEQ ID NO:69	B2M-tgt19	53.8%	4.1%	SEQ ID NO:158	CISH-tgt3	78.3%	1.6%
SEQ ID NO:70	B2M-tgt20	8.0%	0.9%	SEQ ID NO:159	CISH-tgt4	40.8%	1.3%
SEQ ID NO:71	B2M-tgt21	6.1%	0.7%	SEQ ID NO:160	CISH-tgt5	82.2%	1.1%

[0493]

표 7 Cas12a crRNA/핵단백질 복합체로 검출된 indel 퍼센트							
SEQ ID NO:	표적 ID	% 편집	StDev	SEQ ID NO:	표적 ID	% 편집	StDev
SEQ ID NO:72	B2M-tgt22	10.3%	0.3%	SEQ ID NO:161	CISH-tgt6	21.6%	2.7%
SEQ ID NO:73	B2M-tgt23	29.6%	2.7%	SEQ ID NO:162	CISH-tgt7	79.6%	1.7%
SEQ ID NO:74	B2M-tgt24	82.8%	2.6%	SEQ ID NO:163	CISH-tgt8	61.9%	1.6%
SEQ ID NO:75	B2M-tgt25	24.4%	3.6%	SEQ ID NO:164	CISH-tgt9	79.7%	1.2%
SEQ ID NO:76	B2M-tgt26	0.2%	0.0%	SEQ ID NO:165	CISH-tgt10	70.9%	2.5%
SEQ ID NO:77	B2M-tgt27	31.3%	2.6%	SEQ ID NO:166	CBLB-tgt1	12.2%	6.4%
SEQ ID NO:78	B2M-tgt28	27.3%	4.0%	SEQ ID NO:167	CBLB-tgt2	14.6%	1.7%
SEQ ID NO:79	B2M-tgt29	2.8%	0.5%	SEQ ID NO:168	CBLB-tgt3	48.5%	1.6%
SEQ ID NO:80	B2M-tgt30	31.7%	2.2%	SEQ ID NO:169	CBLB-tgt4	71.9%	1.5%
SEQ ID NO:81	B2M-tgt31	14.8%	1.9%	SEQ ID NO:170	CBLB-tgt5	27.1%	2.8%
SEQ ID NO:82	B2M-tgt32	54.4%	4.4%	SEQ ID NO:171	CBLB-tgt6	85.8%	1.8%
SEQ ID NO:83	B2M-tgt33	0.4%	0.2%	SEQ ID NO:172	CBLB-tgt7	16.8%	1.8%
SEQ ID NO:84	B2M-tgt34	77.1%	1.8%	SEQ ID NO:173	CBLB-tgt8	4.1%	0.9%
SEQ ID NO:85	B2M-tgt35	15.3%	1.5%	SEQ ID NO:174	CBLB-tgt9	1.5%	0.0%
SEQ ID NO:86	B2M-tgt36	60.4%	5.9%	SEQ ID NO:175	CBLB-tgt10	6.4%	0.9%

[0494]

표 7 Cas12a crRNA/핵단백질 복합체로 검출된 indel 퍼센트							
SEQ ID NO:	표적 ID	% 편집	StDev	SEQ ID NO:	표적 ID	% 편집	StDev
SEQ ID NO:87	B2M-tgt37	3.4%	0.7%	SEQ ID NO:176	CBLB-tgt11	17.2%	2.1%
SEQ ID NO:88	B2M-tgt38	3.7%	0.4%	SEQ ID NO:177	CBLB-tgt12	31.2%	3.0%
SEQ ID NO:89	B2M-tgt39	48.2%	4.0%	SEQ ID NO:178	CBLB-tgt13	0.4%	0.0%
SEQ ID NO:90	B2M-tgt40	7.0%	0.8%	SEQ ID NO:179	CBLB-tgt14	0.2%	0.1%
SEQ ID NO:91	B2M-tgt41	1.1%	0.4%	SEQ ID NO:180	CBLB-tgt15	7.0%	0.5%
SEQ ID NO:92	B2M-tgt42	1.0%	0.1%	SEQ ID NO:181	CBLB-tgt16	5.2%	0.4%
SEQ ID NO:93	B2M-tgt43	3.0%	0.4%	SEQ ID NO:182	CBLB-tgt17	22.2%	2.1%
SEQ ID NO:94	B2M-tgt44	35.6%	3.0%	SEQ ID NO:183	CBLB-tgt17	0.0%	0.0%
SEQ ID NO:95	B2M-tgt45	4.9%	0.8%	SEQ ID NO:184	CBLB-tgt17	0.0%	0.0%
SEQ ID NO:96	B2M-tgt46	3.5%	0.4%	SEQ ID NO:185	CBLB-tgt20	2.4%	0.3%
SEQ ID NO:97	B2M-tgt47	6.3%	0.9%	SEQ ID NO:186	CBLB-tgt21	6.2%	0.9%
SEQ ID NO:98	B2M-tgt48	7.9%	0.6%	SEQ ID NO:187	CBLB-tgt22	17.6%	5.2%
SEQ ID NO:99	B2M-tgt49	38.7%	2.6%	SEQ ID NO:188	CBLB-tgt23	19.8%	2.8%
SEQ ID NO:100	B2M-tgt50	6.4%	0.8%	SEQ ID NO:189	CBLB-tgt24	0.1%	0.0%

StDev=표준 편차; n=3

표 7에 제시된 데이터는 Cas12a crRNA/핵단백질 복합체가 인간 1차 T 세포에서 다중 유전자를 편집 중일 수 있음을 명확하게 보여준다. 본원의 다른 곳에 기재된 것과 같은 다른 유전자는 AsCas12a 또는 다른 Cas12a 단백질 (예컨대 엘. 박테리움 또는 에프. 노비시다)을 사용하여 유사한 방식으로 표적화될 수 있다.

실시예 5

표적 결합 서열 내의 DNA를 갖는 Cas12a chRDNA 가이드 분자의 조작

하기 실시예는 표적 결합 서열 내의 DNA 염기를 포함하도록 AsCas12a chRDNA 가이드 분자를 조작하는 것을 설명한다.

A. 인 실리코 Cas12a chRDNA 가이드 설계

AsCas12a 가이드의 20개 뉴클레오타이드 표적 결합 서열이 조작을 위해 선택되었고, 개별 DNA 염기는 표적 결합 서열 내의 각각의 위치에서 활용되었다. AsCas12a chRDNA 가이드 분자의 표적 결합 서열 내의 DNA 염기의 위치가 표 8에 제시되어 있다 (DNA 염기는 "d"로 표시되고 RNA 염기는 "R"로 표시되며; 대조군 crRNA가 또한 표시됨).

표 8 AsCas12a chRDNA 가이드 표적 결합 서열		
SEQ ID NO:	DNA 위치	서열
SEQ ID NO:190	crRNA	RRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:191	1	dRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:192	2	RdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:193	3	RRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:194	4	RRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:195	5	RRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:196	6	RRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:197	7	RRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:198	8	RRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:199	9	RRRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:200	10	RRRRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:201	11	RRRRRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:202	12	RRRRRRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:203	13	RRRRRRRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:204	14	RRRRRRRRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:205	15	RRRRRRRRRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:206	16	RRRRRRRRRRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:207	17	RRRRRRRRRRRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:208	18	RRRRRRRRRRRRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:209	19	RRRRRRRRRRRRRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR
SEQ ID NO:210	20	RRRRRRRRRRRRRRRRRRRdRRRRRRRRRRRRRRRRRRRR

[0503]

[0504]

인간 B2M을 코딩하는 유전자 내의 3개의 표적 서열 (B2M-tgt12, B2M-tgt1, B2M-인트론-tgt12), 인간 TRAC를 코딩하는 유전자 내의 표적 서열 (TRAC-tgt12), 및 인간 DNA 메틸트랜스퍼라제 1 (DNMT1)을 코딩하는 유전자 내의 표적 서열 (DNMT1-tgt1)이 편집을 위해 선택되었다. Cas12a crRNA 대조군 서열 뿐만 아니라 각각의 위치에 단일 DNA 염기를 함유하는 표적 결합 서열을 포함하는 각각의 표적에 대한 Cas12a chRDNA 가이드 (표 8 참조)가 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다.

[0505]

B. 세포 형질감염 및 분석

[0506]

스크리닝을 위한 개별 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체는 본질적으로 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조되었다. 실시예 3에 기재된 바와 같이 핵단백질 복합체를 1차 T 세포로 형질감염시키고, 그 결과로 생성된 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 게놈 편집 효율을 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정하였다. 세포내 편집 실험의 결과가 표 9에 제시되어 있다.

표 9 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 편집 비율									
표적	SEQ ID NO:	DNA 위치	% 편집	StDev	표적	SEQ ID NO:	DNA 위치	% 편집	StDev
B2M-tgt12	SEQ ID NO:211	crRNA	87.00%	1.10%	DNMT1-tgt1	SEQ ID NO:253	crRNA	67.10%	2.50%
	SEQ ID NO:212	1	86.40%	1.40%		SEQ ID NO:254	1	68.30%	1.30%
	SEQ ID NO:213	2	84.60%	2.70%		SEQ ID NO:255	2	2.10%	0.20%
	SEQ ID NO:214	3	84.80%	2.20%		SEQ ID NO:256	3	36.40%	0.80%
	SEQ ID NO:215	4	87.00%	1.20%		SEQ ID NO:257	4	12.30%	0.30%
	SEQ ID NO:216	5	86.00%	1.10%		SEQ ID NO:258	5	0.30%	0.10%
	SEQ ID NO:217	6	86.60%	1.00%		SEQ ID NO:259	6	28.00%	0.60%
	SEQ ID NO:218	7	86.30%	0.40%		SEQ ID NO:260	7	8.20%	0.30%
	SEQ ID NO:219	8	85.00%	1.60%		SEQ ID NO:261	8	67.30%	1.20%
	SEQ ID NO:220	9	85.30%	1.50%		SEQ ID NO:262	9	63.80%	1.90%
	SEQ ID NO:221	10	87.00%	2.20%		SEQ ID NO:263	10	62.60%	1.30%
	SEQ ID NO:222	11	85.50%	2.00%		SEQ ID NO:264	11	58.50%	4.10%
	SEQ ID NO:223	12	86.30%	0.90%		SEQ ID NO:265	12	45.60%	0.40%
	SEQ ID NO:224	13	85.70%	1.30%		SEQ ID NO:266	13	18.90%	1.00%
	SEQ ID NO:225	14	80.80%	1.40%		SEQ ID NO:267	14	64.10%	1.10%

[0507]

표 9
Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 편집 비율

표적	SEQ ID NO:	DNA 위치	% 편집	StDev	표적	SEQ ID NO:	DNA 위치	% 편집	StDev
	SEQ ID NO:226	15	85.10%	1.40%		SEQ ID NO:268	15	62.30%	1.00%
	SEQ ID NO:227	16	55.30%	2.10%		SEQ ID NO:269	16	42.90%	1.10%
	SEQ ID NO:228	17	86.20%	1.90%		SEQ ID NO:270	17	59.20%	1.50%
	SEQ ID NO:229	18	86.00%	2.20%		SEQ ID NO:271	18	43.40%	1.00%
	SEQ ID NO:230	19	87.10%	2.30%		SEQ ID NO:272	19	63.40%	1.60%
	SEQ ID NO:231	20	86.20%	1.40%		SEQ ID NO:273	20	64.60%	2.20%
TRAC-tgt12	SEQ ID NO:232	crRNA	90.57%	1.16%	B2M-tgt1	SEQ ID NO:274	crRNA	95.20%	0.60%
	SEQ ID NO:233	1	85.87%	0.52%		SEQ ID NO:275	1	94.80%	1.00%
	SEQ ID NO:234	2	83.90%	0.93%		SEQ ID NO:276	2	20.70%	1.40%
	SEQ ID NO:235	3	28.67%	1.42%		SEQ ID NO:277	3	90.90%	1.20%
	SEQ ID NO:236	4	61.27%	1.97%		SEQ ID NO:278	4	49.50%	2.30%
	SEQ ID NO:237	5	16.43%	1.14%		SEQ ID NO:279	5	20.00%	0.70%
	SEQ ID NO:238	6	2.75%	0.02%		SEQ ID NO:280	6	90.40%	0.60%
	SEQ ID NO:239	7	70.90%	0.71%		SEQ ID NO:281	7	61.90%	2.10%
	SEQ ID NO:240	8	22.27%	0.99%		SEQ ID NO:282	8	95.50%	1.00%

[0508]

표 9
Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 편집 비율

표적	SEQ ID NO:	DNA 위치	% 편집	StDev	표적	SEQ ID NO:	DNA 위치	% 편집	StDev
	SEQ ID NO:241	9	78.90%	1.13%		SEQ ID NO:283	9	94.50%	1.40%
	SEQ ID NO:242	10	83.50%	0.67%		SEQ ID NO:284	10	93.50%	1.70%
	SEQ ID NO:243	11	86.97%	1.21%		SEQ ID NO:285	11	94.90%	1.00%
	SEQ ID NO:244	12	76.30%	0.24%		SEQ ID NO:286	12	94.40%	0.60%
	SEQ ID NO:245	13	58.53%	1.67%		SEQ ID NO:287	13	84.70%	3.30%
	SEQ ID NO:246	14	79.27%	1.21%		SEQ ID NO:288	14	95.70%	0.90%
	SEQ ID NO:247	15	87.40%	1.42%		SEQ ID NO:289	15	92.90%	5.00%
	SEQ ID NO:248	16	73.87%	0.87%		SEQ ID NO:290	16	94.90%	1.10%
	SEQ ID NO:249	17	90.97%	1.47%		SEQ ID NO:291	17	95.40%	0.90%
	SEQ ID NO:250	18	67.97%	0.78%		SEQ ID NO:292	18	94.20%	1.10%
	SEQ ID NO:251	19	90.27%	0.90%		SEQ ID NO:293	19	95.60%	0.80%
	SEQ ID NO:252	20	95.10%	0.70%		SEQ ID NO:294	20	93.80%	1.00%
B2M-인트론-tgt1	SEQ ID NO:295	crRNA	86.40%	6.60%					
	SEQ ID NO:296	1	87.50%	2.00%					
	SEQ ID NO:297	2	13.60%	1.00%					

[0509]

표 9 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 편집 비율									
표적	SEQ ID NO:	DNA 위치	% 편집	StDev	표적	SEQ ID NO:	DNA 위치	% 편집	StDev
	SEQ ID NO:298	3	53.80%	1.00%					
	SEQ ID NO:299	4	54.70%	3.90%					
	SEQ ID NO:300	5	7.70%	0.40%					
	SEQ ID NO:301	6	56.40%	6.80%					
	SEQ ID NO:302	7	28.20%	3.00%					
	SEQ ID NO:303	8	87.30%	0.40%					
	SEQ ID NO:304	9	85.00%	1.70%					
	SEQ ID NO:305	10	86.80%	1.70%					
	SEQ ID NO:306	11	87.70%	0.60%					
	SEQ ID NO:307	12	80.10%	1.20%					
	SEQ ID NO:308	13	53.10%	2.60%					
	SEQ ID NO:309	14	85.20%	2.70%					
	SEQ ID NO:310	15	84.10%	3.00%					
	SEQ ID NO:311	16	66.50%	2.30%					
	SEQ ID NO:312	17	87.80%	1.10%					

표 9 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 편집 비율									
표적	SEQ ID NO:	DNA 위치	% 편집	StDev	표적	SEQ ID NO:	DNA 위치	% 편집	StDev
	SEQ ID NO:313	18	77.10%	2.00%					
	SEQ ID NO:314	19	86.20%	1.10%					
	SEQ ID NO:315	20	87.40%	1.60%					

StDev=표준 편차; n=3

표 9에서의 편집 결과는 스페이서 내의 DNA를 포함하는 Cas12a chRDNA 가이드 분자가 다중 표적 전체에 걸쳐 crRNA에 필적하는 비율로 편집할 수 있음을 입증한다 (서열식별번호: 211과 서열식별번호: 224를 비교하거나; 서열식별번호: 232와 서열식별번호: 234를 비교하거나, 또는 서열식별번호: 274와 서열식별번호: 293을 비교함). 표 9에서의 chRDNA 가이드 설계의 편집 비율은 각각의 표적에 대한 crRNA의 편집 비율로 정규화되었다. 평균 정규화된 편집 비율이 도 13에 제시되며, 여기서 표적 결합 서열 내의 위치는 평균 정규화된 편집의 함수로서 플롯된다. DNA 염기 활용의 바람직한 위치 (즉, 70% 초과 평균 정규화된 편집)는 회색 채우기로 표시되며, 위치 1, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 및 20을 포함한다. 표 9 및 도 13에서의 데이터 뿐만 아니라 본 실시예에 제시된 데이터는 Cas12a 가이드의 표적 결합 서열 내의 어느 위치가 DNA로서 조작될 수

있는지를 결정하는데 사용될 수 있다.

[0514] 실시예 6

[0515] 표적 결합 서열 내의 다중 DNA 염기를 갖는 Cas12a chRNA 가이드 분자

[0516] 본 실시예는 표적 결합 서열 내의 다중 DNA 염기를 갖는 Cas12a chRNA 가이드 분자의 설계 및 시험을 설명한다.

[0517] A. Cas12a chRNA 가이드의 인 실리코 설계

[0518] 인간 B2M을 코딩하는 유전자 내의 3개의 표적 (B2M-tgt12, B2M-tgt1, B2M-인트론-tgt12), 인간 TRAC를 코딩하는 유전자 내의 표적 (TRAC-tgt12), 및 인간 DNA 메틸트랜스퍼라제 1을 코딩하는 유전자 내의 표적 (DNMT1-tgt1)의 20개 뉴클레오티드 서열이 편집을 위해 선택되었다. 각각의 표적에 대해, DNA의 1 내지 7개의 뉴클레오티드를 각각의 AsCas12a 가이드의 표적 결합 서열로 설계하였다. DNA 염기의 위치에 대한 설계 기준은 이전의 단일 위치 스크린 데이터 (실시예 5 참조), DNA에 내성이 있는 위치의 사전 컨센서스 (도 13 참조), 표적 결합 서열 내의 개별 DNA 염기 간의 거리, 및 오프-표적 서열에서 미스매치의 공지된 위치를 포함하나 이에 제한되지는 않았다. Cas12a chRNA 가이드 설계 뿐만 아니라 crRNA 대조군 서열이 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다.

[0519] B. 세포 형질감염 및 분석

[0520] 스크리닝을 위한 개별 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체는 본질적으로 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조되었다. 실시예 3에 기재된 바와 같이 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체를 1차 T 세포로 형질감염시키고, 그 결과로 생성된 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 게놈 편집 효율을 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정하였다. 세포내 편집 실험의 결과, 및 각각의 Cas12a chRNA 가이드의 표적 결합 서열 내의 DNA 염기의 위치가 표 10에 제시되어 있다.

표 10 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 편집 비율				
표적	SEQ ID NO:	DNA 위치	% 편집	StDev
TRAC-tgt12	SEQ ID NO: 316	-	89.00%	1.45%
	SEQ ID NO:317	20, 19	90.00%	0.64%
	SEQ ID NO:318	20,17	90.80%	1.84%
	SEQ ID NO:319	19, 15	80.17%	2.23%
	SEQ ID NO:320	11, 10	87.10%	1.06%
	SEQ ID NO:321	20, 11, 1	90.27%	0.78%
	SEQ ID NO:322	17, 11	87.03%	2.36%
	SEQ ID NO:323	2, 1	23.90%	0.30%
	SEQ ID NO:324	15, 10, 11	60.93%	0.93%
	SEQ ID NO:325	20, 17, 10, 1	59.93%	6.09%
	SEQ ID NO:326	18, 15, 2	10.87%	0.23%
	SEQ ID NO:327	18, 15, 11, 10, 3	5.20%	0.20%
	SEQ ID NO:328	10, 17, 15, 10, 1	74.17%	0.93%
	SEQ ID NO:329	20, 19, 17, 15, 11, 10, 2	1.29%	0.11%
B2M-tgt12	SEQ ID NO:330	-	95.20%	0.60%
	SEQ ID NO:331	20,17	90.83%	0.17%
	SEQ ID NO:332	15, 11	90.77%	1.27%
	SEQ ID NO:333	15, 14	92.17%	1.53%
	SEQ ID NO:334	11, 10	90.83%	1.05%
	SEQ ID NO:335	20, 11, 1	93.60%	0.92%
	SEQ ID NO:336	17, 11	92.57%	1.52%
	SEQ ID NO:337	2, 1	90.70%	0.64%
	SEQ ID NO:338	20, 17, 15, 2	65.30%	8.02%
	SEQ ID NO:339	15, 14, 11, 10	72.63%	1.62%
	SEQ ID NO:340	20, 17, 11, 10, 2, 1,	50.37%	8.52%
	SEQ ID NO:341	17, 15, 14, 11, 10, 9, 3, 1	21.53%	1.15%
	SEQ ID NO:342	19, 16, 13, 11, 10, 1	0.51%	0.09%
	SEQ ID NO:343	16, 9, 3, 2, 1	4.41%	0.25%
	SEQ ID NO:344	20-11	0.00%	0.05%
B2M-tgt1	SEQ ID NO:345	-	97.30%	0.20%
	SEQ ID NO:346	20, 11, 1	85.00%	0.30%
	SEQ ID NO:347	19, 14, 8	94.90%	0.60%
	SEQ ID NO:348	19, 17, 14, 8	52.70%	4.80%
	SEQ ID NO:349	12, 11, 8	65.70%	1.70%
	SEQ ID NO:350	18, 16, 10	59.20%	5.30%
	SEQ ID NO:351	19, 17, 15, 1	74.10%	2.40%
	SEQ ID NO:352	19-16	4.50%	0.60%

표 10 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 편집 비율				
표적	SEQ ID NO:	DNA 위치	% 편집	StDev
B2M-인트론-tgt1	SEQ ID NO:353	-	79.80%	3.00%
	SEQ ID NO:354	20, 11, 1	79.10%	3.90%
	SEQ ID NO:355	20, 17, 11	78.30%	2.00%
	SEQ ID NO:356	8-Nov	65.40%	1.70%
	SEQ ID NO:357	17, 10, 8, 1	74.20%	2.10%
	SEQ ID NO:358	20, 19, 17	61.40%	4.00%
	SEQ ID NO:359	20, 19, 9, 8	66.60%	1.90%
	SEQ ID NO:360	20, 19, 17, 11, 10, 1	42.40%	6.10%
DNMT1-tgt1	SEQ ID NO:361	-	69.00%	1.06%
	SEQ ID NO:362	1, 2	63.43%	3.69%
	SEQ ID NO:363	14, 2	53.00%	0.26%
	SEQ ID NO:364	8, 19	65.80%	2.35%
	SEQ ID NO:365	8, 14	59.93%	1.42%
	SEQ ID NO:366	1, 8, 20	67.43%	0.85%
	SEQ ID NO:367	10-Aug	51.73%	1.01%
	SEQ ID NO:368	8, 9, 15	54.90%	2.96%
	SEQ ID NO:369	1, 8, 19	54.10%	4.11%

StDev=표준 편차; n=3

표 10에서의 편집 결과는 표적 결합 서열 내의 다중 DNA 염기를 포함하는 Cas12a chrDNA 가이드 분자가 다중 표

적 전체에 걸쳐 crRNA에 필적하는 비율로 편집할 수 있음을 입증한다 (서열식별번호: 316과 서열식별번호: 321를 비교하거나; 서열식별번호: 330과 서열식별번호: 335를 비교하거나, 또는 서열식별번호: 345와 서열식별번호: 347을 비교함).

[0525] 실시예 7

[0526] Cas12a chRDNA 가이드로 감소된 오프-표적 편집

[0527] 본 실시예는 SITE-Seq® 검정을 사용한 Cas12a 오프-표적의 확인 (문헌 [Cameron, P., et al., (2017). *Mapping the genomic landscape of CRISPR-Cas9 cleavage*. Nature Methods, 14(6), 600-606. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4284>]) 및 Cas12a crRNA 가이드와 비교하여 Cas12a chRDNA 가이드의 오프-표적 편집 비율 감소를 설명한다.

[0528] A. SITE-Seq® 검정

[0529] 인간 1차 T 세포를 실시예 1에 기재된 바와 같이 성장시켰다. 50 ml 원추형 튜브에서 세포를 확장한 후, 제조업체의 프로토콜에 따라 혈액 및 세포 배양 DNA 맥시 키트 (퀴아젠; 독일 힐텐)를 사용하여, 인간 1차 T 세포로부터 고분자량 게놈 DNA (gDNA)를 추출하였다.

[0530] 인간 리보솜 단백질 L32 (RPL32)를 코딩하는 유전자 (RPL32-tgt1) 및 DNMT1을 코딩하는 유전자 (DNMT1-tgt1) 내의 20개 뉴클레오티드 표적을 SITE-Seq® 검정을 사용하여 평가를 위해 선택하였다 (Cameron, P., et al., (2017). Nature Methods, 14(6), 600-606). 각각의 Cas12a 가이드 성분을 상응하는 핵단백질 농도로 연속 희석하고, 95°C에서 2분 동안 인큐베이션한 다음, 5분에 걸쳐 천천히 실온이 되도록 두었다. 절단 반응 완충액 (60 mM TRIS-아세테이트, 150 mM 아세트산칼륨, 30 mM 아세트산마그네슘, pH 7.9) 중에 인큐베이션된 Cas12a 가이드와 Cas12a 단백질을 3:1 비율로 조합함으로써 RPL32 (서열식별번호: 375) 및 DNMT1 (서열식별번호: 404) 표적에 대한 Cas12a 핵단백질 복합체를 형성하고 37°C에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 10 µg의 게놈 DNA (gDNA)의 개별 절단은 총 용적 50 µL에서 6개의 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체 농도 (8 nM, 16 nM, 32 nM, 48 nM, 64 nM, 96 nM, 및 128 nM)에서 발생하였다. 음성 대조군 반응물 (0 nM)을 병렬로 어셈블리하였고, 어떠한 핵단백질 복합체도 포함하지 않았다. 음성 대조군을 포함한 모든 절단 반응물은 96-웰 형식 플레이트에서 모두 3중으로 어셈블리되었다. 절단 반응물을 37°C에서 4시간 동안 인큐베이션하였다.

[0531] 라이브러리 준비 및 시퀀싱은 핵단백질 복합체 절단 후 dA-테일링 단계를 제외하고, 본질적으로 문헌 [Cameron et al. (Nature Meth., 2017, 14:600-606)]에 기재된 바와 같이 수행되었다. 엇갈린 (5' 오버행) 단부를 초래하는 Cas12a 핵단백질 복합체 절단으로 인해 부가의 효소적 단부-복구 단계가 필요하였다. 부가된 용적은 동일하게 유지되었지만, 원래 dA-테일링 키트 성분은 뉴잉글랜드 바이오랩스로부터의 NEBNext® Ultra™ 단부 복구/dA-테일링 모듈 (NEB # E7442L)의 단부 프랩 효소 믹스 (3 µL) 및 10x 단부 복구 반응 완충액 (5 µL) 성분으로 교체되었다. 샘플을 20°C에서 30분 동안 인큐베이션한 다음, 65°C에서 30분 동안 인큐베이션하고 표준 절차를 재개하였다. NGS 시퀀싱은 일루미나 NextSeq 플랫폼 (일루미나; 미국 캘리포니아주 샌디에이고)을 사용하여 수행되었으며, 각각의 샘플에 대해 ~3백만 판독값을 획득하였다. 커트-부위의 1개 뉴클레오티드 내에 위치한 오프-표적 모티프 없이 SITE-Seq® 검정 (문헌 [Cameron, P., et al., (2017). Nature Methods, 14(6), 600-606])에 의해 회수된 임의의 부위는 위양성물로 간주되어 폐기되었다. SITE-Seq® 오프-표적 검정 실험으로부터 회수된 표적화 부위의 수가 표 11에 제시되어 있다.

표 11 SITE-Seq® 검정 회수된 부위의 수							
SEQ ID NO:	핵단백질 복합체 농도						
	8nM	16nM	32nM	48nM	64nM	96nM	128nM
SEQ ID NO:370	0	6	51	158	221	262	280
SEQ ID NO:404	2	4	10	22	57	88	109

[0532]

[0533] 표 11에 제시된 데이터는 SITE-Seq® 검정 (문헌 [Cameron, P., et al., (2017). *Mapping the genomic landscape of CRISPR-Cas9 cleavage*. Nature Methods, 14(6), 600-606])이 추가의 세포내 평가를 위해 Cas12 가이드의 생화학적 오프-표적을 회수한다는 것을 명확하게 보여준다.

[0534] B. SITE-Seq® 오프-표적 검정 회수된 부위의 세포내 검증

[0535] 표 11에 제시된 SITE-Seq® 오프-표적 부위에서 indel 빈도를 측정하기 위해, 표적화된 심층 시퀀싱 분석이 가장 낮은 (예를 들어, 8 nM 및 16 nM) Cas12a 핵단백질 복합체 농도에 대해 RPL32 및 DNMT1 샘플에서 회수된 부

위의 서브세트에서 수행되었다. RPL32 샘플로부터의 2개의 오프-표적 부위 (서열식별번호: 371 및 서열식별번호: 372) 및 DNMT1 내의 단일 오프-표적 부위 (서열식별번호: 374)를 선택하여 crRNA에 의한 세포내 오프-표적 편집 비율을 평가하였다. 정방향 및 역방향 앰플리콘 프라이머는 각각의 오프-표적 부위에 대해 설계되었고 상업적 제조업체로부터 주문되었다.

인간 1차 T 세포를 실시예 1에 기재된 바와 같이 배양하였다. RPL32 (서열식별번호: 375) 및 DNMT1 (서열식별번호: 404) Cas12a 핵단백질 복합체를 본질적으로 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조하였다. 실시예 3에 기재된 바와 같이 핵단백질 복합체를 1차 T 세포로 형질감염시키고, 그 결과로 생성된 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 게놈 편집 효율을 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정하였다. 형질감염되지 않은 세포 풀을 야생형 참조로서 사용하였다. 돌연변이체 판독값 (% indel)은 커트 부위의 20개 염기쌍 (bp) 내의 임의의 비-참조 변이체 호출로서 정의되었다. 시퀀싱 적용 범위가 낮은 부위 (조합된 Cas12a 핵단백질 복합체-처리된 샘플에서 <1,000개 판독값 또는 참조 샘플에서 <200개 판독값) 또는 참조 샘플에서 >2% 변이체 호출이 있는 부위는 폐기되었다. 조합된 Cas12a 핵단백질 복합체-처리된 샘플에서 >0.1% 돌연변이체 판독값이 축적된 경우, 부위는 세포 오프-표적으로서 집계되었다. 회수된 SITE-Seq® (문헌 [Cameron, P., et al., (2017). Nature Methods, 14(6), 600-606]) 오프-표적 부위의 표적화된 심층 시퀀싱 결과가 표 12에 제시되어 있으며, 여기서 미스매치된 뉴클레오티드에 밑줄이 그어져 있다.

표 12 SITE-Seq® 검정 오프-표적 부위의 세포내 검증					
SEQ ID NO.	명칭	hg38 좌표	서열	평균	StDev
SEQ ID NO:370	RPL32_on	chr3:129389653-129389676	TTTGGGGTGATC AGACCCAACAGC	47.1%	1.7%
SEQ ID NO:371	RPL32-off.1	chr2:88944276-88944299	TTTGGGGTGATC AGACCCAACACC	26.4%	0.3%
SEQ ID NO:372	RPL32-off.2	chr6:33355564-33355587	TTTGGGGTGATC AGACCCAACACC	23.6%	0.6%
SEQ ID NO:373	DNMT1_on	chr19:10133770-10133793	TTTCCTGATGGTC CATGTCTGTTA	41.1%	0.6%
SEQ ID NO:374	DNMT1_off-1	chr1:213204014-213204037	TTTCCTGATGGTC CATGTCTGAAT	0.2%	0.0%

StDev=표준 편차; n=3

표 12에 제시된 데이터는 SITE-Seq® 검정이 Cas12a crRNA 가이드에 의해 T-세포에서 편집되는 오프-표적을 회복한다는 것을 명확하게 보여준다.

C. chrDNA 가이드의 인 실리코 설계

인간 RPL32를 코딩하는 유전자 (RPL32-tgt1) 및 DNMT1을 코딩하는 유전자 (DNMT1-tgt1) 내의 20개-뉴클레오티드 표적이 편집을 위해 선택되었다. 각각의 표적에 대해, DNA의 1 내지 4개 뉴클레오티드를 각각의 AsCas12a chrDNA 가이드의 표적 결합 서열로 설계하였다. DNA 염기의 위치에 대한 설계 기준은 이전의 단일 위치 스크린 데이터 (실시예 5 참조), DNA에 내성이 있는 위치의 사전 컨센서스 (도 13 참조), 표적 결합 서열 내의 개별 DNA 염기 간의 거리, 및 오프-표적 서열에서 미스매치의 공지된 위치를 포함하였으나 이에 제한되지는 않았다. Cas12a chrDNA 가이드 뿐만 아니라 Cas12a crRNA 대조군 서열이 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다.

D. 세포 형질감염 및 분석

개별 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체는 본질적으로 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조하였다. 실시예 3에 기재된 바와 같이 핵단백질 복합체를 1차 T 세포로 형질감염시키고, 그 결과로 생성된 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 게놈 편집 효율을 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정하였다. RPL32 (표 13) 및 DNMT1 (표 14) 표적에 대한 온- 및 오프-표적 (표 12 참조) 세포 편집 실험의 결과 및 각각의 Cas12a chrDNA 가이드의 표적 결합 서열 내의 DNA 염기의 위치가 제시된다. 부가적으로, 무염기 테옥시리보스 부위가 있는 Cas12a chrDNA 가이드 분자를 또한 시험하였으며, 무염기 부위의 위치는 dN으로 표시된다.

표 13 RPL32 crRNA 및 chRDNA 가이드 온- 및 오프-표적 편집							
SEQ ID NO.	DNA 위치	온		오프-표적 1		오프-표적 2	
		평균	StDev	평균	StDev	평균	StDev
SEQ ID NO:375	-	81.0%	0.8%	35.8%	0.8%	41.1%	0.1%
SEQ ID NO:376	1	58.8%	2.4%	23.9%	1.7%	21.4%	1.5%
SEQ ID NO:377	8	37.5%	3.1%	10.5%	1.3%	8.8%	1.5%
SEQ ID NO:378	9	52.7%	1.7%	13.0%	0.7%	11.9%	0.6%
SEQ ID NO:379	10	55.1%	1.9%	19.9%	1.8%	17.9%	1.8%
SEQ ID NO:380	11	66.6%	3.8%	23.7%	3.1%	24.4%	3.4%
SEQ ID NO:381	12	64.8%	3.3%	13.5%	1.6%	14.9%	1.9%
SEQ ID NO:382	14	67.2%	2.6%	17.0%	1.7%	16.7%	1.0%
SEQ ID NO:383	15	70.0%	1.6%	16.0%	1.6%	18.3%	1.5%
SEQ ID NO:384	16	45.1%	1.9%	0.8%	0.2%	1.1%	0.2%
SEQ ID NO:385	17	56.1%	2.0%	14.2%	0.5%	14.3%	1.2%
SEQ ID NO:386	18	38.8%	3.2%	5.8%	0.6%	6.6%	0.7%

[0544]

표 13 RPL32 crRNA 및 chRDNA 가이드 온- 및 오프-표적 편집							
SEQ ID NO.	DNA 위치	온		오프-표적 1		오프-표적 2	
		평균	StDev	평균	StDev	평균	StDev
SEQ ID NO:387	19	54.7%	1.7%	18.0%	0.7%	17.7%	1.4%
SEQ ID NO:388	20	56.1%	2.0%	22.3%	1.9%	20.1%	0.4%
SEQ ID NO:389	13	64.5%	2.4%	0.3%	0.0%	0.4%	0.0%
SEQ ID NO:390	11, 12	80.3%	1.0%	5.4%	0.2%	6.0%	0.4%
SEQ ID NO:391	12, 14	79.1%	0.8%	1.6%	0.1%	1.8%	0.3%
SEQ ID NO:392	14, 15	72.8%	2.6%	1.4%	0.2%	1.6%	0.3%
SEQ ID NO:393	11, 15	81.8%	0.9%	6.0%	0.1%	6.8%	0.3%
SEQ ID NO:394	11, 12, 14	77.7%	0.3%	0.9%	0.2%	1.1%	0.2%
SEQ ID NO:395	12, 14, 15	64.5%	2.5%	0.2%	0.1%	0.2%	0.1%
SEQ ID NO:396	11, 14, 15	74.4%	2.0%	0.9%	0.1%	1.0%	0.1%
SEQ ID NO:397	11, 12, 14, 15	8.3%	0.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
SEQ ID NO:398	dN(20)	59.2%	2.9%	4.5%	0.9%	4.9%	0.6%

[0545]

표 13 RPL32 crRNA 및 chRDNA 가이드 온- 및 오프-표적 편집							
SEQ ID NO.	DNA 위치	온		오프-표적 1		오프-표적 2	
		평균	StDev	평균	StDev	평균	StDev
SEQ ID NO:399	14, dN(20)	40.3%	1.1%	0.6%	0.1%	0.5%	0.1%
SEQ ID NO:400	15, dN(20)	20.2%	2.2%	0.1%	0.0%	0.2%	0.1%
SEQ ID NO:401	12, dN(20)	50.2%	3.3%	0.5%	0.1%	0.6%	0.1%
SEQ ID NO:402	11, dN(20)	25.6%	1.0%	0.7%	0.2%	0.7%	0.1%
SEQ ID NO:403	14, dN(20)	19.5%	1.6%	0.1%	0.0%	0.1%	0.0%

[0546]

[0547] StDev=표준 편차; n=3

표 14 DNMT1 crRNA 및 chRDNA 가이드 온- 및 오프-표적 편집					
SEQ ID NO.	DNA 위치	온		오프-표적 1	
		평균	StDev	평균	StDev
SEQ ID NO:404	-	68.4%	1.3%	0.9%	0.2%
SEQ ID NO:405	1, 20	68.2%	0.4%	0.6%	0.0%
SEQ ID NO:406	8, 19	63.6%	4.6%	0.5%	0.1%
SEQ ID NO:407	9	63.8%	1.9%	0.3%	0.0%
SEQ ID NO:408	8, 14	61.1%	1.5%	0.2%	0.1%
SEQ ID NO:409	10, 17	56.4%	1.8%	0.1%	0.0%
SEQ ID NO:410	1, 8, 20	57.5%	4.4%	0.1%	0.1%
SEQ ID NO:411	1, 8, 19	52.3%	1.1%	<0.1%	0.1%
SEQ ID NO:412	8, 9, 15	52.5%	0.6%	<0.1%	0.0%

[0548]

[0549] StDev=표준 편차; n=3

[0550] 표 13 및 표 14에서의 편집 결과는 Cas12a chRDNA 가이드 분자가 오프-표적 부위에서 감소된 편집이 가능하다는 것을 명확하게 보여주고 (서열식별번호: 375와 서열식별번호: 391; 서열식별번호: 375와 서열식별번호: 394의 오프-표적 편집의 표 13에서의 결과를 비교하고; 서열식별번호: 404와 서열식별번호: 408, 또는 서열식별번호: 404와 서열식별번호: 412의 오프-표적 편집의 표 14에서의 결과를 비교함), 심지어 단일 뉴클레오타드 미스매치가 있는 부위에서도 감소된 편집이 가능하다 (예를 들어, 표 12, 서열식별번호: 371 및 서열식별번호: 372 참조).

[0551] 실시예 8

[0552] 활성화 영역 내의 DNA 염기를 갖는 Cas12a chRDNA 가이드 분자

[0553] 본 실시예는 활성화 영역 내의 DNA 염기를 갖는 AsCas12a chRDNA 가이드 분자의 설계 및 시험을 설명한다.

[0554] A. chRDNA 가이드의 인 실리코 설계

[0555] AsCas12a 가이드의 20개-뉴클레오타드 활성화 영역이 조작을 위해 선택되었으며, 여기서 개별 DNA 염기는 활성화 영역 내의 각각의 위치에서 활용되었다. AsCas12a 가이드의 활성화 영역 내의 DNA 염기의 위치가 표 15에 제시되어 있다.

표 15 활성화 영역 내의 DNA를 갖는 AsCas12a chRDNA 가이드 분자		
SEQ ID NO:	DNA 위치	서열
SEQ ID NO:417	crRNA	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:418	1	TrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:419	2	rUArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:420	3	rUrAArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:421	4	rUrArATrUrUrCrUrArCrUrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:422	5	rUrArArUTrUrCrUrArCrUrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:423	6	rUrArArUrUTrCrUrArCrUrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:424	7	rUrArArUrUrUCrUrArCrUrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:425	8	rUrArArUrUrUrCTrArCrUrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:426	9	rUrArArUrUrUrCrUAcrUrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:427	10	rUrArArUrUrUrCrUrACrUrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:428	11	rUrArArUrUrUrCrUrArCTrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:429	12	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:430	13	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCTrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:431	14	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUTrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:432	15	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUGrUrArGrArU
SEQ ID NO:433	16	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrGTrArGrArU
SEQ ID NO:434	17	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrGrUArGrArU
SEQ ID NO:435	18	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrGrUrAGrArU
SEQ ID NO:436	19	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrGrUrArGrArU
SEQ ID NO:437	20	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrGrUrArGrAT

[0556]

[0557]

인간 DNMT1 (서열식별번호: 361)을 코딩하는 유전자 내의 표적이 편집을 위해 선택하였다. DNMT 표적 결합 서열은 각각의 위치에서 단일 DNA 염기를 함유하는 활성화 영역 서열에 대해 하류 (즉, 3' 방향)에 첨부되었다 (표 15 참조). 서열은 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다.

[0558]

B. 세포 형질감염 및 분석

[0559]

스크리닝을 위한 개별 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체는 본질적으로 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조하였다. 실시예 3에 기재된 바와 같이 핵단백질 복합체를 1차 T 세포로 형질감염시키고, 그 결과로 생성된 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 게놈 편집 효율을 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정하였다. 세포내 편집 실험의 결과가 표 16에 제시되어 있다.

표 16 활성화 영역 내의 DNA를 갖는 Cas12 chRDNA 가이드를 사용한 DNMT1의 편집			
SEQ ID NO:	DNA 위치	평균	StDev
SEQ ID NO:438	crRNA	60.8%	1.0%
SEQ ID NO:439	1	53.1%	0.5%
SEQ ID NO:440	2	29.6%	0.3%
SEQ ID NO:441	3	58.5%	0.1%
SEQ ID NO:442	4	1.4%	0.1%
SEQ ID NO:443	5	44.8%	0.6%
SEQ ID NO:444	6	2.2%	0.1%
SEQ ID NO:445	7	60.8%	1.0%
SEQ ID NO:446	8	25.4%	4.9%
SEQ ID NO:447	9	43.4%	2.2%
SEQ ID NO:448	10	64.8%	3.3%
SEQ ID NO:449	11	19.5%	0.6%
SEQ ID NO:450	12	61.6%	1.4%
SEQ ID NO:451	13	46.4%	1.6%
SEQ ID NO:452	14	65.0%	1.4%
SEQ ID NO:453	15	61.4%	1.1%
SEQ ID NO:454	16	56.8%	0.6%
SEQ ID NO:455	17	58.5%	2.0%
SEQ ID NO:456	18	58.1%	1.0%
SEQ ID NO:457	19	63.0%	0.6%
SEQ ID NO:458	20	28.4%	0.4%

[0560]

[0561]

StDev=표준 편차; n=3

[0562]

표 16에서의 편집 결과는 활성화 영역 내의 DNA를 갖는 Cas12a chRDNA가 다중 표적 전체에 걸쳐 crRNA에 필적하는 비율로 편집할 수 있다는 것을 명확하게 보여준다 (서열식별번호: 438과 서열식별번호: 445를 비교하거나; 서열식별번호: 438과 서열식별번호: 450을 비교하거나, 또는 서열식별번호: 438과 서열식별번호: 457을 비교함). 표 16에서의 chRDNA 설계의 편집 비율은 crRNA의 편집 비율로 정규화되었다. 평균 정규화된 편집 비율은 도 14에 제시되어 있으며, 여기서 활성화 영역 내의 위치는 평균 정규화된 편집의 함수로서 플롯된다. DNA 염기 활용의 바람직한 위치 (즉, 70% 초과와 평균 정규화된 편집)는 회색 채우기로 표시되며 위치 1, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 및 19를 포함한다.

[0563]

D. 활성화 영역 내의 다중 DNA 염기를 갖는 chRDNA

[0564]

표 10에 제시된 결과에 기초하여, 개별 DNA 위치는 다중 DNA 염기를 함유하는 활성화 영역 설계물로 조합되었다. AsCas12a 가이드의 활성화 영역 내의 DNA 염기의 설계 및 위치가 표 17에 제시되어 있다.

표 17 활성화 영역 내의 다중 DNA 염기를 갖는 Cas12a chRDNA 가이드 분자		
SEQ ID NO:	DNA 위치	서열
SEQ ID NO:459	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	TrAArUrUrUCrUrACrUCrUTGrUrArGarU
SEQ ID NO:460	1, 15-19	TrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUGTAGArU
SEQ ID NO:461	1, 13, 16, 17	TrArArUrUrUrCrUrArCrUrCTrGrGTArGrArU
SEQ ID NO:462	7, 10, 12, 14, 15, 17, 19	rUrArArUrUrUCrUrACrUCrUTGrUArGarU
SEQ ID NO:463	1, 3, 12, 14, 16, 17, 19	TrAArUrUrUrCrUrArCrUCrUTrGTArGrArU
SEQ ID NO:464	7, 10, 12, 14, 17, 19	rUrArArUrUrUCrUrACrUCrUTrGrUArGarU
SEQ ID NO:465	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	TrAArUrUrUCrUrACrUCrUTrGrUArGarU

[0565]

[0566]

표 17에 제시된 활성화 영역 설계는 표적 결합 서열 내의 DNA 뉴클레오타이드로 설계된 인간 TRAC를 코딩하는 유

전자 (서열식별번호: 321) 내의 20개 뉴클레오타이드 표적 서열과 조합되었다. TRAC 표적 결합 서열은 표 17에 제시된 활성화 영역 서열에 대해 하류 (즉, 3' 방향)에 첨부되었고, chRDNA 설계물 뿐만 아니라 crRNA 대조군 서열이 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다.

[0567] E. 세포 형질감염 및 분석

[0568] 스크리닝을 위한 개별 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체는 본질적으로 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조하였다. 실시예 3에 기재된 바와 같이 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체를 1차 T 세포로 형질감염시키고, 그 결과로 생성된 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 게놈 편집 효율을 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정하였다. 세포내 편집 실험의 결과 및 각각의 chRDNA의 활성화 영역 및 표적 결합 서열 내의 DNA 염기의 위치가 표 18에 제시되어 있다.

표 18 활성화 영역 및 표적 결합 서열 내의 DNA를 갖는 Cas12 chRDNA 가이드 분자를 사용한 TRAC의 편집				
SEQ ID NO:	활성화 영역 내의 DNA 위치	표적 결합 서열 내의 DNA 위치	평균	StDev
SEQ ID NO:466	0	1, 10, 20	78.7%	1.2%
SEQ ID NO:467	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	1, 10, 20	82.3%	1.1%
SEQ ID NO:468	1, 15-19	1, 10, 20	75.9%	1.3%
SEQ ID NO:469	1, 13, 16, 17	1, 10, 20	76.9%	2.4%
SEQ ID NO:470	7, 10, 12, 14, 15, 17, 19	1, 10, 20	71.3%	1.0%
SEQ ID NO:471	1, 3, 12, 14, 16, 17, 19	1, 10, 20	73.3%	1.9%
SEQ ID NO:472	7, 10, 12, 14, 17, 19	1, 10, 20	67.0%	2.2%
SEQ ID NO:473	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	1, 10, 20	59.3%	4.1%

[0569]

[0570] StDev=표준 편차; n=3

[0571] 표 18에서의 편집 결과는 활성화 영역과 표적 결합 서열 둘 다 내의 DNA를 갖는 Cas12a chRDNA 가이드 분자가 crRNA에 필적하는 비율로 편집할 수 있다는 것을 명확하게 보여준다 (서열식별번호: 466과 서열식별번호: 467을 비교하거나; 서열식별번호: 466과 서열식별번호: 468을 비교하거나, 또는 서열식별번호: 466과 서열식별번호: 469를 비교함).

[0572] 실시예 9

[0573] AAV 공여자 카세트의 클로닝, AAV 생산, 및 1차 세포의 AAV 형질도입

[0574] 본 실시예는 AAV 벡터로의 DNA 공여자 카세트의 설계 및 클로닝, AAV의 생산, Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체의 1차 세포로의 전달, 및 CAR 발현 카세트의 1차 세포로의 부위-특이적 통합을 위한 AAV로 1차 세포의 형질도입을 설명한다.

[0575] AAV는 포유동물 세포에 DNA 공여자 폴리뉴클레오타이드를 전달하도록 조작될 수 있다. AAV 전달이 게놈 절단 이벤트와 조합되고 AAV 내의 DNA 공여자 폴리뉴클레오타이드가 상동성 아암에 의해 플랭킹되는 경우, DNA 공여자 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어, 문헌 [Eyquem et al. (Nature, 2017, 543:113-117)]에 기재된 바와 같이, HDR에 의해 게놈 커트 부위에 매끄럽게 삽입될 수 있다.

[0576] A. AAV 공여자 카세트의 인 실리코 설계 및 rAAV 생산

[0577] CAR 수용체의 설계가 보고되었다. 예를 들어, 문헌 [Kochenderfer et al. (J. Immunotherapy, 2009, 32:689-702)]을 참조한다. CAR 구축물은 N-말단 분비 신호 (CD8a 신호 펩티드), BCMA에 특이적인 scFv 부분, 이어서 CD8 힌지 영역 및 막횡단, 4-1BB 이펙터 영역, CD3ζ 이펙터 영역 및 C-말단 BGH 폴리아데닐화 신호 서열을 함유하도록 설계되었다. 포유동물 프로모터 서열을 CAR 폴리뉴클레오타이드의 상류에 삽입하였다. 부위-특이적 절단 후 DNA 공여자 폴리뉴클레오타이드를 숙주 세포 게놈에 부위-특이적으로 삽입하기 위해, 내인성 TRAC 로커스 (서열식별번호: 23) 내의 표적 부위를 선택하였다. 그런 다음, 커트 부위의 500 bp 길이 상동성 아암 5' 및 3'을 확인하였다. 5' 및 3' 상동성 아암은 DNA 공여자 폴리뉴클레오타이드의 단부에 첨부되었으며, 여기서 DNA 공여자 폴리뉴클레오타이드는 상동성 아암에 대해 역방향으로 (즉, 3'에서 5'로) 배향되었다. 그 결과로 생성된 DNA 공여자 폴리뉴클레오타이드는 서열식별번호: 413에 제시되어 있다.

[0578] B2M 및 HLA 클래스 I 조직적합성 항원인 알파쇄 E (HLA-E)에 대한 설계가 보고되었다. 예를 들어, 문헌

[Gornallusse et al. (*Nature Biotechnology*, 2017, 35(8):765-772)]을 참조한다. 융합 구축물은 N-말단 B2M 분비 신호, 이어서 HLA-G 유래 펩티드 서열, 제1 링커 서열, B2M 서열, 제2 링커 서열, HLA-E 서열 및 C-말단 BGH 폴리아데닐화 신호 서열로 설계되었다. EF1 α 포유동물 프로모터 서열을 B2M-HLA-E 폴리뉴클레오티드의 상류에 삽입하였다. 부위 특이적 절단 후 DNA 공여자 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 계능에 부위 특이적으로 삽입하기 위해, 내인성 B2M 로커스 내의 표적 부위가 선택되었다 (서열식별번호: 62). 그런 다음, 커트 부위의 500 bp 길이 상동성 아암 5' 및 3'을 확인하였다. 5' 및 3' 상동성 아암은 DNA 공여자 폴리뉴클레오티드의 단부에 첨부되었으며, 여기서 DNA 공여자 폴리뉴클레오티드는 상동성 아암에 대해 역방향으로 (즉, 3'에서 5'로) 배향되었다. 그 결과로 생성된 DNA 공여자 폴리뉴클레오티드는 서열식별번호: 414에 제시되어 있다.

[0579] DNA 공여자 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 올리고뉴클레오티드 서열은 적합한 재조합 AAV (rAAV) 플라스미드로의 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다. 서열식별번호: 413을 함유하는 rAAV 플라스미드 및 서열식별번호: 414를 함유하는 별도의 rAAV 플라스미드는 2개의 별도의 AAV6 바이러스로 패키징하기 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다.

[0580] B. rAAV를 사용한 1차 T 세포 형질도입

[0581] 1차 활성화된 T 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 PBMC로부터 획득되었다. TRAC (서열식별번호: 415) 및 B2M (서열식별번호: 416)을 코딩하는 유전자를 표적으로 하는 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체를 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조하였다. T 세포를 TRAC (서열식별번호: 415)-표적화 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체로 형질감염시켰으며, 뉴클레오펙션 후 1분 내지 4시간에, 세포를 1×10^6 의 MOI에서 CAR 공여자 서열 (서열식별번호: 413)로 패키징된 AAV6 바이러스로 감염시켰다. 부가적으로, T 세포를 B2M (서열식별번호: 416)-표적화 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체로 형질감염시켰으며, 뉴클레오펙션 후 1분 내지 4시간에, 세포를 1×10^6 의 MOI에서 B2M-HLA-E 공여자 서열 (서열식별번호: 414)로 패키징된 AAV6 바이러스로 감염시켰다. 형질도입 후 24시간 동안 IL-2 (100 단위/mL)가 보충된 ImmunoCult-XF 완전 배지 (스텝셀 테크놀로지; 미국 매사추세츠주 케임브리지)에서 T 세포를 배양하였다. 그 다음 날, 형질도입된 T 세포를 50 mL 원추형 튜브로 옮기고 대략 7-10분 동안 300 x g에서 원심분리하여 세포를 펠릿화하였다. 상청액을 폐기하고, 펠릿을 부드럽게 재현탁하며, IL-2 (100 단위/mL)가 보충된 적절한 용적의 ImmunoCult-XF 완전 배지 (스텝셀 테크놀로지; 미국 매사추세츠주 케임브리지)에 T 세포를 플링하였다.

[0582] 열거된 T 세포를 IL-2 (100 단위/mL)가 보충된 ImmunoCult-XF 완전 배지 (스텝셀 테크놀로지; 미국 매사추세츠주 케임브리지)에 1×10^6 개 세포/mL로 재현탁하고, 필요한 만큼 많은 T-175 현탁액 플라스크에 플레이팅하였다 (플라스크당 최대 용적은 250 mL임).

[0583] C. 항-BCMA, B2M-HLA-E CAR-T 세포의 발현

[0584] 항-BCMA, B2M-HLA-E CAR-T 세포 뿐만 아니라 대조군 (TRAC 녹아웃 (KO) 및 B2M KO) 및 야생형 T 세포의 시험관 내 특징 규명을 형질도입 후 7일에 수행하였다.

[0585] CAR-T 세포는 피코에리트린 (PE)과 접합된 재조합 BCMA 단백질을 사용한 항-BCMA CAR 발현; 알렉사 플루오르 (Alexa Fluor)® 647 [써모피셔 사이언티픽 (ThermoFisher Scientific; 미국 매사추세츠주 월섬)]에 대한 항-TCR α/β 특이적 항체 접합체를 사용한 TRAC 발현; 또는 PE와 접합된 항-B2M 특이적 항체를 사용한 B2M 발현에 대해 유동 세포계수법을 통한 발현에 관하여 평가되었다. 유동 세포계수법 분석으로부터의 결과가 도 15A에 제시되어 있으며, 여기서 CAR 양성 (도 15A, 1501), TRAC 양성 (도 15A, 1502), 및 B2M 양성 (도 15A, 1503) 비율이, 미처리된 세포 (야생형 T 세포; 도 15A, 1504), Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체 둘 다만으로 형질감염된 세포 (TRAC KO/B2M KO; 도 15A, 1505), 및 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체 둘 다로 형질감염되었고 바이러스 둘 다로 형질도입된 세포 (항-BCMA, B2M-HLA-E CAR-T; 도 15A, 1506)에 대해 제시된다. y축은 다양한 세포 표면 마커에 대해 FACS를 통해 측정된 바와 같이, 양성 세포 퍼센트를 나타낸다. 그 결과가 또한 표 19에 제공된다.

표 19 Cas12a/AAV 처리된 세포의 유동 세포계수법 분석			
	야생형 T 세포	TRAC KO / B2M KO	항-BCMA, B2M-HLA-E CAR-T 세포
CAR 양성	2.6%	5.2%	87.9%
TRAC 양성	96.3%	7.8%	3.9%
B2M 양성	100.0%	8.7%	50.5%

도 15A 및 표 19에 제시된 결과는 내인성 TRAC 및 B2M 발현의 Cas12a chRDNA 가이드-매개 KO, 및 항-BCMA CAR 및 외인성 B2M-HLA-E 단백질의 AAV6 매개 도입 및 발현을 입증한다.

D. 항-BCMA, B2M-HLA-E CAR-T 세포의 시험관내 세포독성

항-BCMA, B2M-HLA-E CAR-T 세포의 세포독성은 BCMA 항원을 제시하는 다발성 골수종 NCI-H929 세포주에 대항하여 시험관 내에서 평가되었다. TRAC KO T 세포는 CAR-매개 사멸을 위한 대조군으로서 사용되었다. 간단히 언급하면, 표적 세포 (NCI-H929(T))를 이펙터 항-BCMA, B2M-HLA-E CAR-T (E)와 구별하기 위해 셀트레이스(CellTrace)TM 바이올렛 (CTV; 써모 피셔 C34557)로 표지하고, 세포를 0:1, 1:20, 1:10, 1:5, 1:3, 1:1, 3:1, 및 10:1의 E:T 비율로 공동-배양하였다 (3개의 공동-배양 웰/E:T 비율). 공동 배양에서 48시간 후 프로피듐 아이오다이드 (PI)에 의해 측정된 바와 같이 CTV 세포 집단 (표적 세포) 및 살아있는 세포에 대한 게이팅에 의해 세포독성을 측정하였다. 데이터는 유동 세포계수법 [인텔리시트 iQue 스크리너 플러스(Intellicyt iQue Screener Plus)]에 의해 분석되었다. 각각의 웰에 대해 하기 방정식을 사용하여 특이적 용해를 계산하였다: 특이적 용해 = 1 - (시험 샘플 중의 살아있는 표적 세포의 수/대조군 샘플 중의 살아있는 표적 세포의 수).

항-BCMA, B2M-HLA-E CAR-T 세포 (회색 원) 및 대조군 TRAC KO T 세포 (흑색 원)에 대한 시험관내 세포독성 검정으로부터의 결과가 도 15B에 제시된다. y축은 표적 세포 사멸의 퍼센트를 나타내고 x축은 사용된 E:T 비율을 나타낸다. 도 15B에 제시된 데이터는 또한 표 20에 제시되어 있다.

표 20 항-BCMA CAR-매개 세포독성				
E:T	TRAC KO T 세포		항-BCMA, B2M-HLA-E CAR-T 세포	
	평균	StDev	평균	StDev
0:1	12%	1%	14%	1%
1:20	12%	1%	76%	4%
1:10	14%	1%	85%	1%
1:5	15%	1%	91%	1%
1:3	19%	1%	93%	1%
1:1	30%	7%	95%	1%
3:1	53%	7%	92%	0%
10:1	71%	8%	82%	3%

StDev=표준 편차; n=3

도 15B 및 표 20에 제시된 결과는 Cas12a chRDNA 가이드 분자를 사용하여 제조된 CAR-T 세포가 표적 세포를 항원-특이적 사멸시킬 수 있다는 것을 입증한다.

본원에 제시된 방법은 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 공여자 폴리뉴클레오티드의 부위-특이적 도입을 위해 Cas12a chRDNA 가이드 분자를 사용하여 다른 세포를 제조하는데 사용될 수 있다. 비-CAR 폴리펩티드 (즉, B2M-HLA-E 융합 구축물)를 발현하는 부가의 공여자 폴리뉴클레오티드는 본원의 지침을 사용하여 유사하게 도입될 수 있다.

실시예 10

B2M-HLA-E 융합물의 내인성 B2M 프로모터 구동 발현을 사용한 항-BCMA CAR-T의 생성

본 실시예는 1차 세포의 계놈으로의 Cas12a chRDNA 매개 파손 부위에서 CAR 폴리뉴클레오티드 및 B2M-HLA-E 폴

리뉴클레오티드 발현 카세트의 부위-특이적 통합을 위한 AAV로 1차 세포의 형질도입을 위한 설계를 설명한다.

[0598]

A. AAV 공여자 카세트의 인 실리코 설계 및 rAAV 생산

[0599]

항-BCMA CAR은 실시예 9에 기재된 바와 같이 설계되었다.

[0600]

P2A-B2M-HLA-E 융합 구축물에 대한 공여자 카세트 폴리뉴클레오티드는 N-말단 B2M 분비 신호를 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 이어, HLA-G 유래 펩티드 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 제1 링커 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, B2M 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 제2 링커 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, HLA-E 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 및 C-말단 BGH 폴리아데닐화 신호 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드로 설계되었다. P2A 리보솜 스킵핑 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 B2M-HLA-E의 상류에 삽입하여, 융합 구축물의 발현이 내인성 B2M 프로모터의 제어하에 있게 하였다. 부위-특이적 절단 후 숙주 세포 계능에 DNA 공여자 폴리뉴클레오티드를 부위-특이적으로 삽입하기 위해, 내인성 B2M 로커스 내의 표적 부위를 선택하였다 (서열식별번호: 62). 그런 다음, 커트 부위의 500개 염기쌍 길이 상동성 아암 5' 및 3'을 확인하였다. 5' 및 3' 상동성 아암은 DNA 공여자 폴리뉴클레오티드의 5' 및 3' 단부에 첨부되었으며, 여기서 DNA 공여자 폴리뉴클레오티드는 상동성 아암에 대해 정방향으로 (즉, 5'에서 3'로) 배향되었다. 그 결과로 생성된 DNA 공여자 폴리뉴클레오티드가 서열식별번호: 479에 제시되어 있다.

[0601]

DNA 공여자 폴리뉴클레오티드를 코딩하는 올리고뉴클레오티드 서열은 적합한 제조함 AAV (rAAV) 플라스미드로의 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다. 서열식별번호: 413을 함유하는 rAAV 플라스미드 및 서열식별번호: 479를 함유하는 별도의 rAAV 플라스미드는 2개의 별도의 AAV6 바이러스로 패키징하기 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다.

[0602]

B. rAAV를 사용한 1차 T 세포 형질도입

[0603]

1차 활성화된 T 세포는 실시예 1에 기재된 바와 같이 PBMC로부터 획득되었다. TRAC (서열식별번호: 415) 및 B2M (서열식별번호: 416)을 코딩하는 유전자를 표적으로 하는 Cas12a chRNA 가이드/핵단백질 복합체를 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조하였다. T 세포를 TRAC (서열식별번호: 415)-표적화 Cas12a chRNA 가이드/핵단백질 복합체로 형질감염시켰으며, 뉴클레오펙션 후 1분 내지 4시간에, 세포를 1×10^6 의 MOI에서 CAR 공여자 서열 (서열식별번호: 413)로 패키징된 AAV6 바이러스로 감염시켰다. 부가적으로, T 세포를 B2M (서열식별번호: 416)-표적화 Cas12a chRNA 가이드/핵단백질 복합체로 형질감염시켰으며, 뉴클레오펙션 후 1분 내지 4시간에, 세포를 P2A-B2M-HLA-E 공여자 서열 (서열식별번호: 479)로 패키징된 AAV6 바이러스로 1×10^6 의 MOI로 감염시켰다. T 세포를 형질도입 후 24시간 동안 IL-2 (100 단위/mL)가 보충된 ImmunoCult-XF 완전 배지 (스템셀 테크놀로지; 미국 매사추세츠주 케임브리지)에서 배양하였다. 그 다음 날, 형질도입된 T 세포를 50 mL 원추형 튜브로 옮기고 대략 7-10분 동안 $300 \times g$ 에서 원심분리하여 세포를 펠릿화하였다. 상청액을 폐기하고, 펠릿을 부드럽게 재현탁하고, T 세포를 IL-2 (100 단위/mL)가 보충된 적절한 용적의 ImmunoCult-XF 완전 배지 (스템셀 테크놀로지; 미국 매사추세츠주 케임브리지)에 플ating하였다.

[0604]

열거된 T 세포를 IL-2 (100 단위/mL)가 보충된 ImmunoCult-XF 완전 배지 (스템셀 테크놀로지; 미국 매사추세츠주 케임브리지)에 1×10^6 개 세포/mL로 재현탁하였고, 필요한 만큼 많은 T-175 현탁액 플라스크에 플레이팅하였다 (플라스크당 최대 용적은 250 mL임).

[0605]

C. CAR-T 세포 상에서의 항-BCMA CAR 및 B2M-HLA-E의 발현

[0606]

항-BCMA, P2A-B2M-HLA-E CAR-T 세포 뿐만 아니라 대조군 (TRAC 녹아웃 (KO) 및 B2M KO) 및 야생형 T 세포의 시험관내 특징 규명을 형질도입 7일 후에 수행하였다.

[0607]

CAR-T 세포는 피코에리트린 (PE)과 접합된 제조함 BCMA 단백질을 사용한 항-BCMA CAR의 발현; 알렉사 플루오르® 647 (써모피셔 사이언티픽; 미국 매사추세츠주 윌섬)에 대한 항-TCR a/b 특이적 항체 접합체를 사용한 TRAC의 발현, 또는 PE와 접합된 항-B2M 특이적 항체를 사용한 B2M의 발현에 관하여 유동 세포계수법을 통해 평가되었다. 유동 세포계수법 분석으로부터 결과가 표 21에 제시되어 있으며, 여기서 CAR 양성, TRAC 양성 및 B2M 양성 비율은 미처리된 세포 (야생형 T 세포), Cas12a chRNA 가이드/핵단백질 복합체 둘 다만으로 형질감염된 세포 (TRAC KO/B2M KO), 및 Cas12a chRNA 가이드/핵단백질 복합체 둘 다로 형질감염되고 바이러스 둘 다로 형질도입된 세포 (항-BCMA, B2M-HLA-E CAR-T)에 대해 표시된다.

표 21 Cas12a/AAV 처리된 세포의 유동 세포계수법 분석			
	야생형 T 세포	TRAC KO / B2M KO	항-BCMA, B2M-HLA-E CAR-T 세포
CAR 양성	2.5%	4.5%	91.6%
TRAC 양성	94.4%	5.1%	3.5%
B2M 양성	99.0%	4.5 %	21.0%

[0608]

[0609]

표 21에 제시된 결과는 내인성 TRAC 및 B2M 발현의 Cas12a chRDNA 가이드-매개 KO, 및 항-BCMA CAR 공여자 카세트의 AAV6-매개 도입 및 외인성 발현 및 외인성 B2M-HLA-E 공여자 카세트의 내인성 B2M 프로모터 구동된 발현을 입증한다.

[0610]

본원에 제시된 방법은 다른 표적에 대한 Cas12 chRDNA 가이드 설계를 확인하는데 사용할 수 있다. 다른 Cas12 chRDNA 가이드의 활성화 영역 및 표적 결합 서열은 본원에 기재된 방법과 유사한 방식으로 스크리닝될 수 있다.

[0611]

실시예 11

[0612]

대안적 링커-NLS 구성을 갖는 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체

[0613]

본 실시예는 글리신-세린 링커 및 본 출원의 이전 실시예에서 사용된 유인원 공포화 바이러스 40 대형 T 항원 NLS (SV40; 서열식별번호: 04)를 사용한 '비최적화된' 설계와 비교한 상이한 링커 및 핵 국제화 신호 (NLS) 구성을 가진 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 설계 및 비교를 설명한다.

[0614]

A. Cas12a 링커-NLS 서열의 인 실리코 설계

[0615]

아시다미노코쿠스 종 (균주 BV3L6) Cas12a 단백질 (서열식별번호: 01)이 조작을 위해 선택되었으며, 2개의 NLS 서열, SV40 (서열식별번호: 04) 및 뉴클레오플라스민 서열 (NPL; 서열식별번호: 05)이, 글리신-세린 (GS) 또는 한 쌍의 글리신-글리신-글리신-글리신-세린 (G4S) 아미노산 링커를 사용하여 Cas12a 단백질에 공유 추가하기 위해 선택되었다. 가변 링커가 있는 2개의 NLS를 포함하는 설계물이 또한 시험을 위해 생성되었다. 링커-NLS 서열 설계물이 표 22에 제시되어 있다:

표 22 링커-NLS 서열 설계물		
SEQ ID NO:	명칭	아미노산 서열
SEQ ID NO:479	GS-SV40*	GSPKKKRKV
SEQ ID NO:480	GS-SV40-GS-SV40	GSPKKKRKVGSPKKKRKV
SEQ ID NO:481	GS-NPL	GSKRPAATKKAGQAKKKK
SEQ ID NO:482	GS-NPL-GS-NPL	GSKRPAATKKAGQAKKKKGSKRPAATKKAGQAKKKK
SEQ ID NO:483	GS-SV40-GS-NPL	GSPKKKRKVGSKRPAATKKAGQAKKKK
SEQ ID NO:484	GS-NPL-GS-SV40	GSKRPAATKKAGQAKKKKGSPKKKRKV
SEQ ID NO:485	(G4S)2-SV40-GS-NPL	GGGGSGGGGSPKKKRKVGSKRPAATKKAGQAKKKK
SEQ ID NO:486	(G4S)2-NPL-GS-SV40	GGGGSGGGGSKRPAATKKAGQAKKKKGSPKKKRKV
SEQ ID NO:487	(G4S)2-SV40	GGGGSGGGGSPKKKRKV
SEQ ID NO:488	(G4S)2-SV40-GS-SV40	GGGGSGGGGSPKKKRKVGSPKKKRKV
SEQ ID NO:489	(G4S)2-NPL	GGGGSGGGGSKRPAATKKAGQAKKKK
SEQ ID NO:490	(G4S)2-NPL-GS-NPL	GGGGSGGGGSKRPAATKKAGQAKKKGSKRPAATKKAGQAKKKK

[0616]

[0617] * = 이전 실시예에서 사용된 NLS 설계

[0618] 표 22에 제시된 NLS 서열을 아시타미노코쿠스 종 (균주 BV3L6) Cas12a 단백질 (서열식별번호: 01)의 C-말단 단 부에서 클로닝하고, 재조합 단백질을 실시예 2에 기재된 바와 같이 발현하였다.

[0619] B. Cas12a 링커-NLS 설계물의 세포 활성

[0620] 표 22에 제시된 링커-NLS 서열을 포함하는 정제된 재조합 Cas12a 단백질을 실시예 2에 기재된 바와 같이 TRAC 유전자 (서열식별번호: 467)를 표적으로 하는 chRDNA 가이드와 복합체 형성하고, 실시예 3에 기재된 바와 같이 1차 T 세포로 형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간에, 그 결과로 생성된 각각의 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 게놈 편집 효율을 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정하였다. 세포 편집 실험의 결과가 도 16A에 나타나 있고 표 23에 제시되어 있다.

표 23 Cas12a 링커-NLS 세포 편집 스크린				
SEQ ID NO:	명칭	FIG16A 표지	평균	StDev
SEQ ID NO:489	(G4S)2-NPL	1601	87.1%	0.7%
SEQ ID NO:485	(G4S)2-SV40-GS-NPL	1602	86.1%	1.4%
SEQ ID NO:487	(G4S)2-SV40	1603	85.9%	1.6%
SEQ ID NO:483	GS-SV40-GS-NPL	1604	82.9%	2.7%
SEQ ID NO:490	(G4S)2-NPL-GS-NPL	1605	83.6%	1.1%
SEQ ID NO:488	(G4S)2-SV40-GS-SV40	1606	80.8%	0.8%
SEQ ID NO:482	GS-NPL-GS-NPL	1607	77.2%	3.6%
SEQ ID NO:486	(G4S)2-NPL-GS-SV40	1608	73.9%	0.7%
SEQ ID NO:480	GS-SV40-GS-SV40	1609	71.1%	2.6%
SEQ ID NO:484	GS-NPL-GS-SV40	1610	68.1%	1.2%
SEQ ID NO:479	GS-SV40*	1611	65.9%	1.4%
SEQ ID NO:481	GS-NPL	1612	65.3%	3.5

[0621] StDev=표준 편차; n=3; * = 이전 실시예에서 사용된 NLS 설계

[0622] 본 실시예의 표 23 뿐만 아니라 도 16A에 제시된 데이터는 대안적 링커 및 NLS 서열이 단일 GS-SV40 NLS 구성을 갖는 설계물과 비교하여 증가된 편집을 초래할 수 있다는 것을 보여준다.

[0623] C. 표적 전체에 걸쳐 대안적 Cas12a 링커-NLS 서열의 세포 활성

[0624] 표 23에 제시된 상위 4개의 Cas12a 링커-NLS 구성 (서열식별번호: 489, 서열식별번호: 485, 서열식별번호: 487, 및 서열식별번호: 483) 및 '비최적화된' 설계물 (서열식별번호: 479)이, crRNA 및 chRDNA의 혼합 패널을 사용하여 비교를 위해 선택되었다. chRDNA 설계물 내의 DNA 염기의 위치를 포함한 표적화 영역이 표 24에 제시되어 있다.

표 24 링커-NLS 비교를 위한 Cas12a 표적			
SEQ ID NO.	표적	가이드 유형	chRDNA 설계
SEQ ID NO:396	RPL32-tgt1	chRDNA	11, 14, 15
SEQ ID NO:404	DNMT1-tgt3	crRNA	-
SEQ ID NO:321	TRAC-tgt12	chRDNA	1, 11, 20
SEQ ID NO:491	TRAC-tgt25	crRNA	-
SEQ ID NO:492	TRAC-tgt28	crRNA	-
SEQ ID NO:335	B2M-tgt12	chRDNA	1, 11, 20
SEQ ID NO:347	B2M-tgt1	chRDNA	8, 14, 19
SEQ ID NO:355	B2M-인트론-tgt12	chRDNA	11, 17, 20

[0625] 표 24에 제시된 표적화 영역은 활성화 영역 (서열식별번호: 459)의 3' 단부에 첨부되었고, 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다.

[0626] 각각의 가이드와 복합체 형성된 개별 Cas12a 링커-NLS 구성은 본질적으로 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조되

었으며, 복합체는 각각의 Cas12a 링커-NLS 및 가이드 조합을 가이드하기 위해 Cas12a의 20:60 및 80:240 pmol의 두 농도에서 어셈블리되었다는 편차가 있다. 실시예 3에 기재된 바와 같이 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체를 1차 T 세포로 형질감염시키고, 그 결과로 생성된 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 게놈 편집 효율을 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정하였다.

표 24에 제시된 가이드와 복합체 형성된 Cas12a 링커-NLS 구성의 편집 결과가 도 16B 및 표 25 및 26에 제시되어 있다.

표 25 표적 전체에 걸친 Cas12a 링커-NLS 구축물의 세포 편집 활성							
			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:396	SEQ ID NO:404	SEQ ID NO:321	SEQ ID NO:491
			표적 명칭	RPL32-tgt1	DNMT1-tgt3	TRAC-tgt12	TRAC-tgt25
Cas12a-NLS	도. 16B 식별자	Cas12a-가이드 [pmol]					
GS-SV40* (SEQ ID NO:479)	도 16B - 1613	20:60	평균	21.8%	61.3%	71.3%	93.4%
			StDev	0.0%	3.8%	5.5%	2.2%
		80:240	평균	69.8%	68.6%	77.4%	96.1%
			StDev	0.4%	1.6%	3.4%	0.0%
GS-SV40-GS-NPL (SEQ ID NO:483)	도 16B - 1614	20:60	평균	85.5%	80.2%	90.5%	96.1%
			StDev	3.7%	16.5%	4.1%	1.0%
		80:240	평균	91.2%	91.4%	92.9%	97.6%
			StDev	0.1%	0.1%	0.7%	0.4%
(G4S)2-SV40 (SEQ ID NO:487)	도 16B - 1615	20:60	평균	32.0%	77.1%	87.5%	94.4%
			StDev	45.3%	11.2%	2.9%	1.5%
		80:240	평균	89.9%	87.4%	91.8%	95.6%
			StDev	0.9%	0.3%	0.8%	0.8%
(G4S)2-NPL (SEQ ID NO:489)	도 16B - 1616	20:60	평균	40.1%	84.6%	87.0%	93.6%
			StDev	56.7%	0.4%	1.9%	0.4%
		80:240	평균	91.8%	90.9%	93.4%	96.4%
			StDev	1.1%	0.4%	0.1%	0.0%
(G4S)2-SV40-GS-NPL (SEQ ID NO:485)	도 16B - 1617	20:60	평균	88.8%	80.4%	83.4%	95.5%
			StDev	1.7%	3.7%	1.5%	0.3%
		80:240	평균	87.9%	89.0%	90.4%	97.0%
			StDev	0.3%	5.6%	5.7%	0.5%

표 26 표적 전체에 걸친 Cas12a 링커-NLS 구축물의 세포 편집 활성							
			SEQ ID NO:	SEQ ID NO:492	SEQ ID NO:335	SEQ ID NO:347	SEQ ID NO:355
			표적 명칭	TRAC-tgt28	B2M-tgt12	B2M-tgt1	B2M-인트론-tgt12
Cas12a-NLS	도. 16B 식별자	Cas12a-가이드 [pmol]					
GS-SV40* (SEQ ID NO:479)	도 16B - 1613	20:60	평균	84.4%	92.9%	88.7%	80.3%
			StDev	5.2%	1.6%	1.4%	0.6%
		80:240	평균	89.9%	95.5%	95.9%	91.3%
			StDev	0.1%	0.2%	0.0%	0.4%
GS-SV40-GS-NPL (SEQ ID NO:483)	도 16B - 1614	20:60	평균	93.7%	95.8%	90.2%	92.4%
			StDev	0.8%	0.6%	0.8%	2.3%
		80:240	평균	94.9%	97.1%	97.2%	96.0%
			StDev	1.7%	0.1%	0.2%	0.1%
(G4S)2-SV40 (SEQ ID NO:487)	도 16B - 1615	20:60	평균	92.1%	93.7%	91.7%	89.8%
			StDev	0.5%	1.7%	0.6%	1.8%
		80:240	평균	94.6%	95.0%	96.5%	94.2%
			StDev	1.2%	0.0%	1.3%	0.9%
(G4S)2-NPL (SEQ ID NO:489)	도 16B - 1616	20:60	평균	91.2%	93.7%	89.7%	89.8%
			StDev	0.6%	1.3%	0.8%	0.8%
		80:240	평균	94.1%	96.1%	96.9%	94.9%
			StDev	0.5%	0.0%	0.7%	0.9%
(G4S)2-SV40-GS-NPL (SEQ ID NO:485)	도 16B - 1617	20:60	평균	88.1%	93.9%	80.3%	88.1%
			StDev	0.4%	0.4%	2.9%	2.6%
		80:240	평균	94.6%	96.2%	95.6%	93.9%
			StDev	0.3%	0.5%	0.7%	0.5%

StDev=표준 편차; n=2; * = 이전 실시예에서 사용된 NLS 설계

도 16B 및 표 25 및 26에 제시된 데이터는 인간 1차 T 세포에서 다중 표적 전체에 걸쳐 다양한 NLS 구성의 개선된 활성을 입증한다 (즉, 도 16B (1616) 또는 도 16B (1617)의 평균 편집과 비교한 도 16B (1613)의 평균 편집; 도 16B 참조). 대안적 NLS 서열, 링커 및 Cas 뉴클레아제는 본원에 기재된 방법과 유사한 방식으로 스크리닝될 수 있다.

실시예 12

Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용한 멀티플렉스화

본 실시예는 GS-SV40 (서열식별번호: 479; "비최적화된 NLS") 및 (G4S)2-NPL (서열식별번호: 489; "최적화된 NLS")과의 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체의 멀티플렉스화된 편집 비율을 비교하는 것과, 단일 형질감염 반응 (멀티플렉스화)에서 다중 Cas12a chRDNA를 세포에 공동 전달하는 것을 설명한다.

A. Cas12a chRDNA 링커-NLS 서열의 인 실리코 설계

아시다미노코쿠스 종 (균주 BV3L6) Cas12a 단백질 (서열식별번호: 01)은 제1 C-말단 링커-NLS 서열 (서열식별번호: 479) 또는 제2 C-말단 링커-NLS 서열 (서열식별번호: 489)로 조작되었고, Cas12a 재조합 단백질은 실시예 2에 기재된 바와 같이 발현되었다.

B. Cas12a 링커-NLS의 세포 멀티플렉스화 활성

링커-NLS 서열 (서열식별번호: 479) 또는 링커-NLS 서열 (서열식별번호: 489)을 포함하는 정제된 재조합 Cas12a 단백질을 실시예 2에 기재된 바와 같이, TRAC 표적화 chRDNA (서열식별번호: 508), B2M 표적화 chRDNA 유전자 (서열식별번호: 416), CISH 표적화 chRDNA (서열식별번호: 509), 또는 CBLB 표적화 chRDNA (서열식별번호: 510)와 복합체 형성하였으며, 복합체가 가이드에 대한 Cas12a의 40:80 pmol의 비율로 어셈블리되었다는 편차를

갖는다. 각각의 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체는 단일 표적화 복합체로서; 하나의 혼합물로 조합된, *TRAC* 및 *B2M* 둘 다를 표적으로 하는 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체로서; 하나의 혼합물로 조합된, *CISH* 및 *CBLB* 둘 다를 표적으로 하는 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체로서; 또는 하나의 혼합물로 조합된, *TRAC*, *B2M*, *CISH*, 및 *CBLB* 모두를 표적으로 하는 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체로서 사용되었다. 각각의 Cas12a chRDNA/핵단백질 조성물을 실시예 3에 기재된 바와 같이 1차 T 세포로 형질감염시켰다. 형질감염 후 48시간에, 그 결과로 생성된 각각의 Cas12a chRDNA/핵단백질 복합체의 게놈 편집 효율을 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정하였다. 세포 편집 실험의 결과가 도 17에 나타나 있고 표 27에 제시되어 있다.

표 27 멀티플렉스 Cas12a 링커-NLS 구축물의 세포 편집 활성						
멀티플렉스화된 가이드의 수	표적 명칭	SEQ ID NO.	비최적화된 NLS		최적화된 NLS	
			rep-1	rep-2	rep-1	rep-2
1개의 가이드	<i>TRAC</i>	SEQ ID NO:36	75.07%	3.35%	86.33%	0.91%
	<i>B2M</i>	SEQ ID NO:62	83.60%	86.50%	89.60%	91.00%
	<i>CISH</i>	SEQ ID NO:158	51.40%	59.00%	83.10%	89.60%
	<i>CBLB</i>	SEQ ID NO:171	47.50%	44.90%	74.00%	81.40%
2개의 가이드	<i>TRAC</i>	SEQ ID NO:36	81.70%	80.80%	93.90%	92.20%
	<i>B2M</i>	SEQ ID NO:62	88.00%	91.30%	93.70%	92.20%
2개의 가이드	<i>CISH</i>	SEQ ID NO:158	64.80%	63.30%	94.50%	93.10%
	<i>CBLB</i>	SEQ ID NO:171	66.20%	60.20%	90.90%	88.30%
4개의 가이드	<i>TRAC</i>	SEQ ID NO:36	78.40%	82.00%	91.20%	93.10%
	<i>B2M</i>	SEQ ID NO:62	90.40%	92.20%	92.40%	94.20%
	<i>CISH</i>	SEQ ID NO:158	53.20%	58.70%	90.80%	91.80%
	<i>CBLB</i>	SEQ ID NO:171	51.60%	58.00%	86.40%	88.20%

도 17 및 표 27에 제시된 데이터는 인간 1차 T 세포에서 멀티플렉스화를 위해 사용될 때 링커-NLS 구축물의 개선된 활성을 입증한다. 예를 들어, 비최적화된 GS-SV40 링커-NLS (서열식별번호: 479, 도 17 1708)를 사용한 시리즈 도 17, 1707의 평균 편집 및 최적화된 (G4S)2-NPL 링커 NLS (서열식별번호: 489, 도 17, 1712)를 사용한 시리즈 도 17, 1711의 평균 편집을 참조한다. 대안적 NLS 서열, 링커, Cas12 뉴클레아제 및 멀티플렉스화를 위한 표적은 본원에 기재된 방법과 유사한 방식으로 스크리닝될 수 있다.

실시예 13

화학적 변형을 포함하는 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체를 사용한 편집

본 실시예는 Cas12a 가이드 RNA의 활성화 및 표적화 영역에서 포스포로티오에이트 화학적 변형을 함유하는 Cas12a chRDNA의 세포 편집 활성을 설명한다.

A. 화학적 변형을 갖는 Cas12a chRDNA의 인 실리코 설계

TRAC 표적-12 서열 (서열식별번호: 316)이 조작을 위해 선택되었다. Cas12a 가이드의 5' 단부에 (즉, 활성화 영역의 5'-말단 뉴클레오타이드) 2개의 포스포로티오에이트 결합을 설계하였고, Cas12a 가이드의 3' 단부에 (즉, 표적화 영역의 3'-말단 뉴클레오타이드) 2개의 포스포로티오에이트 결합을 설계하였다. 이어서, 일련의 Cas12a 가이드는 단부-보호 포스포로티오에이트 변형 이외에 활성화 영역 내의 DNA 염기로 설계되었다. 화학적 변형을

갖는 Cas12a chRDNA의 서열이 표 28에 제시되어 있다. 이러한 서열은 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다 (열거된 포스포로티오에이트 결합 및 DNA 염기 위치는 도 5에 제시된 번호에 상응함).

표 28 화학적 변형을 갖는 Cas12a chRDNA				
SEQ ID NO.	포스포로티오에이트		DNA	서열
	활성화 영역	스페이서	활성화 영역	
SEQ ID NO:511	-	-	-	rUrArArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrUr GrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrUrC rArGrCrUrGrUrArCrArC
SEQ ID NO:512	1,2	38, 39		rU*rA*rArUrUrUrCrUrArCrUrCrUr UrGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrU rCrArGrCrUrGrUrArC*rA*rC
SEQ ID NO:513	1,2	38, 39	1	T*rA*rArUrUrUrCrUrArCrUrCrUrU rGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrUr CrArGrCrUrGrUrArC*rA*rC
SEQ ID NO:514	1, 2, 7	38, 39	7	rU*rA*rArUrUrUC*rUrArCrUrCrUr UrGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrU rCrArGrCrUrGrUrArC*rA*rC
SEQ ID NO:515	1, 2, 10	38, 39	10	rU*rA*rArUrUrUrCrUrAC*rUrCrUr UrGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrU rCrArGrCrUrGrUrArC*rA*rC
SEQ ID NO:516	1, 2, 12	38, 39	12	rU*rA*rArUrUrUrCrUrArCrUC*rUr UrGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrU rCrArGrCrUrGrUrArC*rA*rC
SEQ ID NO:517	1, 2, 14	38, 39	14	rU*rA*rArUrUrUrCrUrArCrUrCrUT *rGrUrArGrArUrGrArGrUrCrUrCrU rCrArGrCrUrGrUrArC*rA*rC

포스포로티오에이트 결합은 "*"로 나타낸다.

B. 세포 형질감염 및 분석

개별 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체를 본질적으로 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조하였다. 실시예 3에 기재된 바와 같이 핵단백질 복합체를 1차 T 세포로 형질감염시키고, 그 결과로 생성된 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 게놈 편집 효율을 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정하였다. 세포내 편집 실험의 결과가 표 29에 제시되어 있다.

표 29 화학적 변형을 갖는 Cas12a chRDNA의 세포 편집					
SEQ ID NO.	포스포로티오에이트 결합 위치		DNA 염기 위치	평균	StDev
	활성화 영역	표적화 영역	활성화 영역		
SEQ ID NO:511	-	-	-	74.8%	1.6%
SEQ ID NO:512	1, 2	38, 39		78.6%	4.7%
SEQ ID NO:513	1, 2, 1	38, 39	1	71.4%	1.9%
SEQ ID NO:514	1, 2, 7	38, 39	7	75.8%	3.7%
SEQ ID NO:515	1, 2, 10	38, 39	10	79.8%	2.4%
SEQ ID NO:516	1, 2, 12	38, 39	12	70.2%	0.7%
SEQ ID NO:517	1, 2, 14	38, 39	14	72.4%	5.0%

StDev=표준 편차; n=2

- [0654] 표 29에 제시된 데이터는 포스포로티오에이트 결합 단백을 포함하거나 또는 포스포로티오에이트 결합과 DNA 염기를 포함하는 Cas12a 가이드의 편집 활성을 입증한다. 이들 가이드는 모든 RNA 가이드와 비교하여 인간 1차 T 세포에서 강력한 편집이 가능하다 (즉, 서열식별번호: 512 또는 서열식별번호: 515의 평균 편집과 비교한 서열식별번호: 511의 평균 편집; 표 29 참조). 화학적 변형의 대안적 조합 및 위치는 본원에 기재된 방법과 유사한 방식으로 스크리닝할 수 있다.
- [0655] 실시예 14
- [0656] Cas12a chRDNA/핵단백질 복합체를 사용한 인간 유도 다능성 줄기 세포의 형질감염
- [0657] 본 실시예는 Cas12a chRDNA/핵단백질 복합체를 사용한 인간 유도 다능성 줄기 세포 (iPSC)의 세포 편집을 설명한다.
- [0658] A. chRDNA 가이드의 인 실리코 설계
- [0659] 가이드의 활성화 영역 내의 DNA 염기를 포함하는 *CISH* 유전자 (서열식별번호: 509)를 표적으로 하는 AsCas12a 가이드 서열이 추가 조작 및 표적화 영역 (서열식별번호: 518 - 서열식별번호: 529) 내로의 부가의 DNA 염기의 도입을 위해 선택되었다. 서열은 합성을 위해 상업적 제조업체에게 제공되었다.
- [0660] B. 세포 형질감염 및 분석
- [0661] 개별 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체는 본질적으로 실시예 2에 기재된 바와 같이 제조하였다. 핵단백질 복합체를 실시예 3에 기재된 바와 같이 1차 T 세포로 형질감염시켰다.
- [0662] iPSC는 하기 변형을 수반하여, 실시예 3에 기재된 1차 T 세포를 취급하고 형질감염시키는 방법과 유사한 방식으로 취급되고 형질감염되었다. iPSC는 형질감염 전에 37°C에서 3시간 동안 최종 농도 10 uM의 Rho-연관, 나선형-코일-함유 단백질 키나제 억제제 ["ROCKi"; 밀리포어시그마 (MilliporeSigma; 미국 매사추세츠주 벨링턴)]가 보충된 mTeSR-플러스 배지 (스템셀 테크놀로지; 미국 매사추세츠주 케임브리지)에서 배양되었다. mTeSR-플러스/ROCKi 배지를 제거하고 iPSC를 10 mL의 PBS로 세척한 다음, 3 mL의 아쿠타제 (스템셀 테크놀로지; 미국 매사추세츠주 케임브리지)를 부가하고 세포를 37°C에서 5-10분 동안 인큐베이션하였다. 7 mL의 mTeSR-플러스와 ROCKi를 세포에 부가하고 세포를 혼합하여 계수하였다. 그런 다음, 세포를 원심분리하고 배지를 제거한 후, 세포를 10 mL의 PBS로 세척하고 다시 원심분리하여 PBS를 제거하였다. 세포를 뉴클레오펙터™ P3 (론자; 미국 뉴저지주 앨런데일) 용액에 2e5개 세포/mL의 밀도로 재현탁하고, Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체와 혼합하고, 펄스 코드 CA158을 사용하여 형질감염시켰다. 그 결과로 생성된 Cas12a 가이드/핵단백질 복합체의 게놈 편집 효율은 실시예 4에 기재된 바와 같이 결정되었고 표 29에 제시되어 있다.

표 29 Cas12a chRDNA를 사용한 iPSC의 세포 편집				
SEQ ID NO.	활성화 영역 내의 DNA 위치	표적 인식 서열 내의 DNA 위치	평균	StDev
SEQ ID NO:509	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	-	91.5%	0.4%
SEQ ID NO:518	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	1	75.5%	3.9%
SEQ ID NO:519	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	8	92.0%	0.0%
SEQ ID NO:520	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	9	92.0%	2.1%
SEQ ID NO:521	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	10	96.0%	0.7%
SEQ ID NO:522	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	11	95.0%	0.0%
SEQ ID NO:523	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	12	94.5%	0.4%
SEQ ID NO:524	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	14	92.5%	1.1%
SEQ ID NO:525	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	15	89.5%	4.6%
SEQ ID NO:526	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	17	91.0%	2.8%
SEQ ID NO:527	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	18	88.0%	-
SEQ ID NO:528	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	19	85.5%	3.2%
SEQ ID NO:529	1, 3, 7, 10, 12, 14, 15, 19	20	81.5%	0.4%

[0663]

[0664]

StDev=표준 편차; n=1-2

[0665]

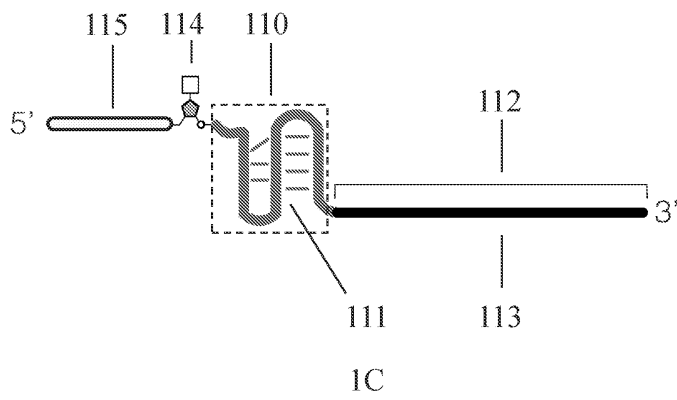
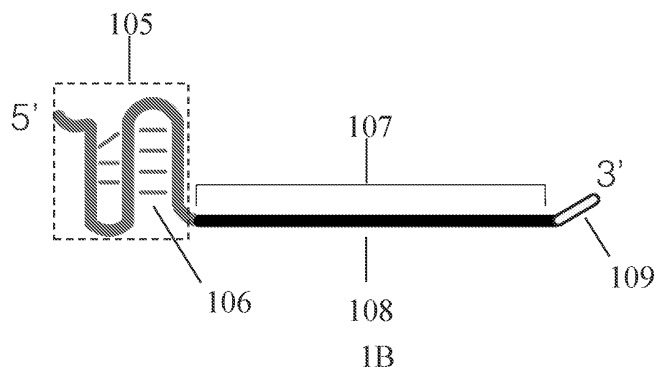
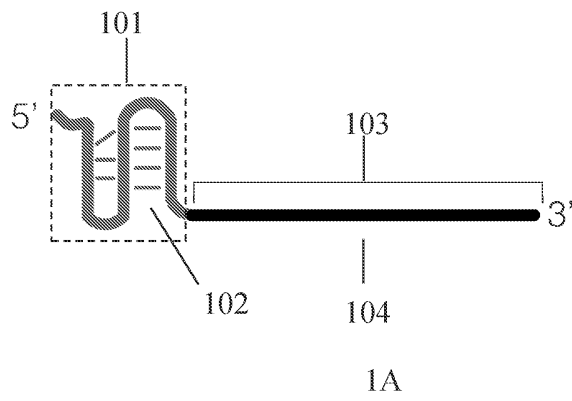
표 29에 제시된 데이터는 Cas12a chRDNA 가이드/핵단백질 복합체가 인간 iPSC의 조작에 사용될 수 있다는 것을 입증한다. 다른 세포 유형은 본원에 기재된 방법과 유사한 방식으로 편집될 수 있다.

[0666]

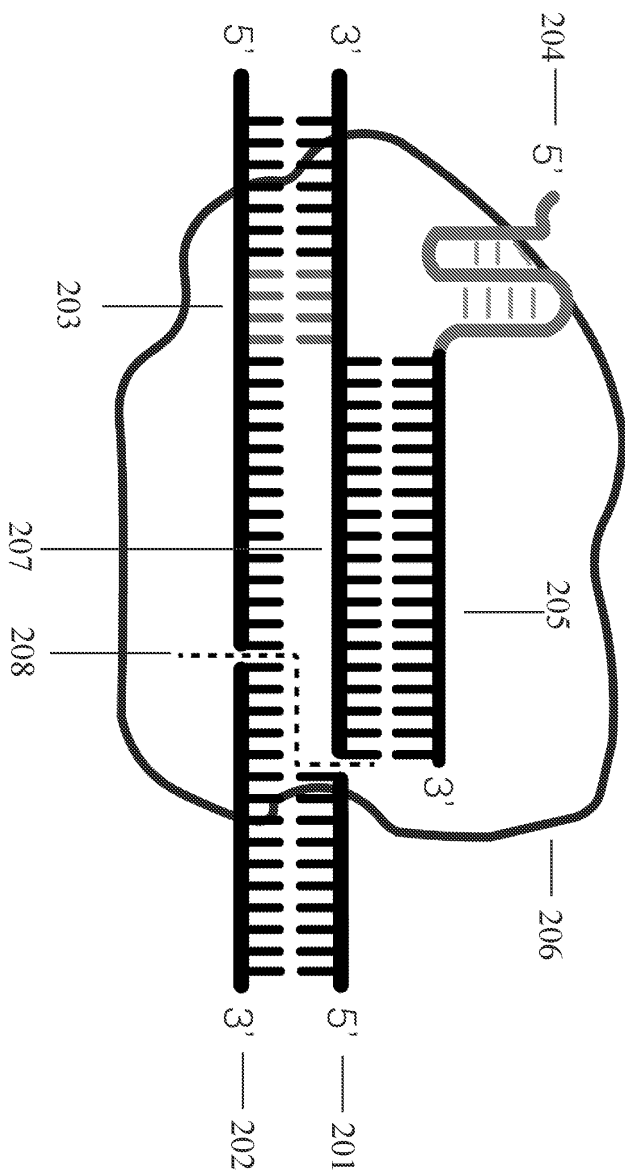
관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 본 개시내용의 취지 및 범주를 벗어나지 않으면서 상기 실시양태의 변형 및 변동이 이루어질 수 있다. 이러한 변형 및 변동은 본 개시내용의 범주 내에 있다.

도면

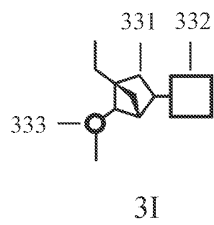
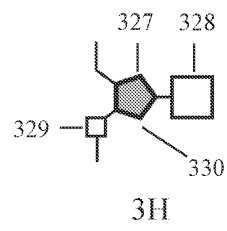
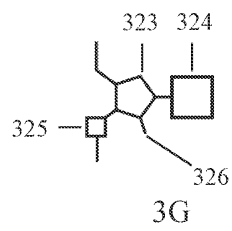
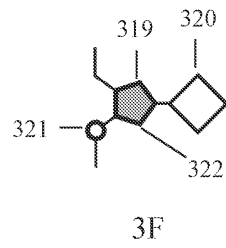
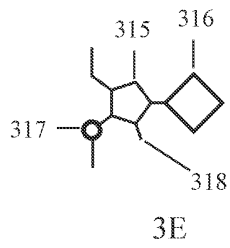
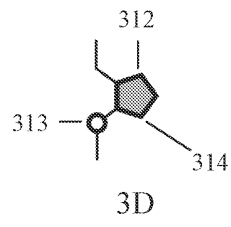
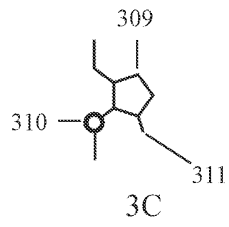
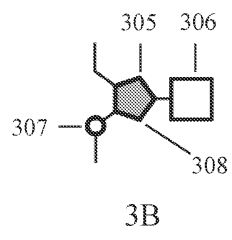
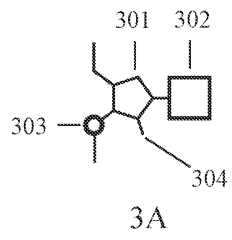
도면1



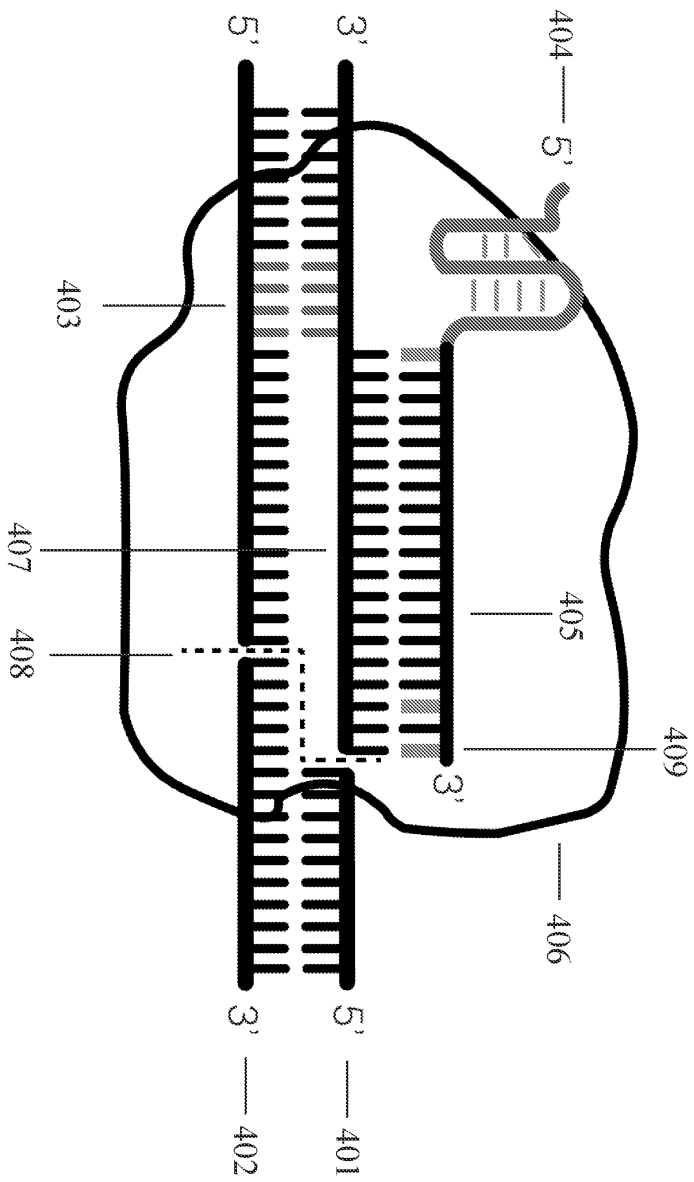
도면2



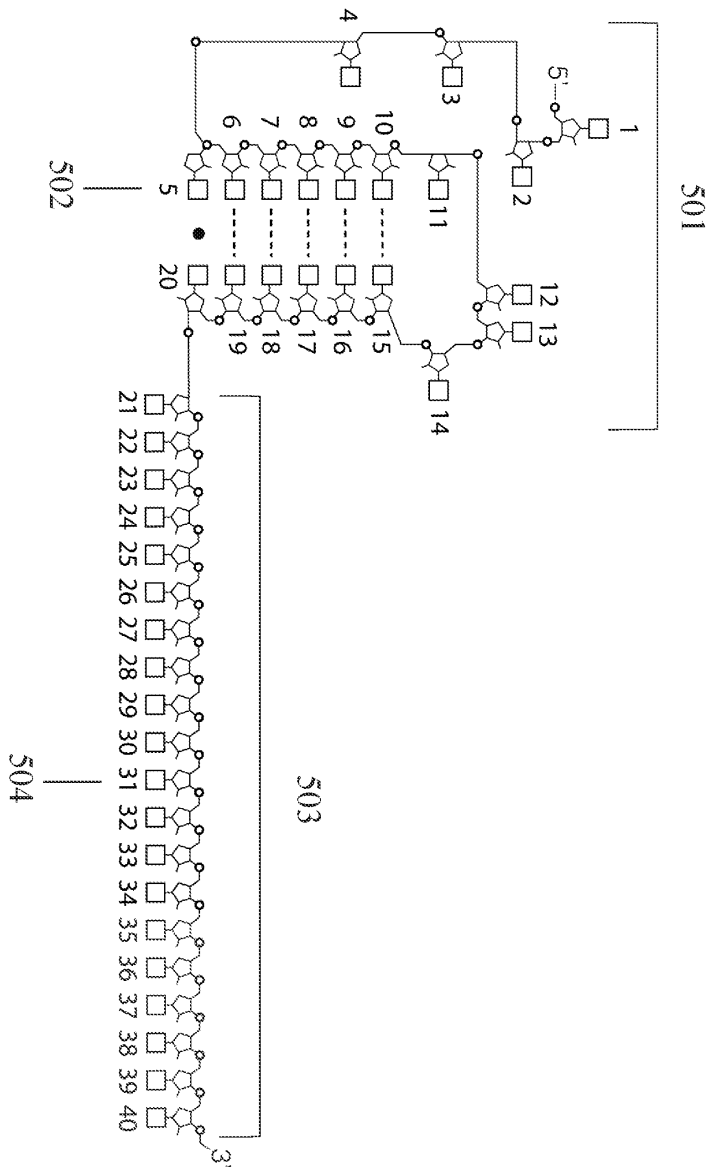
도면3



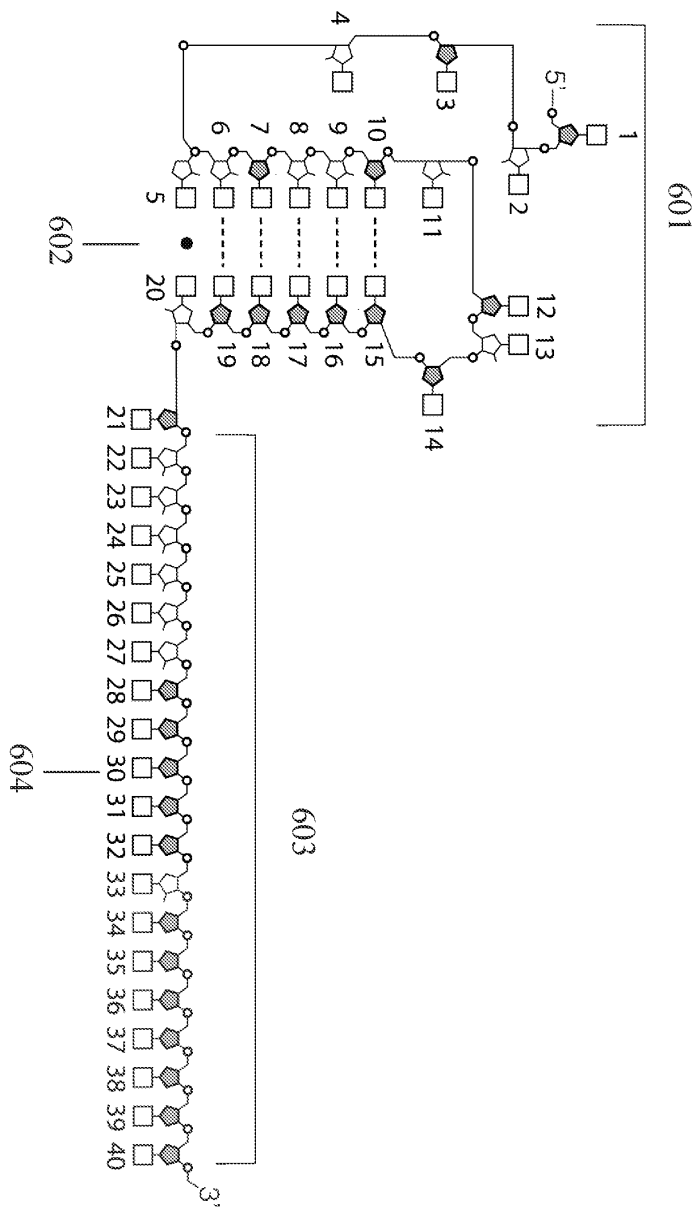
도면4



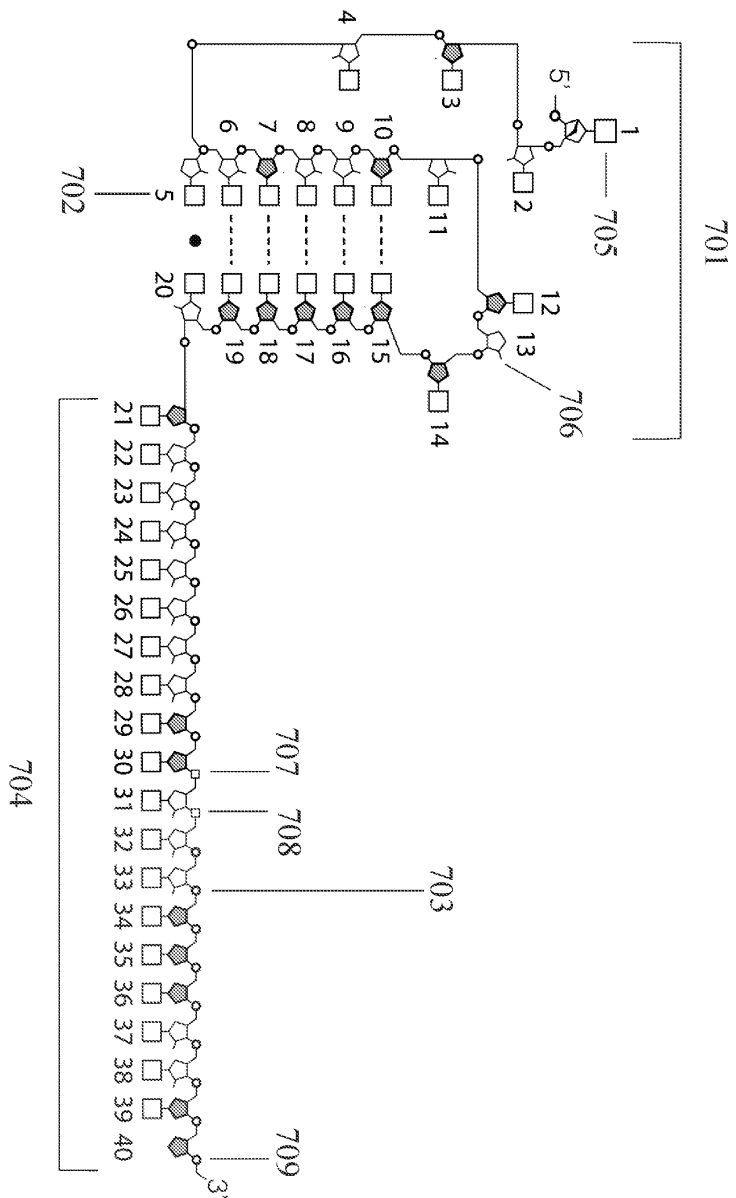
도면5



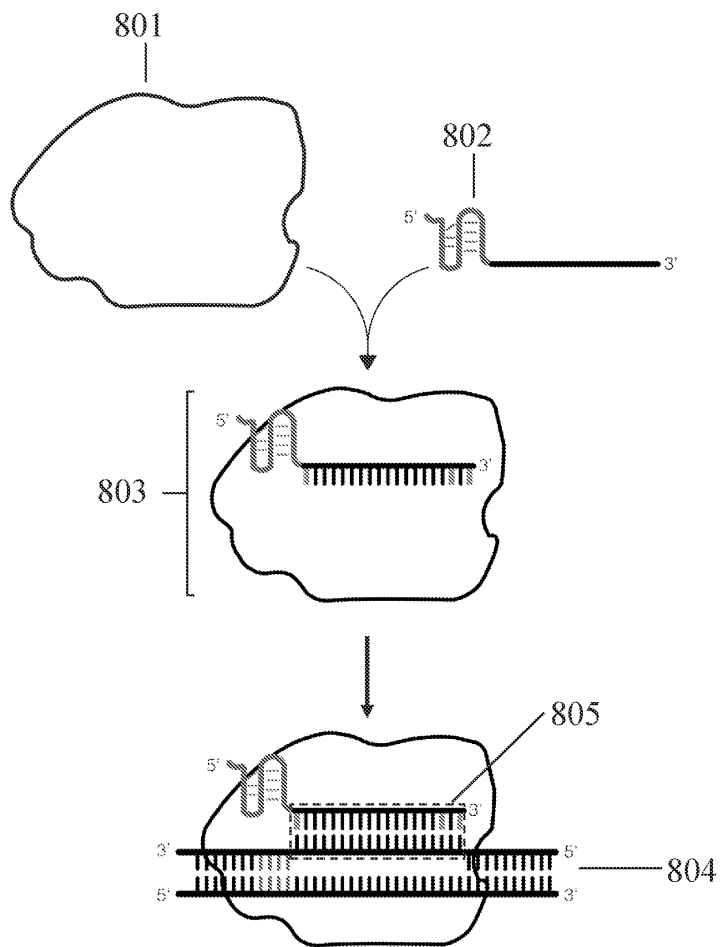
도면6



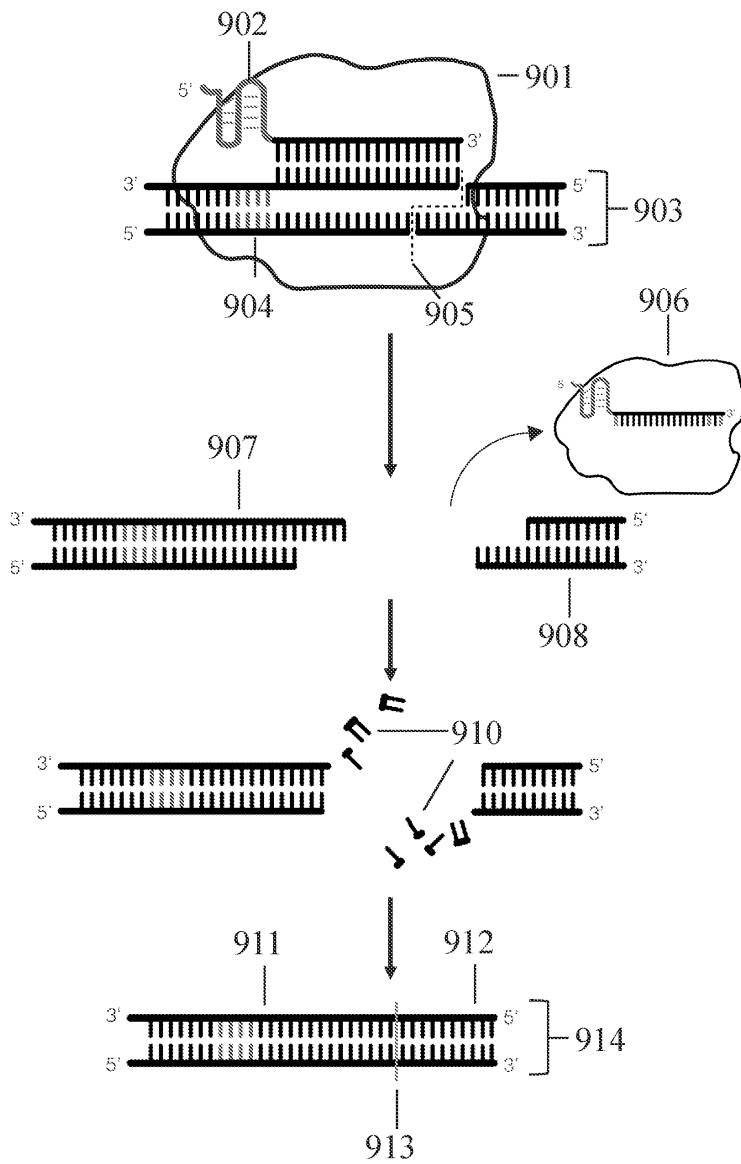
도면7



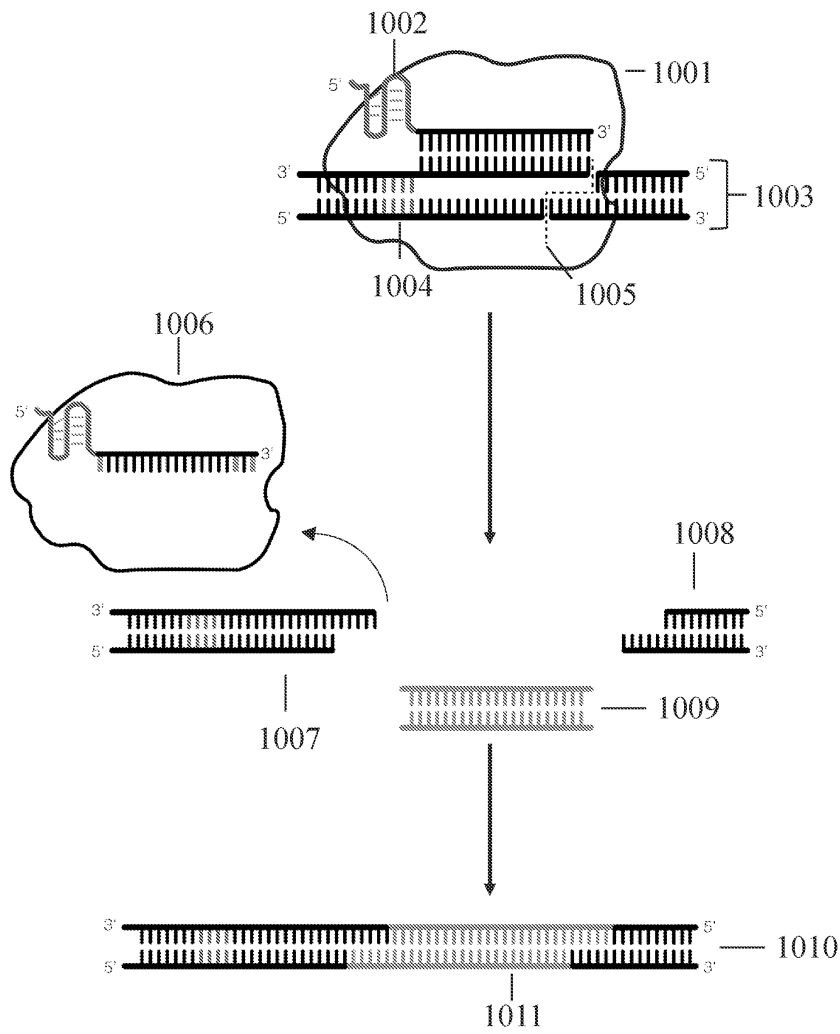
도면8



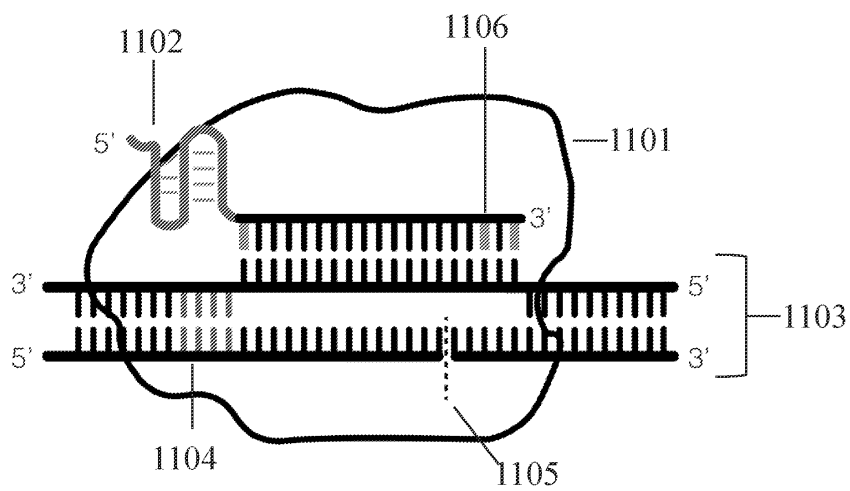
도면9



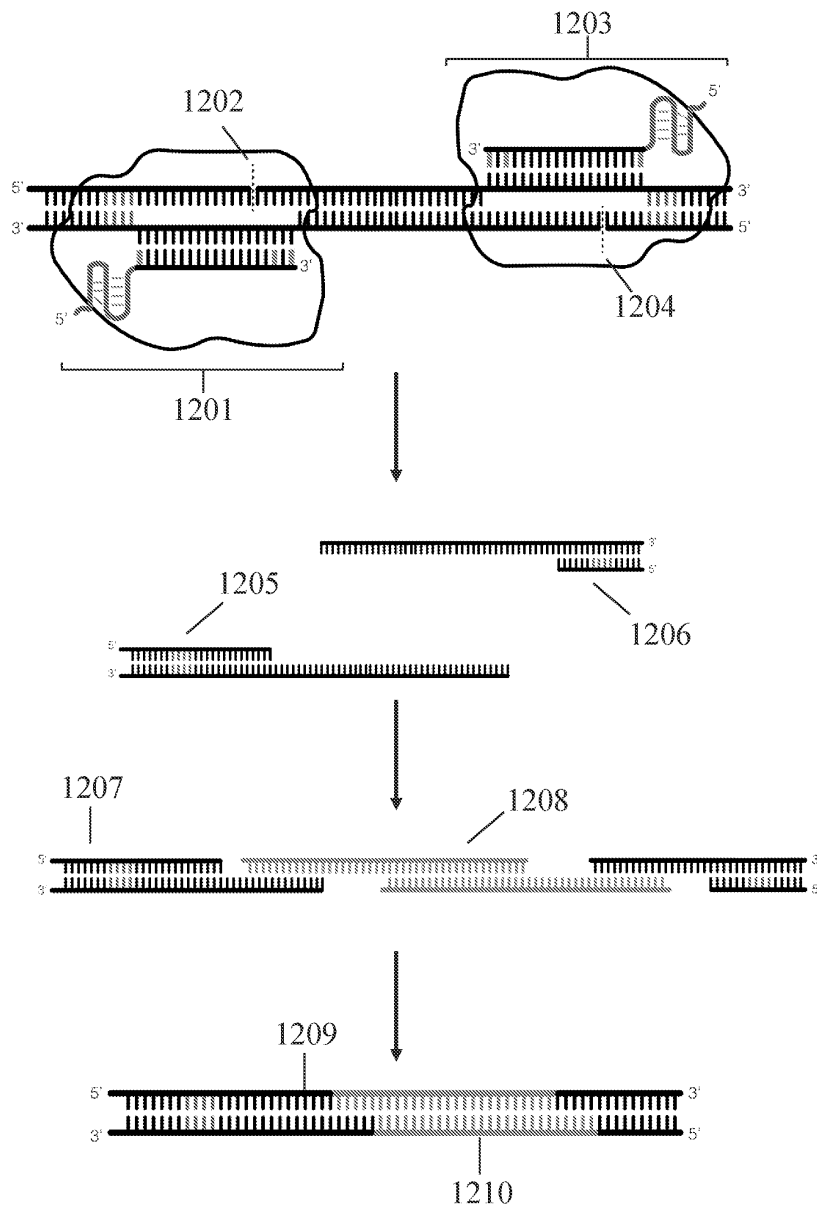
도면10



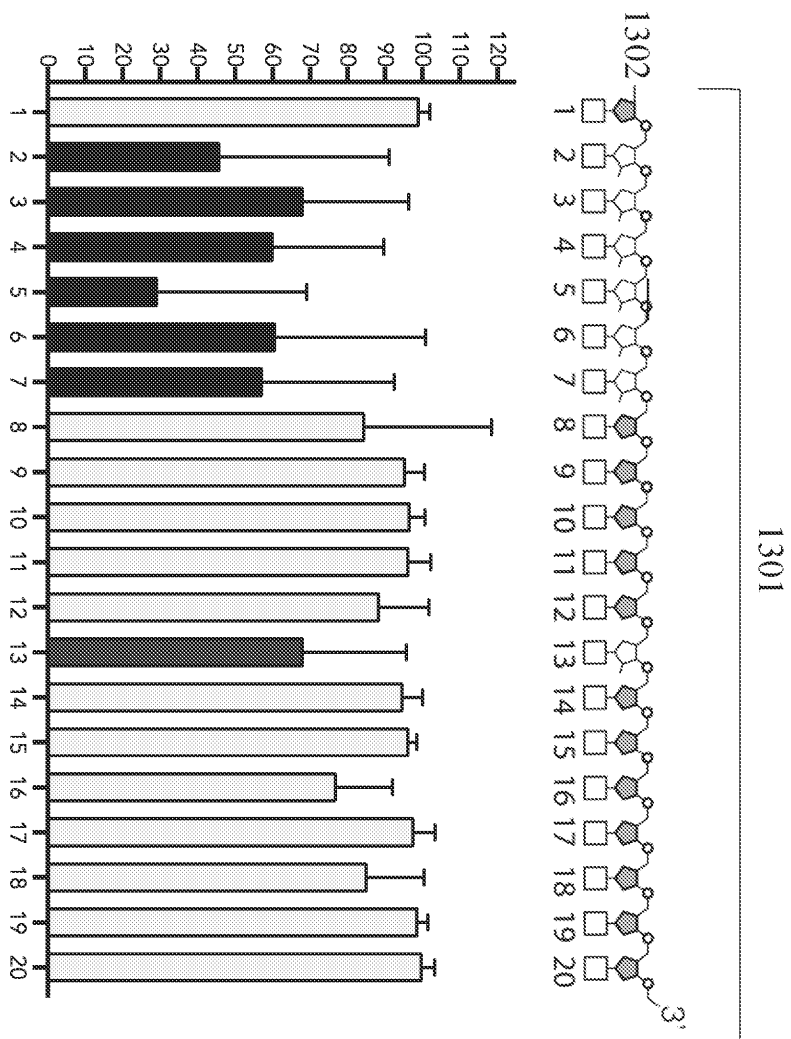
도면11



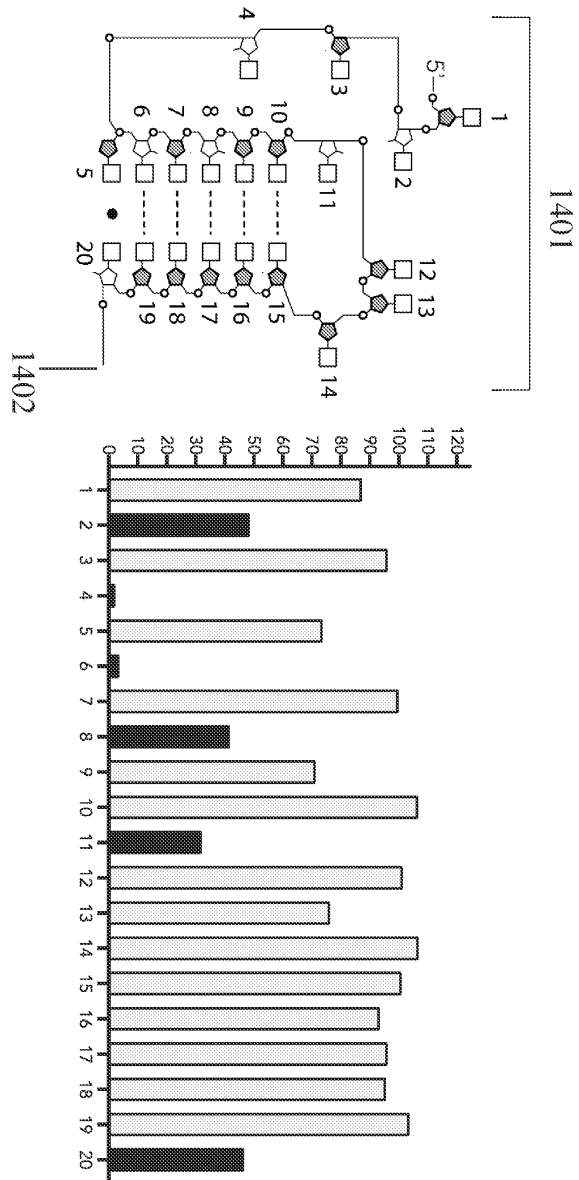
도면12



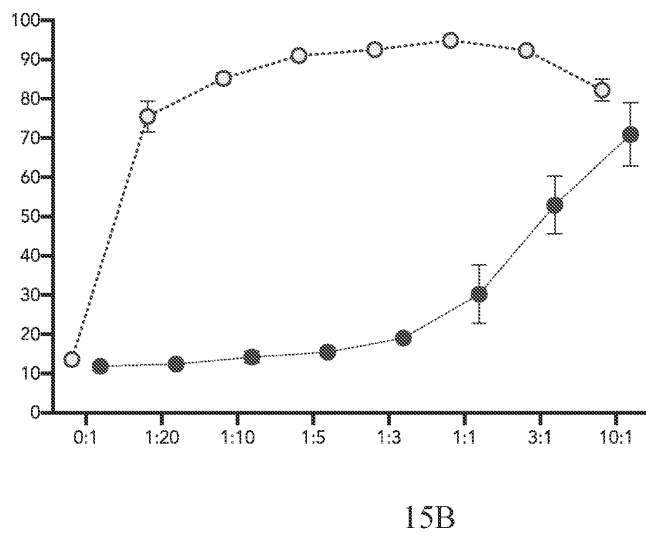
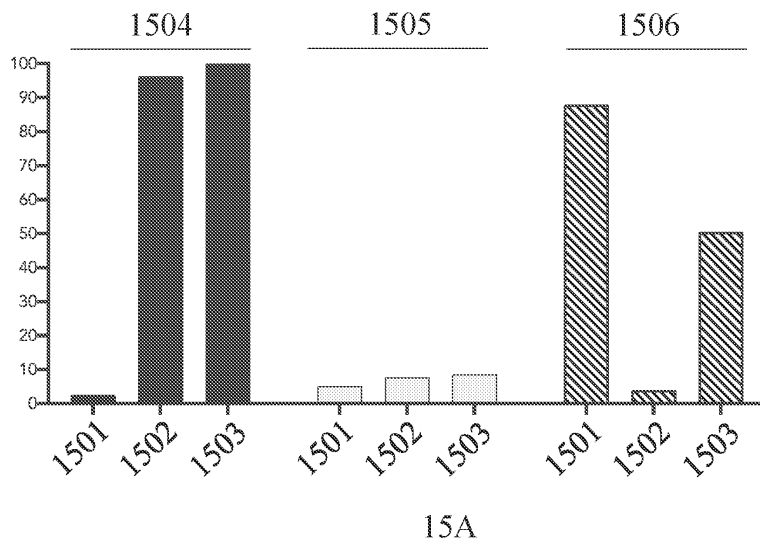
도면13



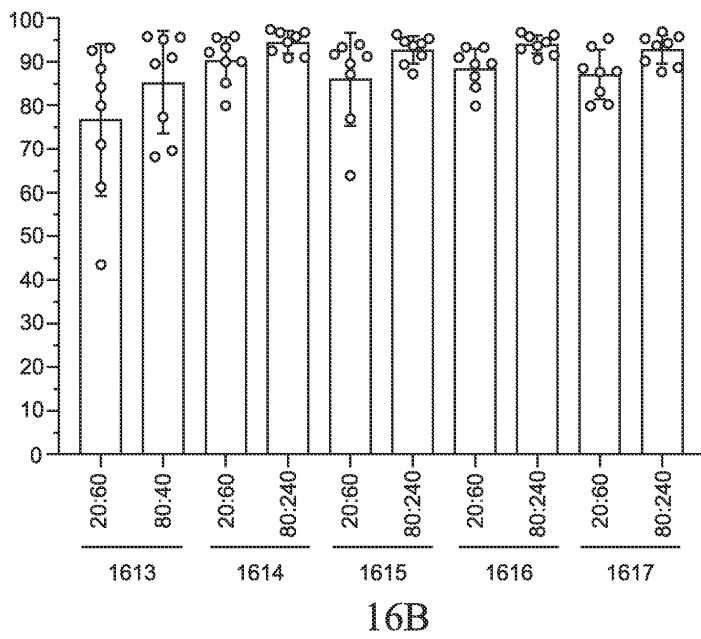
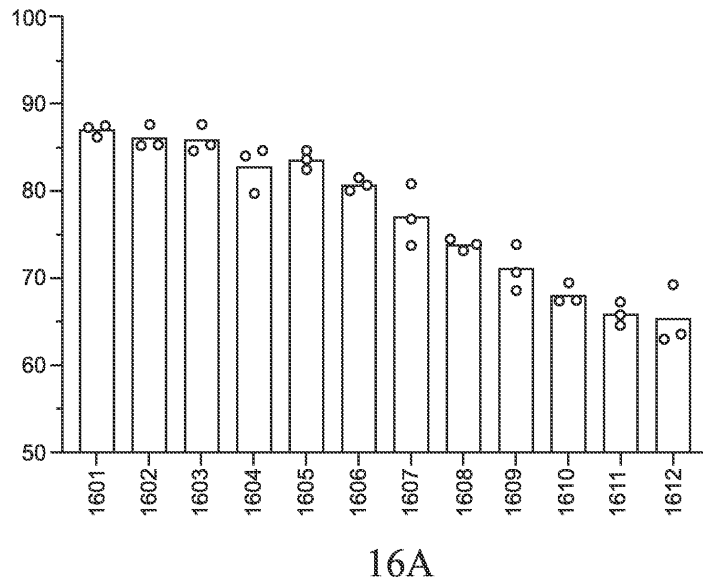
도면14



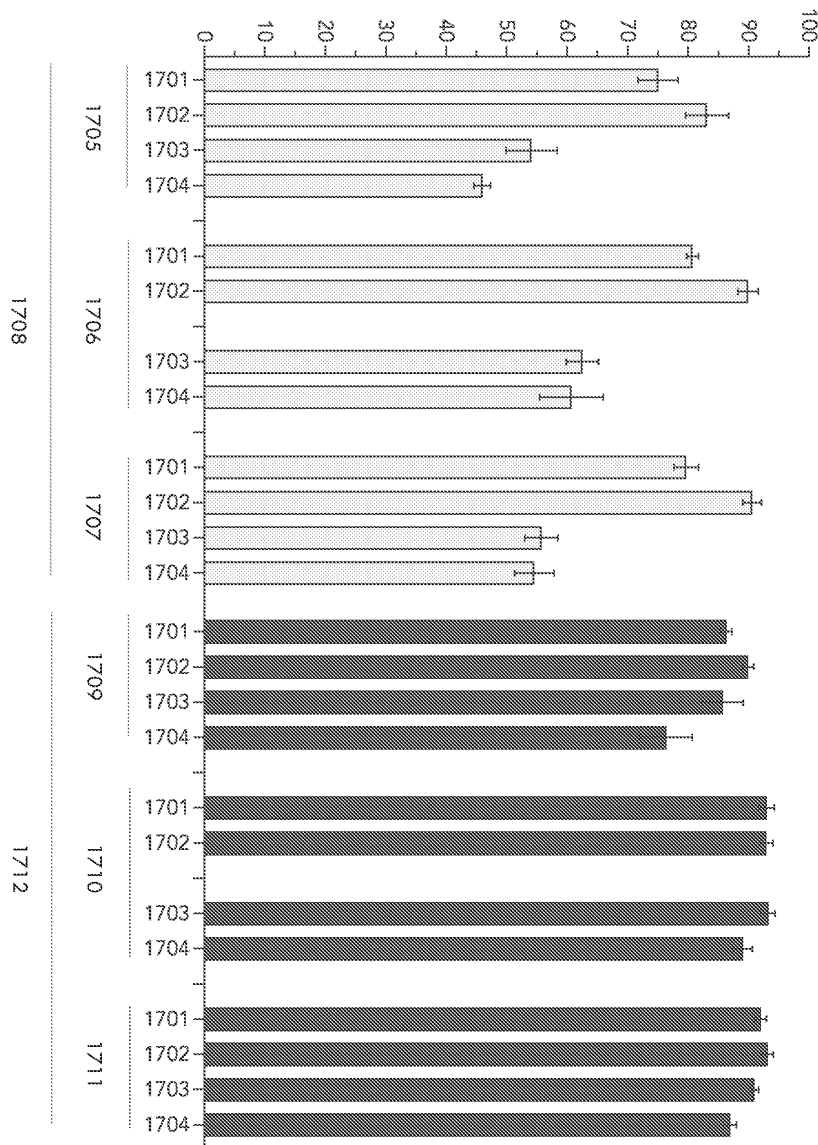
도면15



도면16



도면17



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> CARIBOU BIOSCIENCES, INC.

<120> DNA-CONTAINING POLYNUCLEOTIDES AND GUIDES FOR CRISPR TYPE V
SYSTEMS, AND METHODS OF MAKING AND USING THE SAME

<130> CBI039.30

<140> PCT/US2021/055394

<141> 2021-10-18

<150> 63/229,870

<151> 2021-08-05

<150> 63/127,648

<151> 2020-12-18

<150> 63/093,459

<151> 2020-10-19

<160> 529

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1307

<212> PRT

<213> Acidaminococcus sp.

<220><223> Acidaminococcus sp. (strain BV3L6)

<220><223> Cas12a

<400> 1

Met Thr Gln Phe Glu Gly Phe Thr Asn Leu Tyr Gln Val Ser Lys Thr

1 5 10 15

Leu Arg Phe Glu Leu Ile Pro Gln Gly Lys Thr Leu Lys His Ile Gln

20 25 30

Glu Gln Gly Phe Ile Glu Glu Asp Lys Ala Arg Asn Asp His Tyr Lys

35 40 45

Glu Leu Lys Pro Ile Ile Asp Arg Ile Tyr Lys Thr Tyr Ala Asp Gln

50 55 60

Cys Leu Gln Leu Val Gln Leu Asp Trp Glu Asn Leu Ser Ala Ala Ile

65 70 75 80

Asp Ser Tyr Arg Lys Glu Lys Thr Glu Glu Thr Arg Asn Ala Leu Ile

85 90 95

Glu Glu Gln Ala Thr Tyr Arg Asn Ala Ile His Asp Tyr Phe Ile Gly

100 105 110

Arg Thr Asp Asn Leu Thr Asp Ala Ile Asn Lys Arg His Ala Glu Ile

115 120 125

Tyr Lys Gly Leu Phe Lys Ala Glu Leu Phe Asn Gly Lys Val Leu Lys

130 135 140

Gln Leu Gly Thr Val Thr Thr Thr Glu His Glu Asn Ala Leu Leu Arg

145 150 155 160
 Ser Phe Asp Lys Phe Thr Thr Tyr Phe Ser Gly Phe Tyr Glu Asn Arg
 165 170 175
 Lys Asn Val Phe Ser Ala Glu Asp Ile Ser Thr Ala Ile Pro His Arg
 180 185 190

 Ile Val Gln Asp Asn Phe Pro Lys Phe Lys Glu Asn Cys His Ile Phe
 195 200 205
 Thr Arg Leu Ile Thr Ala Val Pro Ser Leu Arg Glu His Phe Glu Asn
 210 215 220
 Val Lys Lys Ala Ile Gly Ile Phe Val Ser Thr Ser Ile Glu Glu Val
 225 230 235 240
 Phe Ser Phe Pro Phe Tyr Asn Gln Leu Leu Thr Gln Thr Gln Ile Asp
 245 250 255

 Leu Tyr Asn Gln Leu Leu Gly Gly Ile Ser Arg Glu Ala Gly Thr Glu
 260 265 270
 Lys Ile Lys Gly Leu Asn Glu Val Leu Asn Leu Ala Ile Gln Lys Asn
 275 280 285
 Asp Glu Thr Ala His Ile Ile Ala Ser Leu Pro His Arg Phe Ile Pro
 290 295 300
 Leu Phe Lys Gln Ile Leu Ser Asp Arg Asn Thr Leu Ser Phe Ile Leu
 305 310 315 320

 Glu Glu Phe Lys Ser Asp Glu Glu Val Ile Gln Ser Phe Cys Lys Tyr
 325 330 335
 Lys Thr Leu Leu Arg Asn Glu Asn Val Leu Glu Thr Ala Glu Ala Leu
 340 345 350
 Phe Asn Glu Leu Asn Ser Ile Asp Leu Thr His Ile Phe Ile Ser His
 355 360 365
 Lys Lys Leu Glu Thr Ile Ser Ser Ala Leu Cys Asp His Trp Asp Thr
 370 375 380

 Leu Arg Asn Ala Leu Tyr Glu Arg Arg Ile Ser Glu Leu Thr Gly Lys
 385 390 395 400

Ile Thr Lys Ser Ala Lys Glu Lys Val Gln Arg Ser Leu Lys His Glu
405 410 415

Asp Ile Asn Leu Gln Glu Ile Ile Ser Ala Ala Gly Lys Glu Leu Ser
420 425 430

Glu Ala Phe Lys Gln Lys Thr Ser Glu Ile Leu Ser His Ala His Ala
435 440 445

Ala Leu Asp Gln Pro Leu Pro Thr Thr Leu Lys Lys Gln Glu Glu Lys
450 455 460

Glu Ile Leu Lys Ser Gln Leu Asp Ser Leu Leu Gly Leu Tyr His Leu
465 470 475 480

Leu Asp Trp Phe Ala Val Asp Glu Ser Asn Glu Val Asp Pro Glu Phe
485 490 495

Ser Ala Arg Leu Thr Gly Ile Lys Leu Glu Met Glu Pro Ser Leu Ser
500 505 510

Phe Tyr Asn Lys Ala Arg Asn Tyr Ala Thr Lys Lys Pro Tyr Ser Val
515 520 525

Glu Lys Phe Lys Leu Asn Phe Gln Met Pro Thr Leu Ala Ser Gly Trp
530 535 540

Asp Val Asn Lys Glu Lys Asn Asn Gly Ala Ile Leu Phe Val Lys Asn
545 550 555 560

Gly Leu Tyr Tyr Leu Gly Ile Met Pro Lys Gln Lys Gly Arg Tyr Lys
565 570 575

Ala Leu Ser Phe Glu Pro Thr Glu Lys Thr Ser Glu Gly Phe Asp Lys
580 585 590

Met Tyr Tyr Asp Tyr Phe Pro Asp Ala Ala Lys Met Ile Pro Lys Cys
595 600 605

Ser Thr Gln Leu Lys Ala Val Thr Ala His Phe Gln Thr His Thr Thr
610 615 620

Pro Ile Leu Leu Ser Asn Asn Phe Ile Glu Pro Leu Glu Ile Thr Lys
625 630 635 640

Glu Ile Tyr Asp Leu Asn Asn Pro Glu Lys Glu Pro Lys Lys Phe Gln

645	650	655
Thr Ala Tyr Ala Lys Lys Thr Gly Asp Gln Lys Gly Tyr Arg Glu Ala		
660	665	670
Leu Cys Lys Trp Ile Asp Phe Thr Arg Asp Phe Leu Ser Lys Tyr Thr		
675	680	685
Lys Thr Thr Ser Ile Asp Leu Ser Ser Leu Arg Pro Ser Ser Gln Tyr		
690	695	700
Lys Asp Leu Gly Glu Tyr Tyr Ala Glu Leu Asn Pro Leu Leu Tyr His		
705	710	715
Ile Ser Phe Gln Arg Ile Ala Glu Lys Glu Ile Met Asp Ala Val Glu		
725	730	735
Thr Gly Lys Leu Tyr Leu Phe Gln Ile Tyr Asn Lys Asp Phe Ala Lys		
740	745	750
Gly His His Gly Lys Pro Asn Leu His Thr Leu Tyr Trp Thr Gly Leu		
755	760	765
Phe Ser Pro Glu Asn Leu Ala Lys Thr Ser Ile Lys Leu Asn Gly Gln		
770	775	780
Ala Glu Leu Phe Tyr Arg Pro Lys Ser Arg Met Lys Arg Met Ala His		
785	790	795
Arg Leu Gly Glu Lys Met Leu Asn Lys Lys Leu Lys Asp Gln Lys Thr		
805	810	815
Pro Ile Pro Asp Thr Leu Tyr Gln Glu Leu Tyr Asp Tyr Val Asn His		
820	825	830
Arg Leu Ser His Asp Leu Ser Asp Glu Ala Arg Ala Leu Leu Pro Asn		
835	840	845
Val Ile Thr Lys Glu Val Ser His Glu Ile Ile Lys Asp Arg Arg Phe		
850	855	860
Thr Ser Asp Lys Phe Phe Phe His Val Pro Ile Thr Leu Asn Tyr Gln		
865	870	875
Ala Ala Asn Ser Pro Ser Lys Phe Asn Gln Arg Val Asn Ala Tyr Leu		
885	890	895

Lys Glu His Pro Glu Thr Pro Ile Ile Gly Ile Asp Arg Gly Glu Arg
 900 905 910
 Asn Leu Ile Tyr Ile Thr Val Ile Asp Ser Thr Gly Lys Ile Leu Glu
 915 920 925
 Gln Arg Ser Leu Asn Thr Ile Gln Gln Phe Asp Tyr Gln Lys Lys Leu
 930 935 940
 Asp Asn Arg Glu Lys Glu Arg Val Ala Ala Arg Gln Ala Trp Ser Val
 945 950 955 960

 Val Gly Thr Ile Lys Asp Leu Lys Gln Gly Tyr Leu Ser Gln Val Ile
 965 970 975
 His Glu Ile Val Asp Leu Met Ile His Tyr Gln Ala Val Val Val Leu
 980 985 990
 Glu Asn Leu Asn Phe Gly Phe Lys Ser Lys Arg Thr Gly Ile Ala Glu
 995 1000 1005
 Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Glu Lys Met Leu Ile Asp Lys Leu
 1010 1015 1020

 Asn Cys Leu Val Leu Lys Asp Tyr Pro Ala Glu Lys Val Gly Gly
 1025 1030 1035
 Val Leu Asn Pro Tyr Gln Leu Thr Asp Gln Phe Thr Ser Phe Ala
 1040 1045 1050
 Lys Met Gly Thr Gln Ser Gly Phe Leu Phe Tyr Val Pro Ala Pro
 1055 1060 1065
 Tyr Thr Ser Lys Ile Asp Pro Leu Thr Gly Phe Val Asp Pro Phe
 1070 1075 1080

 Val Trp Lys Thr Ile Lys Asn His Glu Ser Arg Lys His Phe Leu
 1085 1090 1095
 Glu Gly Phe Asp Phe Leu His Tyr Asp Val Lys Thr Gly Asp Phe
 1100 1105 1110
 Ile Leu His Phe Lys Met Asn Arg Asn Leu Ser Phe Gln Arg Gly
 1115 1120 1125
 Leu Pro Gly Phe Met Pro Ala Trp Asp Ile Val Phe Glu Lys Asn

1130	1135	1140
Glu Thr Gln Phe Asp Ala Lys Gly Thr Pro Phe Ile Ala Gly Lys		
1145	1150	1155
Arg Ile Val Pro Val Ile Glu Asn His Arg Phe Thr Gly Arg Tyr		
1160	1165	1170
Arg Asp Leu Tyr Pro Ala Asn Glu Leu Ile Ala Leu Leu Glu Glu		
1175	1180	1185
Lys Gly Ile Val Phe Arg Asp Gly Ser Asn Ile Leu Pro Lys Leu		
1190	1195	1200
Leu Glu Asn Asp Asp Ser His Ala Ile Asp Thr Met Val Ala Leu		
1205	1210	1215
Ile Arg Ser Val Leu Gln Met Arg Asn Ser Asn Ala Ala Thr Gly		
1220	1225	1230
Glu Asp Tyr Ile Asn Ser Pro Val Arg Asp Leu Asn Gly Val Cys		
1235	1240	1245
Phe Asp Ser Arg Phe Gln Asn Pro Glu Trp Pro Met Asp Ala Asp		
1250	1255	1260
Ala Asn Gly Ala Tyr His Ile Ala Leu Lys Gly Gln Leu Leu Leu		
1265	1270	1275
Asn His Leu Lys Glu Ser Lys Asp Leu Lys Leu Gln Asn Gly Ile		
1280	1285	1290
Ser Asn Gln Asp Trp Leu Ala Tyr Ile Gln Glu Leu Arg Asn		
1295	1300	1305
<210> 2		
<211> 1228		
<212> PRT		
<213> Unknown		
<220><223> Description of Unknown:		
Lachnospiraceae bacterium ND2006		
<220><223> Cas12a		
<400> 2		

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

245					250					255						
Glu	Tyr	Ile	Asn	Leu	Tyr	Asn	Gln	Lys	Thr	Lys	Gln	Lys	Leu	Pro	Lys	
260					265					270						
Phe	Lys	Pro	Leu	Tyr	Lys	Gln	Val	Leu	Ser	Asp	Arg	Glu	Ser	Leu	Ser	
275					280					285						
Phe	Tyr	Gly	Glu	Gly	Tyr	Thr	Ser	Asp	Glu	Glu	Val	Leu	Glu	Val	Phe	
290					295					300						
Arg	Asn	Thr	Leu	Asn	Lys	Asn	Ser	Glu	Ile	Phe	Ser	Ser	Ile	Lys	Lys	
305					310					315					320	
Leu	Glu	Lys	Leu	Phe	Lys	Asn	Phe	Asp	Glu	Tyr	Ser	Ser	Ala	Gly	Ile	
325					330					335						
Phe	Val	Lys	Asn	Gly	Pro	Ala	Ile	Ser	Thr	Ile	Ser	Lys	Asp	Ile	Phe	
340					345					350						
Gly	Glu	Trp	Asn	Val	Ile	Arg	Asp	Lys	Trp	Asn	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp	
355					360					365						
Ile	His	Leu	Lys	Lys	Lys	Ala	Val	Val	Thr	Glu	Lys	Tyr	Glu	Asp	Asp	
370					375					380						
Arg	Arg	Lys	Ser	Phe	Lys	Lys	Ile	Gly	Ser	Phe	Ser	Leu	Glu	Gln	Leu	
385					390					395					400	
Gln	Glu	Tyr	Ala	Asp	Ala	Asp	Leu	Ser	Val	Val	Glu	Lys	Leu	Lys	Glu	
405					410					415						
Ile	Ile	Ile	Gln	Lys	Val	Asp	Glu	Ile	Tyr	Lys	Val	Tyr	Gly	Ser	Ser	
420					425					430						
Glu	Lys	Leu	Phe	Asp	Ala	Asp	Phe	Val	Leu	Glu	Lys	Ser	Leu	Lys	Lys	
435					440					445						
Asn	Asp	Ala	Val	Val	Ala	Ile	Met	Lys	Asp	Leu	Leu	Asp	Ser	Val	Lys	
450					455					460						
Ser	Phe	Glu	Asn	Tyr	Ile	Lys	Ala	Phe	Phe	Gly	Glu	Gly	Lys	Glu	Thr	
465					470					475					480	
Asn	Arg	Asp	Glu	Ser	Phe	Tyr	Gly	Asp	Phe	Val	Leu	Ala	Tyr	Asp	Ile	
485					490					495						

Leu Leu Lys Val Asp His Ile Tyr Asp Ala Ile Arg Asn Tyr Val Thr
500 505 510

Gln Lys Pro Tyr Ser Lys Asp Lys Phe Lys Leu Tyr Phe Gln Asn Pro
515 520 525

Gln Phe Met Gly Gly Trp Asp Lys Asp Lys Glu Thr Asp Tyr Arg Ala
530 535 540

Thr Ile Leu Arg Tyr Gly Ser Lys Tyr Tyr Leu Ala Ile Met Asp Lys
545 550 555 560

Lys Tyr Ala Lys Cys Leu Gln Lys Ile Asp Lys Asp Asp Val Asn Gly
565 570 575

Asn Tyr Glu Lys Ile Asn Tyr Lys Leu Leu Pro Gly Pro Asn Lys Met
580 585 590

Leu Pro Lys Val Phe Phe Ser Lys Lys Trp Met Ala Tyr Tyr Asn Pro
595 600 605

Ser Glu Asp Ile Gln Lys Ile Tyr Lys Asn Gly Thr Phe Lys Lys Gly
610 615 620

Asp Met Phe Asn Leu Asn Asp Cys His Lys Leu Ile Asp Phe Phe Lys
625 630 635 640

Asp Ser Ile Ser Arg Tyr Pro Lys Trp Ser Asn Ala Tyr Asp Phe Asn
645 650 655

Phe Ser Glu Thr Glu Lys Tyr Lys Asp Ile Ala Gly Phe Tyr Arg Glu
660 665 670

Val Glu Glu Gln Gly Tyr Lys Val Ser Phe Glu Ser Ala Ser Lys Lys
675 680 685

Glu Val Asp Lys Leu Val Glu Glu Gly Lys Leu Tyr Met Phe Gln Ile
690 695 700

Tyr Asn Lys Asp Phe Ser Asp Lys Ser His Gly Thr Pro Asn Leu His
705 710 715 720

Thr Met Tyr Phe Lys Leu Leu Phe Asp Glu Asn Asn His Gly Gln Ile
725 730 735

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

740	745	750	
Lys Glu Glu Leu Val Val His Pro Ala Asn Ser Pro Ile Ala Asn Lys			
755	760	765	
Asn Pro Asp Asn Pro Lys Lys Thr Thr Thr Leu Ser Tyr Asp Val Tyr			
770	775	780	
Lys Asp Lys Arg Phe Ser Glu Asp Gln Tyr Glu Leu His Ile Pro Ile			
785	790	795	800
Ala Ile Asn Lys Cys Pro Lys Asn Ile Phe Lys Ile Asn Thr Glu Val			
805	810	815	
Arg Val Leu Leu Lys His Asp Asp Asn Pro Tyr Val Ile Gly Ile Asp			
820	825	830	
Arg Gly Glu Arg Asn Leu Leu Tyr Ile Val Val Val Asp Gly Lys Gly			
835	840	845	
Asn Ile Val Glu Gln Tyr Ser Leu Asn Glu Ile Ile Asn Asn Phe Asn			
850	855	860	
Gly Ile Arg Ile Lys Thr Asp Tyr His Ser Leu Leu Asp Lys Lys Glu			
865	870	875	880
Lys Glu Arg Phe Glu Ala Arg Gln Asn Trp Thr Ser Ile Glu Asn Ile			
885	890	895	
Lys Glu Leu Lys Ala Gly Tyr Ile Ser Gln Val Val His Lys Ile Cys			
900	905	910	
Glu Leu Val Glu Lys Tyr Asp Ala Val Ile Ala Leu Glu Asp Leu Asn			
915	920	925	
Ser Gly Phe Lys Asn Ser Arg Val Lys Val Glu Lys Gln Val Tyr Gln			
930	935	940	
Lys Phe Glu Lys Met Leu Ile Asp Lys Leu Asn Tyr Met Val Asp Lys			
945	950	955	960
Lys Ser Asn Pro Cys Ala Thr Gly Gly Ala Leu Lys Gly Tyr Gln Ile			
965	970	975	
Thr Asn Lys Phe Glu Ser Phe Lys Ser Met Ser Thr Gln Asn Gly Phe			
980	985	990	

Ile Phe Tyr Ile Pro Ala Trp Leu Thr Ser Lys Ile Asp Pro Ser Thr		
995	1000	1005
Gly Phe Val Asn Leu Leu Lys Thr Lys Tyr Thr Ser Ile Ala Asp		
1010	1015	1020
Ser Lys Lys Phe Ile Ser Ser Phe Asp Arg Ile Met Tyr Val Pro		
1025	1030	1035
Glu Glu Asp Leu Phe Glu Phe Ala Leu Asp Tyr Lys Asn Phe Ser		
1040	1045	1050
Arg Thr Asp Ala Asp Tyr Ile Lys Lys Trp Lys Leu Tyr Ser Tyr		
1055	1060	1065
Gly Asn Arg Ile Arg Ile Phe Arg Asn Pro Lys Lys Asn Asn Val		
1070	1075	1080
Phe Asp Trp Glu Glu Val Cys Leu Thr Ser Ala Tyr Lys Glu Leu		
1085	1090	1095
Phe Asn Lys Tyr Gly Ile Asn Tyr Gln Gln Gly Asp Ile Arg Ala		
1100	1105	1110
Leu Leu Cys Glu Gln Ser Asp Lys Ala Phe Tyr Ser Ser Phe Met		
1115	1120	1125
Ala Leu Met Ser Leu Met Leu Gln Met Arg Asn Ser Ile Thr Gly		
1130	1135	1140
Arg Thr Asp Val Asp Phe Leu Ile Ser Pro Val Lys Asn Ser Asp		
1145	1150	1155
Gly Ile Phe Tyr Asp Ser Arg Asn Tyr Glu Ala Gln Glu Asn Ala		
1160	1165	1170
Ile Leu Pro Lys Asn Ala Asp Ala Asn Gly Ala Tyr Asn Ile Ala		
1175	1180	1185
Arg Lys Val Leu Trp Ala Ile Gly Gln Phe Lys Lys Ala Glu Asp		
1190	1195	1200
Glu Lys Leu Asp Lys Val Lys Ile Ala Ile Ser Asn Lys Glu Trp		
1205	1210	1215
Leu Glu Tyr Ala Gln Thr Ser Val Lys His		

1220 1225

<210> 3

<211> 1300

<212> PRT

<213> Francisella tularensis

<220><223> Francisella tularensis subsp. novicida (strain U112)

<220><223> Cas12a

<400> 3

Met Ser Ile Tyr Gln Glu Phe Val Asn Lys Tyr Ser Leu Ser Lys Thr

1 5 10 15

Leu Arg Phe Glu Leu Ile Pro Gln Gly Lys Thr Leu Glu Asn Ile Lys

20 25 30

Ala Arg Gly Leu Ile Leu Asp Asp Glu Lys Arg Ala Lys Asp Tyr Lys

35 40 45

Lys Ala Lys Gln Ile Ile Asp Lys Tyr His Gln Phe Phe Ile Glu Glu

50 55 60

Ile Leu Ser Ser Val Cys Ile Ser Glu Asp Leu Leu Gln Asn Tyr Ser

65 70 75 80

Asp Val Tyr Phe Lys Leu Lys Lys Ser Asp Asp Asp Asn Leu Gln Lys

85 90 95

Asp Phe Lys Ser Ala Lys Asp Thr Ile Lys Lys Gln Ile Ser Glu Tyr

100 105 110

Ile Lys Asp Ser Glu Lys Phe Lys Asn Leu Phe Asn Gln Asn Leu Ile

115 120 125

Asp Ala Lys Lys Gly Gln Glu Ser Asp Leu Ile Leu Trp Leu Lys Gln

130 135 140

Ser Lys Asp Asn Gly Ile Glu Leu Phe Lys Ala Asn Ser Asp Ile Thr

145 150 155 160

Asp Ile Asp Glu Ala Leu Glu Ile Ile Lys Ser Phe Lys Gly Trp Thr

165 170 175

Thr Tyr Phe Lys Gly Phe His Glu Asn Arg Lys Asn Val Tyr Ser Ser

180 185 190

Asn Asp Ile Pro Thr Ser Ile Ile Tyr Arg Ile Val Asp Asp Asn Leu
195 200 205

Pro Lys Phe Leu Glu Asn Lys Ala Lys Tyr Glu Ser Leu Lys Asp Lys
210 215 220

Ala Pro Glu Ala Ile Asn Tyr Glu Gln Ile Lys Lys Asp Leu Ala Glu
225 230 235 240

Glu Leu Thr Phe Asp Ile Asp Tyr Lys Thr Ser Glu Val Asn Gln Arg
245 250 255

Val Phe Ser Leu Asp Glu Val Phe Glu Ile Ala Asn Phe Asn Asn Tyr
260 265 270

Leu Asn Gln Ser Gly Ile Thr Lys Phe Asn Thr Ile Ile Gly Gly Lys
275 280 285

Phe Val Asn Gly Glu Asn Thr Lys Arg Lys Gly Ile Asn Glu Tyr Ile
290 295 300

Asn Leu Tyr Ser Gln Gln Ile Asn Asp Lys Thr Leu Lys Lys Tyr Lys
305 310 315 320

Met Ser Val Leu Phe Lys Gln Ile Leu Ser Asp Thr Glu Ser Lys Ser
325 330 335

Phe Val Ile Asp Lys Leu Glu Asp Asp Ser Asp Val Val Thr Thr Met
340 345 350

Gln Ser Phe Tyr Glu Gln Ile Ala Ala Phe Lys Thr Val Glu Glu Lys
355 360 365

Ser Ile Lys Glu Thr Leu Ser Leu Leu Phe Asp Asp Leu Lys Ala Gln
370 375 380

Lys Leu Asp Leu Ser Lys Ile Tyr Phe Lys Asn Asp Lys Ser Leu Thr
385 390 395 400

Asp Leu Ser Gln Gln Val Phe Asp Asp Tyr Ser Val Ile Gly Thr Ala
405 410 415

Val Leu Glu Tyr Ile Thr Gln Gln Ile Ala Pro Lys Asn Leu Asp Asn
420 425 430

Pro Ser Lys Lys Glu Gln Glu Leu Ile Ala Lys Lys Thr Glu Lys Ala

435 440 445
 Lys Tyr Leu Ser Leu Glu Thr Ile Lys Leu Ala Leu Glu Glu Phe Asn
 450 455 460

 Lys His Arg Asp Ile Asp Lys Gln Cys Arg Phe Glu Glu Ile Leu Ala
 465 470 475 480
 Asn Phe Ala Ala Ile Pro Met Ile Phe Asp Glu Ile Ala Gln Asn Lys
 485 490 495
 Asp Asn Leu Ala Gln Ile Ser Ile Lys Tyr Gln Asn Gln Gly Lys Lys
 500 505 510
 Asp Leu Leu Gln Ala Ser Ala Glu Asp Asp Val Lys Ala Ile Lys Asp
 515 520 525

 Leu Leu Asp Gln Thr Asn Asn Leu Leu His Lys Leu Lys Ile Phe His
 530 535 540
 Ile Ser Gln Ser Glu Asp Lys Ala Asn Ile Leu Asp Lys Asp Glu His
 545 550 555 560
 Phe Tyr Leu Val Phe Glu Glu Cys Tyr Phe Glu Leu Ala Asn Ile Val
 565 570 575
 Pro Leu Tyr Asn Lys Ile Arg Asn Tyr Ile Thr Gln Lys Pro Tyr Ser
 580 585 590

 Asp Glu Lys Phe Lys Leu Asn Phe Glu Asn Ser Thr Leu Ala Asn Gly
 595 600 605
 Trp Asp Lys Asn Lys Glu Pro Asp Asn Thr Ala Ile Leu Phe Ile Lys
 610 615 620
 Asp Asp Lys Tyr Tyr Leu Gly Val Met Asn Lys Lys Asn Asn Lys Ile
 625 630 635 640
 Phe Asp Asp Lys Ala Ile Lys Glu Asn Lys Gly Glu Gly Tyr Lys Lys
 645 650 655

 Ile Val Tyr Lys Leu Leu Pro Gly Ala Asn Lys Met Leu Pro Lys Val
 660 665 670
 Phe Phe Ser Ala Lys Ser Ile Lys Phe Tyr Asn Pro Ser Glu Asp Ile
 675 680 685

Leu Arg Ile Arg Asn His Ser Thr His Thr Lys Asn Gly Ser Pro Gln
 690 695 700
 Lys Gly Tyr Glu Lys Phe Glu Phe Asn Ile Glu Asp Cys Arg Lys Phe
 705 710 715 720

 Ile Asp Phe Tyr Lys Gln Ser Ile Ser Lys His Pro Glu Trp Lys Asp
 725 730 735
 Phe Gly Phe Arg Phe Ser Asp Thr Gln Arg Tyr Asn Ser Ile Asp Glu
 740 745 750
 Phe Tyr Arg Glu Val Glu Asn Gln Gly Tyr Lys Leu Thr Phe Glu Asn
 755 760 765
 Ile Ser Glu Ser Tyr Ile Asp Ser Val Val Asn Gln Gly Lys Leu Tyr
 770 775 780

 Leu Phe Gln Ile Tyr Asn Lys Asp Phe Ser Ala Tyr Ser Lys Gly Arg
 785 790 795 800
 Pro Asn Leu His Thr Leu Tyr Trp Lys Ala Leu Phe Asp Glu Arg Asn
 805 810 815
 Leu Gln Asp Val Val Tyr Lys Leu Asn Gly Glu Ala Glu Leu Phe Tyr
 820 825 830
 Arg Lys Gln Ser Ile Pro Lys Lys Ile Thr His Pro Ala Lys Glu Ala
 835 840 845

 Ile Ala Asn Lys Asn Lys Asp Asn Pro Lys Lys Glu Ser Val Phe Glu
 850 855 860
 Tyr Asp Leu Ile Lys Asp Lys Arg Phe Thr Glu Asp Lys Phe Phe Phe
 865 870 875 880
 His Cys Pro Ile Thr Ile Asn Phe Lys Ser Ser Gly Ala Asn Lys Phe
 885 890 895
 Asn Asp Glu Ile Asn Leu Leu Leu Lys Glu Lys Ala Asn Asp Val His
 900 905 910

 Ile Leu Ser Ile Asp Arg Gly Glu Arg His Leu Ala Tyr Tyr Thr Leu
 915 920 925
 Val Asp Gly Lys Gly Asn Ile Ile Lys Gln Asp Thr Phe Asn Ile Ile

930	935	940	
Gly Asn Asp Arg Met Lys Thr Asn Tyr His Asp Lys Leu Ala Ala Ile			
945	950	955	960
Glu Lys Asp Arg Asp Ser Ala Arg Lys Asp Trp Lys Lys Ile Asn Asn			
	965	970	975
Ile Lys Glu Met Lys Glu Gly Tyr Leu Ser Gln Val Val His Glu Ile			
	980	985	990
Ala Lys Leu Val Ile Glu Tyr Asn Ala Ile Val Val Phe Glu Asp Leu			
	995	1000	1005
Asn Phe Gly Phe Lys Arg Gly Arg Phe Lys Val Glu Lys Gln Val			
	1010	1015	1020
Tyr Gln Lys Leu Glu Lys Met Leu Ile Glu Lys Leu Asn Tyr Leu			
	1025	1030	1035
Val Phe Lys Asp Asn Glu Phe Asp Lys Thr Gly Gly Val Leu Arg			
	1040	1045	1050
Ala Tyr Gln Leu Thr Ala Pro Phe Glu Thr Phe Lys Lys Met Gly			
	1055	1060	1065
Lys Gln Thr Gly Ile Ile Tyr Tyr Val Pro Ala Gly Phe Thr Ser			
	1070	1075	1080
Lys Ile Cys Pro Val Thr Gly Phe Val Asn Gln Leu Tyr Pro Lys			
	1085	1090	1095
Tyr Glu Ser Val Ser Lys Ser Gln Glu Phe Phe Ser Lys Phe Asp			
	1100	1105	1110
Lys Ile Cys Tyr Asn Leu Asp Lys Gly Tyr Phe Glu Phe Ser Phe			
	1115	1120	1125
Asp Tyr Lys Asn Phe Gly Asp Lys Ala Ala Lys Gly Lys Trp Thr			
	1130	1135	1140
Ile Ala Ser Phe Gly Ser Arg Leu Ile Asn Phe Arg Asn Ser Asp			
	1145	1150	1155
Lys Asn His Asn Trp Asp Thr Arg Glu Val Tyr Pro Thr Lys Glu			
	1160	1165	1170

Leu Glu Lys Leu Leu Lys Asp Tyr Ser Ile Glu Tyr Gly His Gly
 1175 1180 1185
 Glu Cys Ile Lys Ala Ala Ile Cys Gly Glu Ser Asp Lys Lys Phe
 1190 1195 1200
 Phe Ala Lys Leu Thr Ser Val Leu Asn Thr Ile Leu Gln Met Arg
 1205 1210 1215

Asn Ser Lys Thr Gly Thr Glu Leu Asp Tyr Leu Ile Ser Pro Val
 1220 1225 1230
 Ala Asp Val Asn Gly Asn Phe Phe Asp Ser Arg Gln Ala Pro Lys
 1235 1240 1245
 Asn Met Pro Gln Asp Ala Asp Ala Asn Gly Ala Tyr His Ile Gly
 1250 1255 1260
 Leu Lys Gly Leu Met Leu Leu Gly Arg Ile Lys Asn Asn Gln Glu
 1265 1270 1275

Gly Lys Lys Leu Asn Leu Val Ile Lys Asn Glu Glu Tyr Phe Glu
 1280 1285 1290
 Phe Val Gln Asn Arg Asn Met
 1295 1300

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Nuclear localization sequence (NLS)

<400> 4

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 5

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<

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

<220><223> Nuclear localization sequence (NLS)

<400> 5

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

1 5 10 15

<210> 6

<211> 20

<212> RNA

<213> Acidaminococcus sp.

<220><223> Acidaminococcus sp. (strain BV3L6)

<220><223> AsCas12 CRISPR repeat

<400> 6

uaauuucuac ucuuguagau

20

<210> 7

<211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> AsCas12 crRNA

<220><221> modified_base

<222> (21)..(40)

<223> a, c, g, or u

<400> 7

uaauuucuac ucuuguagau nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

40

<210> 8

<211> 21

<212> RNA

<213> Unknown

<220><223> Description of Unknown:

Lachnospiraceae bacterium ND2006

<220><223> LbaCas12 CRISPR repeat

<400> 8

uaauuucuaac uaaguguaga u	21
<210> 9	
<211> 41	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> LbaCas12 crRNA	
<220><221> modified_base	
<222> (22)..(41)	
<223> a, c, g, or u	
<400> 9	
uaauuucuaac uaaguguaga unnnnnnnnnn nnnnnnnnnn n	41
<210> 10	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Francisella tularensis	
<220><223> Francisella tularensis subsp. novicida (strain U112)	
<220><223> FnoCas12 CRISPR repeat	
<400> 10	
uaauuucuaac uguuguagau	20
<210> 11	
<211> 40	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic oligonucleotide	
<220><223> FnoCas12 crRNA	
<220><221> modified_base	
<222> (21)..(40)	
<223> a, c, g, or u	
<400> 11	
uaauuucuaac uguuguagau nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn	40

<210> 12
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt1
 <400> 12
 tttctctcct ctttcccaca gaat 24
 <210> 13
 <211> 24

 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt2
 <400> 13
 tttcccacag aatttagcat ggct 24
 <210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt3
 <400> 14
 ttttagcatgg ctcagacagt cact 24
 <210> 15
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt4
 <400> 15
 tttattcttg tacaagcagc ctcc 24
 <210> 16
 <211> 24
 <212> DNA
 <213>
 > Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt5

<400> 16
 tttctggaag ttcacagaga aacg 24
 <210> 17
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt6
 <400> 17
 tttctctgtg aacttccaga aagc 24
 <210> 18
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt7
 <400> 18
 tttggctgct ttctggaagt tcac 24
 <210> 19
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt8
 <400> 19
 tttatcaacc tcaccaactc acac 24
 <210> 20
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt9
 <400> 20
 tttgctgtca gtccaagctc catg 24
 <210> 21
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220><223> TRAC-tgt10

<400> 21

tttccaaaga caagaggtgt gttt 24

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> TRAC-tgt11

<400> 22

tttgaaagg gcacaagact ttct 24

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> TRAC-tgt12

<400> 23

tttagagtct ctcagctggt acac 24

<210> 24

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> TRAC-tgt13

<400> 24

tttgagaatc aaaatcgggtg aata 24

<210> 25

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> TRAC-tgt14

<400> 25

tttgtttgag aatcaaaatc ggtg 24

<210> 26

<211> 24

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt15
 <400> 26
 ttgtattctc aaacaaatgt gtca 24
 <210> 27
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt16
 <400> 27
 ttgtgacac attgtttga gaat 24
 <210> 28
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt17
 <400> 28
 ttgtctgtg atatacacat caga 24
 <210> 29
 <
 211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt18
 <400> 29
 ttgttgctc caggccacag cact 24
 <210> 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt19
 <400> 30
 ttgcacatg caaagtcaga ttg 24
 <210> 31

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt20
 <400> 31
 ttgcatgtg caaacgcctt caac 24
 <210> 32
 <211> 24
 <212>
 > DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt21
 <400> 32
 ttcccttta gaaagttcct gtga 24
 <210> 33
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt22
 <400> 33
 tttagaaagt tcctgtgatg tcaa 24
 <210> 34
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt23
 <400> 34
 tttctcgacc agcttgacat caca 24
 <210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213>
 > Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt24
 <400> 35

tttcaaagct tttctcgacc agct 24

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> TRAC-tgt25

<400> 36

tttacagata cgaacctaaa cttt 24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> TRAC-tgt26

<400> 37

tttgaaagtt taggttcgta tctg 24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> TRAC-tgt27

<400> 38

tttcaaaacc tgtcagtgat tggg 24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> TRAC-tgt28

<400> 39

tttcaggagg aggattcgga accc 24

<210> 40

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> TRAC-tgt29

<400> 40
 tttaatctgc tcatgacgct gcgg 24

<210> 41
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt30

<400> 41
 tttggagagg gagaagaggg gcaa 24

<210> 42
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt31

<400> 42
 tttcacctcc ttgggggtag gaga 24

<210> 43
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt32

<400> 43
 tttatgatta agattgctga agag 24

<210> 44
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt33

<400> 44
 tttgagcagct cttcagcaat ctta 24

<210> 45
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt34
 <400> 45
 tttatttttt tttaatagtg ttca 24
 <210> 46
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt35
 <400> 46
 tttatgaaca ctattaaaaa aaaa 24
 <210> 47
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt36
 <400> 47
 ttcttttatg aacactatta aaaa 24
 <210> 48
 <
 211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt37
 <400> 48
 tttaatagtg ttcataaaga aata 24
 <210> 49
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt38
 <400> 49
 ttcccccca cgtcttgaga agaa 24
 <210> 50
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> TRAC-tgt39
 <400> 50
 tttaatgaag gcatcggcag cagg 24
 <210> 51
 <211> 24
 <212>
 > DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt1
 <400> 51
 tttaatataa gtggaggcgt cgcg 24
 <210> 52
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt2
 <400> 52
 tttctggcct ggaggctatc cagc 24
 <210> 53
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt3
 <400> 53
 ttcccgata ttctcaggt actc 24
 <210> 54
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220><223> B2M-tgt4
 <400> 54
 ttctactcag tcattccagca gaga 24

<210> 55
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt5
 <400> 55
 ttccattct ctgctggatg acgt 24
 <210> 56
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt6
 <400> 56
 ttgactttc cattctctgc tgga 24
 <210> 57
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt7
 <400> 57
 ttccctgaat tgctatgtgt ctgg 24
 <210> 58
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt8
 <400> 58
 ttccatccat ccgacattga agtt 24
 <210> 59
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt9
 <400> 59

tttcaattct ctctccattc ttca 24

<210> 60

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt10

<400> 60

tttcagcaag gactgggtctt tcta 24

<210> 61

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt11

<400> 61

tttctatctc ttgtactaca ctga 24

<210> 62

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt12

<400> 62

tttcagtggg ggtgaattca gtgt 24

<210> 63

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt13

<400> 63

tttgtcacag cccaagatag ttaa 24

<210> 64

<211>

> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt14
 <400> 64
 tttctccact gtctttttca taga 24
 <210> 65
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt15
 <400> 65
 tttcatagat cgagacatgt aagc 24
 <210> 66
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt16
 <400> 66
 tttctcaagg tcaaaaactt acct 24
 <210> 67
 <211> 24
 <212> DNA

 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt17
 <400> 67
 tttcttttct tttcaggttt gaag 24
 <210> 68
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt18
 <400> 68
 tttcttttca ggtttgaaga tgcc 24
 <210> 69
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt19
 <400> 69
 tttcaggttt gaagatgccg catt 24
 <210> 70
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt20
 <400> 70
 tttgaagatg ccgcatttgg attg 24
 <210> 71
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt21
 <400> 71
 tttggaattc atccaatcca aatg 24
 <210> 72
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt22
 <400> 72
 tttggattgg atgaattcca aatt 24
 <210> 73
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt23
 <400> 73
 tttaaatattg atatgcttat acac 24
 <210> 74

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt24
 <400> 74
 tttgtgcata aagtgt aagt gtat 24
 <210> 75
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt25
 <400> 75
 tttatgcaca aaatgtaggg ttat 24
 <210> 76
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt26
 <400> 76
 tttataattc tactttgagt gctg 24

 <210> 77
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt27
 <400> 77
 tttgagtgtgt gtctccatgt ttga 24
 <210> 78
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt28
 <400> 78
 tttgatgtat ctgagcaggt tgct 24

<210> 79
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt29
 <400> 79
 tttgaactct tcaatctctt gcac 24
 <210> 80
 <211>
 > 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt30
 <400> 80
 tttgagtgca agagattgaa gagt 24
 <210> 81
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt31
 <400> 81
 ttacatact ctgcttagaa ttg 24
 <210> 82
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt32
 <400> 82
 tttccccaa attctaagca gagt 24
 <210> 83
 <211> 24
 <212> DNA

 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt33

<400> 83
 tttctaaatt ttccccaaa ttct 24
 <210> 84
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt34
 <400> 84
 tttaggggaa aatttagaaa tata 24
 <210> 85
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt35
 <400> 85
 tttagaaata taattgacag gatt 24
 <210> 86
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt36
 <400> 86
 tttccaataa tctgtcaat tata 24
 <210> 87
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt37
 <400> 87
 tttcattcat tataacaaat ttcc 24
 <210> 88
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt38

<400> 88

tttgttataa tgaatgaaac attt 24

<210> 89

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt39

<400> 89

tttgtcatat aagattcata tttt 24

<210> 90

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt40

<400> 90

tttacttctt atacatttga taaa 24

<210> 91

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt41

<400> 91

tttatcaaat gtataagaag taaa 24

<210> 92

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt42

<400> 92

tttgataaag taaggcatgg ttgt 24

<210> 93

<211> 24

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt43
 <400> 93
 tttatttttg ttccacaagt taaa 24
 <210> 94
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt44
 <400> 94
 tttaacttgt ggaacaaaaa taaa 24
 <210> 95
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt45
 <400> 95
 tttatttaac ttgtggaaca aaaa 24
 <210> 96
 <211>
 > 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt46
 <400> 96
 tttgttcac aagttaaata aatc 24
 <210> 97
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt47
 <400> 97
 tttatgattt atttaacttg tgga 24
 <210> 98

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt48

<400> 98

tttgaaaata aaggggtaat agtg 24

<210> 99

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt49

<400> 99

tttcctgtt tgaaaataaa gggg 24

<210> 100

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt50

<400> 100

tttatatttca aacagggaaa cagt 24

<210> 101

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt51

<400> 101

tttcaaacag ggaacagtc ttca 24

<210> 102

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt52

<400> 102

tttaccaagt ggaacttgaa gact 24

<210> 103

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt53

<400> 103

tttacctgt gagccaaact ctat 24

<210> 104

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt54

<400> 104

tttggctcac agtgtaaagg gcct 24

<210> 105

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223>

> B2M-tgt55

<400> 105

tttccagatt aggaatctga tgct 24

<210> 106

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt56

<400> 106

tttgagcatc agattcctaa tctg 24

<210> 107

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt57

<400> 107
 tttaacttct ttgagcatca gatt 24

<210> 108
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt58

<400> 108
 tttagccagc gttctttcct gcgg 24

<210> 109
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt59

<400> 109
 tttcctgcgg gccaggtcat gagg 24

<210> 110
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt60

<400> 110
 ttggtccct cttagagtct gcat 24

<210> 111
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt61

<400> 111
 tttaatatatt tagcaaggaa taga 24

<210> 112
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt62
 <400> 112
 tttagcaagg aatagatata caat 24
 <210> 113
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt63
 <400> 113
 tttcaggacc ccttcttgga cacc 24
 <210> 114
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt64
 <400> 114
 tttaggtgtcc aagaaggggt cctg 24

 <210> 115
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt65
 <400> 115
 tttatagaag ggacttaaat atcc 24
 <210> 116
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt66
 <400> 116
 tttaagtccc ttctataaaa tgggt 24
 <210> 117
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt67
 <400> 117
 ttgcatata acctatccac atcc 24
 <210> 118

 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt68
 <400> 118
 tttaaagtat acaggaggat gtgg 24
 <210> 119
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt69
 <400> 119
 tttaaatacat ttctagatta cttg 24
 <210> 120
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt70
 <400> 120
 ttctagatt acttgaata ccta 24
 <210> 121
 <211> 24

 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt71
 <400> 121
 ttacattgt attaggtatt acaa 24

<210> 122
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt72
 <400> 122
 ttgcatagc attacattg tatt 24
 <210> 123
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt73
 <400> 123
 tttcttgta ttattccta aaca 24
 <210> 124
 <211> 24
 <212> DNA

 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt74
 <400> 124
 tttaaggaat aatgacaaga aaaa 24
 <210> 125
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt75
 <400> 125
 ttactgagc atgtacagac tttt 24
 <210> 126
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> B2M-tgt76
 <400> 126

tttccccagt gtttttgatc catg	24
<210> 127	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220><223> B2M-tgt77	
<400> 127	
tttgatccat ggtttgctga atcc	24
<210> 128	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220><223> B2M-tgt78	
<400> 128	
tttgctgaat ccacagatgt ggag	24
<210> 129	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220><223> B2M-tgt79	
<400> 129	
tttgtcattc aaagtacagc gggc	24
<210> 130	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<220><223>	
> B2M-tgt80	
<400> 130	
tttgaatgac aaataacaga ttta	24
<210> 131	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	

<220><223> B2M-tgt81

<400> 131

tttaaactcg ttatttgtca ttca 24

<210> 132

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt82

<400> 132

tttaaaattt tcaaggcata gttt 24

<210> 133

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> B2M-tgt83

<400> 133

tttcaaggca tagttttata cctg 24

<210> 134

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PDCD1-tgt1

<400> 134

tttaattata attataatat aata 24

<210> 135

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PDCD1-tgt2

<400> 135

tttaaagggg ttggccgggc tccc 24

<210> 136

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PDCD1-tgt3

<400> 136

tttaaataat ttcaggaatg ggtt

24

<210> 137

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PDCD1-tgt4

<400> 137

tttcaggaat gggttccaag gaga

24

<210> 138

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PDCD1-tgt5

<400> 138

tttcaggccc agccagcact ctgg

24

<210> 139

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PDCD1-tgt6

<400> 139

tttgtggggc agggaagctg aggc

24

<210> 140

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PDCD1-tgt7

<400> 140

tttacacatg cccaggcagc acct

24

<210> 141

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> PDCD1-tgt8
 <400> 141
 tttcctgccc tgcccaccac agcc 24
 <210> 142
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> PDCD1-tgt9
 <400> 142
 tttcagggaa ggtcagaaga gctc 24
 <210> 143

 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> PDCD1-tgt10
 <400> 143
 tttcgggatg ccaactgccag gggc 24
 <210> 144
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> PDCD1-tgt11
 <400> 144
 tttcctcagg agaagcaggc aggg 24
 <210> 145
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> PDCD1-tgt12
 <400> 145
 tttcctagcg gaatgggcac ctca 24

<210> 146

<211>

> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PDCD1-tgt13

<400> 146

tttccagtgg cgagagaaga cccc 24

<210> 147

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PDCD1-tgt14

<400> 147

tttctcctca aagaaggagg accc 24

<210> 148

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PDCD1-tgt15

<400> 148

tttctctgca gggacaatag gagc 24

<210> 149

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PDCD1-tgt16

<400> 149

tttggaactg gccggctggc ctgg 24

<210> 150

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> PDCD1-tgt17

<400> 150
 tttgtgccct tccagagaga aggg 24
 <210> 151
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> PDCD1-tgt18
 <400> 151
 tttagatctgc gccttggggg ccag 24
 <210> 152
 <211> 24
 <212>
 > DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> PDCD1-tgt19
 <400> 152
 tttagcacga agctctccga tgtg 24
 <210> 153
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> PDCD1-tgt20
 <400> 153
 tttecccttc gctcacctcc gcct 24
 <210> 154
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> PDCD1-tgt21
 <400> 154
 cttactgcct cagcttcctt gcc 24
 <210> 155
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <220><223> PDCD1-tgt22
 <400> 155
 cttagcatgc ttcataattt aatt 24
 <210> 156
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CISH-tgt1
 <400> 156
 tttaccctag gtgagcaccc cctt 24
 <210> 157
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CISH-tgt2
 <400> 157
 tttgttcctt gacaccaaac agta 24
 <210> 158
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CISH-tgt3
 <400> 158
 tttagactgc tgcgctccaa agcg 24
 <210> 159
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CISH-tgt4
 <400> 159
 tttggagcgc agcagtctaa aact 24
 <210> 160
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CISH-tgt5
 <400> 160
 tttgtacgca gaagcagtcg ccgc 24
 <210> 161
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223>
 > CISH-tgt6
 <400> 161
 tttaggtgta cagcagtggc tggc 24
 <210> 162
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CISH-tgt7
 <400> 162
 tttccgcatg tggtcagcct tgtg 24
 <210> 163
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CISH-tgt8
 <400> 163
 tttcactgac agcgtgaaca ggta 24
 <210> 164
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CISH-tgt9
 <400> 164
 tttggctcac tctctgtctg ggct 24

<210> 165
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CISH-tgt10
 <400> 165
 ttgctggct gtggagcgga ctgg 24
 <210> 166
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt1
 <400> 166
 ttctgcat tcattgagtt tgcc 24
 <210> 167
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt2
 <400> 167

 ttctctctc gaccaccagg gttt 24
 <210> 168
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt3
 <400> 168
 ttctgggat ttctctctcg acca 24
 <210> 169
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt4
 <400> 169

tttgggtatt attgatgcta ttca 24

<210> 170

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> CBLB-tgt5

<400> 170

tttgggattt tggcacagtc ttac 24

<210> 171

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> CBLB-tgt6

<400> 171

tttgcctgat acatatcagc attt 24

<210> 172

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> CBLB-tgt7

<400> 172

tttaaagtac tcattctcac tgag 24

<210> 173

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> CBLB-tgt8

<400> 173

tttgactttt tcataaggct atca 24

<210> 174

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> CBLB-tgt9
 <400> 174
 tttaaagagt cttattgccc gttt 24
 <210> 175
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt10
 <400> 175
 tttcttagct gtgacacatc cagg 24
 <210> 176
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt11
 <400> 176
 tttctgtagt cgtgctttaa cttc 24
 <210> 177
 <211> 24

 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt12
 <400> 177
 tttggtgcta tatttctgta gtcg 24
 <210> 178
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt13
 <400> 178
 tttcacaata taattcatat tggt 24
 <210> 179
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt14
 <400> 179
 tttgtcattc tctgcacaaa tctt 24
 <210> 180
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt15
 <400> 180
 tttcagctct gtaagatttg tgca 24
 <210> 181
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt16
 <400> 181
 tttgtgcaga gaatgacaaa gatg 24
 <210> 182
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt17
 <400> 182
 tttgatgtgc acctcttgcc ttac 24
 <210> 183
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt17
 <400> 183
 tttgatgtgc acctcttgcc ttac 24
 <210> 184

<211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt17
 <400> 184
 ttgatgtgc acctcttgcc ttac 24
 <210> 185
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt20
 <400> 185
 tttctgtcgt tgtgaaataa aagg 24
 <210> 186
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><
 223> CBLB-tgt21
 <400> 186
 tttcaggtgg cggtggagga ggat 24
 <210> 187
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt22
 <400> 187
 tttccacatg atggatgtgt ctac 24
 <210> 188
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220><223> CBLB-tgt23
 <400> 188
 ttgggacta atcagcttgt ggga 24

<210> 189

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> CBLB-tgt24

<400> 189

tttgaactcg ctgtgattcc aggt

24

<210> 190

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> crRNA

<220><221> modified_base

<222> (1)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 190

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 191

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d1

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (2)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 191

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 192

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d2

<220><221> modified_base

<222> (1)..(1)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (2)..(2)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (3)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 192

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 193

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d3

<220><221> modified_base

<222> (1)..(2)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (3)..(3)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (4)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 193

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 194

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d4

<220><221> modified_base

<222> (1)..(3)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (4)..(4)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (5)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 194

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 195

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d5

<220><221> modified_base

<222> (1)..(4)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (5)..(5)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (6)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 195

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 196

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d6

<220><221> modified_base

<222> (1)..(5)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (6)..(6)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (7)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 196

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 197

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d7

<220><221> modified_base

<222> (1)..(6)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (7)..(7)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (8)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 197

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 198

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d8

<220><221> modified_base

<222> (1)..(7)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (8)..(8)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (9)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 198

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 199

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d9

<220><221> modified_base

<222> (1)..(8)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (9)..(9)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (10)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 199

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 200

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d10

<220><221> modified_base

<222> (1)..(9)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (10)..(10)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (11)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 200

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 201

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d11

<220><221> modified_base

<222> (1)..(10)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (11)..(11)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (12)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 201

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 202

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d12

<220><221> modified_base

<222> (1)..(11)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (12)..(12)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (13)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 202

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 203

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d13

<220><221> modified_base

<222> (1)..(12)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (13)..(13)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (14)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 203

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 204

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d14

<220><221> modified_base

<222> (1)..(13)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (14)..(14)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (15)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 204

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 205

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d15

<220><221> modified_base

<222> (1)..(14)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (15)..(15)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (16)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 205

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 206

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d16

<220><221> modified_base

<222> (1)..(15)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (16)..(16)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (17)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 206

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 207

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d17

<220><221> modified_base

<222> (1)..(16)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (17)..(17)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (18)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 207

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 208

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d18

<220><221> modified_base

<222> (1)..(17)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (18)..(18)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (19)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 208

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 209

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d19

<220><221> modified_base

<222> (1)..(18)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (19)..(19)

<223> a, c, g, or t

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> a, c, g, or u

<400> 209

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 210

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> d20

<220><221> modified_base

<222> (1)..(19)

<223> a, c, g, or u

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> a, c, g, or t

<400> 210

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn

20

<210> 211

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> BM.t12_cr

<400> 211

agugggggug aaucagugu

20

<210> 212

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d1

<400> 212

agugggggug aaucagugu

20

<210> 213
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> BM.t12_d2
 <400> 213
 agugggggug aaucagugu 20
 <210> 214
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> BM.t12_d3
 <400> 214
 agtgggggug aaucagugu 20
 <210> 215
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> BM.t12_d4
 <400> 215
 agugggggug aaucagugu 20

<210> 216
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> BM.t12_d5
 <400> 216
 agugggggug aaucagugu 20
 <210> 217
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> BM.t12_d6
 <400> 217
 agugggggug aaucagugu 20
 <210> 218
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> BM.t12_d7
 <400> 218
 agugggggug aaucagugu 20

<210> 219

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d8

<400> 219

agugggggug aaucagugu

20

<210> 220

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d9

<400> 220

agugggggtg aaucagugu

20

<210> 221

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d10

<400> 221

agugggggug aaucagugu

20

<210> 222

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d11

<400> 222

agugggggug aaucagugu 20

<210> 223

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d12

<400> 223

agugggggug aaucagugu 20

<210> 224

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d13

<400> 224

agugggggug aatucagugu 20

<210> 225

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d14

<400> 225

agugggggug aautcagugu 20

<210> 226

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d15

<400> 226

agugggggug aaucagugu 20

<210> 227

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d16

<400> 227

agugggggug aaucagugu 20

<210> 228
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> BM.t12_d17
 <400> 228
 agugggggug aaucagugu 20
 <210> 229
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> BM.t12_d18
 <400> 229
 agugggggug aaucagtgu 20
 <210> 230
 <211> 20
 <212>
 DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> BM.t12_d19
 <400> 230
 agugggggug aaucagugu 20

<210> 231

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d20

<400> 231

agugggggug aaucagugt

20

<210> 232

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_cr

<400> 232

gagucucuca gcugguacac

20

<210> 233

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d1

<400> 233

gagucucuca gcugguacac

20

<210> 234

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d2

<400> 234

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 235

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d3

<400> 235

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 236

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d4

<400> 236

gagtcucuca gcugguacac 20

<210> 237

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d5

<400> 237

gagucucuca gcugguacac

20

<210> 238

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d6

<400> 238

gaguctcuca gcugguacac

20

<210> 239

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d7

<400> 239

gagucucuca gcugguacac

20

<210> 240

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d8

<400> 240

gagucuctca gcugguacac 20

<210> 241

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d9

<400> 241

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 242

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d10

<400> 242

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 243

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d11

<400> 243

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 244

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d12

<400> 244

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 245

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d13

<400> 245

gagucucuca gctgguacac 20

<210> 246

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d14

<400> 246

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 247

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d15

<400> 247

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 248

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d16

<400> 248

gagucucuca gcuggtacac 20

<210> 249

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d17

<400> 249

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 250

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d18

<400> 250

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 251

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d19

<400> 251

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 252

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d20

<400> 252

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 253

<211> 20

<212>

RNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> DMT.t3_cr

<400> 253

cugauggucc augucuguua 20

<210> 254

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d1

<400> 254

cugauggucc augucuguua 20

<210> 255

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d2

<400> 255

ctgauggucc augucuguua

20

<210> 256

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d3

<400> 256

cugauggucc augucuguua

20

<210> 257

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d4

<400> 257

cugauggucc augucuguua

20

<210> 258

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d5

<400> 258

cugatggucc augucuguua

20

<210> 259

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d6

<400> 259

cugauggucc augucuguua

20

<210> 260

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d7

<400> 260

cugauggucc augucuguua

20

<210> 261

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d8

<400> 261

cugauggtcc augucuguua

20

<210> 262

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d9

<400> 262

cugauggucc augucuguua

20

<210> 263

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d10

<400> 263

cugauggucc augucuguua

20

<210> 264

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d11

<400> 264

cugauggucc augucuguua

20

<210> 265

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d12

<400> 265

cugauggucc atgucuguua

20

<210> 266

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d13

<400> 266

cugauggucc augucuguua

20

<210> 267

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d14

<400> 267

cugauggucc augtcuguua

20

<210> 268

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d15

<400> 268

cugauggucc augucuguua

20

<210> 269

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d16

<400> 269

cugauggucc auguctguua

20

<210> 270

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d17

<400> 270

cugauggucc augucuguua

20

<210> 271

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d18

<400> 271

cugauggucc augucugtua

20

<210> 272

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d19

<400> 272

cugauggucc augucuguta

20

<210> 273

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d20

<400> 273

cugauggucc augucuguua

20

<210> 274

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> BM_tgt1_act.3'_crRNA

<400> 274

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 275

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.1

<400> 275

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 276

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.2

<400> 276

atauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 277

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.3

<400> 277

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 278

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.4

<400> 278

auataagugg aggcgucgcg

20

<210> 279

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.5

<400> 279

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 280

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.6

<400> 280

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 281

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.7

<400> 281

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 282

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.8

<400> 282

auauaagtgg aggcgucgcg

20

<210> 283

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.9

<400> 283

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 284

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.10

<400> 284

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 285

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.11

<400> 285

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 286

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.12

<400> 286

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 287

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.13

<400> 287

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 288

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.14

<400> 288

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 289

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.15

<400> 289

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 290

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.16

<400> 290

auauaagugg aggcgtcgcg

20

<210> 291

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.17

<400> 291

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 292

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.18

<400> 292

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 293

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.19

<400> 293

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 294

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_act.3'_d.20

<400> 294

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 295

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_act.3'_crRNA

<400> 295

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 296

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.1

<400> 296

tcuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 297

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.2

<400> 297

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 298

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.3

<400> 298

uctggaggcu cucaaggacu

20

<210> 299

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.4

<400> 299

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 300

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.5

<400> 300

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 301

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.6

<400> 301

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 302

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.7

<400> 302

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 303

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.8

<400> 303

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 304

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.9

<400> 304

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 305

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.10

<400> 305

ucuggaggct cucaaggacu

20

<210> 306

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.11

<400> 306

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 307

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.12

<400> 307

ucuggaggcu ctcaaggacu

20

<210> 308

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.13

<400> 308

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 309

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.14

<400> 309

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 310

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.15

<400> 310

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 311

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.16

<400> 311

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 312

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.17

<400> 312

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 313

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.18

<400> 313

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 314

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.19

<400> 314

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 315

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.20

<400> 315

ucuggaggcu cucaaggact

20

<210> 316

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_cr

<400> 316

gagucucuca gcugguacac

20

<210> 317

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d20.19

<400> 317

gagucucuca gcugguacac

20

<210> 318

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d20.17

<400> 318

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 319

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d19.15

<400> 319

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 320

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d11.10

<400> 320

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 321

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d20.11.1

<400> 321

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 322

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d17.11

<400> 322

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 323

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d2.1

<400> 323

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 324

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d15.10.11

<400> 324

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 325

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d20.17.10.1

<400> 325

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 326

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d18.15.2

<400> 326

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 327

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d19.15.11.10.3

<400> 327

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 328

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d20.17.15.10.1

<400> 328

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 329

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR.t12_d_7

<400> 329

gagucucuca gcugguacac 20

<210> 330

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> BM_tgt1_act.3'_crRNA

<400> 330

auaauagugg aggcgucgcg 20

<210> 331

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d20.17

<400> 331

agugggggug aaucagugt

20

<210> 332

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d15.11

<400> 332

agugggggug aaucagugu

20

<210> 333

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d15.14

<400> 333

agugggggug aautcagugu

20

<210> 334

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d11.10

<400> 334

agugggggug aaucagugu 20

<210> 335

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d20.11.1

<400> 335

agugggggug aaucagugt 20

<210> 336

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d17.11

<400> 336

agugggggug aaucagugu 20

<210> 337

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d2.1

<400> 337

agugggggug aaucagugu 20

<210> 338

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d20.17.15.2

<400> 338

agugggggug aaucagugt 20

<210> 339

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d15.14.11.10

<400> 339

agugggggug aautcagugu 20

<210> 340

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d_6a

<400> 340

agugggggug aaucagugt 20

<210> 341

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d_8

<400> 341

agtgggggtg aautcagugu 20

<210> 342

<211> 20

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d_6b

<400> 342

agugggggug aatucagugu 20

<210> 343

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d16.9.1-3

<400> 343

agtgggggtg aaucagugu 20

<210> 344

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.t12_d_10

<400> 344

agugggggug aattcagtgt 20

<210> 345

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> BM_tgt1_cr-3'

<400> 345

auauaagugg aggcgucgcg 20

<210> 346

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_cr-3'_d.20.11.1

<400>

> 346

auauaagugg aggcgucgcg 20

<210> 347

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_cr-3'_d.19.14.8

<400> 347

auauaagtgg aggcgucgcg 20

<210> 348

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_cr-3'_d.19.17.14.8

<400> 348

auauaagtgg aggcgucgcg 20

<210> 349

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_cr-3'_d.12.11.8

<400> 349

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 350

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_cr-3'_d.18.16.10

<400> 350

auauaagugg aggcgtcgcg

20

<210> 351

<211> 20

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_cr-3'_d.19.17.15.1

<400> 351

auauaagugg aggcgucgcg

20

<210> 352

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM_tgt1_cr-3'_d.19-16

<400> 352

auauaagugg aggcgtcgcg

20

<210> 353

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> BM.in_t12_cr-3'

<400> 353

ucuggaggcu cucaaggacu

20

<210> 354

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.01.11.20

<400> 354

tcuggaggcu cucaaggact

20

<210> 355

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.11.17.20

<400> 355

ucuggaggcu cucaaggact 20

<210> 356

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.08.09.10.11

<400> 356

ucuggaggct cucaaggacu 20

<210> 357

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.01.08.10.17

<400> 357

tcuggaggct cucaaggacu 20

<210> 358

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.17.19.20

<400> 358

ucuggaggcu cucaaggact 20

<210> 359

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d.08.09.19.20

<400> 359

ucuggaggcu cucaaggact 20

<210> 360

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> BM.in_t12_cr-3'_d01.10.11.17.19.20

<400> 360

tcuggaggct cucaaggact 20

<210> 361

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> DNMT_crRNA

<400> 361

cugauggucc augucuguua 20

<210> 362

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d1.20

<400> 362

cugauggucc augucuguua 20

<210> 363

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d14.20

<400> 363

cugauggucc augtcuguua 20

<210> 364

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d8.19

<400> 364

cugauggtcc augucuguta 20

<210> 365

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d8.14

<400> 365

cugauggtcc augtcuguua 20

<210> 366

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d1.8.20

<400> 366

cugauggtcc augucuguua 20

<210> 367

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d8-10

<400> 367

cugauggtcc augucuguua 20

<210> 368

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d8.9.15

<400> 368

cugauggtcc augucuguua 20

<210> 369

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_d1.8.19

<400> 369

cugauggtcc augucuguta 20

<210> 370

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> RPL32_on

<400> 370

tttgggtga tcagaccaa cagc 24

<210> 371

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<

<220><223> RPL_32-off.1

<400> 371

tttggggtga tcagacccaa cacc 24

<210> 372

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> RPL_32-off.2

<400> 372

tttggggtga tcagacccaa cacc 24

<210> 373

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> DNMT1_on

<400> 373

tttcctgatg gtccatgtct gtta 24

<210> 374

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> DNMT1_off-1

<400> 374

tttcctgatg gtccatgtct gaat 24

<210> 375

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> RP_cr

<400> 375

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 376

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220>

><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_2_d.1

<400> 376

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 377

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_2_d.8

<400> 377

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 378

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide
 <220><223> RP_cr_2_d.9
 <400> 378
 gggugaucag acccaacagc 20
 <210> 379
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> RP_cr_2_d.10
 <400> 379
 gggugaucag acccaacagc 20
 <210> 380
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> RP_cr_2_d.11
 <400> 380
 gggugaucag acccaacagc 20
 <210> 381
 <211> 20
 <
 212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_2_d.12

<400> 381

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 382

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_2_d.14

<400> 382

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 383

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_2_d.15

<400> 383

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 384

<211> 20

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_2_d.16

<400> 384

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 385

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_2_d.17

<400> 385

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 386

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_2_d.18

<400> 386

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 387

<211> 20

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_2_d.19

<400> 387

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 388

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_2_d.20

<400> 388

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 389

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d.13

<400> 389

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 390

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d11.12

<400> 390

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 391

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d12.14

<400> 391

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 392

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d14.15

<400> 392

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 393

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d11.15

<400> 393

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 394

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d11.12.14

<400> 394

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 395

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d12.14.15

<400> 395

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 396

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d11.14.15

<400> 396

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 397

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d11.12.14.15

<400> 397

gggugaucag acccaacagc 20

<210> 398

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_sp.20

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> an abasic site that lacks 2' - hydroxyl

<400> 398

gggugaucag acccaacagn t 21

<210> 399

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d14_sp20

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> an abasic site that lacks 2' - hydroxyl

<400> 399

gggugaucag acccaacagn t

21

<210> 400

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d15_sp20

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> an abasic site that lacks 2' - hydroxyl

<400> 400

gggugaucag acccaacagn t

21

<210> 401

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d12_sp20

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> an abasic site that lacks 2' - hydroxyl

<400> 401

gggugaucag acccaacagn t 21

<210> 402

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d11_sp20

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> an abasic site that lacks 2' - hydroxyl

<400> 402

gggugaucag acccaacagn t 21

<210> 403

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> RP_cr_3'_d14.15_sp20

<220><221> modified_base

<222> (20)..(20)

<223> an abasic site that lacks 2' - hydroxyl

<400> 403

gggugaucag acccaacagn t 21

<210> 404

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> DNMT1-crRNA

<400> 404

cugauggucc augucuguua 20

<210> 405

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DNMT1-d1.20

<400> 405

cugauggucc augucuguua 20

<210> 406

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DNMT1-d8.19

<400> 406

cugauggtcc augucuguta 20

<210> 407

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DNMT1-d9

<400> 407

cugauggucc augucuguua

20

<210> 408

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DNMT1-d8.14

<400> 408

cugauggtcc augtcuguua

20

<210> 409

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DNMT1-d10.17

<400> 409

cugauggucc augucuguua

20

<210> 410

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DNMT1-d1.8.20

<400> 410

cugauggtcc augucuguua 20

<210> 411

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DNMT1-d1.8.19

<400> 411

cugauggtcc augucuguta 20

<210> 412

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DNMT1-d8.9.15

<400> 412

cugauggtcc augucuguua 20

<210> 413

<211> 3147

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

polynucleotide

<220><223> anti-BCMA CAR construct

<400> 413

cataaacctc ccattctgct aatgcccagc ctaagttggg gagaccactc cagattccaa	60
gatgtacagt ttgctttgct gggccttttt cccatgcctg cctttactct gccagagtta	120
tattgctggg gttttgaaga agatcctatt aaataaaaga ataagcagta ttattaagta	180
gccctgcatt tcaggtttcc ttgagtggca ggccaggcct ggccgtgaac gttcactgaa	240
atcatggcct cttggccaag attgatatgt tgtgcctgtc cctgagtcct agtccatcac	300
gagcagctgg tttctaagat gctattttcc gtataaagca tgagaccgtg acttgccagc	360
cccacagagc cccgcccttg tccatcactg gcactctggac tccagcctgg gttggggcaa	420
agagggaaat gagatcatgt cctaaccctg atcctcttgt cccacagata tccagaacct	480
tgacctgcc gtgtaccagc ttaattaatt agtccataga gcccacgca tccccagcat	540
gcctgctatt gtcttccaa tctctcccct tgcctgctg cccacacca cccccagaa	600
tagaatgaca cctactcaga caatgcgatg caatttcctc atttatttag gaaaggacag	660
tgggagtggc accttccagg gtcaaggaag gcacggggga ggggcaaaca acagatggct	720
ggcaactaga aggcacagtt attacctcgg tggcagggcc tgcatatgga gggcatcgta	780
tgtatctttc gtggccgtac tcaggccttg gtatagaccg tcgtggcctt tccctctgcg	840
tctctctccc ttcattccga tctcgtgtga agcctccgcc atcttatctt tctgcagttc	900
attataaagc cctctctgcg ggttttttct cctcggtttt cctcccatct ctgggtccct	960
ccctcggcgc ttatccaata catcatattc ctctcgctc cccagggtta gtcattgta	1020
aagttggttt tgcccttgct gataggccgg agcgtcagca gaccggctaa atttactct	1080
cagttcgcaa ccacctcct cttcttcggg gaatcggcag ctacatccat cctcctcttg	1140
cgtagtttgg accgggcgca taaatggttg cttaaaaata tacagcaact tttttcttcc	1200
tcttttcgag taaagagtaa taacgaggga cagcagcaag accccgcacg ttccggcaag	1260
cgggtgccag atgtagatgt cgcaagcaaa gtccagcccg cgagtatgaa ccgcgcctcc	1320
cgctgcgggg cgacaagcct ccggccgaag agagagtggc tgggaagcga tagtgggtgc	1380
aggcgtgggt ggccgagggg caggcgtggt tgtggcagcg gctttaattt ccactttggt	1440
gccgccgcca aaggtcggcg gaaagctatg gccgttcttg caataataca ccgcaaaatc	1500

ttccggttcc aggtctgctaa tggtcagggt aaaatcgggtg ccgctgccgc tgccgctaaa 1560

gcgcgccgga atgccggtaa tgctctggct cgcataataa atcagcaggc gcggcgccctg 1620

gcccggtttc tgctgatacc aatgcagata atcgctaatag ctctggctcg cgcggcagct 1680

cagggtcgcg cgttcgcccc ggctcaggct cagggtcgcc gggctctggg tcagcacaat 1740

ttcgctgccg ccgccgccgc tgccgccgcc gccgctgccg ccgccgccgc tgctcacggt 1800

caccagggtg ccttggcccc acacatcaaa atagccatca tagttatagc gcgcgcaata 1860

atacaccgcg gtatcttcgc tgcgcaggct gctcagttcc atatacgcg tgctgggtgct 1920

tttatccgcg gtaatgttca cgcggccttt aaatttttcg ttatatattg tgcctatgctt 1980

atacgaata atatagccca tccattccag gccctggccc ggccgctggc gcaccaatg 2040

catcacatag ctggtaaagg tatagccgct cgctttgcag ctactttca cgctgctgcc 2100

cggttttttc acttccgcgc cgctctgcac cagctgcacc tgcggtcttg ccgctggag 2160

caggagtgcc aatggaagca gaagtgcggt cacgggcaac gccatggtgg ctatgacgcg 2220

tcgcgccgag tgaggggttg tgggctcttt tattgagctc ggggagcaga agcgcgcgaa 2280

cagaagcgag aagcgaactg attggttagt tcaaataagg cacagggtca tttcaggtec 2340

ttggggcacc ctggaacat ctgatgggtc tctagaaact gctgagggcg ggaccgcatc 2400

tggggaccat ctgttcttgg ccttgagccg gggcaggaac tgcttaccac agatatcctg 2460

tttggcccat attctgctgt tccaactgtt ctgggccctg agccggggca ggaactgctt 2520

accacagata tctgttttgg cccatattct gctgtctctc tgttcctaac ctgtatccta 2580

gcttgccaaa cctacagggtg gggcttttca ttccccctt tttctggaga ctaaataaag 2640

tttaaaactga gagactctaa atccagtac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 2700

tctcaacaa atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg 2760

ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtg tggcctggag caacaaatct 2820

gactttgcat gtgcaaagc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc 2880

agcccaggta agggcagctt tgggtgccttc gcaggctgtt tccttgcttc aggaatggcc 2940

aggttctgcc cagagctctg gtcaatgatg tctaaaactc ctctgattgg tgggtctcgcc 3000

cttatccatt gccacaaaa ccctcttttt actaagaaac agtgagcctt gttctggcag 3060

tccagagaat gacacgggaa aaaagcagat gaagagaagg tggcaggaga gggcacgtgg 3120

cccagcctca gtctctccaa ctgagtt 3147

<210> 414

<211> 3409

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> B2M-HLA-e construct

<400> 414

tgagtgtga gagggcatca gaagtccttg agagcctcca gagaaaggct cttaaaaatg	60
cagcgcaatc tccagtgaac gaagatactg ctagaatct gctagaaaaa aaacaaaaaa	120
ggcatgtata gaggaattat gagggaaaga taccaagtca cgttttattc ttcaaaatgg	180
aggtggccttg ttgggaaggt ggaagctcat ttggccagag tggaaatgga attgggagaa	240
atcgatgacc aaatgtaaac acttggtgcc tgatatagct tgacaccaag ttagccccaa	300
gtgaaatacc ctggcaatat taatgtgtct tttcccgata ttctcaggt actccaaaga	360
ttcaggttta ctcacgtcat ccagcagaga atggaaagtc aaatttcctg aattgctatg	420
tgtctgggtt tcatccatcc gacattgaag ttgacttact gaagaatgga gagagaattg	480
aaaaagtgga gcattcagac ttgtctttca gcaaggactg gtctttctat ctcttgctact	540
acactgaatt tttaattaat tagtccatag agcccaccgc atccccagca tgcctgctat	600
tgtcttccca atcctcccc ttgtgtcctt gcccacccc acccccaga atagaatgac	660
acctactcag acaatgcgat gcaatttctt catTTTTATTA ggaaaggaca gtgggagtgg	720
caccttcag ggtcaaggaa ggcacggggg aggggcaaac aacagatggc tggcaactag	780
aaggcacagt tattacaagc tgtgagactc agaccctgg gcactgtcgc tccactcagc	840
cttagagtag ctccctctt ttccacctga gctcttctt ctccatatca cagcagcaac	900
cacagctcca gagaccagac atccaaggag aaccaggcca gcaatgatgc ccacgatggg	960
gatggtgggc tgggaagccg gcttccatct cagggtgacg ggctcgggta gcccctcatg	1020
ctgcacatgg cactgtatc tctgtctct tccagaaggc accaccacag ctgccactt	1080
ctggaagggt ccatccctg caggcctggt ctccacgagc tccgtgtcct gggtatggc	1140
ctccccatcc tgetgccagg tcaagtgtgat ctccgaggg tagaagcca gggcccagca	1200
cctcagggtg gcctcatggt cagagatggg gtggtgagtc acgtgtgtct ttgggggctc	1260
caggtgaagc agcgtctct tcccttctc caggtatttg tggagccact ccacgatgt	1320
gtcttcagg taggctctt ggtgtctcgc ctcaagca tcatttgact ttgtctcgga	1380
gatctgagcc gccgtgtcca ccgcggtcca ggagcgagg tcctcattca ggtgagata	1440
atccttgccg tcgtaggcga actgttcata ccgcggagg aagcgcccgt cgggccccag	1500
ctcgagcca tgcattcact gcagggtgtg agaccggcc tcgtctgtat tgtagtagcc	1560

gcgcagcgtc cgcagattca ctcggaataat ctgtgcggtg tccctggcgc tccgtgtctc 1620
ccggtcccaa tactctgacc cctcctgtct catccacggc gcccgcggca ccatcctcgg 1680
actcgcggcg tcgttgtcga agcgcacgaa ctgggtgtcg tccacgtagc ccacagagat 1740
gaagcggggc tccccgcggc cgggcccggga cacggaagtg tggaaatact tcaaggagtg 1800
ggatccagac cctccgccac cagatccccc tctccagaa ccgcctccgc cagaccctcc 1860
gccacccatg tctcgatccc atttcacgat cttgggctgt gacaaagtca catggttcac 1920

acggcaggca tactcatctt tctccgtagg tgtaaactct gtatagtaca agagatagaa 1980
agaccagtcc ttgctgaaag acaagtctga atgtccact ttttcaattc tctctccatt 2040
cttcagtaag tcaacttcaa tgtcggatgg atgaaacca gacacatagc aattcaggaa 2100
atttgacttt ccatctcttg ctggatgacg tgagtaaacc tgaatctttg gagtacgtcg 2160
gatggagccg ccgcctccgc taccgcctcc tccgtccca cctccacca gaaagagggt 2220
ccgtggtgcc attacagcct ccaggccaga aagagagagt agcgcgagca cagctaaggc 2280
cacggagcga gacatggtgg ctctagagta ggcccggtc acagcttggg tctgtaacgg 2340

cgcagaacag aaaacgaaac aaagacgtag agttgagcaa gcagggtcag gcaaagcgtg 2400
gagagccggc tgagtctagg taggtccaa gggagcggc gacaaaggcc cggctctgac 2460
ctgagcttta aacttaccta gacggcggac gcagttcagg aggcaccaca ggcgggaggc 2520
ggcagaacgc gactcaaccg gcgtggatgg cggcctcagg tagggcggcg ggcgcgtgaa 2580
ggagagatgc gagccccctg aagcttcagc tgtgttctgg cggcaaacc gttgcgaaaa 2640
agaacgttca cggcgactac tgcattata tacggttctc cccaccctc gggaaaaagg 2700
cggagccagt acacgacatc actttcccag ttaccgccg gccaccttct ctaggcaccc 2760

gttcaattgc cgaccctcc cccaacttc tcggggactg tgggcgatgt gcgctctgcc 2820
cactgacggg caccggagcg atcgagatc cttgtcgacc accccactg aaaaagatga 2880
glatgcctgc cgtgtgaacc atgtgacttt gtcacagccc aagatagtta agtggggtaa 2940
gtcttacatt cttttgtaag ctgctgaaag ttgtgtatga gtagtcatat cataaagctg 3000
ctttgatata aaaaaggctc atggccatac taccctgaat gagtccatc ccatctgata 3060
taaacaatct gcatattggg attgtcaggg aatgttctta aagatcagat tagtggcacc 3120
tgctgagata ctgatgcaca gcatggtttc tgaaccagta gtttcctgc agttgagcag 3180

ggagcagcag cagcacttgc acaatacat atacactctt aacacttctt acctactggc 3240
ttcctctage ttttgtgca gcttcaggta tatttagcac tgaacgaaca tctcaagaag 3300
gtataggcct ttgtttgtaa gtctgtgtgt cctagcatcc tataatcctg gacttctcca 3360
gtactttctg gctggattgg tatctgaggc tagtaggaag ggcttggtc 3409

<210> 415

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TRAC_cr3'_tgt.12-d20.11.1

<400> 415

taauuucuac ucutguagau gagucucuca gcugguacac 40

<210> 416

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> B2M_cr3'_tgt.12-d20.11.1

<400> 416

taauuucuac ucutguagau agugggggug aaucagugt 40

<210> 417

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> crRNA

<400> 417

uaauuucuac ucuuguagau 20

<210> 418

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d1

<

<400> 418

taauuucuac ucuuguagau

20

<210> 419

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d2

<400> 419

uaauuucuac ucuuguagau

20

<210> 420

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d3

<400> 420

uaauuucuac ucuuguagau

20

<210> 421

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d4

<400> 421

uaatuucua ucuuguagau 20

<210> 422

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d5

<400> 422

uaautucua ucuuguagau 20

<210> 423

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d6

<400> 423

uaauutcuac ucuuguagau 20

<210> 424

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d7

<400> 424

uaauuucua ucuuguagau 20

<210> 425

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d8

<400> 425

uaauuuctac ucuuguagau 20

<210> 426

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d9

<400> 426

uaauuucua ucuuguagau 20

<210> 427

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d10

<400> 427

uaauuucuac ucuuguagau 20

<210> 428

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d11

<400> 428

uaauuucuac tcuuguagau 20

<210> 429

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d12

<400> 429

uaauuucuac ucuuguagau 20

<210> 430

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d13

<400> 430

uaauuucua uctuguagau

20

<210> 431

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d14

<400> 431

uaauuucua ucutguagau

20

<210> 432

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d15

<400> 432

uaauuucua ucuuguagau

20

<210> 433

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d16

<400> 433

uaauuucuac ucuugtagau 20

<210> 434

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d17

<400> 434

uaauuucuac ucuuguagau 20

<210> 435

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d18

<400> 435

uaauuucuac ucuuguagau 20

<210> 436

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d19

<400> 436

uaauuucuac ucuuguagau 20

<210> 437

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISPR-d20

<400> 437

uaauuucuac ucuuguagat 20

<210> 438

<211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> DMT.t3_crRNA

<400> 438

uaauuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua 40

<210> 439

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d1

<400> 439

taauuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 440

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d2

<400> 440

uaauuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 441

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d3

<400> 441

uaauuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 442

<211> 40

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d4

<400> 442

uaatuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 443

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d5

<400> 443

uaautucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 444

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d6

<400> 444

uaauutcuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 445

<211> 40

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d7

<400> 445

uaauuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 446

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d8

<400> 446

uaauuuctac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 447

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d9

<400> 447

uaauuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 448

<211> 40

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d10

<400> 448

uaauuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 449

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d11

<400> 449

uaauuucuac tcuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 450

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d12

<400> 450

uaauuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 451

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d13

<400> 451

uaauuucuac uctuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 452

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d14

<400> 452

uaauuucuac ucutguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 453

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d15

<400> 453

uaauuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 454

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d16

<400> 454

uaauuucuac ucuugtagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 455

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d17

<400> 455

uaauuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 456

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d18

<400> 456

uaauuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua

40

<210> 457

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d19

<400> 457

uaauuucuac ucuuguagau cugauggucc augucuguua 40

<210> 458

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> DMT.t3_cr-d20

<400> 458

uaauuucuac ucuuguagat cugauggucc augucuguua 40

<210> 459

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISRP-3'

<400> 459

taauuucuac ucutguagau 20

<210> 460

<211> 20

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISRP-2

<400> 460

taauuucuac ucuugtagau

20

<210> 461

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISRP-6

<400> 461

taauuucuac uctugtagau

20

<210> 462

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CRISRP-401

<400> 462

uaauuucuac ucutguagau

20

<210> 463

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISRP-402

<400> 463

taauuucuac ucutgtagau

20

<210> 464

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISRP-403

<400> 464

uaauuucuac ucutguagau

20

<210> 465

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CRISRP-404

<400> 465

taauuucuac ucutguagau

20

<210> 466

<211> 40

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR_cr_tgt.12-d20.11.1

<400> 466

uaauuucuac ucuuguagau gagucucuca gcugguacac

40

<210> 467

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR_cr3'_tgt.12-d20.11.1

<400> 467

taauuucuac ucutguagau gagucucuca gcugguacac

40

<210> 468

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TR_cr-2_tgt.12-d20.11.1

<400> 468

taauuucuac ucuugtagau gagucucuca gcugguacac

40

<210>

> 469

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR_cr-6_tgt.12-d20.11.1

<400> 469

taauuucuac uctugtagau gagucucuca gcugguacac 40

<210> 470

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223>

Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR_cr-401_tgt.12-d20.11.1

<400> 470

uaauuucuac ucutguagau gagucucuca gcugguacac 40

<210> 471

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR_cr-403_tgt.12-d20.11.1

<400> 471

taauuucuac ucutgtagau gagucucuca gcugguacac 40

<210> 472

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR_cr-404_tgt.12-d20.11.1

<400> 472

uaauuucua ucutguagau gagucucuca gcugguacac 40

<210> 473

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220>

><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TR_cr-405_tgt.12-d20.11.1

<400> 473

taauuucua ucutguagau gagucucuca gcugguacac 40

<210> 474

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> BCMA scFv chain 1

<400> 474

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Ala Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Tyr Asn Tyr Asp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser

115

<210> 475

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> BCMA scFv chain 2

<400> 475

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

1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asp Tyr
20 25 30

Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn Gly His Ser Phe Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 476

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> BCMA scFv linker

<400> 476

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 477

<211> 240

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> BCMA scFv

<400> 477

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Ile Ile Pro Tyr Asn Asp Ala Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Tyr Asn Tyr Asp Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

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

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

225 230 235 240

<210> 478

<211> 63

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><223> CD8-alpha signal sequence

<400> 478

atggcggttgcccggtgaccgcactttctgcttccattggcac tctgtctcca cgcggcaaga 60

ccg 63

<210> 479

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> GS_SV40-NLS

<400> 479

Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 480

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> GS_SV40-NLS_GS_SV40-NLS

<400> 480

Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg

1 5 10 15

Lys Val

<210> 481

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> GS_NPL-NLS

<400> 481

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

1 5 10 15

Lys Lys

<210> 482

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> GS_NPL-NLS_GS_NPL-NLS

<400> 482

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

1 5 10 15
Lys Lys Gly Ser Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala

20 25 30
Lys Lys Lys Lys

35

<210> 483

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> GS_SV40-NLS_GS_NPL-NLS

<400> 483

Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Gly Ser Lys Arg Pro Ala Ala

1 5 10 15

Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys

20 25

<210> 484

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> GS_NPL-NLS_GS_SV40-NLS

<400> 484

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

1 5 10 15

Lys Lys Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

20 25

<210> 485

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220><223> (GGGGS)2_SV40-NLS_GS_NPL-NLS

<400> 485

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys

1 5 10 15

Val Gly Ser Lys Arg Pro Ala Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys

20 25 30

Lys Lys Lys

35

<210> 486

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

polypeptide

<220>

><223> (GGGGS)2_NPL-NLS_GS_SV40-NLS

<400> 486

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Arg Pro Ala Ala Thr

1 5 10 15

Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Gly Ser Pro Lys Lys Lys

20 25 30

Arg Lys Val

35

<210> 487

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> (GGGGS)2_SV40-NLS

<400> 487

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys

1 5 10 15

Val

<210> 488

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> (GGGGS)2_SV40-NLS_GS_SV40-NLS

<400> 488

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys

1 5 10 15

Val Gly Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

20

25

<210> 489

<211> 26

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> (GGGGS)2_NPL-NLS

<400> 489

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Arg Pro Ala Ala Thr

1 5 10 15

Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys

20

25

<210> 490

<211> 44

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<220><223> (GGGGS)₂NPL-NLS_GS_NPL-NLS

<400> 490

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Lys Arg Pro Ala Ala Thr

1 5 10 15

Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys Gly Ser Lys Arg Pro Ala

20 25 30

Ala Thr Lys Lys Ala Gly Gln Ala Lys Lys Lys Lys

35 40

<210> 491

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> TRAC-tgt25

<400> 491

cagauacgaa ccuaaacuuu 20

<210> 492

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> TRAC-tgt28

<400> 492

aggaggagga uucggaaccc 20

<210> 493

<211> 21

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> 53BP1

<400> 493

Gly Lys Arg Lys Leu Ile Thr Ser Glu Glu Glu Arg Ser Pro Ala Lys

1 5 10 15

Arg Gly Arg Lys Ser

20

<210> 494

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> VACM-1/CUL5

<400> 494

Pro Lys Leu Lys Arg Gln

1 5

<210> 495

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> CXCR4

<400> 495

Arg Pro Arg Lys

1

<210> 496

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> VP1

<400> 496

Arg Arg Ala Arg Arg Pro Arg Gly

1 5

<210> 497

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> ING4

<400> 497

Lys Gly Lys Lys Gly Arg Thr Gln Lys Glu Lys Lys Ala Ala Arg Ala

1 5 10 15

Arg Ser Lys Gly Lys Asn

20

<210> 498

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> IER5

<400> 498

Arg Lys Arg Cys Ala Ala Gly Val Gly Gly Gly Pro Ala Gly Cys Pro

1 5 10 15

Ala Pro Gly Ser Thr Pro Leu Lys Lys Pro Arg Arg

20

25

<210> 499

<211> 36

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> ERK5

<400> 499

Arg Lys Pro Val Thr Ala Gln Glu Arg Gln Arg Glu Arg Glu Glu Lys

1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Gln Glu Arg Ala Lys Glu Arg Glu Lys Arg Arg Gln

20 25 30

Glu Arg Glu Arg

35

<210> 500

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> UL79

<400> 500

Thr Leu Leu Leu Arg Glu Thr Met Asn Asn Leu Gly Val Ser Asp His

1 5 10 15

Ala Val Leu Ser Arg Lys Thr Pro Gln Pro Tyr

20 25

<210> 501

<211>

> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> EWS

<400> 501

Pro Gly Lys Met Asp Lys Gly Glu His Arg Gln Glu Arg Arg Asp Arg

1 5 10 15

Pro Tyr

<210> 502

<211> 27

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> Hrp1

<400> 502

Arg Ser Gly Gly Asn His Arg Arg Asn Gly Arg Gly Gly Arg Gly Gly

1 5 10 15

Tyr Asn Arg Arg Asn Asn Gly Tyr His Pro Tyr

20 25

<210> 503

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> cMyc (1)

<400> 503

Pro Ala Ala Lys Arg Cys Lys Leu Asp

1 5

<210> 504

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> cMyc (2)

<400> 504

Arg Gln Arg Arg Asn Glu Leu Lys Arg Ser Pro

1 5 10

<210> 505

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> mouse c-able IV

<400> 505

Ser Ala Leu Ile Lys Lys Lys Lys Lys Asn Ala Pro

1 5 10

<210> 506

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> Matalpha2

<400> 506

Lys Ile Pro Ile Lys

1 5

<210> 507

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

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

peptide

<220><223> MINIO

<400> 507

Lys Ser Gly Ser Arg Lys

1 5

<210> 508

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TRAC-tgt25 chRDNA

<400> 508

taauuucuac ucutguagau cagauacgaa ccuaaacuut

40

<210> 509

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CISH-tgt3 chRDNA

<400> 509

taauuucuac ucutguagau gguguacagc aguggcuggu

40

<210> 510

<211>

> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CBLB-tgt3 chRDNA

<400> 510

taauuucuac ucutguagau ccugauacau aucagcauuu

40

<210> 511

<211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> TRAC-tgt12 crRNA

<400> 511

uaauuucuac ucuuguagau gagucucuca gcugguacac

40

<210> 512

<211> 40

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> TRAC-tgt12 ps-r1.2_s19.20

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(40)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 512

uaauuucuac ucuuguagau gagucucuca gcugguacac

40

<210> 513

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

oligonucleotide

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> TRAC-tgt12 ps-r2_r-d1

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(40)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 513

taauuucua ucuuguagau gagucucu gcugguacac

40

<210> 514

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TRAC-tgt12 ps-r1.2_r-d7

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (7)..(8)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(40)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 514

uaauuucua ucuuguagau gagucucu gcugguacac

40

<210> 515

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TRAC-tgt12 ps-r1.2_r-d10

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (10)..(11)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221
 > misc_feature
 <222> (38)..(40)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <400> 515
 uaaauuacuac ucuuguagau gagucucuca gcugguacac 40
 <210> 516
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
 oligonucleotide
 <220><223> TRAC-tgt12 ps-r1.2_r-d12
 <220><221> misc_feature
 <222> (1)..(3)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><
 221> misc_feature
 <222> (12)..(13)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <220><221> misc_feature
 <222> (38)..(40)
 <223> Phosphorothioate linkage
 <400> 516
 uaaauuacuac ucuuguagau gagucucuca gcugguacac 40
 <210> 517
 <211> 40
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> TRAC-tgt12 ps-r1.2_r-d14

<

220><221> misc_feature

<222> (1)..(3)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (14)..(15)

<223> Phosphorothioate linkage

<220><221> misc_feature

<222> (38)..(40)

<223> Phosphorothioate linkage

<400> 517

uaauuucua ucutguagau gagucucu gcugguacac

40

<210> 518

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CSH-tgt3_3'_d1

<400> 518

taauuucua ucutguagau gguguacagc aguggcuggu

40

<210> 519

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CSH-tgt3_3'_d8

<400> 519

taauuucuac ucutguagau gguguacagc aguggcuggu

40

<210> 520

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CSH-tgt3_3'_d9

<400> 520

taauuucuac ucutguagau gguguacagc aguggcuggu

40

<210> 521

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic

oligonucleotide

<220><223> CSH-tgt3_3'_d10

<400> 521

taauuucuac ucutguagau gguguacagc aguggcuggu

40

<210> 522

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CSH-tgt3_3'_d11

<400> 522

taauuucuac ucutguagau gguguacagc aguggcuggu 40

<210> 523

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CSH-tgt3_3'_d12

<400> 523

taauuucuac ucutguagau gguguacagc aguggcuggu 40

<210> 524

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CSH-tgt3_3'_d14

<400> 524

taauuucuac ucutguagau gguguacagc aguggcuggu 40

<210> 525

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CSH-tgt3_3'_d15

<400> 525

taauuucuac ucutguagau gguguacagc aguggcuggu 40

<210> 526

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CSH-tgt3_3'_d17

<400> 526

taauuucuac ucutguagau gguguacagc aguggctggu 40

<210> 527

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CSH-tgt3_3'_d18

<400> 527

taauuucuac ucutguagau gguguacagc aguggcuggu 40

<210> 528

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CSH-tgt3_3'_d19

<400> 528

taauuucuac ucutguagau gguguacagc aguggcuggu 40

<210> 529

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

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

<220><223> Description of Combined DNA/RNA Molecule: Synthetic
oligonucleotide

<220><223> CSH-tgt3_3'_d20

<400> 529

taauuucuac ucutguagau gguguacagc aguggcuggt 40