



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0016475  
(43) 공개일자 2022년02월09일

- |  |   |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C12N 5/0783 (2010.01) A61K 39/00 (2006.01)<br/>A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)<br/>C07K 14/71 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)<br/>C07K 16/28 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>C12N 5/0636 (2013.01)<br/>A61K 39/001102 (2021.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2021-7039324<br/>(22) 출원일자(국제) 2020년04월30일<br/>심사청구일자 없음<br/>(85) 번역문제출일자 2021년11월30일<br/>(86) 국제출원번호 PCT/US2020/030815<br/>(87) 국제공개번호 WO 2020/223535<br/>국제공개일자 2020년11월05일<br/>(30) 우선권주장<br/>62/841,575 2019년05월01일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>주노 세리퓨티크스 인코퍼레이티드<br/>미국 워싱턴 98109 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400<br/>에디타스 메디신, 인코퍼레이티드<br/>미국, 매사추세츠 02141, 캠프리지, 헐리 스트리트 11</p> <p>(72) 발명자<br/>별레이, 스테펜 마이클<br/>미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400<br/>클레이랏, 세드릭<br/>미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>특허법인이름리온</p> |
|--|---|

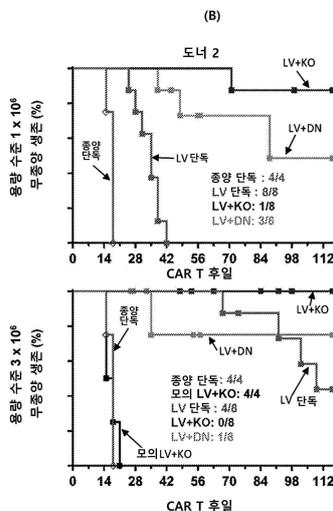
전체 청구항 수 : 총 99 항

(54) 발명의 명칭 변형된 TGFBR2 유전자 좌에서 재조합 수용체를 발현하는 세포, 관련 폴리뉴클레오티드 및 방법

(57) 요약

재조합 수용체를 발현하는 조작된 면역 세포, 예를 들어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 변형된 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형-2(TGFBR2) 유전자 좌를 함유하는 T 세포가 여기에 제공된다. 일부 측면에서, 세포가, TGFBR2 게놈의 유전자 좌에서 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열의 표적화된 통합에 의해 조작된다. 예컨대 TGFBR2 게놈의 유전자 좌 영역 내로 통합하기 위해 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 표적화함으로써 조작된 면역 세포를 함유하는 세포 조성물, 세포를 조작하기 위한 핵산 및 조작된 세포를 생성하기 위한 방법, 키트 및 제조 물품이 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포, 예를 들어 T 세포가 조작된 세포의 입양 전달을 포함한 암 면역 요법과 관련된 것을 포함하는 세포 요법과 관련하여 사용될 수 있다.

대표도 - 도2b



(52) CPC특허분류

*A61P 35/00* (2018.01)  
*C07K 14/7051* (2013.01)  
*C07K 14/70521* (2013.01)  
*C07K 14/70578* (2013.01)  
*C07K 14/71* (2013.01)  
*C07K 16/2803* (2013.01)  
*C07K 2317/622* (2013.01)  
*C07K 2319/03* (2013.01)  
*C12N 2510/00* (2013.01)

(72) 발명자

**친, 멜리사**

미국, 매사추세츠 02141, 케임브리지 헐리 스트리트 11

**할빈스키, 프레드**

미국, 매사추세츠 02141, 케임브리지 헐리 스트리트 11

**나이, 크리스토퍼 히스**

미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400

**새더, 블라이드 디.**

미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400

**봉, 쿼니**

미국, 워싱턴 98109, 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400

**웰스테드, 지. 그랜트**

미국, 매사추세츠 02141, 케임브리지 헐리 스트리트 11

**윌슨, 크리스토퍼**

미국, 매사추세츠 02141, 케임브리지 헐리 스트리트 11

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

유전자 조작된 T 세포(genetically engineered T cell)로서,

변형된 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형-2(transforming growth factor-beta receptor type-2, *TGFBR2*) 유전자 좌(locus)를 포함하되,

상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자(transgene) 서열을 포함하는 것인,

유전자 조작된 T 세포.

#### 청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 전이 유전자 서열이, 선택적으로 상동성 지시 수선(homology directed repair, HDR)을 통해 T 세포의 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에 통합된 것인,

유전자 조작된 T 세포.

#### 청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는:

기능성 *TGFBR2* 폴리펩티드를 암호화하지 않고/거나;

*TGFBR2* 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 *TGFBR2* 폴리펩티드의 발현이 제거되고/거나;

전장 *TGFBR2* 폴리펩티드를 암호화하지 않고/거나;

우성 음성(dominant negative) *TGFBR2* 폴리펩티드를 암호화하며,

선택적으로 여기서 상기 우성 음성 *TGFBR2* 폴리펩티드는, 서열 번호: 59의 22-191 잔기 또는 서열 번호: 60의 22-216 잔기에 대응하는 아미노산 서열, 또는 서열 번호: 59의 22-191 잔기 또는 서열 번호: 60의 22-216 잔기 또는 이의 단편에 대응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 것인,

유전자 조작된 T 세포.

#### 청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 전이 유전자 서열은 내인성 *TGFBR2*의 개방형 관독 프레임(open reading frame) 또는 이의 부분 서열의 하나 이상의 엑손과 인-프레임(in-frame)인 것인,

유전자 조작된 T 세포.

**청구항 5**

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 전이 유전자 서열은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 1의 하류 및 엑손 6의 상류에 존재하는 것인,

유전자 조작된 T 세포.

**청구항 6**

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 전이 유전자 서열은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 4의 하류 및 엑손 6의 상류에 존재하는 것인,

유전자 조작된 T 세포.

**청구항 7**

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(recombinant T cell receptor, TCR)이거나 이를 포함하고, 상기 전이 유전자 서열은 TCR 알파(TCR $\alpha$ ) 사슬, TCR 베타(TCR $\beta$ ) 사슬 또는 둘 다를 암호화하는 것인,

유전자 조작된 T 세포.

**청구항 8**

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)이고,

여기서 상기 CAR은 결합 도메인을 포함하는 세포 외 영역, 막관통 도메인 및 세포 내 영역을 포함하는 것인,

유전자 조작된 T 세포.

**청구항 9**

제 8 항에 있어서,

상기 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이거나 이를 포함하는 것인,

유전자 조작된 T 세포.

**청구항 10**

제 8 항 또는 제 9 항에 있어서,

상기 결합 도메인은 질병, 장애 또는 병태의 세포 또는 조직과 연관된, 이에 특이적인 또는 이의 상에 발현된 표적 항원에 결합할 수 있고,

선택적으로 여기서 상기 표적 항원은 종양 항원인 것인,

유전자 조작된 T 세포.

**청구항 11**

제 10 항에 있어서,

상기 표적 항원은,  $\alpha\beta6$  인테그린( $\alpha\beta6$  integrin), B세포 성숙 항원(B cell maturation antigen, BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 탈수 효소 9(CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로 공지), 암 고환 항원, 암/고환 항원 1B(CTAG, 또한 NY-ESO-1 및 LAGE-2로 공지), 암배아 항원(carcinoembryonic antigen, CEA), 사이클린(cyclin), 사이클린 A2, C-C 모티프 케모카인 리간드 1(CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸 4(chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4), 표피 성장 인자 단백질(epidermal growth factor protein, EGFR), 유형 III 표피 성장 인자 수용체 돌연변이(EGFR vIII), 표피 당단백질 2(epithelial glycoprotein 2, EPG-2), 표피 당단백질 40(EPG-40), 에프린B2(efrinB2), 에프린 수용체 A2(EpHa2), 에스트로겐 수용체, Fc 수용체 유사 5(FCRL5; 또한 Fc 수용체 상동물 5 또는 FCRH5로 공지), 태아 아세틸콜린 수용체(태아 AchR), 엽산 결합 단백질(folate binding protein, FBP), 엽산 수용체 알파, 강글리오사이드 GD2, O-아세틸화 GD2(OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백질 100(glycoprotein 100, gp100), 글리피칸-3(glypican-3, GPC3), G 단백질 결합 수용체 C 클래스 5 그룹 D 멤버(G protein-coupled receptor class C group 5 member D, GPRC5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나제 erb-B2), Her3(erb-B3), Her4(erb-B4), erbB 2량체, 인간 고분자량 흑색종 관련 항원(Human high molecular weight-melanoma-associated antigen, HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1(Human leukocyte antigen A1, HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22R  $\alpha$ ), IL-13 수용체 알파 2(IL-13R  $\alpha$ 2), 키나제 삽입 도메인 수용체(kinase insert domain receptor, kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자(L1 cell adhesion molecule, L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 8 패밀리 멤버 A를 함유하는 루신 리치 반복(Leucine Rich Repeat Containing 8 Family Member A, LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종 관련 항원(Melanoma-associated antigen, MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, 메소텔린(mesothelin, MSLN), c-Met, 무린 시토메갈로 바이러스(cytomegalovirus, CMV), 뮤신 1(MUC1), MUC16, 천연 킬러 그룹 2 멤버 D(natural killer group 2 member D, NKG2D) 리간드, 멜란 A(MART-1), 신경 세포 부착 분자(neural cell adhesion molecule, NCAM), 종양태아성 항원, 흑색종 우선 발현 항원(Preferentially expressed antigen of melanoma, PRAME), 프로게스트론 수용체, 전립선 특이적 항원, 전립선 줄기 세포 항원(prostate stem cell antigen, PSCA), 전립선 특이적 막 항원(prostate specific membrane antigen, PSMA), 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(Receptor Tyrosine Kinase Like Orphan Receptor 1, ROR1), 서바이빈(survivin), 영양막 당단백질(TPBG, 또한 5T4로 공지), 종양 관련 당단백질 72(tumor-associated glycoprotein 72, TAG72), 티로시나제 관련 단백질 1(TRP1, 또한 TYRP1 또는 gp75로 공지), 티로시나제 관련 단백질 2(TRP2, 또한 도파크롬 타우토머라제, 도파크롬 델타 이성화 효소 또는 DCT로 공지), 혈관 내피 성장 인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 빌름스 종양 1(Wilms Tumor 1, WT-1), 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원 또는 범용 태그 관련 항원 및/또는 비오틴화 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체 발현 분자 중에서 선택되는 것인,

유전자 조작된 T 세포.

**청구항 12**

제 8 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포 외 영역은 스페이서를 포함하고,

선택적으로 여기서 상기 스페이서는 상기 결합 도메인과 상기 막관통 도메인 사이에서 작동 가능하게 연결되는 것인,

유전자 조작된 T 세포.

**청구항 13**

제 12 항에 있어서,

상기 스페이서는 면역 글로불린 힌지 영역 및/또는 C<sub>H</sub>2 영역 및 C<sub>H</sub>3 영역을 포함하는 것인,  
유전자 조작된 T 세포.

**청구항 14**

제 8 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 세포 내 영역은 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하는 것인,  
유전자 조작된 T 세포.

**청구항 15**

제 14 항에 있어서,  
상기 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3 사슬, 선택적으로 CD3-제타(CD3 $\zeta$ ) 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분이거나 이를 포함하는 것인,  
유전자 조작된 T 세포.

**청구항 16**

제 8 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 세포 내 영역은 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들)을 포함하는 것인,  
유전자 조작된 T 세포.

**청구항 17**

제 16 항에 있어서,  
상기 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인은 CD28, 4-1BB 또는 ICOS의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분을 포함하는 것인,  
유전자 조작된 T 세포.

**청구항 18**

제 1 항 내지 제 17 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 전이 유전자 서열은, 결합 도메인, 선택적으로 단일 사슬 Fv 단편(single chain Fv fragment, scFv); 스페이서, 선택적으로 인간 면역 글로불린 힌지, 선택적으로 IgG1, IgG2 또는 IgG4 또는 이의 변형된 버전 유래 서열을 포함하고, 선택적으로 C<sub>H</sub>2 영역 및/또는 C<sub>H</sub>3 영역을 더 포함함; 및 막관통 도메인, 선택적으로 인간 CD28 유래; 공자극 신호 전달 도메인, 선택적으로 인간 4-1BB 유래; 및 세포 내 신호 전달 영역, 선택적으로 CD3 $\zeta$  사슬 또는 이의 일부;를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 순서로 포함하고/거나;  
상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 결합 도메인, 선택적으로 scFv; 스페이서, 선택적으로 인간 면역 글로불린 힌지, 선택적으로 IgG1, IgG2 또는 IgG4 또는 이의 변형된 버전 유래 서열을 포함하고, 선택적으로 C<sub>H</sub>2 영역 및/또는 C<sub>H</sub>3 영역을 더 포함함; 및 막관통 도메인, 선택적으로 인간 CD28 유래; 공자극 신호 전달 도메인, 선택적으로 인간 4-1BB 유래; 및 세포 내 신호 전달 영역, 선택적으로 CD3 $\zeta$  사슬 또는 이의 일부;를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 순서로 포함하는;

것인, 유전자 조작된 T 세포.

#### 청구항 19

제 1 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 전이 유전자 서열은 하나 이상의 추가 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인,  
유전자 조작된 T 세포.

#### 청구항 20

제 19 항에 있어서,  
상기 하나 이상의 추가 단백질은 대리 마커이고,  
선택적으로 여기서 상기 대리 마커는 절단된 수용체이며,  
선택적으로 여기서 상기 절단된 수용체는 세포 내 신호 전달 도메인이 결여되고/거나 이의 리간드가 결합될 경우 세포 내 신호 전달을 매개할 수 없는 것인,  
유전자 조작된 T 세포.

#### 청구항 21

제 1 항 내지 제 20 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 전이 유전자 서열은 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)(multicistronic element(s))를 포함하는 것인,  
유전자 조작된 T 세포.

#### 청구항 22

제 21 항에 있어서,  
상기 전이 유전자 서열은 상기 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)가 상기 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 상류에 위치하고/거나; 상기 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 상기 하나 이상의 추가 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치하고/거나;  
상기 재조합 수용체는 TCR이고, 상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)가 TCR $\alpha$ 를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 TCR $\beta$ 를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치하고/거나;  
상기 재조합 수용체는 다중 사슬 CAR인 CAR이고, 상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)가 상기 다중 사슬 CAR의 하나의 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 상기 다중 사슬 CAR의 또 다른 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치하는;  
것인, 유전자 조작된 T 세포.

#### 청구항 23

제 21 항 또는 제 22 항에 있어서,  
상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소는 리보솜 건너뛰기 서열(ribosome skip sequence)이거나 이를 포함하고,  
선택적으로 여기서 상기 리보솜 건너뛰기 서열은 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 요소인 것인,

유전자 조작된 T 세포.

#### 청구항 24

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가 상기 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 상기 전이 유전자 서열의 발현을 제어하도록 작동 가능하게 연결된 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 프로모터 및/또는 조절 또는 제어 요소를 포함하거나; 또는

상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가 상기 재조합 수용체 또는 이의 일부의 발현을 제어하도록 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 이중 조절 또는 제어 요소(들)를 포함하는;

것인, 유전자 조작된 T 세포.

#### 청구항 25

제 1 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 T 세포는 대상체에서 유래된 1차 T 세포이고,

선택적으로 여기서 상기 대상체는 인간인 것인,

유전자 조작된 T 세포.

#### 청구항 26

제 1 항 내지 제 25 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 T 세포는 CD8+ T 세포 또는 이의 하위 유형 또는 CD4+ T 세포 또는 이의 하위 유형인 것인,

유전자 조작된 T 세포.

#### 청구항 27

폴리뉴클레오티드로서,

(a) 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열; 및

(b) 상기 핵산 서열에 연결된 하나 이상의 상동성 암(들);

을 포함하고,

여기서 상기 하나 이상의 상동성 암(들)은 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형-2(*TGFBR2*) 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 영역(들)에 대해 상동성 서열을 포함하는 것인,

폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 28

제 27 항에 있어서,

(a)의 상기 핵산 서열은 T 세포, 선택적으로 인간 T 세포의 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임에 대해 외인성 또는 이중성인 서열인 것인,

폴리뉴클레오티드.

### 청구항 29

제 27 항 또는 제 28 항에 있어서,

상기 하나 이상의 상동성 암(들)은 T 세포, 선택적으로 인간 T 세포의 상기 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 인트론 또는 하나 이상의 엑손을 포함하는 것인,

폴리뉴클레오티드.

### 청구항 30

제 27 항 내지 제 29 항 중 어느 한 항에 있어서,

(a)의 상기 핵산 서열은 상기 하나 이상의 상동성 암(들)에 포함된 상기 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 엑손과 인-프레임인 것인,

폴리뉴클레오티드.

### 청구항 31

제 27 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 영역(들)은 상기 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 1의 하류에 있는 서열이거나 이를 포함하는 것인,

폴리뉴클레오티드.

### 청구항 32

제 27 항 내지 제 31 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 영역(들)은 상기 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 4의 적어도 일부 또는 엑손 4의 하류를 포함하는 서열이거나 이를 포함하는 것인,

폴리뉴클레오티드.

### 청구항 33

제 27 항 내지 제 32 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 상동성 암은 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암을 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 [5' 상동성 암]-[(a)의 상기 핵산 서열]-[3' 상동성 암]의 구조를 포함하는 것인,

폴리뉴클레오티드.

### 청구항 34

제 33 항에 있어서,

상기 5' 상동성 암 및 상기 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 200, 300, 400, 500, 600, 700 또는 800 개의 뉴클레오티드 길이이거나 임의의 전술된 수치 사이의 임의의 수치이거나, 또는 (약) 300 개의 뉴클레오티드 길이를 초과하고, 선택적으로 (약) 400, 500 또는 600 개의 뉴클레오티드 길이이거나 임의의 전술된 수치 사이의 임

의의 수치인 것인,  
폴리뉴클레오티드.

### 청구항 35

제 33 항 또는 제 34 항에 있어서,

상기 5' 상동성 압은, 서열 번호: 69-71에 제시된 서열 또는 서열 번호: 69-71 또는 이의 부분 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함하고/거나,

상기 3' 상동성 압은, 서열 번호: 72에 제시된 서열 또는 서열 번호: 72 또는 이의 부분 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함하는 것인,

폴리뉴클레오티드.

### 청구항 36

제 27 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암호화된 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(TCR)이거나 이를 포함하고, (a)의 상기 핵산 서열은 TCR 알파(TCR  $\alpha$ ) 사슬, TCR 베타(TCR  $\beta$ ) 사슬 또는 둘 다를 암호화하는 것인,

폴리뉴클레오티드.

### 청구항 37

제 27 항 내지 제 35 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암호화된 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이고,

여기서 상기 CAR은 결합 도메인을 포함하는 세포 외 영역, 막관통 도메인 및 세포 내 영역을 포함하는 것인,

폴리뉴클레오티드.

### 청구항 38

제 37 항에 있어서,

상기 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이거나 이를 포함하는 것인,

폴리뉴클레오티드.

### 청구항 39

제 37 항 또는 제 38 항에 있어서,

상기 결합 도메인은 질병, 장애 또는 병태의 세포 또는 조직과 연관된, 이에 특이적인 또는 이의 상에 발현된 표적 항원에 결합할 수 있고,

선택적으로 여기서 상기 표적 항원은 종양 항원인 것인,

폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 40

제 39 항에 있어서,

상기 표적 항원은,  $\alpha v\beta 6$  인테그린( $\alpha v\beta 6$  integrin), B세포 성숙 항원(BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 탈수 효소 9(CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로 공지), 암 고환 항원, 암/고환 항원 1B(CTAG, 또한 NY-ESO-1 및 LAGE-2로 공지), 암배아 항원(CEA), 사이클린(cyclin), 사이클린 A2, C-C 모티프 케모카인 리간드 1(CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸 4(CSPG4), 표피 성장 인자 단백질(EGFR), 유형 III 표피 성장 인자 수용체 돌연변이(EGFR vIII), 표피 당단백질 2(EPG-2), 표피 당단백질 40(EPG-40), 에프린B2(efrinB2), 에프린 수용체 A2(EPhA2), 에스트로겐 수용체, Fc 수용체 유사 5(FCRL5; 또한 FC 수용체 상동물 5 또는 FCRH5로 공지), 태아 아세틸콜린 수용체(태아 AchR), 엽산 결합 단백질(FBP), 엽산 수용체 알파, 강글리오사이드 GD2, O-아세틸화 GD2(OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백질 100(gp100), 글리피칸-3(GPC3), G 단백질 결합 수용체 C 클래스 5 그룹 D 멤버(GPRC5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나제 erb-B2), Her3(erb-B3), Her4(erb-B4), erbB 2량체, 인간 고분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1(HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22R $\alpha$ ), IL-13 수용체 알파 2(IL-13R $\alpha$ 2), 키나제 삽입 도메인 수용체(kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자(L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 8 패밀리 멤버 A를 함유하는 루신 리치 반복(LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종 관련 항원(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, 메소텔린(MSLN), c-Met, 뮤린 시토메갈로 바이러스(CMV), 뮤신 1(MUC1), MUC16, 천연 킬러 그룹 2 멤버 D(NKG2D) 리간드, 멜란 A(MART-1), 신경 세포 부착 분자(NCAM), 종양태아성 항원, 흑색종 우선 발현 항원(PRAME), 프로게스트론 수용체, 전립선 특이적 항원, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1), 서바이빈(survivin), 영양막 당단백질(TPBG, 또한 5T4로 공지), 종양 관련 당단백질 72(TAG72), 티로시나제 관련 단백질 1(TRP1, 또한 TYRP1 또는 gp75로 공지), 티로시나제 관련 단백질 2(TRP2, 또한 도파크롬 타우토머라제, 도파크롬 델타 이성화 효소 또는 DCT로 공지), 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 빌름스 종양 1(WT-1), 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원 또는 범용 태그 관련 항원 및/또는 비오틴화 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체 발현 분자 중에서 선택되는 것인, 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 41

제 37 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 세포 외 영역은 스페이서를 포함하고,

선택적으로 여기서 상기 스페이서는 상기 결합 도메인과 상기 막관통 도메인 사이에서 작동 가능하게 연결되는 것인,

폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 42

제 41 항에 있어서,

상기 스페이서는 면역 글로불린 힌지 영역 및/또는 C<sub>H</sub>2 영역 및 C<sub>H</sub>3 영역을 포함하는 것인,

폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 43

제 37 항 내지 제 42 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 세포 내 영역은 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하는 것인,  
폴리뉴클레오티드.

**청구항 44**

제 43 항에 있어서,  
상기 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3 사슬, 선택적으로 CD3-제타(CD3 $\zeta$ ) 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분이거나 이를 포함하는 것인,  
폴리뉴클레오티드.

**청구항 45**

제 37 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 세포 내 영역은 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들)을 포함하는 것인,  
폴리뉴클레오티드.

**청구항 46**

제 45 항에 있어서,  
상기 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인은 CD28, 4-1BB 또는 ICOS의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분을 포함하는 것인,  
폴리뉴클레오티드.

**청구항 47**

제 27 항 내지 제 46 항 중 어느 한 항에 있어서,  
(a)의 상기 핵산 서열은, 결합 도메인, 선택적으로 단일 사슬 Fv 단편(scFv); 스페이서, 선택적으로 인간 면역 글로블린 힌지, 선택적으로 IgG1, IgG2 또는 IgG4 또는 이의 변형된 버전 유래 서열을 포함하고, 선택적으로 C<sub>H</sub>2 영역 및/또는 C<sub>H</sub>3 영역을 더 포함함; 및 막관통 도메인, 선택적으로 인간 CD28 유래; 공자극 신호 전달 도메인, 선택적으로 인간 4-1BB 유래; 및 세포 내 신호 전달 영역, 선택적으로 CD3 $\zeta$  사슬 또는 이의 일부;를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 순서로 포함하는 것인,  
폴리뉴클레오티드.

**청구항 48**

제 27 항 내지 제 47 항 중 어느 한 항에 있어서,  
(a)의 상기 핵산 서열은 하나 이상의 추가 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인,  
폴리뉴클레오티드.

**청구항 49**

제 48 항에 있어서,

상기 하나 이상의 추가 단백질은 대리 마커이고,

선택적으로 여기서 상기 대리 마커는 절단된 수용체이며,

선택적으로 여기서 상기 절단된 수용체는 세포 내 신호 전달 도메인이 결여되고/거나 이의 리간드가 결합할 경우 세포 내 신호 전달을 매개할 수 없는 것인,

폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 50

제 27 항 내지 제 49 항 중 어느 한 항에 있어서,

(a)의 상기 핵산 서열은 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)를 포함하는 것인,

폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 51

제 50 항에 있어서,

(a)의 상기 핵산 서열은 상기 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)가 상기 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 상류에 위치하고/거나; 상기 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 상기 하나 이상의 추가 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치하고/거나;

상기 재조합 수용체는 TCR이고, 상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)가 TCR  $\alpha$  를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 TCR  $\beta$  를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치하고/거나;

상기 재조합 수용체는 다중 사슬 CAR인 CAR이고, 상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)가 상기 다중 사슬 CAR의 하나의 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 상기 다중 사슬 CAR의 또 다른 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치하는;

것인, 폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 52

제 50 항 또는 제 51 항에 있어서,

상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소는 리보솜 건너뛰기 서열이거나 이를 포함하고,

선택적으로 여기서 상기 리보솜 건너뛰기 서열은 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 요소인 것인,

폴리뉴클레오티드.

#### 청구항 53

제 27 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항에 있어서,

(a)의 상기 핵산 서열은 상기 재조합 수용체 또는 이의 일부의 발현을 제어하도록 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 이중 조절 또는 제어 요소(들)를 포함하는 것인,

폴리뉴클레오티드.

**청구항 54**

제 27 항 내지 제 53 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 폴리뉴클레오티드는 바이러스 벡터에 포함되는 것인,  
폴리뉴클레오티드.

**청구항 55**

제 54 항에 있어서,  
상기 바이러스 벡터는 AAV 벡터이고,  
선택적으로 여기서 상기 AAV 벡터는 AAV2 또는 AAV6 벡터인 것인,  
폴리뉴클레오티드.

**청구항 56**

제 54 항에 있어서,  
상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 선택적으로 렌티바이러스 벡터인 것인,  
폴리뉴클레오티드.

**청구항 57**

제 27 항 내지 제 53 항 중 어느 한 항에 있어서,  
선형 폴리뉴클레오티드, 선택적으로 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드인 것인,  
폴리뉴클레오티드.

**청구항 58**

제 27 항 내지 제 57 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 폴리뉴클레오티드는 (약) 2500 내지 (약) 5000 개의 뉴클레오티드, (약) 3500 내지 (약) 4500 개의 뉴클레오티드 또는 (약) 3750 개의 뉴클레오티드 내지 (약) 4250 개의 뉴클레오티드 길이인 것인,  
폴리뉴클레오티드.

**청구항 59**

유전자 조작된 T 세포 생산 방법으로서,  
상기 방법은 제 27 항 내지 제 58 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드를 *TGFBR2* 유전자 좌에서 유전자 파괴를 포함하는 T 세포 내로 도입시키는 단계를 포함하는,  
방법.

**청구항 60**

유전자 조작된 T 세포 생산 방법으로서,

상기 방법은:

(a) T 세포의 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)를 상기 T 세포 내로 도입하는 단계; 및

(b) 상기 *TGFBR2* 유전자 좌에 유전자 파괴를 포함하는 T 세포 내로 제 27 항 내지 제 58 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계;

를 포함하는,

방법.

#### 청구항 61

제 59 항 또는 제 60 항에 있어서,

제조함 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열이 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 상기 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내에 통합되는 것인,

방법.

#### 청구항 62

유전자 조작된 T 세포 생산 방법으로서,

상기 방법은 제조함 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 T 세포 내로 도입하는 단계를 포함하고,

상기 T 세포는 상기 T 세포의 *TGFBR2* 유전자 좌 내에 유전자 파괴를 가지며,

여기서 상기 제조함 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 상기 핵산 서열이 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 상기 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내에 통합되는 것인,

방법.

#### 청구항 63

제 59 항, 제 61 항 및 제 62 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유전자 파괴는, 상기 T 세포의 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)를 T 세포 내로 도입함으로써 수행되는 것인,

방법.

#### 청구항 64

제 59 항 내지 제 63 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법은 상기 T 세포에서 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 생성하고, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 상기 제조함 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 것인,

방법.

#### 청구항 65

제 62 항 내지 제 64 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리뉴클레오티드는 상기 핵산 서열에 연결된 하나 이상의 상동성 암(들)을 더 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 상동성 암(들)은 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형-2(*TGFBR2*) 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 영역(들)에 대한 상동성 서열을 포함하는 것인,

방법.

#### 청구항 66

제 59 항 내지 제 65 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 방법에 의해 생성된 세포에서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가:

상기 방법에 의해 생성된 세포에서 기능성 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화하지 않고/거나;

TGFBRII 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 TGFBRII 폴리펩티드의 발현이 제거되고/거나;

전장 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 우성 음성 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화하는;

것인, 방법.

#### 청구항 67

제 65 항 또는 제 66 항에 있어서,

상기 하나 이상의 상동성 암은 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암을 포함하고, 상기 폴리뉴클레오티드는 [5' 상동성 암]-[재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 상기 핵산 서열]-[3' 상동성 암]의 구조를 포함하는 것인,

방법.

#### 청구항 68

제 59 항 내지 제 67 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암호화된 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(TCR)이거나 이를 포함하는 것인,

방법.

#### 청구항 69

제 59 항 내지 제 67 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 암호화된 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)인 것인,

방법.

#### 청구항 70

제 60 항 및 제 63 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 있어서,

유전자 파괴를 유도할 수 있는 상기 하나 이상의 제제(들)는 상기 표적 부위에 특이적으로 결합 또는 혼성화하는 DNA 결합 단백질 또는 DNA 결합 핵산, DNA 표적화 단백질 및 뉴클레아제를 포함하는 융합 단백질 또는 RNA 가이드 뉴클레아제를 포함하며,

선택적으로 여기서 상기 하나 이상의 제제(들)는 상기 표적 부위에 특이적으로 결합, 인식 또는 혼성화하는 아연 핑거 뉴클레아제(zinc finger nuclease, ZFN), TAL-이펙터 뉴클레아제(TAL-effector nuclease, TALEN) 또는 및 CRISPR-Cas9 조합물을 포함하는 것인,

방법.

#### 청구항 71

제 60 항 및 제 63 항 내지 제 70 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 하나 이상의 제제는 하나 이상의 상기 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(guide RNA, gRNA)를 포함하는 것인,

방법.

#### 청구항 72

제 71 항에 있어서,

상기 하나 이상의 제제(들)가 gRNA 및 Cas9 단백질을 포함하는 리보핵산단백질(ribonucleoprotein, RNP) 복합체로 도입되고,

선택적으로 여기서 상기 RNP가 전기 천공, 입자 총, 인산 칼슘 형질 감염, 세포 압축 또는 압착을 통해, 선택적으로 전기 천공을 통해 도입되는 것인,

방법.

#### 청구항 73

제 72 항에 있어서,

상기 RNP의 농도는 (약) 1 M 내지 (약) 5 M이고,

선택적으로 여기서 상기 RNP의 농도는 (약) 2 M인 것인,

방법.

#### 청구항 74

제 71 항 내지 제 73 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 gRNA는 GUGGAUGACCUGGCUAACAG(서열 번호: 73)의 표적화 도메인 서열을 갖는 것인,

방법.

#### 청구항 75

제 59 항 내지 제 74 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 T 세포는 대상체에서 유래된 1차 T 세포이고,

선택적으로 여기서 상기 대상체는 인간인 것인,

방법.

#### 청구항 76

제 59 항 내지 제 75 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 T 세포는 CD8+ T 세포 또는 이의 하위 유형 또는 CD4+ T 세포 또는 이의 하위 유형인 것인, 방법.

**청구항 77**

제 59 항 내지 제 76 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 폴리뉴클레오티드는 바이러스 벡터에 포함되는 것인,  
방법.

**청구항 78**

제 77 항에 있어서,  
상기 바이러스 벡터는 AAV 벡터이고, 선택적으로 여기서 상기 AAV 벡터는 AAV2 또는 AAV6 벡터인 것인,  
방법.

**청구항 79**

제 59 항 내지 제 78 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 폴리뉴클레오티드는 선형 폴리뉴클레오티드, 선택적으로 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드인 것인,  
방법.

**청구항 80**

제 60 항 및 제 63 항 내지 제 79 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 폴리뉴클레오티드는 상기 하나 이상의 제제(들)의 도입 후에 도입되는 것인,  
방법.

**청구항 81**

제 80 항에 있어서,  
상기 폴리뉴클레오티드는 상기 제제의 도입 후 즉시 또는 약 30 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 6 분, 6 분, 8 분, 9 분, 10 분, 15 분, 20 분, 30 분, 40 분, 50 분, 60 분, 90 분, 2 시간, 3 시간 또는 4 시간 이내에 도입되는 것인,  
방법.

**청구항 82**

제 60 항 및 제 64 항 내지 제 81 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 하나 이상의 제제 도입 전에, 상기 방법은 하나 이상의 면역 세포를 자극 또는 활성화하는 조건 하에서 하나 이상의 자극제(들)와 상기 세포를 시험관 내에서 인큐베이션하는 것을 포함하고,  
선택적으로 여기서 상기 하나 이상의 자극제(들)는 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체, 선택적으로 항-CD3/항-CD28

비드를 포함하며,  
 선택적으로 여기서 상기 비드 대 세포의 비율은 (약) 1:1인 것인,  
 방법.

**청구항 83**

제 60 항 및 제 64 항 내지 제 82 항 중 어느 한 항에 있어서,  
 상기 방법은 상기 하나 이상의 제제의 도입 및/또는 하나 이상의 재조합 사이토카인과 함께 상기 폴리뉴클레오티드의 도입 전, 중 또는 후에 상기 세포를 인큐베이션하는 단계를 더 포함하고,  
 선택적으로 여기서 상기 하나 이상의 재조합 사이토카인은 IL-2, IL-7, 및 IL-15로 구성된 군에서 선택되며,  
 선택적으로 여기서 상기 하나 이상의 재조합 사이토카인은, (약) 10 U/mL 내지 (약) 200 U/mL, 선택적으로 (약) 50 IU/mL 내지 (약) 100 U/mL의 IL-2 농도; 0.5 ng/mL 내지 50 ng/mL, 선택적으로 (약) 5 ng/mL 내지 (약) 10 ng/mL 농도의 IL-7; 및/또는 0.1 ng/mL 내지 20 ng/mL, 선택적으로 (약) 0.5 ng/mL 내지 (약) 5 ng/mL 농도의 IL-15에서 선택된 농도로 첨가되는 것인,  
 방법.

**청구항 84**

제 82 항 또는 제 83 항에 있어서,  
 상기 인큐베이션은, 상기 하나 이상의 제제의 도입 및 상기 폴리뉴클레오티드의 도입 후에 최대 또는 약 24 시간, 36 시간, 48 시간, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21 일, 선택적으로 최대 또는 약 7 일 동안 수행되는 것인,  
 방법.

**청구항 85**

제 59 항 내지 제 84 항 중 어느 한 항에 있어서,  
 상기 방법에 의해 생성된 복수의 조작된 세포 중 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 90% 이상 또는 초과 세포가 상기 *TGFBR2* 유전자 좌위 내 하나 이상의 상기 표적 부위의 유전자 파괴를 포함하고/거나;  
 상기 방법에 의해 생성된 복수의 조작된 세포 중 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 90% 이상 또는 초과 세포가 상기 재조합 수용체를 발현하는;  
 것인, 방법.

**청구항 86**

제 59 항 내지 제 85 항 중 어느 한 항의 방법을 사용하여 생성된, 유전자 조작된 T 세포 또는 복수의 유전자 조작된 T 세포.

**청구항 87**

제 1 항 내지 제 26 항 및 제 86 항 중 어느 한 항의 유전자 조작된 T 세포; 또는 제 1 항 내지 제 26 항 및 제 86 항 중 어느 한 항의 복수의 유전자 조작된 T 세포를 포함하는, 조성물.

**청구항 88**

제 87 항에 있어서,  
상기 조성물이 CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포를 포함하는 것인,  
조성물.

**청구항 89**

제 88 항에 있어서,  
상기 조성물이 CD4+ T 세포 및 CD8+ T 세포를 포함하고, CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율이 (약) 1:3 내지 3:1, 선택적으로 1:1인 것인,  
조성물.

**청구항 90**

제 87 항 내지 제 89 항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 재조합 수용체를 발현하는 세포가, 상기 조성물 내 총 세포 또는 상기 조성물 내 총 CD4+ T 세포 또는 CD8+ T 세포 중 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상을 구성하는 것인,  
조성물.

**청구항 91**

제 1 항 내지 제 26 항 및 제 86 항 내지 제 90 항 중 어느 한 항의 유전자 조작된 T 세포, 복수의 유전자 조작된 T 세포 또는 조성물을 질병 또는 장애를 갖는 대상체에 투여하는 것을 포함하는, 치료 방법.

**청구항 92**

질병 또는 장애의 치료를 위한 제 1 항 내지 제 26 항 및 제 86 항 내지 제 90 항 중 어느 한 항의 유전자 조작된 T 세포, 복수의 유전자 조작된 T 세포 또는 조성물의 용도.

**청구항 93**

질병 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에서 제 1 항 내지 제 26 항 및 제 86 항 내지 제 90 항 중 어느 한 항의 유전자 조작된 T 세포, 복수의 유전자 조작된 T 세포 또는 조성물의 용도.

**청구항 94**

질병 또는 장애의 치료에 사용하기 위한 제 1 항 내지 제 26 항 및 제 86 항 내지 제 90 항 중 어느 한 항의 유전자 조작된 T 세포, 복수의 유전자 조작된 T 세포 또는 조성물.

**청구항 95**

제 91 항 내지 제 94 항 중 어느 한 항에 있어서,  
 상기 질병 또는 장애는 암 또는 종양인 것인,  
 방법, 용도 또는 유전자 조작된 T 세포, 복수의 유전자 조작된 T 세포 또는 조성물.

**청구항 96**

제 95 항에 있어서,  
 상기 암 또는 종양은 혈액암, 선택적으로 림프종, 백혈병 또는 혈장 세포 악성 종양인 것인,  
 방법, 용도 또는 유전자 조작된 T 세포, 복수의 유전자 조작된 T 세포 또는 조성물.

**청구항 97**

제 95 항에 있어서,  
 상기 암 또는 종양은 고형 종양이고,  
 선택적으로 여기서 상기 고형 종양은 비-소세포 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC) 또는 두경부 편평상  
 피 세포 암종(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)인 것인,  
 방법, 용도 또는 유전자 조작된 T 세포, 복수의 유전자 조작된 T 세포 또는 조성물.

**청구항 98**

키트로서,  
*TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들); 및  
 제 27 항 내지 제 58 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드;  
 를 포함하는,  
 키트.

**청구항 99**

키트로서,  
*TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들); 및  
 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 - 여기서 상기 재조합 수  
 용체 또는 이의 일부를 암호화하는 상기 핵산 서열이 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 상기 표적 부위 또는 근처  
 에서 통합을 위해 표적화됨 - ; 및  
 제 59 항 내지 제 85 항 중 어느 한 항의 방법을 수행하기 위한 지침;  
 을 포함하는,  
 키트.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 재조합 수용체를 발현하는 조작된 면역 세포, 예를 들어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 변형된 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형-2(transforming growth factor-beta receptor type-2, *TGFBR2*)

유전자 좌를 함유하는 T 세포에 관한 것이다. 일부 측면에서, 세포가, *TGFBR2* 게놈의 유전자 좌에서 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열의 표적화된 통합에 의해 조작된다. 예컨대 *TGFBR2* 게놈의 유전자 좌 영역 내로 통합하기 위해 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 표적화함으로써 조작된 면역 세포를 함유하는 세포 조성물, 세포를 조작하기 위한 핵산 및 조작된 세포를 생성하기 위한 방법, 키트 및 제조 물품이 또한 개시된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포, 예를 들어 T 세포가 조작된 세포의 입양 전달을 포함한 암 면역 요법과 관련된 것을 포함하는 세포 요법과 관련하여 사용될 수 있다.

**배경 기술**

[0002] 질병과 관련된 항원을 인식하는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)와 같은 재조합 수용체를 이용하는 입양 세포 요법은 암 및 기타 질병의 치료를 위한 매력적인 치료 양식의 전형이다. 예를 들어 암, 감염성 질병 및 자가 면역 질환의 치료에서 예컨대 입양 면역 요법에 사용하기 위한 재조합 수용체를 발현하는 T 세포를 조작하기 위한 개선된 전략이 필요하다. 상기 요구를 충족시키는 방법에 사용하기 위한 방법, 세포, 조성물 및 키트가 제공된다.

**발명의 내용**

[0003] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0004] 본 출원은 2019년 5월 1일 출원된 미국 가출원 제62/841,575호(발명의 명칭 “변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에서 재조합 수용체를 발현하는 세포, 관련 폴리뉴클레오티드 및 방법”)의 우선권을 주장하며, 이의 전문이 참조로 포함된다.

[0005] 서열 목록의 참조 포함

[0006] 본 출원은 전자 형식의 서열 목록과 함께 출원된다. 서열 목록은 2020년 4월 28일에 생성된 735042012840SeqList.txt라는 제목의 파일로 제공되며 이의 크기는 200 킬로바이트이다. 서열 목록의 전자 형식의 정보는 그 전체가 참조로 포함된다.

[0007] 요약

[0008] 유전자 조작된 T 세포 및 유전자 조작된 T 세포와 관련된 조성물, 방법, 용도, 키트 및 제조 물품이 여기에 제공된다. 임의의 제공된 구현예 중 일부에서, 유전자 조작된 T 세포는 변형된 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형-2(*TGFBR2*) 유전자 좌를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함한다.

[0009] 변형된 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형-2(*TGFBR2*) 유전자 좌를 함유하는 유전자 조작된 T 세포가 여기에 제공되고, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 전이 유전자 서열은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌로 통합되었다. 임의의 구현예 중 일부에서, 통합은 상동성 지시 수선(homology directed repair, HDR)에 의한다.

[0010] 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 기능성 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화하지 않는다. 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 TGFBRII 폴리펩티드의 발현이 제거된다. 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 전장 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 부분적인 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 우성 음성 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 암호화된 TGFBRII 폴리펩티드는 서열 번호: 59의 22-191 잔기 또는 서열 번호: 60의 22-216 잔기에 상응하는 아미노산 서열을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 암호화된 TGFBRII 폴리펩티드는 서열 번호: 59의 22-191 잔기 또는 서열 번호: 60의 22-216 잔기 또는 이의 단편에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 전이 유전자 서열은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 또는 이의 부분 서열의 하나 이상의 엑손과 인-프레임(in-frame)이다.

[0011] 임의의 구현예 중 일부에서, 전이 유전자 서열은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 1의 하류 및 엑손 6의 상류에 존재한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 전이 유전자 서열은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 4의 하류 및 엑손 6의 상류에 존재한다.

[0012] 임의의 구현예 중 일부에서, 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(T cell receptor, TCR)이거나 이를 포함한

다. 임의의 구현예 중 일부에서, 재조합 수용체는 재조합 TCR이고, 전이 유전자 서열은 TCR 알파(TCR α) 사슬, TCR 베타(TCR β) 사슬 또는 둘 다를 암호화한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 재조합 수용체는 기능성 비-T 세포 수용체(비-TCR) 항원 수용체이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 재조합 수용체는 기능성 비-T 세포 수용체(비-TCR) 항원 수용체를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 임의의 구현예 중 일부에서, CAR은 세포 외 영역, 막관통 도메인 및 세포 내 영역을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 외 영역은 결합 도메인을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 결합 도메인은 질병, 장애 또는 병태의 세포 또는 조직과 관련되거나, 이에 특이적이거나 또는 이에서 발현되는 표적 항원과 결합할 수 있다.

[0013] 임의의 구현예 중 일부에서, 표적 항원은 종양 항원이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 표적 항원은 αvβ6 인테그린(αvβ6 integrin), B세포 성숙 항원(B cell maturation antigen, BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 탈수 효소 9(CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로 공지), 암 고환 항원, 암/고환 항원 1B(CTAG, 또한 NY-ESO-1 및 LAGE-2로 공지), 암배아 항원(carcinoembryonic antigen, CEA), 사이클린, 사이클린 A2, C-C 모티프 케모카인 리간드 1(CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸 4(chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4), 표피 성장 인자 단백질(epidermal growth factor protein, EGFR), 유형 III 표피 성장 인자 수용체 돌연변이(EGFR vIII), 표피 당단백질 2(EPG-2), 표피 당단백질 40(EPG-40), 에프린B2, 에프린 수용체 A2(EPHA2), 에스트로겐 수용체, Fc 수용체 유사 5(FcRL5; Fc 수용체 상동물 5 또는 FCRH5로도 공지), 태아 아세틸콜린 수용체(태아 AchR), 엽산 결합 단백질(folate binding protein, FBP), 엽산 수용체 알파, 강글리오사이드 GD2, 0-아세틸화 GD2(OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백질 100(gp100), 글리피칸-3(GPC3), G 단백질 결합 수용체 C 클래스 5 그룹 D 멤버(GPRC5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나제 erb-B2), Her3(erb-B3), Her4(erb-B4), erbB 2량체, 인간 고분자량 흑색종 관련 항원(Human high molecular weight-melanoma-associated antigen, HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1(Human leukocyte antigen A1, HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22R α), IL-13 수용체 알파 2(IL-13R α2), 키나제 삽입 도메인 수용체(kinase insert domain receptor, kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자(L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 8 패밀리를 포함하는 루신 리치 반복(Leucine Rich Repeat Containing 8 Family Member A, LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종 관련 항원(Melanoma-associated antigen, MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, 메소텔린(MSLN), c-Met, 뮤린 시톰에갈로 바이러스(cytomegalovirus, CMV), 뮤신 1(MUC1), MUC16, 천연 킬러 2 그룹 D 멤버(natural killer group 2 member D, NKG2D) 리간드, 멜란 A(MART-1), 신경 세포 부착 분자(neural cell adhesion molecule, NCAM), 종양태아성 항원, 흑색종 우선 발현 항원(PRAME), 프로게스트론 수용체, 전립선 특이적 항원, 전립선 줄기 세포 항원(prostate stem cell antigen, PSCA), 전립선 특이적 막 항원(prostate specific membrane antigen, PSMA), 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1), 서바이빈(survivin), 영양막 당단백질(TPBG, 또한 5T4로 공지), 종양 관련 당단백질 72(tumor-associated glycoprotein 72, TAG72), 티로시나제 관련 단백질 1(TRP1, 또한 TYRP1 또는 gp75로 공지), 티로시나제 관련 단백질 2(TRP2, 또한 도파크롬 타우도메라제, 도파크롬 델타 이성화 효소 또는 DCT로 공지), 혈관 내피 성장 인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 윌름스 종양 1(Wilms Tumor 1, WT-1), 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원 또는 범용 태그 관련 항원 및/또는 비오틴화 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체 발현 분자 중에서 선택된다.

[0014] 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 외 영역은 스페이서를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 스페이서는 결합 도메인과 막관통 도메인 사이에서 작동 가능하게 연결된다. 임의의 구현예 중 일부에서, 스페이서는 면역 글로불린 힌지 영역을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 스페이서는 C<sub>H</sub>2 영역 및 C<sub>H</sub>3 영역을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 내 영역은 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3-제타(CD3 ζ) 사슬과 같은 CD3 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3-제타(CD3 ζ) 사슬과 같은 CD3 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 내 영역은 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들)을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인은 CD28, 4-1BB 또는 ICOS의 세포내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 공자극 신호 전달 영역은 4-1BB의 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0015] 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 N 말단에서 C 말단 순서로: 세포 외 결합 도메인, 스페

이서, 막관통 도메인 및 세포 내 신호 전달 영역을 포함하는 재조합 수용체를 암호화한다.

- [0016] 임의의 구현예 중 일부에서, 전이 유전자 서열은 세포 외 결합 도메인; 스페이서; 및 막관통 도메인; 공자극 신호 전달 도메인; 및 세포 내 신호 전달 영역;을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 순서로 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 세포 외 결합 도메인; 스페이서; 및 막관통 도메인; 공자극 신호 전달 도메인; 및 세포 내 신호 전달 영역;을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 순서로 포함한다.
- [0017] 임의의 구현예 중 일부에서, 전이 유전자 서열은, scFv인 세포 외 결합 도메인; IgG1, IgG2 또는 IgG4 또는 이의 변형된 버전인 인간 면역 글로불린 힌지 유래 서열을 포함하고, C<sub>H</sub>2 영역 및/또는 C<sub>H</sub>3 영역을 더 포함하는 스페이서; 및 인간 CD28 유래인 막관통 도메인; 인간 4-1BB 유래인 공자극 신호 전달 도메인; 및 CD3  $\zeta$  사슬 또는 이의 일부인 세포 내 신호 전달 영역;을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 순서로 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, scFv인 세포 외 결합 도메인; IgG1, IgG2 또는 IgG4 또는 이의 변형된 버전인 인간 면역 글로불린 힌지 유래 서열을 포함하고, CH2 영역 및/또는 CH3 영역을 더 포함하는 스페이서; 및 인간 CD28 유래인 막관통 도메인; 인간 4-1BB 유래인 공자극 신호 전달 도메인; 및 CD3  $\zeta$  사슬 또는 이의 일부인 세포 내 신호 전달 영역;을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 순서로 포함한다.
- [0018] 임의의 구현예 중 일부에서, CAR은 다중 사슬 CAR이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 전이 유전자 서열은 하나 이상의 추가 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0019] 임의의 구현예 중 일부에서, 전이 유전자 서열은 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 다중 시스트론 요소는, CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 하나 이상의 추가 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 추가 단백질은 대리 마커이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 대리 마커는 절단형 수용체이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 절단형 수용체는 세포 내 신호 전달 도메인이 결여되어 있고, 리간드 결합 시 세포 내 신호 전달을 매개할 수 없다. 임의의 구현예 중 일부에서, 절단형 수용체는 세포 내 신호 전달 도메인이 결여되어 있거나, 리간드 결합 시 세포 내 신호 전달을 매개할 수 없다.
- [0020] 임의의 구현예 중 일부에서, 재조합 수용체는 재조합 TCR이고, 다중 시스트론 요소는 TCR  $\alpha$ 를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 TCR  $\beta$ 를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다.
- [0021] 임의의 구현예 중 일부에서, 재조합 수용체는 다중 사슬 CAR이고, 다중 시스트론 요소는 다중 사슬 CAR 중 하나의 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 다중 사슬 CAR 중 또 다른 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다.
- [0022] 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)는 재조합 수용체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 상류에 존재한다.
- [0023] 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 다중 시스트론 요소는 리보솜 건너뛰기 서열이거나 이를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 리보솜 건너뛰기 서열은 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 요소이다.
- [0024] 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열의 발현을 조절하도록 작동 가능하게 연결된 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 프로모터 및 조절 또는 제어 요소를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열의 발현을 조절하도록 작동 가능하게 연결된 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 프로모터 또는 조절 또는 제어 요소를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 유전자 좌는 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열의 발현을 조절하도록 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 이중 조절 또는 제어 요소(들)를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 이중 조절 또는 제어 요소는 이중 프로모터, 인핸서(enhancer), 인트론, 폴리아데닐화 신호, 코작 컨센서스 서열 (Kozak consensus sequence), 스플라이스 수용체 서열 또는 스플라이스 공여체 서열을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 이중 프로모터는 인간 신장 인자 1 알파(EF1 $\alpha$ ) 프로모터 또는 MND 프로모터 또는 이의 변이체이거나 이를 포함한다.
- [0025] 임의의 구현예 중 일부에서, T 세포는 대상체에서 유래된 1차 T 세포이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 대상체는 인간이다. 임의의 구현예 중 일부에서, T 세포는 CD8+ T 세포 또는 이의 하위 유형이다. 임의의 구현예 중 일부에서, T 세포는 CD4+ T 세포 또는 이의 하위 유형이다. 임의의 구현예 중 일부에서, T 세포는 다분화능 또는 다능성 세포에서 유래된다. 임의의 구현예 중 일부에서, T 세포는 iPSC인 다분화능 또는 다능성 세포에서 유래된다.

- [0026] 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열; 및 상기 핵산 서열에 연결된 하나 이상의 상동성 암(들)을 포함하는 폴리뉴클레오티드가 여기에 제공된다. 임의의 구현에 중 일부에서, 하나 이상의 상동성 암(들)은 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형-2(*TGFBR2*) 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 중 하나 이상의 영역(들)에 상동성인 서열을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 재조합 수용체 또는 이의 일부는, 재조합 수용체가 폴리뉴클레오티드로 도입된 세포에서 발현될 경우 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화된다. 임의의 구현에 중 일부에서, 핵산 서열은, T 세포의 내인성 계놈 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임에 대해 외인성 또는 이중인 서열이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 핵산 서열은, 인간 T 세포인 T 세포의 내인성 계놈 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임에 대해 외인성 또는 이중인 서열이다.
- [0027] 임의의 구현에 중 일부에서, 하나 이상의 상동성 암(들)은 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 인트론 또는 하나 이상의 엑손을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 폴리뉴클레오티드로 도입된 세포에서 기능성 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화하지 않는다. 임의의 구현에 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 폴리뉴클레오티드로 도입된 세포에서 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 TGFBR1I 폴리펩티드의 발현이 제거된다.
- [0028] 임의의 구현에 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 폴리뉴클레오티드로 도입된 세포에서 전장 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 부분적인 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 폴리뉴클레오티드로 도입된 세포에서 우성 음성 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드로 도입된 세포에서 암호화된 TGFBR1I 폴리펩티드는, 서열 번호: 59의 22-191 잔기 또는 서열 번호: 60의 22-216 잔기에 상응하는 아미노산 서열 또는 서열 번호: 59의 22-191 잔기 또는 서열 번호: 60의 22-216 잔기 또는 이의 단편에 상응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 핵산 서열은 하나 이상의 상동성 암(들)에 포함된 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 엑손과 인-프레임이다.
- [0029] 임의의 구현에 중 일부에서, 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 영역(들)은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 중 엑손 1의 하류에 존재하는 서열이거나 이를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 영역(들)은 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 중 엑손 4의 적어도 일부 또는 엑손 4의 하류를 포함하는 서열이거나 이를 포함한다.
- [0030] 임의의 구현에 중 일부에서, 하나 이상의 상동성 암은 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는 [5' 상동성 암]-(a)의 핵산 서열-[3' 상동성 암] 구조를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 50 내지 (약) 2000 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 300 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 200 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 300 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 750 뉴클레오티드 또는 (약) 750 내지 (약) 1000 뉴클레오티드 길이이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 200, 300, 400, 500, 600, 700 또는 800개의 뉴클레오티드 길이 또는 상기 중 어느 하나 사이의 임의의 값이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 300개의 뉴클레오티드 길이를 초과한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 400, 500 또는 600개의 뉴클레오티드 길이거나 또는 상기 중 어느 하나 사이의 임의의 값이다.
- [0031] 임의의 구현에 중 일부에서, 5' 상동성 암은, 서열 번호: 69-71에 제시된 서열 또는 서열 번호: 69-71에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열 또는 이의 부분 서열을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 3' 상동성 암은, 서열 번호: 72에 제시된 서열 또는 서열 번호: 72에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열 또는 이의 부분 서열을 포함한다.

- [0032] 임의의 구현에 중 일부에서, 암호화된 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(TCR)이거나 이를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 암호화된 재조합 수용체는 재조합 TCR이고, (a)의 핵산 서열은 TCR 알파(TCR α) 사슬, TCR 베타(TCR β) 사슬 또는 둘 다를 암호화한다.
- [0033] 임의의 구현에 중 일부에서, 암호화된 재조합 수용체는 기능성 비-T 세포 수용체(비-TCR) 항원 수용체이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 암호화된 재조합 수용체는 기능성 비-T 세포 수용체(비-TCR) 항원 수용체를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 암호화된 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다.
- [0034] 임의의 구현에 중 일부에서, CAR은 세포 외 영역, 막관통 도메인 및 세포 내 영역을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 세포 외 영역은 결합 도메인을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 결합 도메인은 질병, 장애 또는 병태의 세포 또는 조직과 관련되거나, 이에 특이적이거나 또는 이에서 발현되는 표적 항원과 결합할 수 있다.
- [0035] 임의의 구현에 중 일부에서, 표적 항원은 종양 항원이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 표적 항원은 αvβ6 인테그린(αvβ6 integrin), B세포 성숙 항원(B cell maturation antigen, BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 탈수 효소 9(CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로 공지), 암 고환 항원, 암/고환 항원 1B(CTAG, 또한 NY-ESO-1 및 LAGE-2로 공지), 암배아 항원(carcinoembryonic antigen, CEA), 사이클린, 사이클린 A2, C-C 모티프 케모카인 리간드 1(CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸 4(chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4), 표피 성장 인자 단백질(epidermal growth factor protein, EGFR), 유형 III 표피 성장 인자 수용체 돌연변이(EGFR vIII), 표피 당단백질 2(EPG-2), 표피 당단백질 40(EPG-40), 에프린B2, 에프린 수용체 A2(EpHa2), 에스트로젠 수용체, Fc 수용체 유사 5(FCRL5; Fc 수용체 상동물 5 또는 FCRH5로도 공지), 태아 아세틸콜린 수용체(태아 AchR), 엽산 결합 단백질(folate binding protein, FBP), 엽산 수용체 알파, 강글리오사이드 GD2, O-아세틸화 GD2(OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백질 100(gp100), 글리피칸-3(GPC3), G 단백질 결합 수용체 C 클래스 5 그룹 D 멤버(GPRC5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나제 erb-B2), Her3(erb-B3), Her4(erb-B4), erbB 2량체, 인간 고분자량 흑색종 관련 항원(Human high molecular weight-melanoma-associated antigen, HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1(Human leukocyte antigen A1, HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22R α), IL-13 수용체 알파 2(IL-13R α2), 키나제 삽입 도메인 수용체(kinase insert domain receptor, kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자(L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 8 패밀리 멤버 A를 함유하는 루신 리치 반복(Leucine Rich Repeat Containing 8 Family Member A, LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종 관련 항원(Melanoma-associated antigen, MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, 메소텔린(MSLN), c-Met, 뮤린 시토메갈로 바이러스(cytomegalovirus, CMV), 뮤신 1(MUC1), MUC16, 천연 킬러 2 그룹 D 멤버(natural killer group 2 member D, NKG2D) 리간드, 멜란 A(MART-1), 신경 세포 부착 분자(neural cell adhesion molecule, NCAM), 종양태아성 항원, 흑색종 우선 발현 항원(PRAME), 프로게스트론 수용체, 전립선 특이적 항원, 전립선 줄기 세포 항원(prostate stem cell antigen, PSCA), 전립선 특이적 막 항원(prostate specific membrane antigen, PSMA), 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1), 서바이빈(survivin), 영양막 당단백질(TPBG, 또한 5T4로 공지), 종양 관련 당단백질 72(tumor-associated glycoprotein 72, TAG72), 티로시나제 관련 단백질 1(TRP1, 또한 TYRP1 또는 gp75로 공지), 티로시나제 관련 단백질 2(TRP2, 또한 도파크롬 타우토메라제, 도파크롬 델타 이성화 효소 또는 DCT로 공지), 혈관 내피 성장 인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 윌름스 종양 1(Wilms Tumor 1, WT-1), 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원 또는 범용 태그 관련 항원 및/또는 비오틴화 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체 발현 분자 중에서 선택된다.
- [0036] 임의의 구현에 중 일부에서, 세포 외 영역은 스페이서를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 세포 외 영역은 결합 도메인과 막관통 도메인 사이에서 작동 가능하게 연결된 스페이서를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 스페이서는 면역 글로불린 힌지 영역을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 스페이서는 C<sub>H</sub>2 영역 및 C<sub>H</sub>3 영역을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 세포 내 영역은 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 세포 내 신호 전달 도메인은, CD3-제타(CD3 ζ) 사슬인 CD3 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 세포 내 신호 전달 도메인은, CD3-제타(CD3 ζ) 사슬

인 CD3 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 세포 내 영역은 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들)을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인은 CD28, 4-1BB 또는 ICOS의 세포내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 공자극 신호 전달 영역은 4-1BB의 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다.

- [0037] 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 N 말단에서 C 말단 순서로: 세포 외 결합 도메인, 스페이서, 막관통 도메인 및 세포 내 신호 전달 영역을 포함하는 재조합 수용체를 암호화한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 전이 유전자 서열은, 세포 외 결합 도메인; 스페이서; 및 막관통 도메인; 및 세포 내 신호 전달 영역; 을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 순서로 포함한다.
- [0038] 임의의 구현예 중 일부에서, 전이 유전자 서열은, scFv인 세포 외 결합 도메인; IgG1, IgG2 또는 IgG4 또는 이의 변형된 버전인 인간 면역 글로불린 힌지 유래 서열을 포함하고, C<sub>H</sub>2 영역 및/또는 C<sub>H</sub>3 영역을 더 포함하는 스페이서; 및 인간 CD28 유래인 막관통 도메인; 인간 4-1BB 유래인 공자극 신호 전달 도메인; 및 CD3 $\zeta$  사슬 또는 이의 일부인 세포 내 신호 전달 영역;을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 순서로 포함한다.
- [0039] 임의의 구현예 중 일부에서, CAR은 다중 사슬 CAR이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 핵산 서열은 하나 이상의 추가 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [0040] 임의의 구현예 중 일부에서, 핵산 서열은 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 다중 시스트론 요소는, CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 하나 이상의 추가 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다.
- [0041] 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 추가 단백질은 대리 마커이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 추가 단백질은 절단형 수용체인 대리 마커이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 추가 단백질은, 세포 내 신호 전달 도메인이 결합되고 리간드가 결합할 경우 세포 내 신호 전달을 매개할 수 없는 절단형 수용체인 대리 마커이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 추가 단백질은, 세포 내 신호 전달 도메인이 결합되거나 리간드가 결합할 경우 세포 내 신호 전달을 매개할 수 없는 절단형 수용체인 대리 마커이다.
- [0042] 임의의 구현예 중 일부에서, 재조합 수용체는 재조합 TCR이고, 다중 시스트론 요소는 TCR  $\alpha$ 를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 TCR  $\beta$ 를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다.
- [0043] 임의의 구현예 중 일부에서, 재조합 수용체는 다중 사슬 CAR이고, 다중 시스트론 요소는 다중 사슬 CAR 중 하나의 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 다중 사슬 CAR 중 또 다른 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다.
- [0044] 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)는 재조합 수용체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 상류에 존재한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 다중 시스트론 요소는 리보솜 건너뛰기 서열이거나 이를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 다중 시스트론 요소는 T2A, P2A, E2A, 또는 F2A 요소인 리보솜 건너뛰기 서열이거나 이를 포함한다.
- [0045] 임의의 구현예 중 일부에서, 핵산 서열은 폴리뉴클레오티드로 도입된 세포에서 발현될 경우, 재조합 수용체의 발현을 제어하도록 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 이중 또는 조절 제어 요소(들)를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 이중 조절 또는 제어 요소는 이중 프로모터, 인핸서, 인트론, 폴리아데닐화 신호, 코작 컨센서스 서열, 스플라이스 수용체 서열 및/또는 스플라이스 공여체 서열을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 이중 프로모터는 인간 신장 인자 1 알파(EF1 $\alpha$ ) 프로모터 또는 MND 프로모터 또는 이의 변이체이거나 이를 포함한다.
- [0046] 임의의 구현예 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는 바이러스 벡터 내에 포함된다. 임의의 구현예 중 일부에서, 바이러스 벡터는 AAV 벡터이다. 임의의 구현예 중 일부에서, AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 또는 AAV8 벡터 중에서 선택된다. 임의의 구현예 중 일부에서, AAV 벡터는 AAV2 또는 AAV6 벡터이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터인 레트로바이러스 벡터이다.
- [0047] 임의의 구현예 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는 선형 폴리뉴클레오티드이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드인 선형 폴리뉴클레오티드이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는 (약) 2500, 2750, 3000, 3250, 3500, 3750, 4000, 4250,

4500, 4760, 5000, 5250, 5500, 5750, 6000, 7000, 7500, 8000, 9000 또는 10000개 이상의 뉴클레오티드 길이 이거나 또는 상기 중 어느 하나 사이의 임의의 값이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는 (약) 2500 내지 (약) 5000 뉴클레오티드, (약) 3500 내지 (약) 4500 뉴클레오티드 또는 (약) 3750 뉴클레오티드 내지 (약) 4250개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0048] 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 방법이 여기에 제공되고, 상기 방법은 *TGFBR2* 유전자 좌의 유전자 파괴를 포함하는 T 세포로 제공된 임의의 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것을 포함한다.

[0049] 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 방법이 여기에 제공되고, 상기 방법은 T 세포의 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)를 T 세포로 도입하는 것; 및 *TGFBR2* 유전자 좌에서 유전자 파괴를 포함하는 T 세포로 상기 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것을 포함하고, 여기서 상기 방법은 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 생성하며, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열이 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내에 통합된다.

[0050] 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 방법이 여기에 제공되고, 상기 방법은 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 T 세포로 도입하는 것을 포함하고, 상기 T 세포는 T 세포의 *TGFBR2* 유전자 좌 내에 유전자 파괴를 가지며, 여기서 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열은 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내에 통합된다. 임의의 구현예 중 일부에서, 유전자 파괴는, T 세포의 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)를 T 세포로 도입함으로써 수행된다. 임의의 구현예 중 일부에서, 방법은 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 생성하고, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는 핵산 서열에 연결된 하나 이상의 상동성 암(들)을 더 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 상동성 암(들)은 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형-2(*TGFBR2*) 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 영역(들)에 상동성인 서열을 포함한다.

[0051] 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 방법에 의해 생성된 세포에서 기능성 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화하지 않는다. 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 방법에 의해 생성된 세포에서 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 TGFBR1I 폴리펩티드의 발현이 제거된다. 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 방법에 의해 생성된 세포에서 전장 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 부분적인 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 방법에 의해 생성된 세포에서 우성 음성 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화한다.

[0052] 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 상동성 암은 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는 [5' 상동성 암]-[재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열]-[3' 상동성 암] 구조를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 50 내지 (약) 2000 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 300 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 200 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 300 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 750 뉴클레오티드 또는 (약) 750 내지 (약) 1000 뉴클레오티드 길이이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 200, 300, 400, 500, 600, 700 또는 800개의 뉴클레오티드 길이 이거나 또는 상기 중 어느 하나 사이의 임의의 값이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 300개의 뉴클레오티드 길이를 초과한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 400, 500 또는 600개의 뉴클레오티드 길이 이거나 또는 상기 중 어느 하나 사이의 임의의 값이다.

[0053] 임의의 구현예 중 일부에서, 5' 상동성 암은, 서열 번호: 69-71에 제시된 서열 또는 서열 번호: 69-71에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열 또는 이의 부분 서열을 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 3' 상동성 암은, 서열 번호: 72에 제시된 서열 또는 서열 번호: 72에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열 또는 이의 부분 서열을 포함한다.

- [0054] 임의의 구현에 중 일부에서, 암호화된 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(TCR)이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 암호화된 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(TCR)를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 암호화된 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다.
- [0055] 임의의 구현에 중 일부에서, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)는 표적 부위에 특이적으로 결합하거나 혼성화하는 DNA 결합 단백질 또는 DNA 결합 핵산, DNA 표적화 단백질 및 뉴클레아제를 포함하는 융합 단백질 또는 RNA 가이드 뉴클레아제를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 하나 이상의 제제(들)는 표적 부위에 특이적으로 결합, 인식 또는 혼성화하는 징크 핑거 뉴클레아제(zinc finger nuclease, ZFN), TAL-이펙터 뉴클레아제(TAL-effector nuclease, TALEN) 및/또는 CRISPR-Cas9 조합물을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 각각의 하나 이상의 제제(들)는 하나 이상의 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA)를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 하나 이상의 제제(들)가 gRNA 및 Cas9 단백질을 포함하는 리보뉴클레오단백질(RNP) 복합체로서 도입된다. 임의의 구현에 중 일부에서, RNP는 전기 천공, 입자 총, 인산칼슘 형질 감염, 세포 압축 또는 압착, 예컨대 전기 천공을 통해 도입된다. 임의의 구현에 중 일부에서, RNP의 농도는 (약) 1  $\mu$ M 내지 (약) 5  $\mu$ M이다. 임의의 구현에 중 일부에서, RNP의 농도는 (약) 2  $\mu$ M이다. 임의의 구현에 중 일부에서, gRNA는 GUGGAUGACCUGGCUAACAG(서열 번호: 73)의 표적화 도메인 서열을 갖는다.
- [0056] 임의의 구현에 중 일부에서, T 세포는 대상체에서 유래된 1차 T 세포이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 대상체는 인간이다. 임의의 구현에 중 일부에서, T 세포는 CD8+ T 세포 또는 이의 하위 유형이다. 임의의 구현에 중 일부에서, T 세포는 CD4+ T 세포 또는 이의 하위 유형이다. 임의의 구현에 중 일부에서, T 세포는 다분화능 또는 다능성 세포에서 유래된다. 임의의 구현에 중 일부에서, T 세포는 iPSC인 다분화능 또는 다능성 세포에서 유래된다.
- [0057] 임의의 구현에 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는 바이러스 벡터 내에 포함된다. 임의의 구현에 중 일부에서, 바이러스 벡터는 AAV 벡터이다. 임의의 구현에 중 일부에서, AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 또는 AAV8 벡터 중에서 선택된다. 임의의 구현에 중 일부에서, AAV 벡터는 AAV2 또는 AAV6 벡터이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터인 레트로바이러스 벡터이다.
- [0058] 임의의 구현에 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는 선형 폴리뉴클레오티드이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는, 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드인 선형 폴리뉴클레오티드이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 하나 이상의 제제(들) 및 폴리뉴클레오티드는 동시에 또는 순차적으로 임의의 순서로 도입된다. 임의의 구현에 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 제제(들)의 도입 후에 도입된다. 임의의 구현에 중 일부에서, 폴리뉴클레오티드는 제제의 도입 후 약 30 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 6 분, 6 분, 8 분, 9 분, 10 분, 15 분, 20 분, 30 분, 40 분, 50 분, 60 분, 90 분, 2 시간, 3 시간 또는 4 시간 직후 또는 이내에 도입된다.
- [0059] 임의의 구현에 중 일부에서, 방법은 하나 이상의 제제의 도입 전에 하나 이상의 면역 세포를 자극 또는 활성화하기 위한 조건 하에서 자극제(들)와 세포를 시험관에서 인큐베이션하는 것을 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 자극제(들)는 항-CD3 및 항-CD28 항체를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 자극제(들)는 항-CD3 또는 항-CD28 항체를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 자극제(들)는, 항-CD3/항-CD28 비드인 항-CD3 및 항-CD28 항체를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 자극제(들)는, 항-CD3/항-CD28 비드인 항-CD3 또는 항-CD28 항체를 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 자극제(들)는, 항-CD3/항-CD28 비드인 항-CD3 및 항-CD28 항체를 포함하며, 여기서 비드 대 세포의 비율은 (약) 1:1이다. 임의의 구현에 중 일부에서, 자극제(들)는, 항-CD3/항-CD28 비드인 항-CD3 또는 항-CD28 항체를 포함하며, 여기서 비드 대 세포의 비율은 (약) 1:1이다.
- [0060] 임의의 구현에 중 일부에서, 방법은 하나 이상의 제제를 도입하기 전에 하나 이상의 면역 세포에서 자극제(들)를 제거하는 것을 포함한다.
- [0061] 임의의 구현에 중 일부에서, 방법은 하나 이상의 제제의 도입 및/또는 주형 폴리뉴클레오티드의 도입 전, 중 또는 후에 세포를 하나 이상의 재조합 사이토카인과 함께 인큐베이션하는 것을 더 포함한다. 임의의 구현에 중 일부에서, 방법은 하나 이상의 제제의 도입 및/또는 주형 폴리뉴클레오티드의 도입 전, 중 또는 후에 세포를 하나 이상의 재조합 사이토카인과 인큐베이션하는 것을 더 포함하며, 여기서 상기 하나 이상의 재조합 사이토카인은 IL-2, IL-7 및 IL-15로 이루어진 군에서 선택된다. 임의의 구현에 중 일부에서, 하나 이상의 재조합 사이토카인

은 (약) 10 U/mL 내지 (약) 200 U/mL의 IL-2 농도에서 선택된 농도로 추가된다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 재조합 사이토카인이, (약) 10 U/mL 내지 (약) 200 U/mL의 IL-2 농도에서 선택된 농도, 즉 (약) 50 IU/mL 내지 (약) 100 U/mL; 0.5 ng/mL 내지 50 ng/mL의 IL-7 농도로 첨가된다. 임의의 구현예 중 일부에서, 하나 이상의 재조합 사이토카인이, (약) 10 U/mL 내지 (약) 200 U/mL의 IL-2 농도에서 선택된 농도, 즉 (약) 50 IU/mL 내지 (약) 100 U/mL; 0.5 ng/mL 내지 50 ng/mL의 농도, 즉 (약) 5 ng/mL 내지 (약) 10 ng/mL로 IL-7; 및/또는 0.1 ng/mL 내지 20 ng/mL의 농도, 예컨대 (약) 0.5 ng/mL 내지 (약) 5 ng/mL의 IL-15로 첨가된다. 임의의 구현예 중 일부에서, 인큐베이션이, 하나 이상의 체제의 도입 및 주형 폴리뉴클레오티드의 도입 후에 최대 또는 약 24 시간, 36 시간, 48 시간, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21 일 동안 수행된다. 임의의 구현예 중 일부에서, 인큐베이션이, 하나 이상의 체제의 도입 및 주형 폴리뉴클레오티드의 도입 후에 최대 또는 약 24 시간, 36 시간, 48 시간, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21 일 - 이는 최대 또는 약 7 일일 수 있음 - 동안 수행된다.

- [0062] 임의의 구현예 중 일부에서, 방법에 의해 생성된 복수의 조작된 세포 중 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 90% 이상 또는 초과인 세포가, *TGFBR2* 유전자 좌위 내 하나 이상의 표적 부위의 유전자 파괴를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 방법에 의해 생성된 복수의 조작된 세포 중 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 90% 이상 또는 초과인 세포가, 재조합 수용체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현한다.
- [0063] 여기에 기재된 임의의 방법을 사용하여 생성된 조작된 T 세포 또는 복수의 조작된 T 세포가 여기에 제공된다.
- [0064] 여기에 기재된 임의의 구현예 유래 조작된 T 세포를 포함하는 조성물이 여기에 제공된다.
- [0065] 여기에 기재된 임의의 구현예 유래 복수의 조작된 T 세포를 포함하는 조성물이 여기에 제공된다. 임의의 구현예 중 일부에서, 조성물은 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포를 포함한다. 임의의 구현예 중 일부에서, 조성물은 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하고, CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율은 (약) 1:3 내지 3:1이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 조성물은 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하고, CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율은 (약) 1:3 내지 3:1 - 이는 1:1일 수 있음 - 이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 재조합 수용체를 발현하는 세포는, 조성물 내 총 세포 중 또는 조성물 내 총 CD4+ 또는 CD8+ 세포 중 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상을 구성한다.
- [0066] 여기에 기재된 임의의 구현예의 조작된 세포, 복수의 조작된 세포 또는 조성물을 질병 또는 장애를 앓는 대상체에 투여하는 것을 포함하는 치료 방법이 여기에 제공된다.
- [0067] 질병 또는 장애의 치료를 위해 여기에 기재된 임의의 구현예의 조작된 세포, 복수의 조작된 세포 또는 조성물의 용도가 여기에 제공된다.
- [0068] 질병 또는 장애를 치료하는 약제의 제조에서 여기에 기재된 임의의 구현예의 조작된 세포, 복수의 조작된 세포 또는 조성물의 용도가 여기에 제공된다.
- [0069] 질병 또는 장애의 치료에 사용하기 위한 여기에 기재된 임의의 구현예의 조작된 세포, 복수의 조작된 세포 또는 조성물의 용도가 여기에 제공된다.
- [0070] 여기에 기재된 방법, 용도 또는 임의의 구현예의 용도를 위한 조작된 세포, 복수의 조작된 세포 또는 조성물에 대한 임의의 구현예 중 일부에서, 질병 또는 장애는 암 또는 종양이다.
- [0071] 임의의 구현예 중 일부에서, 암 또는 종양은 혈액암, 예컨대 림프종, 백혈병 또는 혈장 세포 악성 종양이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 암은 림프종이고 림프종은 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma, NHL), 호지킨 림프종, 발덴스트롬 고분자글로불린혈증(Waldenstrom macroglobulinemia), 여포성 림프종, 작은 비절단 세포 림프종, 점막-관련 림프 조직 림프종(mucosa-associated lymphatic tissue lymphoma, MALT), 변연부 림프종, 비장 림프종, 결절 단핵구 B 세포 림프종, 면역 모세포 림프종, 거대 세포 림프종, 확산 혼합 세포 림프종, 폐 B 세포 혈관 중심 림프종, 작은 림프구성 림프종, 1 차 종격동 B 세포 림프종, 림프구 형질세포성 림프종(lymphoplasmacytic lymphoma, LPL), 또는 맨틀 세포 림프종(mantle cell lymphoma, MCL)이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 암은 백혈병이고, 백혈병은 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 형질 세포성 백혈병 또는 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia, ALL)이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 암은 혈장 세포 악성 종양이고, 혈장 세포 악성 종양은 다발성 골수종(multiple myeloma, MM)이다.

[0072] 임의의 구현예 중 일부에서, 종양은 고품 종양이다. 임의의 구현예 중 일부에서, 고품 종양은 비-소세포 폐암 (non-small cell lung cancer, NSCLC) 또는 두경부 편평상피 세포 암종(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)이다.

[0073] *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들); 및 여기에 제공된 임의의 구현예의 폴리뉴클레오티드;를 포함하는 키트가 여기에 제공된다.

[0074] *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들); 및 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 - 여기서 재조합 수용체 또는 단편, 예컨대 이의 항원 결합 단편, 도메인 및/또는 사슬을 암호화하는 전이 유전자는 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 표적 부위 또는 근처에서 통합을 위해 표적화됨 - ; 및 여기에 제공된 임의의 구현예의 방법을 수행하기 위한 지침;을 포함하는 키트가 여기에 제공된다.

**도면의 간단한 설명**

[0075] 도 1a-1d는, H1975 비-소세포 폐암 세포가 피하로 주입된 종양 보유 마우스 이중 이식 모델 NOD.Cg.Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG)에서 종양 부위의 변화에 의해 결정된 바와 같이 입양적으로 전달된 항-ROR1 CAR+ T 세포의 항종양 활성을 도시한다. 도 1a 및 1c(그룹 평균; 각각 도너 1 및 2) 및 도 1b 및 1d(개별 마우스; 각각 도너 1 및 2)는, (1) 렌티바이러스 전달에 의해 항-ROR1 CAR R12를 발현하는 조작된 T 세포(LV 단독), (2) 렌티바이러스 전달에 의해 항-ROR1 CAR R12를 발현하고 *TGFBR2*가 녹아웃(knockout)된 조작된 T 세포(LV+KO) 또는 (3)  $1 \times 10^6$ 개의 세포 용량(저용량; 상단 패널) 또는  $3 \times 10^6$ 개의 세포 용량(고용량; 하단 패널)으로 투여된 렌티바이러스 전달에 의해 항-ROR1 CAR R12 및 DN-TGFBRII를 발현하는 조작된 T 세포(LV+DN); 및 대조군으로  $3 \times 10^6$ 개의 모의 처리된 세포(모의 KO) 또는 비처리(종양 단독);와 같이 2개의 독립적인 도너(도너 1, 도너 2) 중 하나에서 생성된 조작된 1차 인간 T 세포 조성물이 투여된 마우스에 대한 종양 부위의 변화를 도시한다.

도 2a 및 2b(각각 도너 1 및 2)는 실시예 1.B에 기재된 바와 같은 조작된 세포의 입양 전달을 받은 H1975 종양 보유 NSG 마우스의 무종양 생존 곡선을 도시한다.

도 3a(그룹) 및 3b(개별)는, 모든 그룹 대상체의 조작된 세포가 전기 천공된 (1) 렌티바이러스 전달에 의해 항-ROR1 CAR R12를 발현하는 조작된 T 세포(LV), (2) 렌티바이러스 전달에 의해 항-ROR1 CAR R12를 발현하고 *TGFBR2*가 녹아웃된 조작된 T 세포(LV+KO) 또는 (3)  $1 \times 10^6$ 개의 세포 용량으로 렌티바이러스 전달에 의해 항-ROR1 CAR R12 및 DN-TGFBRII를 발현하는 조작된 T 세포(LV+DN)와 같이 종양, 비장 및 혈액 샘플의 수집 전에 H1975 종양 보유 NSG 마우스에  $1 \times 10^6$ 개의 조작된 T 세포가 투여된 후 처음 14 일 동안 종양 부위의 변화를 도시한다.

도 4a-4b는, 실시예 2.B에 기재된 바와 같이 조작된 세포가 다양한 전달 방법에 의해 투여된 마우스의 혈액(도 4a) 또는 비장(도 4b)에서 CAR 발현 CD4+(상단 패널) 및 CD8+(하단 패널) T 세포의 빈도를 도시한다. 도 4c-4d는 종양에서(도 4c) CAR 발현 CD4+(상단 패널) 및 CD8+(하단 패널) T 세포의 빈도 및 종양에서(도 4d) CD103+ CAR 발현 CD4+(상단 패널) 및 CD8+(하단 패널) T 세포의 빈도를 도시한다.

도 5a-5b는, 조작된 T 세포가 다양한 전달 방법을 사용하여 투여된 마우스 유래 종양 샘플 또는 비장으로부터 단리된 종양 침윤 림프구(tumor-infiltrating lymphocytes, TILs)가 혈청 함유 배지에서 낮은 수준의 TGFβ의 존재 하에 1:5의 이펙터 대 표적 비율로 H1975 종양 회전 타원체와 함께 인큐베이션된 회전 타원체 사멸 분석에 근거한 카스파제 3/7 활성화(도 5a; 총 녹색 개체 통합 강도) 및 H1975 종양 회전 타원체 크기(도 5b; 총 적색 개체 통합 강도)의 변화를 도시한다. 대조군으로, H1975 종양 회전 타원체 세포가 조작된 세포없이(종양 단독) 인큐베이션되었다.

도 6a-6b는, 1:5의 이펙터 대 표적 비율로 *TGFBR2*가 녹아웃(완전히 인간 KO)되거나 또는 녹아웃되지 않은(완전히 인간 WT), H1975 종양 회전 타원체와 함께 항-ROR1 CAR R12 또는 인간 항-ROR1 scFv 항원 결합 도메인을 완전히 함유하는 CAR을 발현하는 조작된 세포를 인큐베이션한 후 회전 타원체 사멸 분석에 근거한 카스파제 3/7 활성화(도 6a) 및 H1975 종양 회전 타원체 크기(도 6b)의 변화를 도시한다. 대조군으로, H1975 종양 회전 타원체 세포가 조작된 세포없이(종양 단독) 인큐베이션되었다. 상기 실시예 1.A에 기재된 *TGFBR2*가 녹아웃(R12 KO)되거나 또는 녹아웃되지 않으면서(R12 WT) R12에서 유래된 scFv 항원 결합 도메인을 갖는 항-ROR1 CAR을 발현하는

세포 및 모의 형질 도입 및 RNP없이 전기 천공(모의)되거나 또는 *TGFBR2*의 녹아웃을 위해 RNP로 모의 형질 도입 (모의 KO)으로 처리된 세포가 대조군으로 또한 분석되었다.

도 7은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 통합을 위해 예시적인 CAR을 암호화하는 전이 유전자 서열을 표적화함으로써 생성된 CAR 발현 세포에서 유세포 분석에 의해 분석된 바와 같은 예시적인 키메라 항원 수용체(CAR)의 표면 발현 및 측면 산란(side scatter, SSC)을 도시한다. 전이 유전자 서열은, a) 이중 프로모터의 제어 하에 CAR 암호화 서열의 발현을 구동하기 위한 인간 신장 인자 1 알파(EF1 $\alpha$ ) 프로모터(EF1 $\alpha$ -CAR); 또는 b) *TGFBR2* 개방형 관독 프레임에 인-프레임으로 표적화된 통합(KO/KI) 시 내인성 *TGFBR2* 프로모터로부터 CAR의 발현을 구동하기 위해 예시적인 CAR을 암호화하는 핵산 서열의 상류에 P2A 리보솜 건너뛰기 요소를 암호화하는 서열(P2A-CAR);을 또한 포함한다. 대조군으로, CAR 암호화 핵산 서열이 무작위 통합에 의해 T 세포로 도입된 서열로부터 CAR의 발현을 위해 예시적인 HIV-1 유래 렌티바이러스 벡터로 통합되었다(Lenti). 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 II(DN-TGFBRII)의 우성 음성(dominant negative, DN) 형태의 발현을 위해, 렌티바이러스 형질 도입 작제물은 DN-TGFBRII를 암호화하는 핵산 서열을 더 함유했다. CAR 발현 세포(CAR+)의 백분율이 표시된다.

도 8a-8c는, (1) 렌티바이러스 단독 전달(LV), (2) *TGFBR2*가 녹아웃된 렌티바이러스 전달(LV+KO), (3) 우성 음성 TGFBRII의 렌티바이러스 전달 및 발현(LV+DN); 또는 (4) HDR에 의한 *TGFBR2* 유전자 좌에서 표적화된 녹인(knock-in) (KO/KI)과 같이 다양한 전달 방법을 사용하여, 조작된 항-ROR1 CAR R12를 발현하는 조작된 세포와 함께 인큐베이션한 후 항-ROR1 CAR R12 발현(유세포 분석에 의한 기하 평균 형광; 도 8a), 회전 타원체 사멸 분석에 근거한 카스파제 3/7 활성화(도 8b) 및 H1975 중앙 회전 타원체 크기(도 8c)의 변화를 도시한다.

도 9a-9c는, 장기 자극 평가 전(pre-) 또는 후(post-)에 항-ROR1 CAR R12 발현의 변화(% CAR+ 세포; 도 9a), 1:5(상단 패널) 또는 1:10(하단 패널)의 이펙터:표적(E:T) 비율로 인큐베이션된 제조항 ROR1-Fc 융합 단백질로 코팅된 비드에 의해 7 일 장기 자극의 대상이 되고 다양한 전달 방법을 사용하여 조작된 항-ROR1 CAR R12를 발현하는 조작된 세포와 함께 인큐베이션한 후 회전 타원체 사멸 분석에 근거한 카스파제 3/7 활성화(도 9b) 및 H1975 중앙 회전 타원체 크기(도 9c)의 변화를 도시한다.

도 10a-10b는, 배지에 10 ng/mL TGF $\beta$ 가 있거나(하단 패널) 또는 없으면서(상단 패널) (1) 렌티바이러스 단독 전달(TCR), (2) *TGFBR2*가 녹아웃된 렌티바이러스 전달(TCR+KO) 또는 (3) RNP없이 렌티바이러스 전달 및 모의 전기 천공(TCR EP)와 같이 다양한 전달 방법을 사용하여 조작된 예시적인 조작된 항-인간 유두종 바이러스 16(HPV16) T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 조작된 세포와 함께 인큐베이션한 후 회전 타원체 사멸 분석에 근거한 카스파제 3/7 활성화(도 10a) 및 H1975 중앙 회전 타원체 크기(도 10b)의 변화를 도시한다. 대조군으로, 모의 형질 도입(모의), 모의 형질 도입 및 RNP없이 전기 천공(모의 EP) 또는 모의 형질 도입 및 *TGFBR2*의 녹아웃을 위해 RNP로 전기 천공(모의 KO)으로 처리된 세포가 또한 분석되었다.

도 11a-11b는, 항-V베타2 항체를 사용하여 염색된 바와 같은 조작된 예시적인 항-인간 유두종 바이러스 16(HPV16) T 세포 수용체(TCR)의 표면 발현 및 a) 인간 신장 인자 1 알파(EF1 $\alpha$ ) 프로모터(EF1 $\alpha$  KO/KI) 또는 b) MND 프로모터(MND KO/KI) 중 어느 하나의 제어 하에 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 통합을 위해 예시적인 TCR을 암호화하는 전이 유전자 서열을 표적화함으로써 생성된 TCR 발현 세포에서 유세포 분석에 의해 평가된 바와 같은 측면 산란(SSC)을 도시한다. *TGFBR2*가 녹아웃(TCR LV *TGFBR2* KO)되거나 *TGFBR2*가 녹아웃되지 않은(TCR LV) 렌티바이러스 전달로 제조항 TCR을 발현하는 세포가 또한 분석되었다. 추가 대조군은 모의 처리된 세포(모의) 및 제조항 TCR을 발현하도록 조작되지 않은 *TGFBR2*가 녹아웃된 세포(*TGFBR2* KO)를 포함했다.

도 12a-12b는, 이펙터:표적(E:T)의 비율이 1:1(상단 패널) 또는 1:5(하단 패널)로 인큐베이션된 실시예 6.B에 기재된 다양한 전달 방법을 사용하여 조작된 항-HPV16 TCR을 발현하는 조작된 세포와 함께 인큐베이션한 후 회전 타원체 사멸 분석에 근거한 카스파제 3/7 활성화(도 12a) 및 H1975 중앙 회전 타원체 크기(도 12b)의 변화를 도시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0076]

제조항 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 하나 이상의 전이 유전자 서열(이하에서 “도너(donor)” 서열, 예를 들어 T 세포에 대해 외인성 또는 이중인 서열로 상호 교환적으로 또한 지칭됨)을 포함하는 변형된 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형 2(*TGFBR2*) 유전자 좌를 갖는 유전자 조작된 세포, 예컨대 T 세포가 여기에 제공된다. 일부 측면에서, 제조항 수용체 또는 이의 일부, 예컨대 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 이의 일부는, 세포 계놈의 *TGFBR2* 유전자 좌에서 통합된 전이 유전자 서열에 의해 암호화되어 계놈에서 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 초래한다. 일부 구현예에서, TGFBRII 단백질 또는 이의 일부는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화된다. 일

부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2*에 의해 암호화된 *TGFBRII*의 일부는, 예를 들어 형질 전환 성장 인자 베타( $TGF\beta$ ) 리간드에 대한 결합을 두고 야생형 또는 비변형 *TGFBRII*와 경쟁함으로써 *TGFBRII*의 우성 음성 형태로 작용할 수 있다. 일부 구현예에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자의 발현이 조작된 세포에서 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌로부터 녹아웃, 감소 또는 제거된다.

[0077] 제조합 수용체 또는 이의 일부를 발현하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 함유하는 유전자 조작된 세포를 생성하는 방법이 또한 제공된다. 제공된 구현예는 제조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에 대해 특이적으로 표적화하는 것을 포함한다. 일부 상황에서, 제공된 구현예는, 예를 들어 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 제조합 수용체 암호화 전이 유전자 서열의 표적화된 녹인을 위해 유전자 편집 방법 및 상동성 지시 수선(HDR)을 사용하여 표적화된 유전자 파괴, 예를 들어 DNA 파손의 생성을 유도함으로써 내인성 *TGFBR2* 유전자의 발현 및/또는 기능을 감소 또는 제거하는 것을 포함한다. 여기에 제공된 조작된 세포의 생성 및/또는 여기에 제공된 방법에 사용하기 위한 관련 세포 조성물, 핵산 및 키트가 또한 제공된다.

[0078] (관심 질병 또는 장애에 특이적인 키메라 항원 수용체(CAR), 제조합 T 세포 수용체(TCR) 또는 기타 제조합, 조작된 또는 키메라 수용체와 같은 제조합, 조작된 또는 키메라 수용체를 발현하는 조작된 세포의 투여를 수반하는 것을 포함하는) 입양 T 세포 요법과 같은 T 세포 기반 요법은 암 및 기타 질병 및 장애의 치료에 효과적일 수 있다. 특정 상황에서, 입양 세포 요법을 위한 조작된 세포를 생성하는 기타 접근법이 항상 전적으로 만족스럽지 않을 수 있다. 일부 측면에서, 조작된 세포의 효능 또는 유효성은, T 세포 고갈, 면역 억제 종양 미세 환경(tumor microenvironment, TME), 표적, 예를 들어 종양으로의 불량한 세포 침윤 및 내인성 항-종양 면역 반응의 결여를 포함하는 다양한 인자에 좌우될 수 있다. 일부 상황에서, 최적의 활성 또는 결과는 투여된 세포가 표적, 예를 들어 표적 항원을 인식하고 결합하는 능력, 대상체, 종양 및 이의 환경 내에서 적절한 부위로 왕래, 국소화 및 성공적으로 진입하는 능력에 좌우될 수 있다. 일부 상황에서, 최적의 활성 또는 결과는 투여된 세포가 활성화, 증폭되는 능력, 세포 독성 사멸 및 사이토카인과 같은 다양한 인자의 분비를 포함한 다양한 이펙터 기능을 발휘하는 능력, 장기간을 포함하여 지속되는 능력, 특정 표현형 상태(예컨대 장기 기억, 덜분화된 및 이펙터 상태)로의 분화, 전환 또는 재프로그래밍에 관여하는 능력, 질병의 국소 미세 환경에서 면역 억제 상태를 피하거나 감소시키는 능력, 클리어런스 및 표적 리간드 또는 항원에 대한 재노출 후에 효과적이고 강력한 리콜 반응을 제공하는 능력, 고갈, 아네르기, 말초 내성, 말단 분화 및/또는 억제 상태로의 분화를 피하거나 감소시키는 능력에 좌우될 수 있다.

[0079] 일부 측면에서, 제공된 구현예는, 표적화된 유전자 파괴 및 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 HDR에 의해 제조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열의 통합을 유도함으로써 내인성 *TGFBR2* 유전자에서 *TGFBRII*의 발현을 변경, 감소 또는 제거하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 제공된 구현예는, 예를 들어 유전자 파괴(예를 들어, 녹아웃) 및/또는 제조합 수용체를 암호화하는 서열과 같은 전이 유전자 서열의 표적화된 통합(예를 들어, 녹인)에 의해 *TGFBRII* 발현의 감소 및/또는 제거가 조작된 세포의 항-종양 활성, 사이토카인 생성, 증폭 및/또는 지속성과 같은 활성 및/또는 기능의 개선을 초래한다는 관찰에 근거한다. 일부 측면에서, 조작된 세포는 변형된 *TGFBR2* 유전자를 함유할 수 있고, 여기서 *TGFBRII*의 발현이 녹아웃, 감소 또는 제거되거나 *TGFBRII* 폴리펩티드의 변형된 형태가 발현된다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열의 표적화된 통합이, 동일한 세포에서 발현된 야생형 또는 비변형 *TGFBRII*의 기능 또는 활성과 경쟁하거나 이를 억제할 수 있는 *TGFBRII* 폴리펩티드의 변형된 형태의 발현을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적화된 유전자 파괴 및 HDR에 의한 전이 유전자 서열의 통합이, 세포 외 도메인 및 막관통 도메인을 포함하나 세포질 도메인의 전부 또는 일부가 결여된 DN 형태와 같은 *TGFBRII* 폴리펩티드의 우성 음성(DN) 형태의 발현을 초래할 수 있다. 일부 측면에서, *TGFBRII*의 DN 형태와 같은 변형된 *TGFBR2* 폴리펩티드는 형질 전환 성장 인자 베타( $TGF\beta$ ) 리간드에 대한 결합을 두고 야생형 또는 비변형 *TGFBRII*와 경쟁할 수 있다.

[0080] 일부 상황에서, T 세포와 같은 면역 세포의 표면 상에 보통 발현되는 수용체인 내인성 *TGFBRII*에 대한 리간드 형질 전환 성장 인자 베타( $TGF\beta$ )의 결합이 수용체 복합체의 형성을 개시하여 세포 내 신호 전달을 개시한다. CD4+ 및 CD8+ T 세포와 같은 면역 세포에서  $TGF\beta$  매개 세포의 신호 전달은, CD4+ 세포에서 CD8+ T 세포의 억제 및 조절 T 세포(Treg) 표현형의 유도를 초래할 수 있다. 일부 측면에서, TME에서  $TGF\beta$ 는 T 세포 증식에 영향을 미치고, T 헬퍼 세포의 성숙을 억제하고/거나 T 세포 이펙터 기능을 감소시킬 수 있다. 일부 측면에서,  $TGF\beta$ 는 페르포린, 그랜자임 A, 그랜자임 B,  $IFN\gamma$  및 Fas 리간드와 같은 T 세포의 세포 독성에 수반되는 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 일부 측면에서,  $TGF\beta$ 는 면역 억제를 초래할 수 있는 Treg 세포의 발달을 유도할 수 있다. 일부 측면에서, 예를 들어 *TGFBRII*와 같은  $TGF\beta$ 에 대한 수용체 발현의 녹아웃에 의한  $TGF\beta$  매개 세포의 신호 전달의 감소 또는 하향 조절 또는 *TGFBRII*의 우성 음성 형태의 발현이, 세포에서  $TGF\beta$  신호 전달의 억제 효과

의 극복을 초래할 수 있다(예를 들어, 문헌[Yang et al., Trends Immunol. (2010) 31(6): 220-227; Oh et al., J Immunol. (2013) 191(8): 3973-3979; Principe et al., Cancer Res. (2016) 76(9): 2525-2539]을 참조한다).

- [0081] 일부 측면에서, 제공된 구현에는, 입양 요법을 위해 투여된 조작된 세포가 종양 미세 환경(TME)에서 TGFβ의 면역 억제 효과를 완화 또는 극복하도록 허용하는 장점을 제공한다. 일부 경우에, TME는 면역 억제 신호를 매개하여 T 세포 요법을 위해 투여된 T 세포의 활성화, 기능, 증식, 생존 및/또는 지속성을 억제할 수 있는 TGFβ와 같은 인자 또는 조건을 함유 또는 생성한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포에서 *TGFBR2* 발현의 감소 또는 제거는, 조작된 세포가 TGFβ 매개 신호 전달의 면역 억제 효과와 같은 면역 억제 효과를 경감 또는 극복하고, T 세포의 기능, 활성화, 증식, 생존 및/또는 지속성을 촉진하는 것을 가능하게 한다.
- [0082] 특정 구현예에서, 제공된 세포, 조성물, 핵산, 키트 및 방법은, 특히 종양 미세 환경의 항원을 표적화하거나 이에 특이적인 세포 요법을 위한 개선된 세포 요법을 초래할 수 있다. 일부 경우에, 제공된 세포, 조성물 및 방법은 TGFβ 수용체의 발현 감소를 초래하고/거나 TGFβ의 억제 효과에 저항할 수 있는 우성 음성 TGFβR(DN TGFβR)의 생성으로 이어져 보다 오랜 생존 및/또는 개선된 기능을 갖는 T 세포를 초래할 수 있다.
- [0083] 일부 상황에서, 제공된 방법은 고형 종양 표적 또는 기타 질병 미세 환경과 관련하여 사용될 수 있으며, 그렇지 않으면 TGFβ 면역 억제 활성이 T 세포 요법의 기능, 생존 또는 활성을 손상 또는 감소시킬 수 있다. 게다가, 제공된 세포, 조성물, 핵산, 키트 및 방법은 세포 요법의 세포 상에서 재조합 수용체, 예를 들어 CAR의 발현을 제어 및 조절하는 데 장점을 또한 제공한다.
- [0084] 일부 상황에서, 여기 제공된 조작된 세포에서 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌로부터 암호화된 재조합 수용체는, 게놈의 *TGFBR2* 유전자 좌의 내인성 조절 요소 또는 외인성 조절 요소의 제어 하에 암호화될 수 있다. 일부 측면에서, 제공된 구현에는 재조합 수용체가 내인성 *TGFBR2* 조절 요소 또는 제어 요소, 예를 들어 시스(cis) 조절 요소, 예컨대 프로모터 또는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 5' 및/또는 3' 비번역 영역(untranslated regions, UTRs)의 제어 하에 발현되는 것을 허용한다. 일부 측면에서, 상기 구현에는 재조합 수용체, 예를 들어 CAR 또는 이의 일부가 발현되는 것을 허용하고/거나 발현이 예를 들어 핵산 수준 및/또는 단백질 수준에서 내인성 TGFBR2와 유사한 수준으로 조절된다.
- [0085] 일부 측면에서, 제공된 구현에는 재조합 수용체가 일부 측면에서 보다 제어 가능한 발현 수준을 제공하는 외인성 또는 이중 조절 또는 제어 요소의 제어 하에 발현되는 것을 허용한다. 일부 측면에서, 제공된 구현에는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 내인성 프로모터가 비활성일 수 있는 세포를 포함하여 다양한 세포 유형에서 재조합 수용체의 표적화되고 제어된 발현을 허용한다.
- [0086] 일부 상황에서, 재조합 세포의 최적의 효능은, 치료 세포 조성물에서 면역 세포 및/또는 세포 집단과 같은 세포 중에서 수용체의 균일, 균질 및/또는 일관된 발현을 포함한 재조합 수용체를 발현하는 투여된 세포의 능력 및 재조합 수용체가 대상체, 종양 및 이의 환경 내에서 표적, 예를 들어, 표적 항원을 인식하고 이에 결합하는 능력에 좌우될 수 있다. 일부 경우에, CAR과 같은 재조합 수용체를 세포로 도입하기 위한 이용 가능한 방법은, 재조합 수용체를 암호화하는 서열의 무작위 통합에 의한 것이다. 특정 관점에서, 상기 방법은 완전히 만족스럽지 않다. 일부 측면에서, 무작위 통합은 세포 기능 및 활성화에 중요할 수 있는 것을 포함하여 세포에서 하나 이상의 무작위 유전자의 유전자 좌의 가능한 삽입 돌연변이 유발 및/또는 유전자 파괴를 초래할 수 있다. 일부 경우에, 세포의 게놈으로 수용체를 암호화하는 전이 유전자의 반무작위 또는 무작위 통합은, 일부 경우에, 게놈에서 원치 않는 위치, 예를 들어, 세포의 활성을 조절하는 데 중요한 유전자 또는 필수적인 유전자로 핵산 서열의 통합으로 인한 불리하고/거나 원치 않는 효과를 초래할 수 있다.
- [0087] 일부 경우에, 무작위 통합은, 치료 세포 조성물과 같은 세포 조성물의 세포 내에서 일관성 없는 발현, 핵산의 가변적 카피 수 및/또는 수용체 발현의 가변성을 초래할 수 있는 재조합 또는 키메라 수용체를 암호화하는 서열의 가변적인 통합을 초래할 수 있다. 일부 경우에, 수용체를 암호화하는 핵산 서열의 무작위 통합은, 통합 부위 및/또는 핵산 서열 카피 수에 따라 변화가 많은, 이질적, 비균일 및/또는 최적이지 않은 발현 또는 항원 결합, 발암성 형질 전환 및 핵산 서열의 전사 침묵을 초래할 수 있다. 일부 측면에서, 세포 집단에서 이질적 및 비균일 발현은, 재조합 또는 키메라 수용체의 발현 및/또는 항원 결합의 비일관성 또는 불안정, 조작된 세포의 기능의 예측 불가능 또는 기능 감소 및/또는 비균일 의약물을 초래함으로써 조작된 세포의 효능을 감소시킬 수 있다. 일부 측면에서, 특정 렌티바이러스 벡터와 같은 특정 무작위 통합 벡터의 사용은, 조작된 세포가 복제 가능한 바이러스를 함유하지 않는 것의 확인을 필요로 한다. 집단에서 핵산의 무작위 통합 및/또는 이질적 발현을 최소화하면서 재조합 또는 키메라 수용체의 일관된 발현 수준 및 기능을 달성하기 위한 개선된 전략이 필요하다.

[0088] 일부 상황에서, 제공된 구현에는 상동성 지시 수선(HDR)에 의해 세포, 예를 들어 T 세포의 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌로 통합될 재조합 수용체를 암호화하는 핵산을 갖는 세포를 조작하는 것에 관한 것이다. 일부 측면에서, HDR은 유전자 파괴를 위한 표적 부위, 예컨대 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 또는 근처에서 전이 유전자 서열(예컨대 재조합 수용체 또는 키메라 수용체 또는 이의 일부, 사슬 또는 단편을 암호화하는 전이 유전자 서열)의 부위 특이적 통합을 매개할 수 있다. 일부 구현예에서, (예를 들어, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 표적 부위에) 유전자 파괴 및 (예를 들어, 상기 유전자 파괴 주변 서열에 상동성인 핵산 서열을 함유하는) 하나 이상의 상동성 암을 함유하는 주형 폴리뉴클레오티드의 존재가 HDR을 유도 또는 지시할 수 있고, 상동성 서열이 DNA 수선을 위한 주형으로 작용한다. 유전자 파괴를 둘러싼 내인성 유전자 서열과 주형 폴리뉴클레오티드에 포함된 상동성 암 사이의 상동성에 근거하여, 세포의 DNA 수선 기체가 주형 폴리뉴클레오티드를 사용하여 DNA 손상을 수선하고 유전자 파괴의 부위에서 유전 정보를 재합성함으로써 유전자 파괴 부위에서 또는 근처에서 상동성 암(예컨대 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열) 사이의 서열을 효과적으로 삽입하거나 통합할 수 있다. 제공된 구현에는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 함유하는 세포를 생성할 수 있으며, 여기서 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열은 HDR에 의해 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌로 통합된다.

[0089] 일부 측면에서, 제공된 구현에는 세포에서 재조합 수용체를 암호화하는 핵산의 개선되고/거나 보다 효율적인 표적화를 갖는 조작된 세포를 생성하는 데 있어 장점을 제공하며, 이는 *TGFBR2*의 발현 감소 및/또는 제거를 또한 동시에 초래하고 조작된 세포의 활성 및/또는 기능의 개선 또는 일부 경우에 *TGFBRII*의 우성 음성의 발현을 초래할 수 있다. 일부 경우에, 제공된 구현에는 가능한 반무작위 또는 무작위 통합 및/또는 이질적 또는 변화가 많은 발현을 최소화하고, 재조합 수용체의 개선된, 균일한, 동질의, 일관적인 또는 안정적인 발현을 초래하거나 또는 삽입 돌연변이 형성의 감소되었거나 낮거나 없는 가능성을 초래한다. 일부 측면에서, 재조합 또는 키메라 수용체, 예를 들어 TCR 또는 CAR을 발현하는 유전자 조작된 면역 세포를 생성하는 다른 방법에 비해, 제공된 구현에는 재조합 또는 키메라 수용체의 보다 안정적인, 보다 생리학적인, 보다 제어 가능한 또는 보다 균일한, 일관적인 또는 동질적인 발현을 허용한다. 일부 경우에, 방법은 보다 일관적이고 보다 예측 가능한 의약품, 예를 들어 조작된 세포를 함유하는 세포 조성물의 생성을 초래하고, 이는 환자의 치료를 위한 보다 안전한 요법을 초래할 수 있다. 일부 측면에서, 제공된 구현에는 관심 단일 유전자의 유전자 좌 또는 복수의 유전자의 유전자 좌에서 예측 가능하고 일관적인 통합을 또한 허용한다. 일부 구현예에서, 제공된 구현에는 집단의 세포에 통합된 핵산의 일관된 카피 수(전형적으로 1 또는 2)를 갖는 세포 집단의 생성을 또한 초래할 수 있고, 이는 일부 측면에서 세포 집단 내 내인성 수용체 유전자의 발현 및 재조합 수용체 발현의 일관성을 제공한다. 일부 경우에, 제공된 구현에는 통합을 위해 바이러스 벡터의 사용을 포함하지 않고 따라서 조작된 세포가 복제 가능한 바이러스를 함유하지 않는 점의 확인에 대한 필요성을 감소시킬 수 있어서 세포 조성물의 안전성을 개선시킬 수 있다.

[0090] 조작된 세포의 설계, 준비 및 생산 방법 및 조작된 세포를 생성하거나 생산하기 위한 키트 및 장치가 또한 제공된다. 본 방법에 의해 생성된 세포 및 세포 조성물이 또한 제공된다. 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 바이러스 벡터 및 예컨대 형질 도입 또는 전기 천공과 같은 물리적 전달에 의해 상기 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입하기 위한 방법이 제공된다. 조작된 세포를 함유하는 조성물 및 예컨대 입양 세포 요법을 위해 대상체에 세포 및 조성물을 투여하기 위한 방법, 키트 및 장치가 또한 제공된다. 일부 측면에서, 세포가 대상체에서 단리되고, 조작되고, 동일한 대상체에 투여된다. 다른 측면에서, 세포가 한 대상체에서 단리되고, 조작되고, 또 다른 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 제공된 폴리뉴클레오티드, 뉴클레오티드 서열, 핵산 서열, 전이 유전자 및/또는 벡터가 면역 세포로 전달될 때, T 세포 활성을 조절할 수 있고, 일부 경우에, T 세포 분화 또는 항상성을 조절할 수 있는 재조합 또는 키메라 수용체, 예를 들어 TCR 또는 CAR의 발현을 초래한다. 생성된 유전자 조작된 세포 또는 세포 조성물은 입양 세포 요법 방법에 사용될 수 있다.

[0091] 본 출원에서 언급된 특허 문서, 과학 논문 및 데이터베이스를 포함한 모든 간행물은, 각각의 개별 간행물이 개별적으로 참조로 통합된 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 그 전문이 참조로 포함된다. 여기에 제시된 정의가 여기에 참조로 포함된 특허, 출원, 공개된 출원 및 기타 간행물에 제시된 정의와 상반되거나 달리 부합하지 않는 경우, 여기에 제시된 정의가 여기에 참조로 포함된 정의보다 우선한다.

[0092] 여기에 사용된 섹션 제목은 단지 조직화를 위한 목적이며 기재된 주제를 한정하는 것으로 이해되어서는 안된다.

[0093] **I. 상동성 지시 수선에 의해 재조합 수용체를 발현하는 세포를 생성하는 방법**

[0094] 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 포함하는 유전자 조작된 세포를 생성 또는 생산하는 방법이 여기에 제공되며, 여기

서 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)과 같은 재조합 수용체 또는 키메라 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 유전자 조작된 세포의 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 (예를 들어, 상기 유전자 좌가 변형되도록) 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌로 통합된 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자를 함유하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, “주형 폴리뉴클레오티드(template polynucleotide)”로도 명명)를 사용하여 표적화된 유전자 파괴 및 상동성 의존적 수선(homology dependent repair, HDR)을 유도함으로써 *TGFBR2* 유전자 좌에서 전이 유전자의 통합을 표적화하는 것을 포함한다. 방법에 의해 생성된 세포 및 세포 조성물 및 방법에 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드 및 키트가 또한 제공된다.

[0095] 일부 측면에서, 제공된 구현예는 *TGFBR2* 유전자 좌로 전이 유전자 서열의 표적화된 통합을 위해 HDR을 이용한다. 일부 경우에, 방법은 HDR에 의해 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열의 표적화된 통합과 조합된 유전자 편집 기술에 의해 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 하나 이상의 표적화된 유전자 파괴(들), 예를 들어 DNA 파손을 도입하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 표적화된 유전자 파괴(들)는 유전자 파괴(들)를 도입할 수 있는 하나 이상의 제제(들)의 도입에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, HDR 단계는 표적 게놈 위치의 DNA에서 파괴 또는 파손, 예를 들어 이중 가닥 파손을 수반한다. 일부 구현예에서, DNA 파손은 유전자 편집 방법, 예를 들어 표적화된 뉴클레아제를 이용하여 유도된다. 일부 구현예에서, 방법은 *TGFBR2*의 발현에 대해 녹아아웃된 조작된 세포를 생성한다.

[0096] 일부 측면에서, 제공된 방법은, *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)를 T 세포로 도입하는 단계; 및 전이 유전자 및 하나 이상의 상동성 암을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드를 T 세포로 도입하는 단계;를 포함한다. 일부 측면에서, 전이 유전자는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자와 같은 핵산 서열은 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 *TGFBR2* 유전자 좌 내에서 통합을 위해 표적화된다. 일부 측면에서, 제공된 방법은 *TGFBR2* 유전자 좌 내에 유전자 파괴를 갖는 T 세포로 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 내에서 하나 이상의 표적 부위의 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제에 의해 유도되었으며, 전이 유전자와 같은 핵산 서열은 HDR을 통해 *TGFBR2* 유전자 좌 내에서 통합을 위해 표적화된다. 일부 구현예에서, 임의의 제공된 방법에 의해 생성된 유전자 조작된 면역 세포를 포함하여, 보다 개선된, 균일한, 동질의 및/또는 안정적인 발현 및/또는 재조합 수용체에 의한 항원 결합을 나타내는 세포 집단과 같은, 재조합 수용체, 예를 들어, TCR 또는 CAR를 발현하도록 조작된 세포 집단을 함유하는 조성물이 또한 제공된다.

[0097] 일부 측면에서, 구현예는 유전자 편집 방법 및/또는 표적화된 뉴클레아제를 사용한 뒤 하나 이상의 주형 폴리뉴클레오티드(들), 예를 들어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열 및 선택적으로 기타 분자를 암호화하는 핵산 서열에 연결된 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 서열에 상동성인 상동성 서열을 함유하는 주형 폴리뉴클레오티드(들)에 근거한 HDR에 의해 표적화된 DNA 파손과 같은 표적화된 게놈 파괴를 생성하여 DNA 파손 또는 근처에서 전이 유전자 서열을 특이적으로 표적화 및 통합하는 것을 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, 방법은 (예를 들어, 유전자 편집을 통해) 표적화된 유전자 파괴를 유도하는 단계 및 전이 유전자 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드를 (예를 들어, HDR을 통해) 세포로 도입하는 단계를 포함한다.

[0098] 일부 구현예에서, HDR에 의해 전이 유전자 서열의 표적화된 유전자 파괴 및 표적화된 통합은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 하나 이상의 표적 부위(들)에서 발생한다. 일부 측면에서, 표적화된 통합은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 내에서 발생한다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열의 표적화된 통합은, 예를 들어 내인성 *TGFBR2* 유전자의 발현이 제거되는 것과 같은 내인성 *TGFBR2* 유전자의 녹아아웃을 초래한다. 일부 측면에서, 전이 유전자의 표적화된 통합은 TGFBR1I 폴리펩티드의 우성 음성(DN) 형태의 발현을 초래한다. 일부 측면에서, 우성 음성(DN) 형태(항형태 돌연변이로도 명명)는 동일한 세포에서 발현된 야생형 유전자 생성물에 대해 길항적으로 작용하는 변형된 유전자 생성물이다. 일부 측면에서, DN 형태는 선택적으로 유전자 생성물의 정상적인 기능을 억제, 반작용, 경쟁 및/또는 불활성화시키는 변형된 분자 기능을 초래하고, 우성 또는 반-우성 표현형으로 특성화된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, DN 형태는 동일한 세포에서 발현될 경우 야생형 유전자 생성물과 동일한 인자 또는 분자와 여전히 상호 작용할 수 있으나 야생형 유전자 생성물의 기능 중 일부 측면을 차단할 수 있다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 서열이 엑손 서열과 인-프레임이도록 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 또는 이의 부분 서열 내에서 예를 들어,

상동성 지시 수선(HDR)에 의해 *TGFBR2* 유전자 좌로 통합되었다. 일부 측면에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 일부, 예컨대 통합된 전이 유전자 서열의 상류의 일부 및 재조합 수용체 또는 이의 일부가, 선택적으로 다중 시스템 요소에 의해 분리되어 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에서 발현된다. 일부 측면에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 발현된 부분은 TGFBR2의 DN 형태를 암호화한다.

[0099] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드가 하나 이상의 표적화된 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제(들)의 도입 전, 동시에 또는 후에 조작된 세포로 도입된다. 하나 이상의 표적화된 유전자 파괴, 예를 들어, DNA 파손의 존재 하에, 주형 폴리뉴클레오티드가 DNA 수선 주형으로 사용되어, 주형 폴리뉴클레오티드에 포함된 5' 및/또는 3' 상동성 압과 같은 하나 이상의 상동성 압 및 유전자 파괴를 둘러싼 내인성 유전자 서열 사이 상동성에 근거한 HDR에 의해 표적화된 유전자 파괴 부위에서 또는 이의 근처에서 전이 유전자를 효과적으로 복제 및/또는 통합할 수 있다.

[0100] 일부 측면에서, 2개의 단계가 순차적으로 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 및 HDR 단계가 동시에 및/또는 하나의 실험 반응으로 수행된다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 및 HDR 단계가 하나 또는 연속적인 실험 반응(들)에서 연속적으로 또는 순차적으로 수행된다. 일부 구현예에서, 유전자 편집 및 HDR 단계가 동시에 또는 상이한 시간에 별도의 실험 반응으로 수행된다.

[0101] 면역 세포는 T 세포를 함유하는 세포 집단을 포함할 수 있다. 상기 세포는 말초 혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC) 샘플, 비분획된 T 세포 샘플, 림프구 샘플, 백혈구 샘플, 성분 채집술 생성물 또는 백혈구 성분 채집술 생성물에서 수득된 것과 같은 대상체에서 수득된 세포일 수 있다. 일부 구현예에서, T 세포와 같은 면역 세포는 1차 T 세포와 같은 1차 세포이다. 일부 구현예에서, T 세포가 분리 또는 선택되어 양성 또는 음성 선택 및 농축 방법을 사용하여 집단의 T 세포가 농축될 수 있다. 일부 구현예에서, 집단은 CD4+, CD8+ 또는 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 주형 폴리뉴클레오티드)의 도입 단계 및 제제(예를 들어, Cas9/gRNA RNP)의 도입 단계가 임의의 순서로 동시에 또는 순차적으로 발생할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드가 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(예를 들어, Cas9/gRNA RNP)의 도입과 동시에 도입된다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 주형이 제제(들)(예를 들어, Cas9/gRNA RNP)를 도입하는 단계에 의해 유전자 파괴를 유도한 후에 면역 세포로 도입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 주형 및 하나 이상의 제제(예를 들어, Cas9/gRNA RNP)의 도입 전, 동안 및/또는 후에, 세포가 세포의 증폭 및/또는 증식을 자극하는 조건 하에서 배양되거나 인큐베이션된다.

[0102] 제공된 방법의 특정 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드의 도입은 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제의 도입 후에 수행된다. 하나 이상의 제제(들)를 도입하는 임의의 방법이 유전자 파괴를 유도하는 데 사용된 특정 제제(들)에 따라 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. 일부 측면에서, 파괴가, 파괴된 *TGFBR2* 유전자 좌에 특이적인 유전자 편집, 예컨대 RNA 가이드 뉴클레아제, 예컨대 클러스터링되고 규칙적으로 산재된 짧은 팔린드롬 핵산(CRISPR)-Cas 시스템 예컨대, CRISPR-Cas9 시스템을 사용함으로써 수행된다. 일부 측면에서, 파괴가 *TGFBR2* 유전자 좌에 특이적인 CRISPR-Cas9 시스템을 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, *TGFBR2* 유전자 좌 영역을 표적화하는 표적화 도메인을 함유하는 Cas9 및 가이드 RNA(gRNA)를 함유하는 제제가 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 제제는 *TGFBR2* 표적화된 표적화 도메인을 함유하는 Cas9 및 gRNA의 리보뉴클레오타단백질(RNP) 복합체(Cas9/gRNA RNP)이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 도입은 시험관 내에서 세포와 제제 또는 이의 일부를 접촉시키는 것을 포함하며, 이는 최대 24, 36 또는 48시간 또는 3, 4, 5, 6, 7 또는 8일 동안 세포 및 제제를 배양 또는 인큐베이션하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 도입은 세포로 제제의 전달을 달성하는 것을 더 포함할 수 있다. 다양한 구현예에서, 본 발명에 따른 방법, 조성물 및 세포는, 예를 들어 전기 천공에 의해 세포로 Cas9 및 gRNA의 리보뉴클레오타단백질(RNP) 복합체의 직접적인 전달을 이용한다. 일부 구현예에서, RNP 복합체는 3' 폴리-A 꼬리 및 5' ARCA(Anti-Reverse Cap Analog) 캡을 포함하도록 변경된 gRNA를 포함한다. 일부 경우에, 변형된 세포의 전기 천공은 세포의 전기 천공 후 및 플레이팅 전에, 예를 들어, 32 °C에서 세포의 저온 충격을 포함한다.

[0103] 제공된 방법의 상기 측면에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 전기 천공을 통해 도입된 Cas9/gRNA RNP와 같은 하나 이상의 제제(들)를 도입한 후 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드는 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제의 도입 직후 도입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드는, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제의 도입 후 (약) 30 초 이내, (약) 1 분 이내, (약) 2 분 이내, (약) 3 분 이내, (약) 4 분 이내, (약) 5 분 이내, (약) 6 분 이내, (약) 6 분 이내, (약) 8 분 이내, (약) 9 분 이내, (약) 10 분 이내, (약) 15 분 이내, (약) 20 분 이내, (약) 30 분 이내, (약) 40 분 이내, (약) 50 분 이내, (약) 60

분 이내, (약) 90 분 이내, (약) 2 시간 이내, (약) 3 시간 이내 또는 (약) 4 시간 이내에 세포로 도입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드는, 하나 이상의 체제(들) 도입 후 (약) 15 분 내지 (약) 4 시간, 예컨대 (약) 15 분 내지 (약) 3 시간, (약) 15 분 내지 (약) 2 시간, (약) 15 분 내지 (약) 1 시간, (약) 15 분 내지 (약) 30 분, (약) 30 분 내지 (약) 4 시간, (약) 30 분 내지 (약) 3 시간, (약) 30 분 내지 (약) 2 시간, (약) 30 분 내지 (약) 1 시간, (약) 1 시간 내지 (약) 4 시간, (약) 1 시간 내지 (약) 3 시간, (약) 1 시간 내지 (약) 2 시간, (약) 2 시간 내지 (약) 4 시간, (약) 2 시간 내지 (약) 3 시간 또는 (약) 3 시간 내지 (약) 4 시간의 시기에 세포로 도입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 전기 천공을 통해 도입되었던 Cas9/gRNA RNP와 같은 하나 이상의 체제의 도입 후 (약) 2 시간에 세포로 도입된다.

[0104] 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드를 도입하는 임의의 방법이 세포로 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드의 전달을 위해 사용되는 특정 방법에 따라 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. 예시적인 방법은 바이러스, 예를 들어 레트로바이러스 또는 렌티바이러스, 형질 도입, 트랜스포손 및 전기천공을 통한 것을 포함하여 수용체를 암호화하는 핵산의 전달을 위한 방법을 포함한다. 특정 구현예에서, 바이러스 형질 도입 방법이 이용된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 시미안 바이러스 40(simian virus 40, SV40), 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus, AAV)로부터 유래된 벡터와 같은 재조합 감염성 바이러스 입자를 사용하여 세포 내로 전달되거나 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터, 예컨대 감마-레트로바이러스 벡터를 사용하여 T 세포 내로 전달된다(예를 들어, 문헌[Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93; Park et al., Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557]을 참조한다). 특정 구현예에서, 바이러스 벡터는 AAV2 또는 AAV6과 같은 AAV이다.

[0105] 일부 구현예에서, 세포와 체제를 접촉하기 전, 동안 또는 이후 및/또는 전달을 달성(예를 들어 전기 천공)하기 전, 동안 또는 이후에, 제공된 방법은 사이토카인, 자극제 및/또는 면역 세포(예를 들어, T 세포)의 증식, 자극 또는 활성화를 유도할 수 있는 체제의 존재 하에 세포를 인큐베이션하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부는 CD3에 특이적인 항체, CD28에 특이적인 항체 및/또는 사이토카인, 예컨대 항-CD3/항-CD28 비드이거나 이를 포함하는 자극제의 존재 하에 진행된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부는 재조합 IL-2, 재조합 IL-7 및/또는 재조합 IL-15 중 하나 이상과 같은 사이토카인의 존재 하에 진행된다. 일부 구현예에서, Cas9/gRNA RNP와 같은 하나 이상의 체제(들) 및 주형 폴리뉴클레오티드를 예를 들어 전기 천공을 통해 도입하기 전 또는 후 최대 8 일, 예컨대 최대 24 시간, 36 시간 또는 48 시간 또는 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 일 동안 인큐베이션한다.

[0106] 일부 구현예에서, 방법은 체제, 예를 들어 Cas9/gRNA RNP 및 폴리뉴클레오티드 주형을 도입하기 전 자극제(예를 들어, 항-CD3/항-CD28 항체)로 세포를 활성화 또는 자극하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9/gRNA RNP와 같은 하나 이상의 체제(들)를 예를 들어, 전기 천공을 통해 도입하기 전 자극제(예를 들어, 항-CD3/항-CD28)의 존재 하에 6 시간 내지 96 시간, 예컨대 24 내지 48 시간 또는 24 내지 36 시간 동안 인큐베이션한다. 일부 구현예에서, 자극제와의 인큐베이션은 재조합 IL-2, 재조합 IL-7 및/또는 재조합 IL-15 중 하나 이상과 같은 사이토카인의 존재를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 인큐베이션이, 재조합 사이토카인, 예컨대 IL-2(예를 들어, 1 U/mL 내지 500 U/mL, 예컨대 10 U/mL 내지 200 U/mL, 예를 들어 약 또는 50 U/mL 또는 100 U/mL 이상), IL-7(예를 들어, 0.5 ng/mL 내지 50 ng/mL, 예컨대 1 ng/mL 내지 20 ng/mL, 예를 들어, 약 또는 5 ng/mL 또는 10 ng/mL 이상) 또는 IL-15(예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 50 ng/mL, 예컨대 0.5 ng/mL 내지 25 ng/mL, 예를 들어, 약 또는 1 ng/mL 또는 5 ng/mL 이상)의 존재 하에 수행된다. 일부 구현예에서, 자극제(들)(예를 들어, 항-CD3/항-CD28 항체)가, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 체제(들), Cas9/gRNA RNP 및/또는 폴리뉴클레오티드 주형을 세포로 도입 또는 전달하기 전에 세척되거나 또는 세포에서 제거된다. 일부 구현예에서, 체제(들) 도입 전에, 예를 들어 임의의 자극제 또는 활성제를 제거함으로써 세포가 정치된다. 일부 구현예에서, 체제(들) 도입 전에, 자극제 또는 활성화제 및/또는 사이토카인이 제거되지 않는다.

[0107] 일부 구현예에서, 체제(들), 예를 들어 Cas9/gRNA 및/또는 폴리뉴클레오티드 주형의 도입 후에, 세포가 재조합 IL-2, 재조합 IL-7 및/또는 재조합 IL-15 중 하나 이상과 같은 재조합 사이토카인의 존재 하에 인큐베이션, 양식 또는 배양된다. 일부 구현예에서, 인큐베이션이, 재조합 사이토카인, 예컨대 IL-2(예를 들어, 1 U/mL 내지 500 U/mL, 예컨대 10 U/mL 내지 200 U/mL, 예를 들어 약 또는 50 U/mL 또는 100 U/mL 이상), IL-7(예를 들어, 0.5 ng/mL 내지 50 ng/mL, 예컨대 1 ng/mL 내지 20 ng/mL, 예를 들어, 약 또는 5 ng/mL 또는 10 ng/mL 이상)

또는 IL-15(예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 50 ng/mL, 예컨대 0.5 ng/mL 내지 25 ng/mL, 예를 들어, 약 또는 1 ng/mL 또는 5 ng/mL 이상)의 존재 하에 수행된다. 세포가 세포의 증식 또는 증폭을 유도하기 위한 조건 하에서 인큐베이션 또는 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포가 수확을 위한 세포의 역치 수, 예를 들어 치료적 유효 용량이 달성될 때까지 인큐베이션 또는 배양될 수 있다.

[0108] [115] 일부 구현예에서, 프로세스의 임의의 일부 또는 모든 프로세스 동안 30°C ± 2°C 내지 39°C ± 2°C, 예컨대 (약) 30°C ± 2°C, 32°C ± 2°C, 34°C ± 2°C 또는 37°C ± 2°C 이상의 온도에서 인큐베이션될 수 있다. 일부 구현예에서, 인큐베이션의 적어도 일부는 30°C ± 2°C이고, 인큐베이션의 적어도 일부는 37°C ± 2°C이다.

[0109] 일부 측면에서, 제공된 구현예는 재조합 수용체가 이종 또는 외인성 조절 또는 제어 요소, 예를 들어 이종 프로모터, 예컨대 구성적 프로모터 또는 조절 가능 프로모터의 제어 하에 발현되는 것을 허용한다. 일부 측면에서, 제공된 구현예는 재조합 수용체가 내인성 *TGFBR2* 조절 요소의 제어 하에 발현되는 것을 허용한다. 일부 측면에서, 제공된 구현예는 재조합 수용체를 암호화하는 핵산이 내인성 조절 또는 제어 요소, 예를 들어, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 프로모터 또는 5' 및/또는 3' 비번역 영역(UTR)과 같은 시스(cis) 조절 요소에 작동 가능하게 연결되는 것을 허용한다. 따라서, 일부 측면에서, 제공된 구현예는 재조합 수용체, 예를 들어 CAR이 발현되는 것을 허용하고/거나 발현이 내인성 *TGFBR2*와 유사한 수준으로 조절된다.

[0110] 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 유전자 파괴를 수행하고/거나 *TGFBR2* 유전자 좌로 재조합 또는 키메라 수용체의 일부와 같은 전이 유전자 서열의 표적화된 통합을 위해 HDR을 수행하는 예시적인 방법이 하기 하위 섹션에 기재된다.

[0111] **A. 유전자 파괴**

[0112] 일부 구현예에서, 하나 이상의 표적화된 유전자 파괴가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 유도된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 표적화된 유전자 파괴가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 또는 근처의 하나 이상의 표적 부위에서 유도된다. 일부 구현예에서, 표적화된 유전자 파괴가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손에서 유도된다. 일부 구현예에서, 표적화된 유전자 파괴가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 인트론에서 유도된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 표적화된 유전자 파괴 및 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드의 존재가, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 하나 이상의 유전자 파괴(예를 들어, 표적 부위) 또는 근처에서 전이 유전자 서열의 표적화된 통합을 초래할 수 있다.

[0113] 일부 구현예에서, 유전자 파괴가, 게놈의 하나 이상의 표적 부위에서 DNA 파손, 예컨대 이중 가닥 파손(double-strand break, DSB) 또는 절단 또는 닉, 예컨대 단일 가닥 파손(single-strand break, SSB)을 초래한다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴, 예를 들어 DNA 파손 또는 닉 부위에서, 세포의 DNA 수선 기제의 작용이 유전자의 전부 또는 일부의 녹아웃, 삽입, 미스센스 또는 프레임이동 돌연변이, 예컨대 이중 대립 프레임이동 돌연변이, 결실을 초래할 수 있거나; 또는 수선의 존재 하에 주형, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드가, 주형에 함유된 재조합 수용체의 전부 또는 일부를 암호화하는 전이 유전자와 같은 핵산 서열의 통합 또는 삽입과 같은 수선 주형에 근거하여 DNA 서열을 변경할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 유전자 또는 이의 일부의 하나 이상의 엑손에 대해 표적화될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 재조합 수용체를 암호화하는 외인성 서열, 예를 들어 전이 유전자 서열의 표적화된 통합의 바람직한 부위 근처에서 표적화될 수 있다.

[0114] 일부 구현예에서, 하나 이상의 표적 부위(들) 중 하나의 근처 영역에 있는 서열에 특이적으로 결합하거나 이와 혼성화하는 DNA 결합 단백질 또는 DNA 결합 핵산이 표적화된 파괴를 위해 사용된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자와 같은 핵산 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오티드 및 상동성 서열이, 여기, 예를 들어 섹션 I.B.에 기재된 바와 같이 유전자 파괴 부위 또는 근처에서 재조합 수용체 암호화 서열의 표적화된 통합을 위해 HDR에 의해 도입될 수 있다.

[0115] 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)를 도입함으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 상기 제제는 유전자에 특이적으로 결합하거나 혼성화하는 DNA 결합 단백질 또는 DNA 결합 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 제제는 DNA 표적화 단백질 및 뉴클레아제 또는 RNA 가이드 뉴클레아제를 포함하는 융합 단백질과 같은 다양한 구성 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제는 하나 이상의 표적 부위 또는 표적 위치를 표적화할 수 있다. 일부 측면에서, 표적 부위의 양쪽 측면 상에 한 쌍의 단일 가닥 파손(예를 들어, 닉)이 생성될 수 있다.

[0116] 제공된 구현예에서, 용어 "도입(introducing)"은 시험관 내 또는 생체 내에서 DNA와 같은 핵산 및/또는 단백질을 세포 내로 도입하는 다양한 방법을 포괄하며, 상기 방법은 형질 전환, 형질 도입, 형질 감염(예를 들어, 전

기 천공) 및 감염을 포함한다. 박터는 DNA 암호화 분자를 세포로 도입하는 데 유용하다. 가능한 박터는 플라스미드 박터 및 바이러스 박터를 포함한다. 바이러스 박터는 레트로바이러스 박터, 렌티바이러스 박터 또는 아데노바이러스 박터 또는 아데노 관련 박터와 같은 기타 박터를 포함한다. 전기 천공과 같은 방법이, 예를 들어 표적화 gRNA와 복합체로 Cas9 단백질을 함유하는 단백질 또는 리보뉴클레오단백질(RNP)을 관심 세포로 도입하거나 전달하는 데 또한 사용될 수 있다.

[0117] 일부 구현예에서, 유전자 파괴가, 예를 들어 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 표적 부위("표적 위치(target position)", "표적 DNA 서열(target DNA sequence)" 또는 "표적 위치(target location)"로도 공지됨)에서 발생한다. 일부 구현예에서, 표적 부위는 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 체제(들), 예를 들어 표적 부위를 지정하는 gRNA와 복합체를 이룬 Cas9 분자에 의해 변형된 표적 DNA(예를 들어, 게놈 DNA) 상의 부위를 포함한다. 예를 들어, 표적 부위는 절단 또는 DNA 파손이 발생하는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 DNA 내 위치를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자와 같은 핵산 서열의 HDR에 의한 통합이 표적 부위 또는 표적 서열 또는 근처에서 발생할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 부위는 하나 이상의 뉴클레오티드가 첨가되는 DNA 상에 2개의 뉴클레오티드, 예를 들어 인접한 뉴클레오티드 사이의 부위일 수 있다. 표적 부위는 주형 폴리뉴클레오티드에 의해 변경되는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 부위는 표적 서열(예를 들어, gRNA가 결합하는 서열) 내에 있다. 일부 구현예에서, 표적 부위는 표적 서열의 상류 또는 하류에 있다.

[0118] **1. 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 표적 부위**

[0119] 일부 구현예에서, 유전자 파괴 및/또는 상동성 지시 수선(HDR)을 통한 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자의 통합이, 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형 II(TGFBRII, *TGFBR2*, TGFR-2, TGFβ-RII, TGF베타-RII, TBR-ii, TBRII, AAT3, FAA3, LDS1B, LDS2, LDS2B, MFS2, RIIC 또는 TAAD2로도 공지됨)를 암호화하는 내인성 또는 게놈의 유전자 좌에서 표적화된다.

[0120] 인간에서, TGFBRII는 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형 II(*TGFBR2*) 유전자에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴 및 재조합 수용체를 암호화하는 전이 유전자의 통합이 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 인간 *TGFBR2* 유전자 좌에서 표적화된다. 일부 측면에서, 유전자 파괴는, 전이 유전자 서열의 표적화된 통합 또는 삽입이 *TGFBR2* 유전자 좌의 유전자 파괴 부위 또는 근처에서 발생하도록 TGFBRII를 암호화하는 개방형 판독 프레임(들)을 함유하는 *TGFBR2* 유전자 좌 내의 표적 부위에서 표적화된다. 일부 측면에서, 유전자 파괴가 TGFBRII를 암호화하는 개방형 판독 프레임의 엑손 또는 근처에서 표적화된다. 일부 측면에서, 유전자 파괴가 TGFBRII를 암호화하는 개방형 판독 프레임의 인트론 또는 근처에서 표적화된다.

[0121] TGFBRII 막관통 단백질은 세린/트레오닌 단백질 키나제 패밀리 및 TGFB 수용체 하위 패밀리의 멤버이다. TGFBRII는TGF 베타 유형 I 세린/트레오닌 키나제 수용체(TGFBRI), 형질 전환 성장 인자 베타(TGFβ) 사이토카인 TGFβ1, TGFβ2 및 TGFβ3에 대한 비-무차별적 수용체와 이중 2량체 복합체를 형성하여 사이토카인으로부터 신호를 전달하고, 상피 및 조혈 세포에서 세포 주기 정지, 중간엽 세포 증식 및 분화의 제어, 상처 치료, 세포 외 매트릭스 생성, 면역 억제 및 발암을 포함한 다양한 생리학적 및 병리학적 프로세스를 조절한다(예를 들어, 문헌[Yang et al., Trends Immunol. (2010) 31(6): 220-227; Oh et al., J Immunol. (2013) 191(8): 3973-3979; Principe et al., Cancer Res. (2016) 76(9): 2525-2539]을 참조한다).

[0122] 일부 측면에서, TGFβ는 잠재 형태로 합성되고, 활성화되어 TGFβ 수용체 TGFBRI 및 TGFBRII와 4량체 수용체 복합체의 형성이 가능해진다. 일부 측면에서, 사이토카인 2량체에 대칭적으로 결합된 2개의 TGFBRI 및 2개의 TGFBRII 분자로 구성된 수용체 복합체의 형성이, 구성적으로 활성화된 TGFBRII에 의해 TGFBRI의 인산화 및 활성화를 초래한다. 정규 SMAD 의존적 TGFβ 신호 전달 경로와 같은 일부 경우에, 활성화된 TGFBRI이, 수용체로부터 해리되고 SMAD4와 상호 작용하는 데카펜타플레그(decapentaplegic) 상동물 2(SMAD2)에 대해 모체를 인산화한다. SMAD2-SMAD4 복합체가 후속적으로 핵으로 전위되고, 여기서 TGFβ 조절된 유전자의 전사를 조절한다. 일부 측면에서, TGFBRII가 비정규 SMAD 비의존적 TGFβ 신호 전달 경로에 또한 포함될 수 있다.

[0123] 종양 또는 암의 상황에서, TGFβ가, 예를 들어 사이클린 의존적 키나제 억제제의 조절 장애, 세포 골격 구조의 변경, 프로테아제 및 세포 외 매트릭스 형성의 증가, 면역 감독의 감소 및 혈관 형성의 증가에 의해 종양을 촉진할 수 있다.

[0124] 일부 측면에서, TGFβ가, 복수의 면역 세포 계통의 증식, 분화 및 생존에 대한 영향을 통해 면역 반응을 제어하고 면역 항상성을 유지할 수 있다. 일부 측면에서, TGFβ1은 면역 시스템에서 발현된 1차 동형 단백질이고, 복

수의 유형의 면역 세포에 영향을 미치는 광범위한 조절 활성을 갖는다. T 세포에서와 같은 일부 상황에서, TGFBR2에 대한 TGFβ의 결합이 T 세포 활성화, 증식 및 분화를 하향 조절, 억제 또는 방해할 수 있다. TGFβ는 T 세포에 대한 영향을 통해 면역 내성을 또한 제어할 수 있다. 종양 미세 환경(TME)에 존재할 수 있는 면역 세포의 경우, TGFβ가 항종양 면역에 역효과를 가질 수 있고, 종양 면역 감도를 유의미하게 억제한다. 예를 들어, T 세포 특이적 프로모터 하에서 우성 음성 TGFBR2를 발현하는 유전자 이식 마우스는 자발적인 T 세포 분화 및 자가 면역 질환을 갖는 것으로 관찰되었다(예를 들어, 문헌[Gorelik et al., Nat. Rev. Immunol. (2002) 2(1):46-53]을 참조한다). 일부 측면에서, TGFβ는, 일부 경우에 페르포린, 그랜자임 및 세포 독소와 같은 복수의 핵심 분자를 암호화하는 유전자의 전사 억제를 통해 세포 독성 T 림프구의 세포 독성 활성을 직접 억제할 수 있다. 일부 측면에서, TGFβ는 CD8+ T 세포의 클론 증폭 및 세포 독성 활성을 조절하고, 이는 이어서 종양 진행 또는 종양 축진을 초래할 수 있다. 일부 측면에서, TGFβ는 CD4+ T 세포 분화 및 기능에 유의미한 영향을 또한 갖고, 조절 T 세포(Treg) 및 Th17 세포의 생성을 촉진한다(예를 들어, 문헌[Principe et al., Cancer Res. (2016) 76(9): 2525-2539]을 참조한다). 일부 측면에서, 종양 상황의 TGFβ는 종양 진행을 촉진하고 TGFβ 신호 전달 구성 요소, 예를 들어 TGFβ 수용체의 면역 억제 활성, 감소, 억제 또는 결실을 가질 수 있고, T 세포 분화, 기능 및 지속성을 향상시킬 수 있다.

[0125] 일부 측면에서, TGFβ는 암발생의 다양한 측면과 관련된다. 일부 상황에서, 손상된 TGFβ 신호 전달은 두경부 편평상피 세포 암종(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)에서 암 진행과 빈번하게 관련된다. 일부 상황에서, TGFBR2의 감소 또는 완전한 손실이 인간 HNSCC의 약 30% 내지 87%에서 관찰된다. 일부 측면에서, Smad4(22% 내지 51%) 및 Smad2(14% 내지 38%) 발현의 손실이 인간 HNSCC에서 보고되었다. 일부 측면에서, TGFβ 신호 전달이 상피 세포 부착의 손실, 세포 외 매트릭스 개조 및 향상된 혈관 형성에 의해 종양 진행에 또한 관여하여 예를 들어 상피에서 중간엽으로 전환의 축진을 초래할 수 있다. 일부 경우에, TGFβ의 수준이 정상 조직에 비해 HNSCC 샘플에서, 예를 들어 1.5 내지 7.5 배 증가로 상승되고; TGFβ 수준은 HNSCC가 인접한 조직 샘플의 44%에서 1.5 내지 5.3 배 증가로 관찰되었다.

[0126] 예시적인 인간 TGFBR2 전구체 폴리펩티드 서열이 서열 번호: 59(동형 단백질 1; 성숙한 폴리펩티드는 서열 번호: 59의 23-567 잔기를 포함하며; Uniprot 수탁 번호 P37173-1; NCBI 참조 서열: NP\_003233.4; 서열 번호: 61에 제시된 mRNA 서열, NCBI 참조 서열: NM\_003242.5를 참조한다) 또는 서열 번호: 60(동형 단백질 2; 성숙한 폴리펩티드는 서열 번호: 60의 23-592 잔기를 포함하며; Uniprot 수탁 번호 P37173-2; NCBI 참조 서열: NP\_001020018.1; 서열 번호: 62에 제시된 mRNA 서열, NCBI 참조 서열: NM\_001024847.2를 참조한다)에 제시된다. 2개의 동형 단백질은 대안적인 스플라이싱에 의해 생성된다.

[0127] 예시적인 성숙한 TGFBR2는 (서열 번호: 59에 제시된 인간 TGFBR2 전구체 서열(동형 단백질 1) 중 22-166 아미노산 잔기 또는 서열 번호: 60에 제시된 인간 TGFBR2 전구체 서열(동형 단백질 2) 중 22-191 아미노산 잔기를 포함하는) 세포 외 영역, (서열 번호: 59에 제시된 인간 TGFBR2 전구체 서열(동형 단백질 1) 중 167-187 아미노산 잔기 또는 서열 번호: 60에 제시된 인간 TGFBR2 전구체 서열(동형 단백질 2) 중 192-212 아미노산 잔기를 포함하는) 막관통 영역 및 (서열 번호: 59에 제시된 인간 TGFBR2 전구체 서열(동형 단백질 1) 중 188-567 아미노산 잔기 또는 서열 번호: 60에 제시된 인간 TGFBR2 전구체 서열(동형 단백질 2) 중 213-592 아미노산 잔기를 포함하는) 세포 내 영역을 함유한다. TGFBR2는 서열 번호: 59에 제시된 인간 TGFBR2 전구체 서열(동형 단백질 1)의 244-544 아미노산 잔기 또는 서열 번호: 60에 제시된 인간 TGFBR2 전구체 서열(동형 단백질 2)의 269-569 아미노산 잔기에 세린-트레오닌/티로신-단백질 키나제 촉매 도메인을 함유한다. 인간의 경우, TGFBR1, TGFBR2를 암호화하는 예시적인 게놈의 유전자 좌는, 동형 단백질 1을 암호화하는 전사 변이체에 대한 엑손 7 및 인트론 6 또는 동형 단백질 2를 암호화하는 전사 변이체에 대한 엑손 8 및 인트론 7을 함유하는 개방형 판독 프레임 을 포함한다.

[0128] 동형 단백질 1을 암호화하는 TGFBR2의 예시적인 mRNA 전사물은 인간 게놈 버전 GRCh38(UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly)을 참조하여 정방향 가닥 상의 염색체 3: 30,606,502-30,694,134에 대응하는 서열을 포괄할 수 있다. 표 1은 예시적인 인간 TGFBR2 유전자 좌의 동형 단백질 1을 암호화하는 전사물의 개방형 판독 프레임 및 비번역 영역의 엑손 및 인트론의 좌표를 제시한다.

**표 1**

예시적인 인간 *TGFBR2* 유전자 좌, 동형 단백질 1(GRCh38, 염색체 3, 정방향 가닥)의 엑손 및 인트론의 좌표

	시작 (GrCh38)	끝 (GrCh38)	길이
5' UTR 및 엑손 1	30,606,502	30,606,977	476
인트론 1-2	30,606,978	30,644,746	37,769
엑손 2	30,644,747	30,644,915	169
인트론 2-3	30,644,916	30,650,269	5,354
엑손 3	30,650,270	30,650,460	191
인트론 3-4	30,650,461	30,671,637	21,177
엑손 4	30,671,638	30,672,437	800
인트론 4-5	30,672,438	30,674,104	1,667
엑손 5	30,674,105	30,674,246	142
인트론 5-6	30,674,247	30,688,383	14,137
엑손 6	30,688,384	30,688,511	128
인트론 6-7	30,688,512	30,691,419	2,908
엑손 7 및 3' UTR	30,691,420	30,694,134	2,715

[0129]

[0130]

동형 단백질 2를 암호화하는 *TGFBR2*의 예시적인 mRNA 전사물은 인간 게놈 버전 GRCh38(UCSC Genome Browser on Human Dec. 2013 (GRCh38/hg38) Assembly)을 참조하여 정방향 가닥 상의 염색체 3: 30,606,601-30,694,142에 대응하는 서열을 포괄할 수 있다. 표 2는 예시적인 인간 *TGFBR2* 유전자 좌의 동형 단백질 2를 암호화하는 전사물의 개방형 판독 프레임 및 비번역 영역의 엑손 및 인트론의 좌표를 제시한다.

표 2

예시적인 인간 *TGFBR2* 유전자 좌, 동형 단백질 2(GrCh38, 염색체 3, 정방향 가닥)의 엑손 및 인트론의 좌표

	시작 (GrCh38)	끝 (GrCh38)	길이
5' UTR 및 엑손 1	30,606,601	30,606,977	377
인트론 1-2	30,606,978	30,623,198	16,221
엑손 2	30,623,199	30,623,273	75
인트론 2-3	30,623,274	30,644,746	21,473
엑손 3	30,644,747	30,644,915	169
인트론 3-4	30,644,916	30,650,269	5,354
엑손 4	30,650,270	30,650,460	191
인트론 4-5	30,650,461	30,671,637	21,177
엑손 5	30,671,638	30,672,437	800
인트론 5-6	30,672,438	30,674,104	1,667
엑손 6	30,674,105	30,674,246	142
인트론 6-7	30,674,247	30,688,383	14,137
엑손 7	30,688,384	30,688,511	128
인트론 7-8	30,688,512	30,691,419	2,908
엑손 8 및 3' UTR	30,691,420	30,694,142	2,723

[0131]

[0132]

일부 측면에서, 주형 폴리뉴클레오티드 내의 전이 유전자(예를 들어, 외인성 핵산 서열)가 사용되어 표적 부위 및/또는 상동성 암의 위치를 안내할 수 있다. 일부 측면에서, 유전자 파괴의 표적 부위가 가이드로서 사용되어 HDR을 위해 사용되는 주형 폴리뉴클레오티드 및/또는 상동성 암을 설계할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 (예를 들어, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는) 전이 유전자 서열의 표적화된 통합의 바람직한 부위 근처에서 표적화될 수 있다. 일부 측면에서, 유전자 파괴가 표적화되어 재조합 수용체를 암호화하는 전이 유전자의 통합 시, 내인성 *TGFBR2* 유전자의 발현이 감소 또는 제거된다. 일부 측면에서, 유전자 파괴가 표적화되어 재조합 수용체를 암호화하는 전이 유전자의 통합 시, 발현된 내인성 *TGFBR2* 유전자의 일부는 TGFBR1I의 우성 음성 형태 및/또는 TGFBR1I의 비기능성 형태를 암호화한다.

[0133]

특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌에서, 근처에서 또는 내에서 표적화된다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 (여기 표 1 및 2에 기재된 바와 같은) *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임에서, 근처에서 또는 내에서 표적화된다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 TCR α 불변 도메인을 암호화하는 개방형 판독 프레임에서, 근처에서 또는 내에서 표적화된다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 (여기 표 1 및 2에 기재된 바와 같은) *TGFBR2* 유전자 좌에서, 근처에서 또는 내에서 또는 (여기 표 1 및 2에 기재된 바와 같은) *TGFBR2* 유전자 좌의 전부 또는 일부, 예를 들어 500, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500 또는 4,000개 또는 이상의 인접한 뉴클레오티드에 대해 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9% 또는 이상의 서열 동일성을 갖는 서열에서 표적화된다.

[0134]

일부 측면에서, 표적 부위는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 내에 있다. 일부 측면에서,

표적 부위는 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 인트론 내에 있다. 일부 측면에서, 표적 부위는 *TGFBR2* 유전자 좌의 조절 또는 제어 요소, 예를 들어, 프로모터, 5' 비번역 영역(UTR) 또는 3' UTR 내에 있다. 일부 구현예에서, 표적 부위는 여기 표 1 및 2에 기재된 *TGFBR2* 게놈 영역 서열 또는 그 안에 함유된 *TGFBR2* 게놈 영역 서열의 임의의 엑손 또는 인트론 내에 있다.

[0135] 일부 구현예에서, 유전자 파괴를 위한 표적 부위는, 전이 유전자 서열의 통합 후에, 세포가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌로부터의 발현에 대해 녹아웃, 감소 및/또는 제거되도록 선택된다.

[0136] 일부 구현예에서, 유전자 파괴, 예를 들어 DNA 파손은 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임의 엑손 내에서 표적화된다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임의 제1 엑손, 제2 엑손, 제3 엑손 또는 제4 엑손 내에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임의 제1 엑손 내에 존재한다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임에 있는 제1 엑손의 5' 말단으로부터 500 염기 쌍(base pair, bp) 하류 내에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 엑손 1의 5' 뉴클레오티드와 엑손 1의 3' 뉴클레오티드의 상류 사이에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임에 있는 제1 엑손의 5' 말단으로부터 400 bp, 350 bp, 300 bp, 250 bp, 200 bp, 150 bp, 100 bp 또는 50 bp 하류 내에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임에 있는 제1 엑손의 5' 말단으로부터 1 bp 내지 400 bp, 50 내지 300 bp, 100 bp 내지 200 bp 또는 100 bp 내지 150 bp(각각의 수치 포함) 사이 하류에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임에 있는 제1 엑손의 5' 말단으로부터 100 bp 내지 150 bp(수치 포함) 사이 하류에 존재한다.

[0137] 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 (여기 표 1 또는 2에 기재된 바와 같은) 예시적인 인간 *TGFBR2* 유전자 좌의 동형 단백질 1을 암호화하는 전사물의 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 개방형 판독 프레임의 제 4 엑손 내에 존재한다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임에 있는 제4 엑손의 5' 말단으로부터 500 염기 쌍(bp) 하류 내에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 엑손 4의 5' 뉴클레오티드와 엑손 4의 3' 뉴클레오티드의 상류 사이에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임에 있는 제4 엑손의 5' 말단으로부터 400 bp, 350 bp, 300 bp, 250 bp, 200 bp, 150 bp, 100 bp 또는 50 bp 하류 내에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임에 있는 제4 엑손의 5' 말단으로부터 1 bp 내지 400 bp, 50 내지 300 bp, 100 bp 내지 200 bp 또는 100 bp 내지 150 bp(각각의 수치 포함) 사이 하류에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임에 있는 제4 엑손의 5' 말단으로부터 100 bp 내지 150 bp(수치 포함) 사이 하류에 존재한다.

[0138] 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 (여기 표 2에 기재된 바와 같은) 예시적인 인간 *TGFBR2* 유전자 좌의 동형 단백질 2를 암호화하는 전사물의 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 개방형 판독 프레임의 제5 엑손 내에서 표적화된다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임에 있는 제5 엑손의 5' 말단으로부터 500 염기 쌍(bp) 하류 내에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 엑손 5의 5' 뉴클레오티드와 엑손 5의 3' 뉴클레오티드의 상류 사이에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임에 있는 제5 엑손의 5' 말단으로부터 400 bp, 350 bp, 300 bp, 250 bp, 200 bp, 150 bp, 100 bp 또는 50 bp 하류 내에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임에 있는 제5 엑손의 5' 말단으로부터 1 bp 내지 400 bp, 50 내지 300 bp, 100 bp 내지 200 bp 또는 100 bp 내지 150 bp(각각의 수치 포함) 사이 하류에 존재한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 이의 개방형 판독 프레임에 있는 제5 엑손의 5' 말단으로부터 100 bp 내지 150 bp(수치 포함) 사이 하류에 존재한다.

[0139] 일부 측면에서, 표적 부위는 초기 코딩 영역에 대응하는 엑손과 같은 엑손 내에 존재한다. 일부 구현예에서, 표적 부위는, (여기 표 1 및 2에 기재된 바와 같은) 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 초기 코딩 영역에 대응하는 엑손, 예를 들어 엑손 1, 2, 3, 4 또는 5 내 또는 이와 매우 근접하여 존재하거나 또는 엑손 1, 2, 3, 4 또는 5 내 또는 엑손 1, 2, 3, 4 또는 5의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내의 전사 시작 부위 직후 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 표적 부위는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 1에 또는 엑손 1 근처, 예를 들어 엑손 1의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내에 존재한다. 일부 구현예에서, 표적 부위는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 2에 또는 엑손 2 근처, 또는 엑손 2의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내에 존재한다. 일부 측면에서, 표적 부위는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 3에 또는 엑손 3 근처, 예를 들어 엑손 3의 500, 450, 400, 350,

300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내에 존재한다. 일부 측면에서, 표적 부위는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 4에 또는 엑손 4 근처, 예를 들어 엑손 4의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내에 존재한다. 일부 측면에서, 표적 부위는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 5에 또는 엑손 5 근처, 예를 들어 엑손 5의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내에 존재한다. 일부 측면에서, 표적 부위는 *TGFBR2* 유전자 좌의 조절 또는 제어 요소, 예를 들어, 프로모터 내에 존재한다.

[0140] 일부 측면에서, 표적 부위는, 전이 유전자의 표적화된 통합이 *TGFBR2*의 우성 음성(DN) 형태를 암호화하는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌를 생성하도록 선택된다. 일부 측면에서, TGFBR2의 우성 음성 형태는, 세포에서 발현될 경우, TGFβ 수용체 복합체에 의한 신호 전달을 억제, 감소 또는 방해할 수 있는 TGFBR2의 변이체를 포함한다. 일부 측면에서, TGFBR2의 예시적인 우성 음성 형태는, 절단형 TGFBR2, 예컨대 세포질 도메인의 전부 또는 일부가 결여된 TGFBR2를 포함한다. 일부 구현예에서, 우성 음성 TGFBR2는, 예를 들어 문헌[Wieser et al., (1993) Mol. Cell Biol. 13(12): 7239-247; Brand et al., (1995) JBC 270: 8274-8284; Bottinger et al., (1997) EMBO J 16(10): 2621-2633; Shah et al., (2002) Cancer Res 62:7135-7138; Bollard et al. (2002) Gene Therapy 99(9): 3179-87; 및 Zhang et al., (2013) Gene Therapy 20: 575-580; 및 Pang et al. (2013) Cancer Discov. 3(8): 936-951]에 기재된 것을 포함한다.

[0141] 일부 측면에서, TGFBR2의 예시적인 우성 음성 형태는, 예를 들어 서열 번호: 59에 제시된 인간 TGFBR2 전구체 서열(동형 단백질 1)의 188-567 아미노산 잔기 또는 서열 번호: 60에 제시된 인간 TGFBR2 전구체 서열(동형 단백질 2)의 213-592 아미노산 잔기를 포함하는 TGFBR2의 세포 내 영역에 있는 하나 이상의 아미노산 잔기, 선택적으로 하나 이상의 인접한 아미노산 잔기의 결실을 함유하는 TGFBR2를 포함한다. 일부 측면에서, TGFBR2의 예시적인 우성 음성 형태는 서열 번호: 59에 제시된 아미노산 서열의 22-191 잔기에 대응하는 아미노산 서열 또는 서열 번호: 60에 제시된 아미노산 서열의 22-216 잔기에 대응하는 아미노산 서열 또는 상기 또는 이의 단편에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0142] 일부 측면에서, 표적 부위는 TGFBR2의 세포 내 영역, 예를 들어 서열 번호: 59에 제시된 인간 TGFBR2 전구체 서열(동형 단백질 1)의 188-567 아미노산 잔기 또는 서열 번호: 60에 제시된 인간 TGFBR2 전구체 서열(동형 단백질 2)의 213-592 아미노산 잔기를 암호화하는 내인성 개방형 판독 프레임의 시작 또는 근처에 위치한다. 일부 구현예에서, 표적 부위는 (여기 표 1에 기재된 바와 같은) 예시적인 인간 *TGFBR2* 유전자 좌의 동형 단백질 1을 암호화하는 전사물의 개방형 판독 프레임의 엑손 4 또는 이의 근처 또는 (여기 표 1에 기재된 바와 같은) 예시적인 인간 *TGFBR2* 유전자 좌의 동형 단백질 1을 암호화하는 전사물의 개방형 판독 프레임의 엑손 4의 3' 뒤, 하류 또는 (여기 표 2에 기재된 바와 같은) 예시적인 인간 *TGFBR2* 유전자 좌의 동형 단백질 2를 암호화하는 전사물의 개방형 판독 프레임의 엑손 5 또는 이의 근처 또는 (여기 표 2에 기재된 바와 같은) 예시적인 인간 *TGFBR2* 유전자 좌의 동형 단백질 2를 암호화하는 전사물의 개방형 판독 프레임의 엑손 5의 3' 뒤, 하류에 위치한다. 일부 구현예에서, 표적 부위의 유전자 파괴 및 전이 유전자 서열, 예를 들어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열의 표적화된 통합의 도입 시, 암호화된 폴리펩티드는 TGFBR2의 우성 음성 형태인 TGFBR2 폴리펩티드의 일부 및 재조합 수용체를 포함할 것이다. 일부 구현예에서, 표적 부위의 유전자 파괴 및 전이 유전자 서열, 예를 들어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하고 2A 요소와 같은 리보솜 건너뛰기 요소를 함유하는 전이 유전자 서열의 표적화된 통합의 도입 시, 암호화된 폴리펩티드는 TGFBR2의 우성 음성 형태인 TGFBR2 폴리펩티드의 일부, 리보솜 건너뛰기 서열 및 재조합 수용체를 포함할 것이다. 따라서, 리보솜 건너뛰기 및/또는 자가 절단 시, 암호화된 폴리펩티드는 TGFBR2의 우성 음성 형태 및 재조합 수용체를 생성할 것이다.

[0143] 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2* 유전자 좌에서, 근처에서 또는 내에서 표적화된다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 (여기 표 1 또는 2에 기재된 바와 같은) *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임에서, 근처에서 또는 내에서 표적화된다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴는 *TGFBR2*를 암호화하는 개방형 판독 프레임에서, 근처에서 또는 내에서 표적화된다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 (여기 표 1 또는 2에 기재된 바와 같은) *TGFBR2* 유전자 좌에서, 근처에서 또는 내에서 또는 (여기 표 1 또는 2에 기재된 바와 같은) *TGFBR2* 유전자 좌의 전부 또는 일부, 예를 들어 500, 1,000, 1,500, 2,000, 2,500, 3,000, 3,500 또는 4,000개 또는 이상의 인접한 뉴클레오티드에 대해 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 99.9% 또는 이상의 서열 동일성을 갖는 서열에서 표적화된다.

[0144] **2. 유전자 파괴 방법**

- [0145] 일부 측면에서, 유전자 조작된 세포를 생성하기 위한 방법은 하나 이상의 표적 부위(들), 예를 들어 *TGFBR2* 유전자 좌의 하나 이상의 표적 부위에 유전자 파괴를 도입하는 단계를 포함한다. 여기에 기재된 것을 포함하여 유전자 파괴를 생성하기 위한 방법은 내인성 또는 게놈 DNA의 표적 부위 또는 표적 위치에서 유전자 파괴, 절단 및/또는 이중 가닥 파손(double strand break, DSB) 또는 닉(예를 들어, 단일 가닥 파손(single strand break, SSB))을 유도하는 조작 시스템과 같은 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)의 사용을 포함할 수 있어서 NHEJ(non-homologous end joining)와 같은 오류 발생 프로세스에 의한 파손의 수선 또는 주형 수선을 이용하는 HDR에 의한 수선이 표적 부위 또는 위치에서 또는 근처에서 관심 서열(예를 들어, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 외인성 핵산 서열 또는 전이 유전자)의 삽입을 초래할 수 있다. 여기에 제공된 방법에 사용하기 위한 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)가 또한 제공된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 제제(들)가 전이 유전자 서열의 상동성 지시 수선(HDR) 매개 표적화된 통합을 위해 여기에 제공된 주형 뉴클레오티드와 조합하여 사용될 수 있다.
- [0146] 일부 구현예에서, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)는 게놈의 특정 부위 또는 위치, 예를 들어 표적 부위 또는 표적 위치에 특이적으로 결합하거나 혼성화하는 DNA 결합 단백질 또는 DNA 결합 핵산을 포함한다. 일부 측면에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 표적화된 유전자 파괴, 예를 들어 DNA 파손 또는 절단은, 예컨대 키메라 또는 융합 단백질로 유전자 편집 뉴클레아제에 결합되거나 이와 복합체를 형성한 단백질 또는 핵산을 사용하여 달성된다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)는 RNA-가이드 뉴클레아제 또는 DNA 표적화 단백질 및 뉴클레아제를 포함하는 융합 단백질을 포함한다.
- [0147] 일부 구현예에서, 제제는 RNA 가이드 뉴클레아제 또는 DNA 표적화 단백질 및 뉴클레아제를 포함하는 융합 단백질과 같은 다양한 구성 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적화된 유전자 파괴는 엔도뉴클레아제와 같은 뉴클레아제에 융합된 하나 이상의 아연 핑거 단백질(zinc finger protein, ZFP) 또는 전사 활성화제 유사 이펙터(transcription activator-like effector, TALE)와 같은 DNA 결합 단백질을 포함하는 DNA 표적화 분자를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 표적화된 유전자 파괴는 클러스터링되고 규칙적으로 산재된 짧은 팔린드롬 핵산(clustered regularly interspaced short palindromic nucleic acid, CRISPR) 결합 뉴클레아제(Cas) 시스템(Cas 및/또는 Cfp1 포함)과 같은 RNA 가이드 뉴클레아제를 사용하여 수행된다. 일부 구현예에서, 표적화된 유전자 파괴는, 하나 이상의 표적 부위(들), 유전자 또는 이의 일부의 서열에 표적화되도록 특이적으로 설계된 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제, 예컨대 DNA 결합 표적화된 뉴클레아제 및 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN) 및 전사 활성화제 유사 이펙터 뉴클레아제(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)와 같은 유전자 편집 뉴클레아제를 포함한 서열 특이적 또는 표적화된 뉴클레아제 및 CRISPR 결합 뉴클레아제(Cas) 시스템과 같은 RNA 가이드 뉴클레아제를 사용하여 수행된다. 예시적인 ZFN, TALE 및 TALEN이 예를 들어, 문헌[Lloyd *et al.*, *Frontiers in Immunology*, 4(221): 1-7 (2013)]에 기재되어 있다.
- [0148] 아연 핑거 단백질(ZFP), 전사 활성화제 유사 이펙터(TALE) 및 CRISPR 시스템 결합 도메인은, 예를 들어 자연적으로 발생하는 ZFP 또는 TALE 단백질의 인식 나선 영역의 조작(하나 이상의 아미노산 변경)을 통해 미리 결정된 뉴클레오티드 서열에 결합하도록 “조작(engineered)” 될 수 있다. 조작된 DNA 결합 단백질(ZFP 또는 TALE)은 자연적으로 발생하지 않는 단백질이다. 설계에 대한 합리적인 기준은 기존 ZFP 및/또는 TALE 설계 및 결합 데이터의 정보를 저장하는 데이터베이스의 정보를 처리하기 위한 대체 규칙 및 전산화된 알고리즘의 적용을 포함한다. 예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 6,140,081; 6,453,242; 및 6,534,261; 또한 국제 출원 WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 및 WO 03/016496 및 미국 공개 번호 20110301073]을 참조한다.
- [0149] 일부 구현예에서, 하나 이상의 제제(들)가 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 근처의 하나 이상의 표적 부위(들)를 특이적으로 표적화한다. 일부 구현예에서, 제제는 표적 부위(들)에 특이적으로 결합, 인식 또는 혼성화하는 ZFN, TALEN 또는 CRISPR/Cas9 조합물을 포함한다. 일부 구현예에서, CRISPR/Cas9 시스템은 특정 절단을 가이드하는 조작된 crRNA/tracrRNA (“단일 가이드 RNA(single guide RNA)”)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제는 Argonaute 시스템(예를 들어, 'TtAgo'(Swarts *et al.* (2014) *Nature* 507(7491): 258-261)로 공지된 *T. thermophilus* 유래)에 근거한 뉴클레아제를 포함한다. 여기에 기재된 임의의 뉴클레아제 시스템을 사용한 표적화된 절단이 개발되어 HDR 또는 NHEJ 매개 프로세스를 이용하여 핵산 서열, 예를 들어, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 특정 표적 위치로 삽입시킬 수 있다.
- [0150] 일부 구현예에서, “아연 핑거 DNA 결합 단백질(zinc finger DNA binding protein)” (또는 결합 도메인)은 아연 이온의 배위를 통해 구조가 안정화된 결합 도메인 내 아미노산 서열 영역인, 하나 이상의 아연 핑거를 통해 서열 특이적 방식으로 DNA에 결합하는 단백질 또는 보다 큰 단백질 내 도메인이다. 아연 핑거 DNA 결합 단백질 용어는 종종 아연 핑거 단백질 또는 ZFP로 축약된다. ZFP 중에 전형적으로 9-18 뉴클레오티드 길이이고, 개별

핑거의 조립에 의해 생성된, 특정 DNA 서열을 표적화하는 인공 ZFP 도메인이 있다. ZFP는 단일 핑거 도메인이 약 30 개의 아미노산 길이며 단일 베타 턴의 2 개의 시스테인과 아연을 통해 배워진 2 개의 불변 히스티딘 잔기를 함유하고 2, 3, 4, 5 또는 6 개의 핑거를 갖는 알파 나선을 함유하는 것을 포함한다. 일반적으로, ZFP의 서열 특이성이 아연 핑거 인식 나선 상의 4 개의 나선 위치(-1, 2, 3 및 6)의 아미노산 치환에 의해 변경될 수 있다. 따라서, 예를 들어, ZFP 또는 ZFP 함유 분자는 자연적으로 발생하지 않으며, 예를 들어, 선택 표적 부위에 결합하도록 조작된다.

[0151] 일부 경우에, DNA 표적화 분자는 DNA 절단 도메인에 융합된 아연 핑거 DNA 결합 도메인이거나 이를 포함하여 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN)를 형성한다. 예를 들어, 융합 단백질은 하나 이상의 IIS 유형 제한 효소 유래 절단 도메인(또는 절단 하프 도메인) 및 하나 이상의 아연 핑거 결합 도메인을 포함하며, 이는 조작되거나 조작되지 않을 수 있다. 일부 경우에, 절단 도메인은, 하나의 가닥 상의 제한 부위로부터 9 개의 뉴클레오티드 및 나머지 다른 가닥 상의 제한 부위로부터 13 개의 뉴클레오티드에서 DNA의 이중 가닥 절단을 일반적으로 촉매하는 IIS 유형 제한 엔도뉴클레아제 FokI 유래이다. 예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 5,356,802; 5,436,150 및 5,487,994; Li *et al.* (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4275-4279; Li *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:2764-2768; Kim *et al.* (1994a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:883-887; Kim *et al.* (1994b) J. Biol. Chem. 269: 978-982]을 참조한다. 일부 유전자-특이적 조작된 아연 핑거가 상업적으로 이용 가능하다. 예를 들어, 수 천개의 표적에 대해 특이적으로 표적화된 아연 핑거를 제공하는, 아연 핑거 작제물에 대해 CompoZr로 명명되는 플랫폼이 이용 가능하다. 예를 들어, 문헌[Gaj *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 2013, 31(7), 397-405]을 참조한다. 일부 경우에, 상업적으로 이용 가능한 아연 핑거가 사용되거나 맞춤 설계된다.

[0152] 일부 구현예에서, 예를 들어, *TGFBR2* 유전자 좌 내 하나 이상의 표적 부위(들)가 조작된 ZFN에 의한 유전자 파괴를 위해 표적화될 수 있다. 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌를 표적화하는 예시적인 ZFN은 예를 들어, NCBI 수탁 번호 NM\_029575.3 또는 NM\_031132에 설명된 플라스미드에 의해 암호화된 것을 포함한다.

[0153] 전사 활성화제 유사 이펙터(TALE)는 복수의 반복 서열을 포함하는 *Xanthomonas* 세균 종 유래 단백질이며, 각각의 반복은 핵산 표적화 서열의 각 뉴클레오티드 염기에 특이적인 12 및 13 위치의 2-잔기(RVD)를 포함한다. 유사한 모듈의 염기 당 염기 핵산 결합 특성을 가진 결합 도메인(MBBBD)이 상이한 세균 종에서 또한 유래될 수 있다. 새로운 모듈 단백질은 TAL 반복보다 더 많은 서열 가변성을 나타내는 장점이 있다. 일부 구현예에서, 상이한 뉴클레오티드 인식에 관련된 RVD는 C 인식을 위한 HD, T 인식을 위한 NG, A 인식을 위한 NI, G 또는 A 인식을 위한 NN, A, C, G 또는 T 인식을 위한 NS, T 인식을 위한 HG, T 인식을 위한 IG, G 인식을 위한 NK, C 인식을 위한 HA, C 인식을 위한 ND, C 인식을 위한 HI, G 인식을 위한 HN, G 인식을 위한 NA, G 또는 A 인식을 위한 SN 및 T 인식을 위한 YG, A 인식을 위한 TL, A 또는 G 인식을 위한 VT 및 A 인식을 위한 SW이다. 일부 구현예에서, 중요한 아미노산 12 및 13은 A, T, C 및 G 뉴클레오티드에 대한 특이성을 조절하고 특히 상기 특이성을 향상시키기 위해 다른 아미노산 잔기로 돌연변이될 수 있다.

[0154] 일부 구현예에서, "TALE DNA 결합 도메인(TALE DNA binding domain)" 또는 "TALE"는 하나 이상의 TALE 반복 도메인/단위를 포함하는 폴리펩티드이다. 반복 가변 2잔기(repeat variable diresidue, RVD)를 각각 포함하는 반복 도메인은 코그니트(cognate) 표적 DNA 서열에 대한 TALE의 결합에 관여한다. 단일 "반복 단위(repeat unit)"("반복(repeat)")으로도 지칭)는 전형적으로 33-35 개의 아미노산 길이며, 자연 발생 TALE 단백질 내 다른 TALE 반복 서열과 적어도 일부 서열 상동성을 나타낸다. TALE 단백질은 반복 단위 내 정규 또는 비정규 RVD를 사용하여 표적 부위에 결합하도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 8,586,526 및 9,458,205]을 참조한다.

[0155] 일부 구현예에서, "TALE 뉴클레아제(TALE-nuclease)" (TALEN)는 전사 활성화제 유사 이펙터(TALE)에서 전형적으로 유래된 핵산 결합 도메인 및 핵산 표적 서열을 절단하는 뉴클레아제 촉매 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 촉매 도메인은 뉴클레아제 도메인 또는 예를 들어, I-TevI, ColE7, NucA 및 Fok-I과 같은 엔도뉴클레아제 활성을 갖는 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, TALE 도메인은, 예를 들어 I-CreI 및 I-OnuI과 같은 메가뉴클레아제 또는 이의 기능적 변이체에 융합될 수 있다. 일부 구현예에서, TALEN은 단량체 TALEN이다. 단량체 TALEN은 문헌[국제 출원 WO2012138927]에 기재된 I-TevI의 촉매 도메인과 조작된 TAL 반복의 융합과 같이 특이적 인식 및 절단을 위해 2량체화가 필요없는 TALEN이다. TALEN이 유전자 표적화 및 유전자 변형을 위해 기재되었고 사용되었다(예를 들어, 문헌[Boch *et al.* (2009) Science 326(5959): 1509-12.; Moscou and Bogdanove (2009) Science 326(5959): 1501; Christian *et al.* (2010) Genetics 186(2): 757-61; Li *et al.* (2011) Nucleic Acids Res 39(1): 359-72] 참조). 일부 구현예에서, *TGFBR2* 유전자 좌의 하나 이상의 부위가 조작된

TALEN에 의한 유전자 파괴를 위해 표적화될 수 있다.

- [0156] 일부 구현예에서, "TtAgo"는 유전자 침묵에 관여하는 것으로 생각되는 원핵 생물 아르고누테(Argonaute) 단백질이다. TtAgo는 *Thermus thermophilus* 세균에서 유래된다. 예를 들어, 문헌[Swarts et al., (2014) Nature 507(7491): 258-261, G. Sheng et al., (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 111, 652]을 참조한다. "TtAgo 시스템(TtAgo system)"은 예를 들어, TtAgo 효소에 의한 절단을 위해 가이드 DNA를 포함한 필요한 모든 구성 요소이다.
- [0157] 일부 구현예에서, 조작된 아연 핑거 단백질, TALE 단백질 또는 CRISPR/Cas 시스템은 자연에서 발견되지 않으며, 이의 생성은 과지 디스플레이, 상호 작용 트랩 또는 하이브리드 선택과 같은 경험적 프로세스에서 주로 발생한다. 예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 5,789,538; 미국 특허 번호 5,925,523; 미국 특허 번호 6,007,988; 미국 특허 번호 6,013,453; 미국 특허 번호 6,200,759; 국제 출원 WO 95/19431; 국제 출원 WO 96/06166; 국제 출원 WO 98/53057; 국제 출원 WO 98/54311; 국제 출원 WO 00/27878; 국제 출원 WO 01/60970; 국제 출원 WO 01/88197 및 국제 출원 WO 02/099084]을 참조한다.
- [0158] 아연 핑거 및 TALE DNA 결합 도메인은, 예를 들어 자연 발생 아연 핑거 단백질의 인식 나선 영역의 조작(하나 이상의 아미노산 변경)을 통해 또는 DNA 결합에 관여하는 (반복 가변 2잔기 또는 RVD 영역) 아미노산의 조작에 의해 미리 결정된 뉴클레오티드 서열에 결합하도록 조작될 수 있다. 따라서, 조작된 아연 핑거 단백질 또는 TALE 단백질은 자연적으로 발생하지 않는 단백질이다. 아연 핑거 단백질 및 TALE 조작을 위한 비제한적인 방법의 예는 설계 및 선택이다. 설계된 단백질은 이의 설계/구성이 주로 합리적인 기준에서 발생하는 자연에서 발생하지 않는 단백질이다. 설계를 위한 합리적인 기준은, 기존 ZFP 또는 TALE 설계(정규 및 비정규 RVD) 및 결합 데이터의 정보를 저장하는 데이터베이스의 정보를 처리하기 위한 대체 규칙 및 전산화된 알고리즘의 적용을 포함한다. 예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 9,458,205; 8,586,526; 6,140,081; 6,453,242; 및 6,534,261; 또한 국제 출원 WO 98/53058; WO 98/53059; WO 98/53060; WO 02/016536 및 WO 03/016496]을 참조한다.
- [0159] 게놈 DNA의 표적화된 절단을 위한 다양한 방법 및 조성물이 기재되었다. 상기 표적화된 절단 이벤트가 이용되어, 예를 들어 표적화된 돌연변이 유발을 유도하고, 세포 DNA 서열의 표적화된 결실을 유도하고, 미리 결정된 염색체 유전자 좌의 표적화된 재조합을 촉진할 수 있다. 예를 들어, 이의 개시 전체가 참조로 포함된 문헌 [미국 특허 번호 9,255,250; 9,200,266; 9,045,763; 9,005,973; 9,150,847; 8,956,828; 8,945,868; 8,703,489; 8,586,526; 6,534,261; 6,599,692; 6,503,717; 6,689,558; 7,067,317; 7,262,054; 7,888,121; 7,972,854; 7,914,796; 7,951,925; 8,110,379; 8,409,861; 미국 특허 공개 번호 20030232410; 20050208489; 20050026157; 20050064474; 20060063231; 20080159996; 201000218264; 20120017290; 20110265198; 20130137104; 20130122591; 20130177983; 20130196373; 20140120622; 20150056705; 20150335708; 20160030477 및 20160024474]을 참조한다.
- [0160] a. CRISPR/Cas9
- [0161] 일부 구현예에서, 인간의 경우 내인성 유전자 *TGFBR2*의 표적화된 유전자 파괴, 예를 들어 DNA 파손이 클러스터링되고 규칙적으로 산재된 짧은 팔린드롬 반복(CRISPR) 및 CRISPR 결합(Cas) 단백질을 사용하여 수행된다. 문헌 [Sander and Joung, (2014) Nature Biotechnology, 32(4): 347-355]을 참조한다.
- [0162] 일반적으로, "CRISPR 시스템(CRISPR system)"은, Cas 유전자를 암호화하는 서열, tracr(트랜스 활성화 CRISPR) 서열(예를 들어, tracrRNA 또는 활성 부분 tracrRNA), (내인성 CRISPR 시스템의 상황에서 "동향 반복(direct repeat)" 및 tracrRNA 프로세싱된 부분 동향 반복을 포괄하는) tracr-메이트 서열, 가이드 서열(내인성 CRISPR 시스템 상황에서 "스페이스(spacer)"로도 지칭됨) 및/또는 CRISPR 유전자 좌의 다른 서열 및 전사물을 포함하여, CRISPR 결합("Cas") 유전자의 발현 또는 이의 활성을 지시하는 데 관여하는 전사물 및 다른 요소를 집합적으로 지칭한다.
- [0163] 일부 측면에서, CRISPR/Cas 뉴클레아제 또는 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템은 DNA에 서열 특이적으로 결합하는 비코딩 가이드 RNA(gRNA) 및 뉴클레아제 기능을 갖는 Cas 단백질(예를 들어, Cas9)을 포함한다.
- [0164] 유전자 파괴를 도입할 수 있는 하나 이상의 제제가 또한 제공된다. 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들) 중 하나 이상의 구성 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 핵산 분자)가 또한 제공된다.
- [0165] (i) 가이드 RNA(gRNA)
- [0166] 일부 구현예에서, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)는, *TGFBR2* 유전자 좌의 표적 부위에 상

보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA) 또는 gRNA를 암호화하는 하나 이상의 핵산 중 하나 이상을 포함한다.

- [0167] 일부 측면에서, “gRNA 분자(gRNA molecule)” 는, 세포의 게놈 DNA 상의 유전자 좌와 같은 핵산을 표적화하도록 gRNA 분자/Cas9 분자 복합체의 특이적 표적화 또는 귀소를 촉진하는 핵산이다. gRNA 분자는 (단일 RNA 분자를 갖는) 단분자일 수 있으며, 여기서 “키메라(chimeric)” gRNA 또는 (하나 이상 및 전형적으로 2 개의, 분리된 RNA 분자를 포함하는) 모듈로 때때로 지칭될 수 있다. 일반적으로, 가이드 서열, 예를 들어 가이드 RNA는, 예컨대 인간의 *TGFBR2* 유전자 좌에서 표적 폴리뉴클레오티드 서열과 충분한 상보성을 가져서 표적 부위의 표적 서열과 혼성화하고 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열 특이적 결합을 지시하는 적어도 서열 일부를 포함하는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열이다. 일부 구현예에서, CRISPR 복합체 형성의 정황에서, “표적 서열(target sequence)”은 가이드 서열이 상보성을 갖도록 설계된 서열이며, 여기서 표적 서열과 가이드 RNA의 도메인, 예를 들어 표적화 도메인 사이의 혼성화가 CRISPR 복합체의 형성을 촉진한다. 혼성화를 유발하고 CRISPR 복합체의 형성을 촉진하기에 충분한 상보성이 있다면 완전한 상보성이 반드시 필요한 것은 아니다. 일반적으로, 가이드 서열이 선택되어 가이드 서열 내 2 차 구조의 정도가 감소된다. 2 차 구조는 임의의 적합한 폴리뉴클레오티드 폴딩 알고리즘에 의해 결정될 수 있다.
- [0168] 일부 구현예에서, (예를 들어, 인간의 *TGFBR2* 유전자 좌에서) 관심 표적 유전자 좌에 특이적인 가이드 RNA(gRNA)가 RNA 가이드 뉴클레아제, 예를 들어 Cas에 대해 사용되어 표적 부위 또는 표적 위치에서 DNA 과손을 유도한다. gRNA 및 예시적인 표적화 도메인을 설계하는 방법인, 예를 들어, 문헌[PCT 국제 출원 공개 번호 W02015/161276, W02017/193107 및 W02017/093969]에 기재된 것들을 포함할 수 있다.
- [0169] 그 위에 표시된 도메인과 함께 몇몇 예시적인 gRNA 구조가 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 1A-1G]에 기재되어 있다. gRNA 활성 형태의 3 차원 형태 또는 가닥 내 또는 가닥 간 상호 작용에 관하여 이론에 구속되길 바라지 않지만, 높은 상보성 영역이 국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 1A-1G 및 여기 제공된 다른 도면에서 때때로 이중 영역으로 도시된다.
- [0170] 일부 경우에, gRNA는, 5'에서 3' 방향으로: (서열 번호: 74에 제시된 서열을 코딩하는) *TGFBR2* 유전자의 서열과 같은 표적 핵산에 상보적인 표적화 도메인; 제1 상보성 도메인; 연결 도메인; (제1 상보성 도메인에 상보적인) 제2 상보성 도메인; 근위 도메인; 및 선택적으로 꼬리 도메인;을 포함하는 단분자 또는 키메라 gRNA이다.
- [0171] 다른 경우에, gRNA는 제1 및 제2 가닥을 포함하는 모듈식 gRNA이다. 상기 경우에, 제1 가닥은 바람직하게는 5'에서 3' 방향으로: (서열 번호: 74 또는 76에 제시된 서열을 코딩하는 *TGFBR2* 유전자의 서열과 같은 표적 핵산에 상보적인) 표적화 도메인 및 제1 상보성 도메인을 포함한다. 제2 가닥은 일반적으로 5'에서 3' 방향으로: 선택적으로 5' 연장 도메인; 제2 상보성 도메인; 근위 도메인; 및 선택적으로 꼬리 도메인;을 포함한다.
- [0172] (a) 표적화 도메인
- [0173] 표적화 도메인은 표적 핵산 상의 표적 서열에 대해 상보적인, 예를 들어 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 이상 상보적인, 예를 들어 완전히 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 표적 서열을 포함하는 표적 핵산의 가닥이 표적 핵산의 “상보적 가닥(complementary strand)”으로 여기서 지칭된다. 표적화 도메인 선택에 대한 지침을, 예를 들어, 문헌[Fu Y *et al.*, Nat Biotechnol 2014 (doi: 10.1038/nbt.2808) 및 Sternberg SH *et al.*, Nature 2014 (doi: 10.1038/nature13011)]에서 찾을 수 있다. 표적화 도메인의 배치의 예가 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 1A-1G]에 기재된 것들을 포함한다.
- [0174] 표적화 도메인은 RNA 분자의 일부이며, 따라서 우라실(U) 염기를 포함하나, gRNA 분자를 암호화하는 임의의 DNA는 티민(T) 염기를 포함할 것이다. 이론에 구속되길 바라지 않지만, 일부 구현예에서, 표적 서열과 표적화 도메인의 상보성이 표적 핵산과 gRNA 분자/Cas9 분자 복합체의 상호작용의 특이성에 기여하는 것으로 여겨진다. 표적화 도메인 및 표적 서열 쌍에서, 표적화 도메인의 우라실 염기가 표적 서열의 아데닌 염기와 쌍을 이룰 것으로 이해된다. 일부 구현예에서, 표적 도메인 자체가 5'에서 3' 방향으로, 선택적인 제2 도메인 및 코어 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 코어 도메인은 표적 서열과 완전히 상보적이다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 5 내지 50개의 뉴클레오티드 길이이다. 표적화 도메인이 상보적인 표적 핵산의 가닥은 여기서 상보적 가닥으로 지칭된다. 도메인의 전부 또는 일부 뉴클레오티드는, 예를 들어, 분해에 덜 취약하게 되고 생체 적합성을 개선시키는 등의 변형을 가질 수 있다. 비제한적인 예로서, 표적 도메인의 백본(backbone)은 포스포로티오에이트로 변형되거나 다른 변경(들)을 가질 수 있다. 일부 경우에, 표적화 도메인의 뉴클레오티드는 2' 변형, 예를 들어, 2-아세틸화, 예를 들어, 2' 메틸화 또는 기타 변형(들)을 포함할 수 있다.

- [0175] 다양한 구현예에서, 표적화 도메인은 16-26 개의 뉴클레오티드 길이(즉, 16 개의 뉴클레오티드 길이, 또는 17 개의 뉴클레오티드 길이 또는 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26 개의 뉴클레오티드 길이)이다.
- [0176] (b) 예시적인 표적화 도메인
- [0177] 일부 구현예에서, *TGFBR2* 유전자 좌와 같은 특정 유전자의 표적 부위를 표적화하는 표적화 도메인 서열이거나 이를 포함하는 gRNA 서열이 설계되거나 확인된다. CRISPR 게놈 편집을 위한 게놈 전체 gRNA 데이터베이스가 공개적으로 이용 가능하고, 이는 인간 게놈 또는 마우스 게놈에서 유전자의 구성적 엑손을 표적화하는 예시적인 단일 가이드 RNA(single guide RNA, sgRNA) 서열을 함유한다(예를 들어, 문헌[genescript.com/gRNA-database.html 참조; 또한, Sanjana *et al.* (2014) *Nat. Methods*, 11:783-4] 참조). 일부 측면에서, gRNA 서열은 비표적 부위 또는 위치에 대한 최소한의 표적 외 결합을 갖는 서열이거나 이를 포함한다.
- [0178] 일부 구현예에서, 표적 서열(표적 도메인)은 서열 번호: 74 또는 76에 제시된 *TGFBR2* 코딩 서열의 임의의 일부와 같은 *TGFBR2* 유전자 좌 또는 근처이다. 일부 구현예에서, 표적 도메인에 상보적인 표적 핵산은 *TGFBR2*와 같은 관심 유전자의 초기 코딩 영역에 위치한다. 초기 코딩 영역의 표적화는 관심 유전자의 유전자 파괴(즉, 발현 제거)에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 관심 유전자의 초기 코딩 영역은 시작 코돈(예를 들어, ATG) 직후의 서열 또는 시작 코돈의 500bp 이내(예를 들어, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 bp, 40bp, 30bp, 20bp, 또는 10bp 미만)의 서열을 포함한다. 특정 예에서, 표적 핵산은 시작 코돈의 200bp, 150bp, 100bp, 50bp, 40bp, 30bp, 20bp 또는 10bp 이내에 있다. 일부 예에서, gRNA의 표적화 도메인은 *TGFBR2* 유전자 좌에 있는 표적 핵산과 같은 표적 핵산 상의 표적 서열에 대해 상보적, 예를 들어 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 이상 상보적, 예를 들어 완전히 상보적이다.
- [0179] 일부 구현예에서, gRNA는, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 전이 유전자 서열의 표적화된 통합의 바람직한 부위 근처 *TGFBR2* 유전자 좌의 부위를 표적화할 수 있다. 일부 측면에서, gRNA는 재조합 수용체를 발현하는 세포에서 발현에 바람직한 *TGFBR2*를 암호화하는 서열의 양에 근거한 부위를 표적화할 수 있다. 일부 측면에서, gRNA는, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 전이 유전자 서열의 통합 시, 생성된 *TGFBR2* 유전자 좌가 *TGFBR2*의 우성 음성을 암호화하도록 부위를 표적화할 수 있다. 일부 측면에서, gRNA는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 내 부위를 표적화할 수 있다. 일부 측면에서, gRNA는 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 인트론 내 부위를 표적화할 수 있다. 일부 측면에서, gRNA는 *TGFBR2* 유전자 좌의 조절 또는 제어 요소, 예를 들어, 프로모터 내 부위를 표적화할 수 있다. 일부 측면에서, gRNA에 의해 표적화되는 *TGFBR2* 유전자 좌의 표적 부위는 여기, 예를 들어 섹션 I.A.1.에 기재된 임의의 표적 부위일 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA는, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 초기 코딩영역에 대응하는 엑손, 예를 들어 엑손 1, 2, 3, 4 또는 5 내 또는 이와 매우 근접하거나 또는 엑손 1, 2, 3, 4 또는 5 내 또는 엑손 1, 2, 3, 4 또는 5의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내의 전사 시작 부위 직후 서열을 포함하는 부위를 표적화할 수 있다. 일부 구현예에서, gRNA는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 2 또는 근처, 또는 엑손 2의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내의 부위를 표적화할 수 있다.
- [0180] Cas9를 이용하여 인간 *TGFBR2* 유전자 좌의 파괴를 위한 예시적인 표적 부위 서열은 서열 번호: 63-68 및 73 중 어느 하나에 제시된 것을 포함할 수 있다. 예시적인 gRNA는 서열 번호: 74-76, 80, 81, 87-96 및 127-182 중 어느 하나에 제시된 표적 부위 서열에 결합 또는 이를 표적화할 수 있거나 또는 이에 상보적이거나 또는 이의 상보성 가닥 서열에 결합할 수 있는 리보핵산 서열을 포함할 수 있다. 임의의 공지된 방법이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 유전자 파괴를 표적화 및 생성하는 데 사용될 수 있으며, 여기에 제공된 구현예에 사용될 수 있다.
- [0181] 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 *S. pyogenes* Cas9 또는 *N. meningitidis* Cas9를 사용하여 *TGFBR2* 유전자에서 유전자 파괴를 도입하기 위한 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 *S. pyogenes* Cas9를 사용하여 *TGFBR2* 유전자에서 유전자 파괴를 도입하기 위한 것을 포함한다. 임의의 표적화 도메인이 이중 가닥 파손(Cas9 뉴클레아제) 또는 단일 가닥 파손(Cas9 니카제)을 생성하는 *S. pyogenes* Cas9 분자와 함께 사용될 수 있다.
- [0182] 일부 구현예에서, 이중 표적화가 사용되어 맞은편 DNA 가닥에 상보적인 2 개의 표적화 도메인을 갖는 *S. pyogenes* Cas9 니카제를 사용함으로써 맞은편 DNA 가닥 상에 2 개의 틱을 형성하는데, 예를 들어 임의의 마이너스 가닥 표적화 도메인을 포함하는 gRNA는 플러스 가닥 표적화 도메인을 포함하는 임의의 gRNA와 페어링될 수 있다. 일부 구현예에서, 2 개의 gRNA가 PAM이 바깥쪽으로 향하고 gRNA의 5' 말단 사이의 거리가 0-50bp이도록 DNA 상에 배향된다. 일부 구현예에서, 2 개의 gRNA가, 예를 들어, 표적 도메인의 맞은편 가닥 상에 2 개의 단일

가닥 파손을 가진 표적 도메인을 절단하는 2 개의 상이한 gRNA 분자에 의해 가이드된 Cas9 분자/gRNA 분자 복합체의 쌍을 사용하여 2 개의 Cas9 뉴클레아제 또는 2 개의 Cas9 니카제를 표적화하는 데 사용된다. 일부 구현예에서, 2 개의 Cas9 니카제는, HNH 활성을 갖는 분자, 예를 들어, 비활성화된 RuvC 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어 D10에서 돌연변이, 예를 들어, D10A 돌연변이를 갖는 Cas9 분자, RuvC 활성을 갖는 분자, 예를 들어 비활성화된 HNH 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어 H840, 예를 들어 H840A에서 돌연변이를 갖는 Cas9 분자 또는 RuvC 활성을 갖는 분자, 예를 들어, 비활성화된 HNH 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, N863, 예를 들어, N863A에서 돌연변이를 갖는 Cas9 분자를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 2 개의 gRNA 각각이 D10A Cas9 니카제와 복합체를 이룬다.

[0183] (c) 제1 상보성 도메인

[0184] 제1 상보성 도메인은 여기에 기재된 제2 상보성 도메인과 상보적이며, 일반적으로 제2 상보성 도메인과 충분한 상보성을 가지고 있어서 적어도 일부 생리적 조건 하에서 이중 영역을 형성한다. 제1 상보성 도메인은 전형적으로 5 내지 30 뉴클레오티드 길이이고, 5 내지 25 뉴클레오티드 길이, 7 내지 25 뉴클레오티드 길이, 7 내지 22 뉴클레오티드 길이, 7 내지 18 뉴클레오티드 길이 또는 7 내지 15 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 다양한 구현예에서, 제1 상보성 도메인은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 뉴클레오티드 길이이다. 제1 상보성 도메인의 예는 문헌[국제 출원 WO2015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 1A-1G]에 기재된 것을 포함한다.

[0185] 전형적으로, 제1 상보성 도메인은 제2 상보성 도메인 표적과 정확한 상보성을 갖지 않는다. 일부 구현예에서, 제1 상보성 도메인은 제2 상보성 도메인의 대응 뉴클레오티드와 상보적이지 않은 1, 2, 3, 4 또는 5개의 뉴클레오티드를 가질 수 있다. 예를 들어, 제1 상보성 도메인의 1, 2, 3, 4, 5 또는 6(예를 들어, 3)개의 뉴클레오티드 세그먼트가 이중 영역에서 쌍을 이루지 못할 수 있으며, 비-이중 영역 또는 루프-아웃(looped-out) 영역을 형성할 수 있다. 일부 경우에, 쌍을 이루지 못한 또는 루프 아웃 영역, 예를 들어, 3 개의 뉴클레오티드의 루프 아웃이 제2 상보성 도메인 상에 존재한다. 상기 쌍을 이루지 못한 영역은 선택적으로 제 2 상보성 도메인의 5' 말단으로부터 1, 2, 3, 4, 5 또는 6, 예를 들어, 4번째 뉴클레오티드에서 시작한다.

[0186] 제1 상보성 도메인은 5'에서 3' 방향으로: 5' 하위 도메인, 중앙 하위 도메인 및 3' 하위 도메인인 3 개의 하위 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 5' 하위 도메인은 4-9, 예를 들어 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 중앙 하위 도메인은 1, 2 또는 3, 예를 들어, 1 개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3' 하위 도메인은 3 내지 25, 예를 들어, 4-22, 4-18 또는 4 내지 10 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0187] 일부 구현예에서, 이중 영역의 경우, 제1 및 제2 상보성 도메인은, 예를 들어, gRNA 서열에 11 개의 페어링된 뉴클레오티드를 포함한다(페어링된 가닥에서 하나는 밑줄, 하나는 굵게 표시):  
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAA**UAGCAAGU**AAAAU**AAGGCUAGUC**CGUUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(서열 번호: 97).

[0188] 일부 구현예에서, 이중 영역의 경우, 제1 및 제2 상보성 도메인은, 예를 들어, gRNA 서열에서 15 개의 페어링된 뉴클레오티드를 포함한다(페어링된 가닥에서 하나는 밑줄, 하나는 굵게 표시):  
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCU**AUGCUGAAAAGCAUAGCAAGU**AAAAU**AAGGCUAGUC**CGUUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(서열 번호: 98).

[0189] 일부 구현예에서, 이중 영역의 경우, 제1 및 제2 상보성 도메인은, 예를 들어, gRNA 서열에서 16 개의 페어링된 뉴클레오티드를 포함한다(페어링된 가닥에서 하나는 밑줄, 하나는 굵게 표시):  
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCU**AUGCUGGAAAAGCAUAGCAAGU**AAAAU**AAGGCUAGUC**CGUUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(서열 번호: 99).

[0190] 일부 구현예에서, 이중 영역의 경우, 제1 및 제2 상보성 도메인은, 예를 들어, gRNA 서열에서 21 개의 페어링된 뉴클레오티드를 포함한다(페어링된 가닥에서 하나는 밑줄, 하나는 굵게 표시):  
 NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCU**AUGCUGUUUGGAAA**CAAA**ACAGCAUAGCAAGU**AAAAU**AAGGCUAGUC**CGUUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(서열 번호: 100).

[0191] 일부 구현예에서, 뉴클레오티드가 교환되어 예를 들어, gRNA 서열에서 폴리-U 트랙이 제거된다(교환된 뉴클레오티드 밑줄):

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAUAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(서열 번호:101);

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUAAUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(서열 번호:102);

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUAGAGCUAUGCUGUUUGGAAACAUACAGCAUAGCAAGUAAUAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC(서열 번호:103).

[0192] 제1 상보성 도메인은 자연 발생 제1 상보성 도메인과 상동성을 공유하거나 이로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기는 여기 개시된 제1 상보성 도메인, 예를 들어 *S. pyogenes*, *S. aureus*, *N. meningitidis*, 또는 *S. thermophilus* 제1 상보성 도메인과 50% 이상의 상동성을 갖는다.

[0193] 제1 상동성 도메인의 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 심지어 모든 뉴클레오티드가 표적화 도메인에 대해 여기서 논의된 방침에 따라 변형될 수 있음에 유의해야 한다.

[0194] **(d) 연결 도메인**

[0195] 단분자 또는 키메라 gRNA에서, 연결 도메인은 단분자 gRNA의 제1 상보성 도메인과 제2 상보성 도메인을 연결하는 역할을 한다. 연결 도메인은 제1 및 제2 상보성 도메인을 공유 또는 비공유적으로 연결할 수 있다. 일부 구현예에서, 연결은 공유적이다. 일부 구현예에서, 연결 도메인은 제1 및 제2 상보성 도메인을 공유적으로 연결하며, 예를 들어, 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 1B-1E]을 참조한다. 일부 구현예에서, 연결 도메인은 제1 상보성 도메인과 제2 상보성 도메인 사이에 개재된 공유 결합이거나 이를 포함한다. 전형적으로, 연결 도메인은 하나 이상의 뉴클레오티드, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 뉴클레오티드를 포함하나, 다양한 구현예에서 링커는 20, 30, 40, 50 또는 심지어 100 개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 연결 도메인의 예는 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 1A-1G]에 기재된 것을 포함한다.

[0196] 모듈식 gRNA 분자에서, 2 개의 분자가 상보성 도메인의 혼성화를 통해 결합되고, 연결 도메인이 존재하지 않을 수 있다. 예를 들어, 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 1A]을 참조한다.

[0197] 다양한 연결 도메인이 단분자 gRNA 분자에 사용하기에 적합하다. 연결 도메인은 공유 결합으로 구성될 수 있거나, 1 또는 몇 개의 뉴클레오티드, 예를 들어, 1, 2, 3, 4 또는 5 개의 뉴클레오티드 길이만큼 짧을 수 있다. 일부 구현예에서, 연결 도메인은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25 개 이상의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 연결 도메인은 2 내지 50, 2 내지 40, 2 내지 30, 2 내지 20, 2 내지 10 또는 2 내지 5 개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 연결 도메인은 자연 발생 서열, 예를 들어 제2 상보성 도메인에 대해 5'인 tracrRNA 서열과 상동성을 공유하거나 이로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 연결 도메인은 여기에 개시된 연결 도메인과 50% 이상의 상동성을 갖는다.

[0198] 제1 상보성 도메인과 관련하여 여기에 논의된 바와 같이, 연결 도메인의 전부 또는 일부 뉴클레오티드가 변형을 포함할 수 있다.

[0199] **(e) 5' 연장 도메인**

[0200] 일부 경우에, 모듈식 gRNA는 여기서 5' 연장 도메인으로 지칭되는 제2 상보성 도메인에 대해 5' 추가 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 5' 연장 도메인은 2-10, 2-9, 2-8, 2-7, 2-6, 2-5 또는 2-4 개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5' 연장 도메인은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이상의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5' 연장 도메인의 예는, 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 1A]에 기재된 것을 포함한다.

[0201] **(f) 제2 상보성 도메인**

[0202] 제2 상보성 도메인은 제1 상보성 도메인과 상보적이며, 일반적으로 제2 상보성 도메인과 충분한 상보성을 가지고 있어서 적어도 일부 생리학적 조건 하에서 이중 영역을 형성한다. 일부 경우에, 예를 들어, 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 1A-1B]에 도시된 바와 같이, 제2 상보성 도메인은 제1 상보성 도메인과 상보성이 결여된 서열, 예를 들어, 이중 영역으로부터 루프 아웃된 서열을 포함할 수 있다. 제2 상보성 도메인의 예는 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 1A-1G]에 기재된 것을 포함한다.

[0203] 제2 상보성 도메인은 5 내지 27 개의 뉴클레오티드 길이일 수 있고, 일부 경우에 제1 상보성 영역보다 더 길 수 있다. 일부 구현예에서, 제2 상보성 도메인은 7 내지 27 개의 뉴클레오티드 길이, 7 내지 25 개의 뉴클레오티드 길이, 7 내지 20 개의 뉴클레오티드 길이 또는 7 내지 17 개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 보다 일반적으로,

상보성 도메인은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26 개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0204] 일부 구현예에서, 제2 상보성 도메인은, 5'에서 3' 방향으로: 5' 하위 도메인, 중앙 하위 도메인 및 3' 하위 도메인인 3 개의 하위 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 5' 하위 도메인은 3 내지 25, 예를 들어, 4 내지 22, 4 내지 18 또는 4 내지 10 또는 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25 개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 중앙 하위 도메인은 1, 2, 3, 4 또는 5, 예를 들어, 3 개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 3' 하위 도메인은 4 내지 9, 예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9 개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0205] 일부 구현예에서, 제1 상보성 도메인의 5' 하위 도메인 및 3' 하위 도메인은 각각 제2 상보성 도메인의 3' 하위 도메인 및 5' 하위 도메인과 상보적, 예를 들어 완전히 상보적이다.

[0206] 제2 상보성 도메인은 자연 발생 제2 상보성 도메인과 상동성을 공유하거나 이로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기는 여기 개시된 제2 상보성 도메인, 예를 들어 *S. pyogenes*, *S. aureus*, *N. meningitidis*, 또는 *S. thermophilus* 제1 상보성 도메인과 50% 이상의 상동성을 갖는다.

[0207] 제2 상보성 도메인의 전부 또는 일부 뉴클레오티드는 변형, 예를 들어 여기에 기재된 변형을 가질 수 있다.

[0208] **(g) 근위 도메인**

[0209] 근위 도메인의 예는 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 1A-1G]에 기재된 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 근위 도메인은 5 내지 20 개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 근위 도메인은 자연 발생 근위 도메인과 상동성을 공유하거나 이로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기는 여기 개시된 근위 도메인, 예를 들어 *S. pyogenes*, *S. aureus*, *N. meningitidis*, 또는 *S. thermophilus* 근위 도메인과 50% 이상의 상동성을 갖는다.

[0210] 근위 도메인의 전부 또는 일부 뉴클레오티드가 여기 기재된 방침에 따라 변형을 가질 수 있다.

[0211] **(h) 꼬리 도메인**

[0212] 국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 1A 및 도면 1B-1F의 꼬리 도메인 조사에 의해 알 수 있는 바와 같이, 광범위한 꼬리 도메인이 gRNA 분자에 사용하기에 적합하다. 다양한 구현예에서, 꼬리 도메인은 0(부제), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개의 뉴클레오티드 길이이다. 특정 구현예에서, 꼬리 도메인 뉴클레오티드는 자연 발생 꼬리 도메인의 5' 말단으로부터 유래하거나 이와 상동성을 공유하며, 예를 들어, 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 1D 또는 1E]을 참조한다. 꼬리 도메인은 서로 상보적이고, 적어도 일부 생리적 조건하에서 이중 영역을 형성하는 서열을 선택적으로 또한 포함한다. 꼬리 도메인의 예는 문헌 [국제 출원 W02015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 1A-1G]에 기재된 것을 포함한다.

[0213] 꼬리 도메인은 자연 발생 근위 꼬리 도메인과 상동성을 공유하거나 이로부터 유래될 수 있다. 비제한적인 예로서, 본 발명의 다양한 구현예에 따라 주어진 꼬리 도메인은 여기에 개시된 자연 발생 꼬리 도메인, 예를 들어 *S. Pyogenes*, *S. aureus*, *N. meningitidis* 또는 *S. thermophilus* 꼬리 도메인과 함께 50% 이상의 상동성을 공유할 수 있다.

[0214] 특정 경우에, 꼬리 도메인은 시험관 내 또는 생체 내 전사의 방법과 관련된 3' 말단에 뉴클레오티드를 포함한다. T7 프로모터가 gRNA의 시험관 내 전사에 사용될 경우, 상기 뉴클레오티드는 DNA 주형의 3' 말단 앞에 존재하는 임의의 뉴클레오티드일 수 있다. U6 프로모터가 생체 내 전사에 사용될 경우, 상기 뉴클레오티드는 UUUUUU 서열일 수 있다. 대안적인 pol-III 프로모터가 사용될 경우, 상기 뉴클레오티드는 다양한 숫자 또는 우라실 염기일 수 있거나 대안적인 염기를 포함할 수 있다.

[0215] [206] 비제한적인 예로서, 다양한 구현예에서, 근위 및 꼬리 도메인은 함께 AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGUC(서열 번호: 104), AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGGUGC(서열 번호: 105), AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCGGAUC(서열 번호: 106), AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG(서열 번호: 107), AAGGCUAGUCCGUUAUCA(서열 번호: 108) 또는 AAGGCUAGUCCG(서열 번호: 109) 서열을 포함한다.

[0216] 일부 구현예에서, 꼬리 도메인은 예를 들어, U6 프로모터가 전사에 사용될 경우, 3' 서열 UUUUUU를 포함한다. 일부 구현예에서, 꼬리 도메인은 예를 들어, H1 프로모터가 전사에 사용될 경우, 3' 서열 UUUU를 포함한다. 일

부 구현예에서, 꼬리 도메인은 예를 들어, 사용되는 pol-III 프로모터의 종결 신호에 따라 다양한 수의 3' U를 포함한다. 일부 구현예에서, 꼬리 도메인은 T7 프로모터가 사용되는 경우, DNA 주형에서 유래된 가변적인 3' 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 꼬리 도메인은, 예를 들어, 시험관 내 전사가 이용되어 RNA 분자를 생성하는 경우, DNA 주형에서 유래된 가변적인 3' 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 꼬리 도메인은, 예를 들어, pol-II 프로모터가 전사를 구동하기 위해 사용될 경우, DNA 주형에서 유래된 가변 3' 서열을 포함한다.

[0217] 일부 구현예에서, gRNA는: 5' [표적화 도메인]-[제1 상보성 도메인]-[연결 도메인]-[제2 상보성 도메인]-[근위 도메인]-[꼬리 도메인]-3' 구조를 갖고, 여기서 표적화 도메인은 코어 도메인 및 선택적으로 제2 도메인을 포함하며 10 내지 50 뉴클레오티드 길이이고; 제1 상보성 도메인은 5 내지 25 뉴클레오티드 길이이고, 일부 구현예에서 여기 개시된 참조 제1 상보성 도메인과 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 이상의 상동성을 가지며; 연결 도메인은 1 내지 5 개의 뉴클레오티드 길이이고; 근위 도메인은 5 내지 20 개의 뉴클레오티드 길이이며, 일부 구현예에서 여기 개시된 참조 근위 도메인과 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 이상의 상동성을 갖고; 꼬리 도메인은 부재하거나 뉴클레오티드 서열은 1 내지 50 개의 뉴클레오티드 길이이며, 일부 구현예에서 여기 개시된 참조 꼬리 도메인과 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 또는 99% 이상의 상동성을 갖는다.

[0218] (i) 예시적인 키메라 gRNA

[0219] 일부 구현예에서, 단분자 또는 키메라 gRNA는, 바람직하게는 5'에서 3' 방향으로: 예를 들어 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26 개의 뉴클레오티드를 포함하는 표적화 도메인(표적 핵산에 대해 상보적임); 제1 상보성 도메인; 연결 도메인; 제2 상보성 도메인(제1 상보성 도메인에 대해 상보적임); 근위 도메인; 및 꼬리 도메인;을 포함하고, 여기서 (a) 근위 도메인 및 꼬리 도메인은 함께 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드를 포함하거나; (b) 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 또는 53 개 이상의 3' 뉴클레오티드가 존재하거나; 또는 (c) 제1 상보성 도메인의 대응하는 뉴클레오티드에 대해 상보적인 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 또는 54 개 이상의 3' 뉴클레오티드가 존재한다.

[0220] 일부 구현예에서, (a), (b) 또는 (c) 유래 서열은 자연 발생 gRNA의 대응 서열 또는 여기 기재된 gRNA와 60, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99% 이상의 상동성을 갖는다. 일부 구현예에서, 근위 및 꼬리 도메인은 함께 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 또는 53 개 이상의 3' 뉴클레오티드가 존재한다. 일부 구현예에서, 제1 상보성 도메인의 대응하는 뉴클레오티드에 대해 상보적인 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 또는 54 개 이상의 3' 뉴클레오티드가 존재한다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 표적 도메인과 상보성을 갖는 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26 개의 뉴클레오티드(예를 들어, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26 개의 연속적인 뉴클레오티드)를 포함하거나 갖거나 이로 구성되며, 예를 들어, 표적화 도메인은 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26 개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0221] 일부 구현예에서, 단분자 또는 키메라 gRNA 분자(표적화 도메인, 제1 상보성 도메인, 연결 도메인, 제2 상보성 도메인, 근위 도메인 및 선택적으로 꼬리 도메인을 포함함)는 NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCGCUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGUGCUUUUUU (서열 번호: 110) 서열을 포함하고, 여기서 표적화 도메인은 20 N으로 표시되나 임의의 서열일 수 있고 16 내지 26 개의 뉴클레오티드 길이 범위일 수 있으며, gRNA 서열 뒤에 6 개의 U가 있으며, 이는 U6 프로모터에 대한 종결 신호로 작용하나 부재하거나 보다 작은 수일 수 있다. 일부 구현예에서, 단분자 또는 키메라 gRNA 분자는 *S. pyogenes* gRNA 분자이다.

[0222] 일부 구현예에서, 단분자 또는 키메라 gRNA 분자(표적화 도메인, 제1 상보성 도메인, 연결 도메인, 제2 상보성 도메인, 근위 도메인 및 선택적으로 꼬리 도메인을 포함함)는 NNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGCUAACUUGUGGCGAGAUUUUUU (서열 번호: 111) 서열을 포함하고, 여기서 표적화 도메인은 20 N으로 표시되나 임의의 서열일 수 있고, 16 내지 26 개의 뉴클레오티드 길이 범위일 수 있으며, gRNA 서열 뒤에 6 개의 U가 있으며, 이는 U6 프로모터에 대한 종결 신호로 작용하나 부재하거나 보다 작은 수일 수 있다. 일부 구현예에서, 단분자 또는 키메라 gRNA 분자는 *S. aureus* gRNA 분자이다. 예시적인 키메라 gRNA의 서열 및 구조가 문헌[국제 출원 WO2015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 10A-10B]에 또한 도시된다.

[0223] 여기에 기재된 바와 같은 임의의 gRNA 분자가 이중 가닥 파손 또는 단일 가닥 파손을 생성하여 표적 핵산, 예를

들어, 표적 위치 또는 표적 유전자 특징 서열을 변경하는 임의의 Cas9 분자와 함께 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 표적 핵산은 기재된 임의의 것과 같은 *TGFB2* 유전자 좌 또는 근처에 존재한다. 일부 구현예에서, gRNA 분자와 같은 리보핵산 분자 및 Cas9 단백질 또는 이의 변이체와 같은 단백질이 여기 제공된 임의의 조작된 세포로 도입된다. 상기 방법에 유용한 gRNA 분자가 하기에 기재된다.

- [0224] 일부 구현예에서, gRNA, 예를 들어 키메라 gRNA는:
- [0225] a) 예를 들어, 이중 가닥 파손을 만드는 Cas9 분자를 표적화하는 경우, (i) 표적 위치의 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 개의 뉴클레오티드 내 또는 (ii) 상기 표적 위치가 말단 절제 영역 내에 존재하도록 충분히 가깝게 이중 가닥 파손을 위치시킬 수 있고;
- [0226] b) 16 개 이상의 뉴클레오티드의 표적화 도메인, 예를 들어, (i) 16, (ii) 17, (iii) 18, (iv) 19, (v) 20, (vi) 21, (vii) 22, (viii) 23, (ix) 24, (x) 25, 또는 (xi) 26 개의 뉴클레오티드의 표적화 도메인을 갖고;
- [0227] c) (i) 근위 및 꼬리 도메인이 함께 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 및 근위 도메인 유래 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 포함하거나;
- [0228] (ii) 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 3' 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* gRNA의 대응 서열 유래 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열이 존재하거나;
- [0229] (iii) 제1 상보성 도메인의 대응하는 뉴클레오티드에 상보적인 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51, 또는 54 개 이상의 3' 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* gRNA의 대응 서열 유래 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51, 또는 54 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열이 존재하거나;
- [0230] (iv) 꼬리 도메인이 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 개 이상의 뉴클레오티드 길이이며, 예를 들어, 상기가 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 도메인 유래 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 포함하거나; 또는
- [0231] (v) 꼬리 도메인이 자연 발생 꼬리 도메인, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 도메인의 대응하는 부분의 15, 20, 25, 30, 35, 40 개 뉴클레오티드 또는 전부를 포함하는;
- [0232] 특성 중 하나 이상을 포함하도록 구성된다.
- [0233] 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(iii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(iv) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(v) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(vi) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(vii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(viii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(ix) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(x) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(xi) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a, b 및 c 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(i), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(i), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iv), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iv), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(v), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(v), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vi), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA

는 a(i), b(vi), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(viii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(viii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ix), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ix), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(x), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(x), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(xi), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(xi), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다.

- [0234] 일부 구현예에서, gRNA, 예를 들어 키메라 gRNA는:
- [0235] a) 예를 들어, 단일 가닥 파손을 만드는 Cas9 분자를 표적화하는 경우, (i) gRNA 중 하나 또는 둘 다가 (i) 표적 위치의 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 개의 뉴클레오티드 내 또는 (ii) 상기 표적 위치가 말단 절제 영역 내에 존재하도록 충분히 가깝게 단일 가닥 파손을 위치시킬 수 있고;
- [0236] b) 하나 또는 둘 다가 16 개 이상의 뉴클레오티드의 표적화 도메인, 예를 들어, (i) 16, (ii), 17, (iii) 18, (iv) 19, (v) 20, (vi) 21, (vii) 22, (viii) 23, (ix) 24, (x) 25, 또는 (xi) 26 개 뉴클레오티드의 표적화 도메인을 갖고;
- [0237] c) (i) 근위 및 꼬리 도메인이 함께 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 및 근위 도메인 유래 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 포함하거나;
- [0238] (ii) 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 3' 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* gRNA의 대응 서열 유래 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열이 존재하거나;
- [0239] (iii) 제1 상보성 도메인의 대응하는 뉴클레오티드에 상보적인 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51, 또는 54 개 이상의 3' 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* gRNA의 대응 서열 유래 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51, 또는 54 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열이 존재하거나;
- [0240] (iv) 꼬리 도메인이 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 개 이상의 뉴클레오티드 길이이며, 예를 들어, 상기가 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 도메인 유래 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 포함하거나; 또는
- [0241] (v) 꼬리 도메인이 자연 발생 꼬리 도메인, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 도메인의 대응하는 부분의 15, 20, 25, 30, 35, 40 개 뉴클레오티드 또는 전부를 포함하는;
- [0242] 특성 중 하나 이상을 포함하도록 구성된다.
- [0243] 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(iii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(iv) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(v) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(vi) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(vii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(viii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(ix) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(x) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(xi) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 c 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a, b 및 c 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(i), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(i), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i),

b(iii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iv), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iv), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(v), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(v), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vi), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vi), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(viii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(viii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ix), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ix), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(x), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(x), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(xi), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(xi), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다.

- [0244] 일부 구현예에서, gRNA는 HNH 활성을 갖는 Cas9 니카제 분자, 예를 들어, 비활성화된 RuvC 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, D10에서의 돌연변이, 예를 들어, D10A 돌연변이를 갖는 Cas9 분자와 함께 사용된다.
- [0245] 일부 구현예에서, gRNA는 RuvC 활성을 갖는 Cas9 니카제 분자, 예를 들어, 비활성화된 HNH 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, H840, 예를 들어, H840A에서의 돌연변이를 갖는 Cas9 분자와 함께 사용된다.
- [0246] [217] 일부 구현예에서, gRNA 쌍, 예를 들어 키메라 gRNA의 쌍은:
- [0247] a) 예를 들어, 단일 가닥 파손을 만드는 Cas9 분자를 표적화하는 경우, (i) gRNA 중 하나 또는 둘 다가 (i) 표적 위치의 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 개의 뉴클레오티드 내 또는 (ii) 상기 표적 위치가 말단 절제 영역 내에 존재하도록 충분히 가깝게 단일 가닥 파손을 위치시킬 수 있고;
- [0248] b) 하나 또는 둘 다가 16 개 이상의 뉴클레오티드의 표적화 도메인, 예를 들어, (i) 16, (ii) 17, (iii) 18, (iv) 19, (v) 20, (vi) 21, (vii) 22, (viii) 23, (ix) 24, (x) 25, 또는 (xi) 26 개 뉴클레오티드의 표적화 도메인을 갖고;
- [0249] c) 하나 또는 둘다의 경우:
  - [0250] (i) 근위 및 꼬리 도메인이 함께 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 및 근위 도메인 유래 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 포함하거나;
  - [0251] (ii) 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 3' 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* gRNA의 대응 서열 유래 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열이 존재하거나;
  - [0252] (iii) 제1 상보성 도메인의 대응하는 뉴클레오티드에 상보적인 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51, 또는 54 개 이상의 3' 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* gRNA의 대응 서열 유래 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51, 또는 54 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열이 존재하거나;
  - [0253] (iv) 꼬리 도메인이 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 개 이상의 뉴클레오티드 길이이며, 예를 들어, 상기가 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 도메인 유래 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 개 이상의 뉴클레오티드; 또는 상기 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 포함하거나; 또는
  - [0254] (v) 꼬리 도메인이 자연 발생 꼬리 도메인, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 도메인의 대응하는 부분 중 15, 20, 25, 30, 35, 40 개 뉴클레오티드 또는 전부를 포함하고;
  - [0255] d) gRNA가, 표적 핵산에 혼성화될 경우, 0-50, 0-100, 0-200, 10 이상, 20 이상, 30 이상 또는 50 개 이상의



b(viii), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(viii), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ix), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ix), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ix), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ix), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ix), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(x), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(x), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(x), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(x), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(x), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(xi), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(xi), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(xi), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(xi), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(xi), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다.

[0260] 일부 구현예에서, gRNA는 HNH 활성을 갖는 Cas9 니카제 분자, 예를 들어, 비활성화된 RuvC 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, D10에서의 돌연변이, 예를 들어, D10A 돌연변이를 갖는 Cas9 분자와 함께 사용된다.

[0261] 일부 구현예에서, gRNA는 RuvC 활성을 갖는 Cas9 니카제 분자, 예를 들어, 비활성화된 HNH 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, H840, 예를 들어, H840A에서의 돌연변이를 갖는 Cas9 분자와 함께 사용된다. 일부 구현예에서, gRNA는 RuvC 활성을 갖는 Cas9 니카제 분자, 예를 들어, 비활성화된 HNH 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, N863, 예를 들어, N863A에서의 돌연변이를 갖는 Cas9 분자와 함께 사용된다.

[0262] *(j) 예시적인 모듈식 gRNA*

[0263] 일부 구현예에서, 모듈식 gRNA는 제1 및 제2 가닥을 포함한다. 제1 가닥은 바람직하게는 5'에서 3' 방향으로; 예를 들어, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26 개의 뉴클레오티드를 포함하는 표적화 도메인; 제1 상보성 도메인;을 포함한다. 제2 가닥은 바람직하게는 5'에서 3' 방향으로; 선택적으로 5' 확장 도메인; 제2 상보성 도메인; 근위 도메인; 및 꼬리 도메인;을 포함하고, 여기서: (a) 근위 도메인 및 꼬리 도메인은 함께 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드를 포함하거나; (b) 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 또는 53 개 이상의 3' 뉴클레오티드가 존재하거나; 또는 (c) 제1 상보성 도메인의 대응 뉴클레오티드에 대해 상보적인 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 또는 54 개 이상의 3' 뉴클레오티드가 존재한다.

[0264] 일부 구현예에서, (a), (b) 또는 (c) 유래 서열은 자연 발생 gRNA의 대응 서열 또는 여기 기재된 gRNA와 60, 75, 80, 85, 90, 95 또는 99% 이상의 상동성을 갖는다. 일부 구현예에서, 근위 및 꼬리 도메인은 함께 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50 또는 53 개 이상의 3' 뉴클레오티드가 존재한다.

[0265] 일부 구현예에서, 제1 상보성 도메인의 대응하는 뉴클레오티드에 대해 상보적인 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51 또는 54 개 이상의 3' 뉴클레오티드가 존재한다.

[0266] 일부 구현예에서, 표적화 도메인은 표적 도메인과 상보성을 갖는 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26 개의 뉴클레오티드(예를 들어, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26 개의 연속적인 뉴클레오티드)를 갖거나 이로 구성되며, 예를 들어, 표적화 도메인은 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 또는 26 개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0267] *(k) gRNA 설계 방법*

[0268] 표적화 도메인을 선택, 설계 및 유효성을 검사하는 방법을 포함하여, gRNA를 설계하는 방법이 여기에 기재되어 있다. 예시적인 표적화 도메인도 여기에 제공된다. 여기에 논의된 표적화 도메인이 여기 기재된 gRNA로 통합될 수 있다.

- [0269] 표적 서열의 선택 및 유효성 검사를 위한 방법 및 표적 외 분석이, 예를 들어, 문헌[Mali et al., 2013 Science 339(6121): 823-826; Hsu et al. Nat Biotechnol, 31(9): 827-32; Fu et al., 2014 Nat Biotechnol, doi: 10.1038/nbt.2808. PubMed PMID: 24463574; Heigwer et al., 2014 Nat Methods 11(2):122-3. doi: 10.1038/nmeth.2812. PubMed PMID: 24481216; Bae et al., 2014 Bioinformatics PubMed PMID: 24463181; Xiao A et al., 2014 Bioinformatics PubMed PMID: 24389662]에 기재되어 있다.
- [0270] 일부 구현예에서, 소프트웨어 툴이 사용되어 예를 들어, 게놈에 걸쳐 총 표적 외 활성을 최소화하기 위해 사용자의 표적 서열 내에서 gRNA의 선택을 최적화할 수 있다. 절단이 아닌 표적 외 활성이 있을 수 있다. 예를 들어, *S. pyogenes* Cas9를 사용한 각각의 가능한 gRNA 선택에 대해, 소프트웨어 툴이 최대 특정 수(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10)의 잘못 짝지어진 염기 쌍을 함유하는 게놈에 걸쳐 모든 가능한 표적 외 서열(NAG 또는 NGG PAM에 선행함)을 확인할 수 있다. 각 표적 외 서열의 절단 효율이 예를 들어, 실험적으로 유래된 가중치 체계를 사용하여 예측될 수 있다. 이어서 각각의 가능한 gRNA가 이의 총 예측 표적 외 절단에 따라 순위가 매겨질 수 있고; 최상위 gRNA는 가장 큰 표적 상 및 최소한의 표적 외 절단을 가질 가능성이 있는 것들을 나타낸다. 다른 기능, 예를 들어, gRNA 벡터 작제를 위한 자동화된 시약 설계, 표적 상 측량자 분석을 위한 프라이머 설계, 차세대 염기 서열 분석을 통한 표적 외 절단의 고처리량 검출 및 정량화를 위한 프라이머 설계도 툴에 포함될 수 있다. 후보 gRNA 분자가 여기에 기재된 바와 같은 또는 당업계에 공지된 방법으로 평가될 수 있다.
- [0271] 일부 구현예에서, *S. pyogenes*, *S. aureus* 및 *N. meningitidis* Cas9와 함께 사용하기 위한 gRNA가 DNA 서열 검색 알고리즘, 예를 들어, 공개 툴인 cas-offinder(Bae et al. Bioinformatics. 2014; 30(10): 1473-1475)를 기반으로 한 사용자 지정 gRNA 설계 소프트웨어를 사용하여 확인된다. 사용자 지정 gRNA 설계 소프트웨어 점수는 게놈 전체 표적 외 성향을 계산한 후 안내한다. 17 내지 24 개 길이 범위의 가이드에 대해 전형적으로 완벽한 매치에서 7 개의 미스매치 범위의 매치가 고려된다. 일부 측면에서, 표적 외 부위가 계산으로 결정되면, 각 가이드에 대해 집계 점수가 계산되고 웹 인터페이스를 사용하여 표로 정리한 출력물로 요약된다. PAM 서열에 인접한 잠재적 gRNA 부위를 확인하는 것 외에도, 소프트웨어는 선택된 gRNA 부위와 1, 2, 3 이상의 뉴클레오티드 차이로 상이한 모든 PAM 인접 서열을 또한 확인할 수 있다. 일부 구현예에서, 각 유전자에 대한 게놈 DNA 서열이 UCSC 게놈 브라우저에서 수득되며, 서열이 공개적으로 이용 가능한 RepeatMasker 프로그램을 사용하여 반복 요소에 대해 선별될 수 있다. RepeatMasker가 반복 요소 및 복잡성이 낮은 영역에 대해 입력 DNA 서열을 검색한다. 결과는 주어진 의문의 서열에 존재하는 반복의 상세한 주석이다.
- [0272] 확인 후, gRNA는 표적 부위까지의 이의 거리, 이의 직교성 및 5' G의 존재(관련 PAM, 예를 들어, *S. pyogenes*의 경우 NGG PAM 및 *S. aureus*의 경우 NNGRR(예를 들어, NNGRRT 또는 NNGRRV) PAM 및 *N. meningitidis*의 경우 NNNNGATT 또는 NNNNGCTT PAM을 함유하는 인간 게놈에서 가까운 매치의 확인에 근거함) 중 하나 이상에 근거하여 층으로 순위가 매겨질 수 있다. 직교성은 표적 서열에 대한 최소 수의 미스매치를 함유하는 인간 게놈에서의 서열 수를 지칭한다. "높은 수준의 직교성(high level of orthogonality)" 또는 "좋은 직교성(good orthogonality)"은 예를 들어, 의도된 표적 외에 인간 게놈에서 동일한 서열을 갖지 않거나 또는 표적 서열에서 1 또는 2 개의 미스매치를 함유하는 임의의 서열도 갖지 않는 20-mer 표적화 도메인을 지칭할 수 있다. 좋은 직교성을 가진 표적화 도메인이 선택되어 표적 외 DNA 절단을 최소화한다. 상기는 비제한적인 예이며, 다양한 전략이 이용되어 *S. pyogenes*, *S. aureus* 및 *N. meningitidis* 또는 기타 Cas9 효소와 함께 사용하기 위한 gRNA를 확인할 수 있음이 이해되어야 한다.
- [0273] 일부 구현예에서, *S. pyogenes* Cas9와 함께 사용하기 위한 gRNA가 공개적으로 이용 가능한 웹 기반 ZiFiT 서버를 사용하여 확인될 수 있다(Fu et al., Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. Nat Biotechnol. 2014 Jan 26. doi: 10.1038/nbt.2808. PubMed PMID: 24463574, 최초 참조를 위해 문헌[Sander et al., 2007, NAR 35:W599-605; Sander et al., 2010, NAR 38: W462-8]을 참조). PAM 서열에 인접한 잠재적 gRNA 부위를 확인하는 것 외에도, 소프트웨어가 선택된 gRNA 부위와 1, 2, 3 이상의 뉴클레오티드 차이로 상이한 모든 PAM 인접 서열을 또한 확인한다. 일부 측면에서, 각 유전자에 대한 게놈 DNA 서열이 UCSC 게놈 브라우저에서 수득될 수 있고, 서열이 공개적으로 이용 가능한 Repeat-Masker 프로그램을 사용하여 반복 요소에 대해 스크리닝될 수 있다. RepeatMasker가 반복 요소 및 복잡성이 낮은 영역에 대해 입력 DNA 서열을 검색한다. 결과는 주어진 의문의 서열에 존재하는 반복의 상세한 주석이다.
- [0274] 확인 후, *S. pyogenes* Cas9와 함께 사용하기 위한 gRNA가 층, 예를 들어 5 개의 층으로 순위가 매겨질 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 층 gRNA 분자에 대한 표적화 도메인이 표적 부위까지 이의 거리, 이의 직교성 및 5' G의 존재(NGG PAM을 함유하는 인간 게놈에서 가까운 매치의 ZiFiT 확인에 근거함)에 근거하여 선택된다. 일부 구현

예에서, 17-mer 및 20-mer gRNA 둘 다 표적을 위해 설계된다. 일부 측면에서, gRNA가 단일 gRNA 뉴클레아제 절단 및 이중 gRNA 니카제 전략을 위해 둘 다 또한 선택된다. gRNA를 선택하는 기준 및 어떤 gRNA가 어떤 전략을 위해 사용될 수 있는지에 대한 결정이 몇 가지 고려 사항에 근거할 수 있다. 일부 구현예에서, 단일 gRNA 뉴클레아제 절단 및 이중 gRNA 페어링된 “니카제(nickase)” 전략 둘 다를 위한 gRNA가 확인된다. 이중 gRNA 페어링된 “니카제(nickase)” 전략을 위해 어떤 gRNA가 사용될 수 있는지에 대한 결정을 포함하여 gRNA를 선택하기 위한 일부 구현예에서, gRNA 쌍은, PAM이 외부를 향하고 D10A Cas9 니카제로의 절단이 5' 오버행을 초래하도록 DNA 상에 배향되어야 한다. 일부 측면에서, 이중 니카제 쌍으로의 절단이 적절한 빈도로 전체 개재 서열의 결실을 초래할 것이라고 가정할 수 있다. 그러나, 이중 니카제 쌍으로의 절단이 종종 gRNA 중 하나의 부위에서만 인텔 돌연변이를 또한 초래할 수 있다. 후보 쌍 멤버가 하나의 gRNA 부위에서 인텔 돌연변이를 단지 야기하는지 대 전체 서열을 얼마나 효율적으로 제거하는지에 대해 테스트될 수 있다.

[0275] 일부 구현예에서, 제1 층 gRNA 분자에 대한 표적화 도메인이, (1) 표적 위치까지의 적절한 거리, 예를 들어 시작 코돈의 코딩 서열 하류의 처음 500bp 이내, (2) 높은 수준의 직교성 및 (3) 5' G의 존재에 근거하여 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 제2 층 gRNA의 선택을 위해, 5'G에 대한 요건은 제거될 수 있으나, 거리 제한이 필요하고 높은 수준의 직교성이 요구되었다. 일부 구현예에서, 제3 층 선택은 동일한 거리 제한 및 5'G에 대한 요건을 이용하나 좋은 직교성의 요건을 제거한다. 일부 구현예에서, 제4 층 선택이 동일한 거리 제한을 사용하나 좋은 직교성의 요건을 제거하고 5'G로 시작한다. 일부 구현예에서, 제5 층 선택은 좋은 직교성 및 5'G의 요건을 제거하고, 보다 긴 서열(예를 들어, 나머지 코딩 서열, 예를 들어, 전사 표적 부위에 대한 추가 500bp 상류 또는 하류)이 스캔된다. 특정 경우에, 어떤 gRNA도 특정 층의 기준에 근거하여 확인되지 않는다.

[0276] 일부 구현예에서, 단일 gRNA 뉴클레아제 절단뿐만 아니라 이중 gRNA 페어링된 “니카제(nickase)” 전략을 위한 gRNA가 확인된다.

[0277] 일부 측면에서, *N. meningitidis* 및 *S. aureus* Cas9와 함께 사용하기 위한 gRNA가 PAM 서열의 존재에 대해 게놈 DNA 서열을 스캔함으로써 수동으로 확인될 수 있다. 상기 gRNA는 2개의 층으로 분리될 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 층 gRNA의 경우, 표적화 도메인이 시작 코돈의 하류에서 처음 500bp의 코딩 서열 내에서 선택된다. 일부 구현예에서, 제2 층 gRNA의 경우, 표적화 도메인이 나머지 코딩 서열(처음 500bp의 하류) 내에서 선택된다. 특정 경우에, 어떤 gRNA도 특정 층의 기준에 근거하여 확인되지 않는다.

[0278] 일부 구현예에서, *S. pyogenes*, *S. aureus* 및 *N. meningitidis* Cas9와 함께 사용하기 위한 가이드 RNA(gRNA)를 확인하는 또 다른 전략은 DNA 서열 검색 알고리즘을 이용할 수 있다. 일부 측면에서, 가이드 RNA 설계가 공개 툴인 cas-offinder(Bae et al. *Bioinformatics*. 2014; 30(10): 1473-1475)를 기반으로 한 사용자 지정 가이드 RNA 설계 소프트웨어를 사용하여 수행된다. 상기 사용자 지정 가이드 RNA 설계 소프트웨어 점수가 게놈 전체 표적 외 성향을 계산한 후 안내한다. 17 내지 24 개 길이 범위의 가이드에 대해 전형적으로 완벽한 매치에서 7 개의 미스매치 범위의 매치가 고려된다. 표적 외 부위가 계산으로 결정되면, 각 가이드에 대해 집계 점수가 계산되고 웹 인터페이스를 사용하여 표로 정리한 출력물로 요약된다. PAM 서열에 인접한 잠재적 gRNA 부위를 확인하는 것 외에도, 소프트웨어가 선택된 gRNA 부위와 1, 2, 3 이상의 뉴클레오티드 차이로 상이한 모든 PAM 인접 서열을 또한 확인한다. 일부 구현예에서, 각 유전자에 대한 게놈 DNA 서열이 UCSC 게놈 브라우저에서 수득되며, 서열이 공개적으로 이용 가능한 RepeatMasker 프로그램을 사용하여 반복 요소에 대해 스크리닝된다. RepeatMasker가 반복 요소 및 복잡성이 낮은 영역에 대해 입력 DNA 서열을 검색한다. 결과는 주어진 의문의 서열에 존재하는 반복의 상세한 주석이다.

[0279] 일부 구현예에서, 확인 후, gRNA가 표적 부위까지의 이의 거리 또는 이의 직교성(관련 PAM, 예를 들어, *S. pyogenes*의 경우 NGG PAM 및 *S. aureus*의 경우 NNGRR(예를 들어, NNGRRT 또는 NNGRRV) PAM 및 *N. meningitidis*의 경우 NNNNGATT 또는 NNNNGCTT PAM을 함유하는 인간 게놈에서 가까운 매치의 확인에 근거함)에 근거하여 층으로 순위가 매겨진다. 일부 측면에서, 좋은 직교성을 가진 표적화 도메인이 선택되어 표적 외 DNA 절단을 최소화한다.

[0280] 예로서, *S. pyogenes* 및 *N. meningitidis* 표적에 대해, 17-mer 또는 20-mer gRNA가 설계될 수 있다. 또 다른 예로서, *S. aureus* 표적에 대해, 18-mer, 19-mer, 20-mer, 21-mer, 22-mer, 23-mer 및 24-mer gRNA가 설계될 수 있다.

[0281] 일부 구현예에서, 단일 gRNA 뉴클레아제 절단 및 이중 gRNA 페어링된 “니카제(nickase)” 전략 둘 다를 위한 gRNA가 확인된다. 이중 gRNA 페어링된 “니카제(nickase)” 전략을 위해 어떤 gRNA가 사용될 수 있는지에 대한 결정을 포함하여 gRNA를 선택하기 위한 일부 구현예에서, gRNA 쌍은, PAM이 외부를 향하고 D10A Cas9 니카제로의

절단이 5' 오버행을 초래하도록 DNA 상에 배향되어야 한다. 일부 측면에서, 이중 니카제 쌍으로의 절단이 적절한 빈도로 전체 개재 서열의 결실을 초래할 것이라고 가정할 수 있다. 그러나, 이중 니카제 쌍으로의 절단이 종종 gRNA 중 하나의 부위에서만 인텔 돌연변이를 또한 초래할 수 있다. 후보 쌍 멤버가 하나의 gRNA 부위에서 인텔 돌연변이를 단지 야기하는지 대 전체 서열을 얼마나 효율적으로 제거하는지에 대해 테스트될 수 있다.

[0282] 유전자 파괴를 위한 전략 설계의 경우, 일부 구현예에서, *S. pyogenes*에 대한 1 층 gRNA 분자에 대한 표적화 도메인이 표적 부위까지의 이의 거리 및 이의 직교성(PAM이 NGG임)에 근거하여 선택된다. 일부 경우에, 1 층 gRNA 분자에 대한 표적화 도메인이, (1) 표적 위치까지의 적절한 거리, 예를 들어 시작 코돈의 하류에 처음 500bp의 코딩 서열 이내 및 (2) 높은 수준의 직교성에 근거하여 선택된다. 일부 측면에서, 2 층 gRNA의 선택을 위해 높은 수준의 직교성이 요구되지 않는다. 일부 경우에, 3 층 gRNA는 우수한 직교성의 요건을 제거하고, 보다 긴 서열(예를 들어, 나머지 코딩 서열)이 스캔될 수 있다. 특정 경우에, 어떤 gRNA도 특정 층의 기준에 근거하여 확인되지 않는다.

[0283] 유전자 파괴를 위한 전략 설계의 경우, 일부 구현예에서, *N. meningitidis*에 대한 1 층 gRNA 분자에 대한 표적화 도메인이 코딩 서열의 처음 500bp 이내에서 선택되었고, 높은 수준의 직교성을 가졌다. *N. meningitidis*에 대한 2 층 gRNA 분자에 대한 표적화 도메인이 코딩 서열의 처음 500bp 내에서 선택되었고, 높은 직교성을 요구하지 않았다. *N. meningitidis*에 대한 3 층 gRNA 분자에 대한 표적화 도메인이 500bp의 하류에 있는 코딩 서열의 나머지 내에서 선택되었다. 층은 포함되지 않음(각 gRNA는 한 번만 열거됨)에 유의한다. 특정 경우에, 어떤 gRNA도 특정 층의 기준에 근거하여 확인되지 않았다.

[0284] 유전자 파괴를 위한 전략 설계의 경우, 일부 구현예에서, *S. aureus*에 대한 1 층 gRNA 분자에 대한 표적화 도메인이 코딩 서열의 처음 500bp 내에서 선택되고, 높은 수준의 직교성을 가지며, NNGRRT PAM을 함유한다. 일부 구현예에서, *S. aureus*의 2 층 gRNA 분자에 대한 표적화 도메인이 코딩 서열의 처음 500bp 내에서 선택되고, 어떤 수준의 직교성도 요구되지 않으며, NNGRRT PAM을 함유한다. 일부 구현예에서, *S. aureus*의 3 층 gRNA 분자에 대한 표적화 도메인이 코딩 서열 하류의 나머지 내에서 선택되고, NNGRRT PAM을 함유한다. 일부 구현예에서, *S. aureus*의 4 층 gRNA 분자에 대한 표적화 도메인의 코딩 서열의 처음 500bp 내에서 선택되고, NNGRRV PAM을 함유한다. 일부 구현예에서, *S. aureus*의 5 층 gRNA 분자에 대한 표적화 도메인이 코딩 서열 하류의 나머지 내에서 선택되고, NNGRRV PAM을 함유한다. 특정 경우에, 어떤 gRNA도 특정 층의 기준에 근거하여 확인되지 않는다.

[0285] (ii) Cas9

[0286] 다양한 종의 Cas9 분자가 여기에 기재된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. *S. pyogenes*, *S. aureus*, *N. meningitidis* 및 *S. thermophilus* Cas9 분자가 여기에서 많은 개시의 주제이나, 여기에 열거된 다른 종의 Cas9 단백질의, 이의 유래 또는 이에 근거한 Cas9 분자 역시 사용될 수 있다. 즉, 여기서 다수의 기재가 *S. pyogenes*, *S. aureus*, *N. meningitidis* 및 *S. thermophilus* Cas9 분자를 사용하나, 다른 종 유래 Cas9 분자가 이를 대체할 수 있다. 상기 종은: *Acidovorax avenae*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Actinobacillus succinogenes*, *Actinobacillus suis*, *Actinomyces sp.*, *Cylophilusdenitrificans*, *Aminomonas paucivorans*, *Bacillus cereus*, *Bacillus smithii*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacteroides sp.*, *Blastopirellula marina*, *Bradyrhizobium sp.*, *Brevibacillus laterosporus*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, *Candidatus puniceispirillum*, *Clostridium cellulolyticum*, *Clostridium perfringens*, *Corynebacterium accolens*, *Corynebacterium diphtheria*, *Corynebacterium matruchotii*, *Dinoroseobacter shibae*, *Eubacterium dolichum*, *Gammaproteobacterium*, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus sputorum*, *Helicobacter canadensis*, *Helicobacter cinaedi*, *Helicobacter mustelae*, *Ilyobacter polytropus*, *Kingella kingae*, *Lactobacillus crispatus*, *Listeria ivanovii*, *Listeria monocytogenes*, *Listeriaceae bacterium*, *Methylocystis sp.*, *Methylosinus trichosporium*, *Mobiluncus mulieris*, *Neisseria bacilliformis*, *Neisseria cinerea*, *Neisseria flavescens*, *Neisseria lactamica*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria sp.*, *Neisseria wadsworthii*, *Nitrosomonas sp.*, *Parvibaculum lavamentivorans*, *Pasteurella multocida*, *Phascolarctobacterium succinatutens*, *Ralstonia syzygii*, *Rhodopseudomonas palustris*, *Rhodovulum sp.*, *Simonsiella muelleri*, *Sphingomonas sp.*, *Sporolactobacillus vineae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Streptococcus sp.*, *Subdoligranulum sp.*, *Tistrella mobilis*, *Treponema sp.*, 또는 *Verminophrobacter eiseniae*를 포함한다. Cas9 분자의 예는 예를 들어, 문헌[국제 출원 WO2015/161276, WO2017/193107, WO2017/093969, 미국 출원 US2016/272999 및 US2015/056705]에 기재된 것들을 포함할 수 있다.

- [0287] 여기에 사용된 바와 같은 용어, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 gRNA 분자와 상호 작용할 수 있고, 표적 도메인 및 PAM 서열을 포함하는 부위로 gRNA 분자와 함께 귀소 또는 국소화하는 분자 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 여기에 사용된 바와 같이, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 자연 발생 Cas9 분자 및 참조 서열 예를 들어, 가장 유사한 자연 발생 Cas9 분자와 예를 들어, 하나 이상의 아미노산 잔기가 상이한 조작된, 변경된 또는 변형된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드를 지칭한다.
- [0288] 2 개의 상이한 자연 발생 세균의 Cas9 분자(Jinek et al., Science, 343(6176):1247997, 2014) 및 가이드 RNA (예를 들어, crRNA 및 tracrRNA의 합성 융합)를 갖는 *S. pyogenes* Cas9(Nishimasu et al., Cell, 156:935-949, 2014; 및 Anders et al., Nature, 2014, doi: 10.1038/nature13579)에 대한 결정 구조가 결정되었다.
- [0289] 자연 발생 Cas9 분자는 2개의 로브(lobe): 인식(recognition, REC) 로브 및 뉴클레아제(nuclease, NUC) 로브를 포함하고; 이들 각각은 여기 기재된 도메인을 더 포함한다. 1차 구조에서 중요한 Cas9 도메인 조직의 예시적인 개요도가 문헌[국제 출원 WO2015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 8A-8B]에 기재되어 있다. 상기 개시 전체에 사용된 각각의 도메인에 의해 포괄되는 아미노산 잔기의 도메인 명명법 및 넘버링은 문헌[Nishimasu et al.]에 기재된 바와 같다. 아미노산 잔기의 넘버링은 *S. pyogenes* 유래 Cas9에 관한 것이다.
- [0290] REC 로브는 아르기닌이 풍부한 가교 나선(bridge helix, BH), REC1 도메인 및 REC2 도메인을 포함한다. REC 로브는 다른 공지된 단백질과 구조적 유사성을 공유하지 않으며, 이는 상기가 Cas9 특이적 기능성 도메인임을 나타낸다. BH 도메인은 긴  $\alpha$ -나선 및 아르기닌이 풍부한 영역이며, *S. pyogenes* Cas9 서열의 60-93 아미노산을 포함한다. REC1 도메인은 반복:항-반복 이중 영역, 예를 들어 gRNA 또는 tracrRNA의 인식에 중요하며, 따라서 표적 서열을 인식함으로써 Cas9 활성화에 중요하다. REC1 도메인은 *S. pyogenes* Cas9 서열의 94 내지 179 및 308 내지 717 아미노산에 2 개의 REC1 모티프를 포함한다. 상기 2 개의 REC1 도메인은 선형 1차 구조에서 REC2 도메인에 의해 분리되나 3차 구조로 조립되어 REC1 도메인을 형성한다. REC2 도메인 또는 이의 일부는 반복:항-반복 이중 영역의 인식에 또한 역할을 할 수 있다. REC2 도메인은 *S. pyogenes* Cas9 서열의 180-307 아미노산을 포함한다.
- [0291] NUC 로브는 (여기서 RuvC 유사 도메인으로도 지칭되는) RuvC 도메인, (여기서 HNH 유사 도메인으로도 지칭되는) HNH 도메인 및 PAM-상호작용(PAM-interacting, PI) 도메인을 포함한다. RuvC 도메인은 레트로바이러스의 인테그라제 상과(superfamily) 멤버와 구조적 유사성을 공유하고, 단일 가닥, 예를 들어, 표적 핵산 분자의 비상보성 가닥을 절단한다. RuvC 도메인은 *S. pyogenes* Cas9 서열의 각각 1-59, 718-769 및 909-10983 아미노산의 3개의 분할 RuvC 모티프(종종 일반적으로 RuvCI 도메인 또는 N-말단 RuvC 도메인, RuvCII 도메인 및 RuvCIII 도메인으로 지칭되는 RuvC I, RuvCII 및 RuvCIII)로부터 조립된다. REC1 도메인과 유사하게, 3개의 RuvC 모티프가 1차 구조에서 다른 도메인에 의해 선형적으로 분리되나, 3차 구조에서 3개의 RuvC 모티프가 조립되고 RuvC 도메인을 형성한다. HNH 도메인은 HNH 엔도뉴클레아제와 구조적 유사성을 공유하고, 단일 가닥, 예를 들어, 표적 핵산 분자의 상보성 가닥을 절단한다. HNH 도메인은 RuvC II-III 모티프 사이에 있으며, *S. pyogenes* Cas9 서열의 775-908 아미노산을 포함한다. PI 도메인은 표적 핵산 분자의 PAM과 상호 작용하고, *S. pyogenes* Cas9 서열의 1099-1368 아미노산을 포함한다.
- [0292] **(a) RuvC 유사 도메인 및 HNH 유사 도메인**
- [0293] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 HNH 유사 도메인 및 RuvC 유사 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 절단 활성은 RuvC 유사 도메인 및 HNH 유사 도메인에 좌우된다. Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는, RuvC 유사 도메인 및 HNH 유사 도메인 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드이고, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는 RuvC 유사 도메인, 예를 들어, 여기에 기재된 RuvC 유사 도메인 및/또는 HNH 유사 도메인, 예를 들어 여기에 기재된 HNH 유사 도메인을 포함한다.
- [0294] **(b) RuvC 유사 도메인**
- [0295] 일부 구현예에서, RuvC 유사 도메인은 단일 가닥, 예를 들어, 표적 핵산 분자의 비상보성 가닥을 절단한다. Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 하나 이상의 RuvC 유사 도메인(예를 들어, 1 개, 2 개, 3 개 이상의 RuvC 유사 도메인)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, RuvC 유사 도메인은 5, 6, 7, 8 개 이상의 아미노산 길이이나, 20, 19, 18, 17, 16 또는 15 개 이내의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 약 10 내지 20 개의 아미노산, 예를 들어 약 15 개의 아미노산 길이의 N-말단 RuvC 유사 도메인을 포함한다.
- [0296] **(c) N-말단 RuvC 유사 도메인**

- [0297] 일부 자연 발생 Cas9 분자는 N-말단 RuvC 유사 도메인에 의존하여 절단하는 하나 이상의 RuvC 유사 도메인을 포함한다. 따라서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 N-말단 RuvC 유사 도메인을 포함할 수 있다.
- [0298] 구현예에서, N-말단 RuvC 유사 도메인은 절단 능력이 있다.
- [0299] 구현예에서, N-말단 RuvC 유사 도메인은 절단 능력이 없다.
- [0300] 일부 구현예에서, N-말단 RuvC 유사 도메인은 여기, 예를 들어 국제 출원 W02015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 3A-3B 또는 도면 7A-7B에 개시된 N-말단 RuvC 유사 도메인의 서열과 1 내지 2, 3, 4 또는 5 잔기 이내만큼 많이 상이하다. 일부 구현예에서, 국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 3A-3B 또는 도면 7A-7B에서 확인된 매우 보존된 잔기 중 1, 2 또는 3 개 모두가 존재한다.
- [0301] 일부 구현예에서, N-말단 RuvC 유사 도메인은 여기, 예를 들어 국제 출원 W02015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 4A-4B 또는 도면 7A-7B에 개시된 N-말단 RuvC 유사 도메인의 서열과 1 내지 2, 3, 4 또는 5 잔기 이내만큼 많이 상이하다. 일부 구현예에서, 국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 4A-4B 또는 도면 7A-7B에서 확인된 매우 보존된 잔기 중 1, 2, 3 또는 4 개 모두가 존재한다.
- [0302] *(d) 추가 RuvC 유사 도메인*
- [0303] N-말단 RuvC 유사 도메인 이외에, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는 하나 이상의 추가 RuvC 유사 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 2 개의 추가 RuvC 유사 도메인을 포함할 수 있다. 바람직하게는, 추가 RuvC 유사 도메인은 5 개 이상의 아미노산 길이 및 예를 들어 15 개 미만의 아미노산 길이, 예를 들어 5 내지 10 개의 아미노산 길이, 예를 들어 8 개의 아미노산 길이이다.
- [0304] *(e) HNH 유사 도메인*
- [0305] 일부 구현예에서, HNH 유사 도메인은 단일 가닥 상보성 도메인, 예를 들어, 이중 가닥 핵산 분자의 상보성 가닥을 절단한다. 일부 구현예에서, HNH 유사 도메인은 15, 20, 25 개 이상의 아미노산 길이나 40, 35 또는 30 개 이내의 아미노산 길이, 예를 들어 20 내지 35 개의 아미노산 길이, 예를 들어 25 내지 30 개의 아미노산 길이이다. 예시적인 HNH 유사 도메인이 여기에 기재되어 있다.
- [0306] 일부 구현예에서, HNH 유사 도메인은 절단 능력이 있다.
- [0307] 일부 구현예에서, HNH 유사 도메인은 절단 능력이 없다.
- [0308] 일부 구현예에서, HNH 유사 도메인은 여기, 예를 들어 국제 출원 W02015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 5A-5C 또는 도면 7A-7B에 개시된 HNH 유사 도메인의 서열과 1 내지 2, 3, 4 또는 5 잔기 이내만큼 많이 상이하다. 일부 구현예에서, 국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 5A-5C 또는 도면 7A-7B에서 확인된 매우 보존된 잔기 중 1 또는 둘 다가 존재한다.
- [0309] 일부 구현예에서, HNH 유사 도메인은 여기, 예를 들어 국제 출원 W02015/161276, 예를 들어 그 안의 도면 6A-6B 또는 도면 7A-7B에 개시된 HNH 유사 도메인의 서열과 1 내지 2, 3, 4 또는 5 잔기 이내만큼 많이 상이하다. 일부 구현예에서, 국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 6A-6B 또는 도면 7A-7B에서 확인된 매우 보존된 잔기 중 1, 2, 3 개 모두가 존재한다.
- [0310] *(f) 뉴클레아제 및 헬리카제 활성*
- [0311] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 표적 핵산 분자를 절단할 수 있다. 전형적으로, 야생형 Cas9 분자는 표적 핵산 분자의 두 가닥 모두를 절단한다. Cas9 분자 및 Cas9 폴리펩티드가 뉴클레아제 절단(또는 다른 특성)이 변경되도록 조작되어, 예를 들어, 니카제이거나 또는 표적 핵산을 절단하는 능력이 없는 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드를 제공할 수 있다. 표적 핵산 분자를 절단할 수 있는 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드가 여기서 eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드로 지칭된다.
- [0312] 일부 구현예에서, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는, 니카제 활성, 즉 단일 가닥, 예를 들어 핵산 분자의 비상보성 가닥 또는 상보성 가닥을 절단하는 능력; 이중 가닥 뉴클레아제 활성, 즉 이중 가닥 핵산의 양쪽 가닥을 절단하고 이중 가닥 파손을 형성하는 능력, 이는 일부 구현예에서 2 개의 니카제 활성의 존재임; 엔도뉴클레아제 활성; 엑소뉴클레아제 활성; 및 헬리카제 활성, 즉 이중 가닥 핵산의 나선 구조를 푸는 능력; 중 하나 이상을 포함한다.

- [0313] 일부 구현예에서, 효소적 활성 또는 eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는 양쪽 가닥을 모두 절단하고 이중 가닥 파손을 초래한다. 일부 구현예에서, eaCas9 분자는 하나의 가닥만, 예를 들어 gRNA가 혼성화하는 가닥 또는 gRNA가 혼성화하는 가닥에 대해 상보적인 가닥만을 절단한다. 일부 구현예에서, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는 HNH 유사 도메인과 관련된 절단 활성을 포함한다. 일부 구현예에서, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는 N-말단 RuvC 유사 도메인과 관련된 절단 활성을 포함한다. 일부 구현예에서, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는 HNH 유사 도메인과 관련된 절단 활성 및 N-말단 RuvC 유사 도메인과 관련된 절단 활성을 포함한다. 일부 구현예에서, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는, 활성 또는 절단 능력이 있는 HNH 유사 도메인 및 비활성 또는 절단 능력이 없는 N-말단 RuvC 유사 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는 비활성 또는 절단 능력이 없는 HNH 유사 도메인 및 활성 또는 절단 능력이 있는 N-말단 RuvC 유사 도메인을 포함한다.
- [0314] 일부 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 gRNA 분자와 상호 작용하는 능력 및 gRNA 분자와 함께 코어 표적 도메인으로 국소화하는 능력을 가지나 표적 핵산을 절단할 수 없거나 효율적인 속도로 절단할 수 없다. 절단 활성이 없거나 실질적인 절단 활성이 없는 Cas9 분자가 여기서 eiCas9 분자 또는 eiCas9 폴리펩티드로 지칭된다. 예를 들어, eiCas9 분자 또는 eiCas9 폴리펩티드는 절단 활성이 없거나 또는 실질적으로 보다 작은 활성, 예를 들어, 여기에 기재된 분석에 의해 측정된 바와 같이, 참조 Cas9 분자 또는 eiCas9 폴리펩티드의 20, 10, 5, 1 또는 0.1 % 미만의 절단 활성을 가질 수 있다.
- [0315] (g) 표적화 및 PAM
- [0316] Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 가이드 RNA(gRNA) 분자와 상호작용할 수 있고, 표적 도메인 및 PAM 서열을 포함하는 부위로 gRNA 분자와 함께 국소화할 수 있는 폴리펩티드이다.
- [0317] 일부 구현예에서, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드가 표적 핵산과 상호 작용하고 표적 핵산을 절단하는 능력은 PAM 서열에 좌우된다. PAM 서열은 표적 핵산에 있는 서열이다. 일부 구현예에서, 표적 핵산의 절단은 PAM 서열로부터 상류에서 발생한다. 상이한 세균 종 유래 eaCas9 분자는 상이한 서열 모티프(예를 들어, PAM 서열)를 인식할 수 있다. 일부 구현예에서, *S. pyogenes*의 eaCas9 분자는 NGG, NAG, NGA 서열 모티프를 인식하고, 상기 서열의 상류에서 표적 핵산 서열 1 내지 10, 예를 들어, 3 내지 5 개 염기쌍의 절단을 지시한다. 예를 들어, 문헌[Mali *et al.*, Science 2013; 339(6121): 823-826]을 참조한다. 일부 구현예에서, *S. thermophilus*의 eaCas9 분자는 NGGNG 및/또는 NNAGAAW(W = A 또는 T) 서열 모티프를 인식하고, 상기 서열의 상류에서 표적 핵산 서열 1 내지 10, 예를 들어, 3 내지 5 개 염기쌍의 절단을 지시한다. 예를 들어, 문헌[Horvath *et al.*, Science 2010; 327(5962):167-170, and Deveau *et al.*, J Bacteriol 2008; 190(4): 1390-1400]을 참조한다. 일부 구현예에서, *S. mutans*의 eaCas9 분자는 NGG 및/또는 NAAR(R = A 또는 G) 서열 모티프를 인식하고, 상기 서열의 상류에서 코어 표적 핵산 서열 1 내지 10, 예를 들어, 3 내지 5 개 염기쌍의 절단을 지시한다. 예를 들어, 문헌[Deveau *et al.*, J Bacteriol 2008; 190(4): 1390-1400]을 참조한다. 일부 구현예에서, *S. aureus*의 eaCas9 분자는 NNGRR(R = A 또는 G) 서열 모티프를 인식하고, 상기 서열의 상류에서 표적 핵산 서열 1 내지 10, 예를 들어, 3 내지 5 개 염기쌍의 절단을 지시한다. 일부 구현예에서, *S. aureus*의 eaCas9 분자는 NNGRRT(R = A 또는 G) 서열 모티프를 인식하고, 상기 서열의 상류에서 표적 핵산 서열 1 내지 10, 예를 들어, 3 내지 5 개 염기쌍의 절단을 지시한다. 일부 구현예에서, *S. aureus*의 eaCas9 분자는 NNGRRV(R = A 또는 G) 서열 모티프를 인식하고, 상기 서열의 상류에서 표적 핵산 서열 1 내지 10, 예를 들어, 3 내지 5 개 염기쌍의 절단을 지시한다. 일부 구현예에서, *N. meningitidis*의 eaCas9 분자는 NNNNGATT 또는 NNGCTT(R = A 또는 G, V = A, G 또는 C) 서열 모티프를 인식하고, 상기 서열의 상류에서 표적 핵산 서열 1 내지 10, 예를 들어, 3 내지 5 개 염기쌍의 절단을 지시한다. 예를 들어, 문헌[Hou *et al.*, PNAS Early Edition 2013, 1-6]을 참조한다. PAM 서열을 인식하는 Cas9 분자의 능력이 예를 들어, 문헌[Jinek *et al.*, Science 2012 337:816]에 기재된 형질 전환 분석을 이용하여 결정될 수 있다. 상기 언급된 구현예에서, N은 임의의 뉴클레오티드 잔기, 예를 들어, A, G, C 또는 T 중 어느 하나일 수 있다.
- [0318] 여기에 논의된 바와 같이, Cas9 분자가 조작되어 Cas9 분자의 PAM 특이성을 변경시킬 수 있다.
- [0319] 예시적인 자연 발생 Cas9 분자가 문헌[Chylinski *et al.*, RNA Biology 2013 10:5, 727-737]에 기재되어 있다. 상기 Cas9 분자는 클러스터 1 - 78 세균 패밀리의 Cas9 분자를 포함한다.
- [0320] 예시적인 자연 발생 Cas9 분자는 클러스터 1 세균 패밀리의 Cas9 분자를 포함한다. 예는: *S. pyogenes*(예를 들어, SF370, MGAS10270, MGAS10750, MGAS2096, MGAS315, MGAS5005, MGAS6180, MGAS9429, NZ131 및 SSI-1 균주), *S. thermophilus*(예를 들어, LMD-9 균주), *S. pseudoporcinus*(예를 들어, SPIN 20026 균주), *S. mutans*

(예를 들어, UA159, NN2025 균주), *S. macacae*(예를 들어, NCTC11558 균주), *S. gallolyticus*(예를 들어, UCN34, ATCC BAA-2069 균주), *S. equines*(예를 들어, ATCC 9812, MGCS 124 균주), *S. dysdactiae*(예를 들어, GGS 124 균주), *S. bovis*(예를 들어, ATCC 700338 균주), *S. anginosus*(예를 들어, F0211 균주), *S. agalactiae*(예를 들어, NEM316, A909 균주), *Listeria monocytogenes*(예를 들어, F6854 균주), *Listeria innocua*(*L. innocua*, 예를 들어, Clip11262 균주), *Enterococcus italicus*(예를 들어, DSM 15952 균주) 또는 *Enterococcus faecium*(예를 들어, 1,231,408 균주)의 Cas9 분자를 포함한다. 또 다른 예시적인 Cas9 분자는 *Neisseria meningitidis*의 Cas9 분자이다(Hou et al., PNAS Early Edition 2013, 1-6).

[0321] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는, 여기에 기재된 임의의 Cas9 분자 서열 또는 자연 발생 Cas9 분자 서열, 예를 들어, 여기에 열거된 중 유래 Cas9 분자(예를 들어, 서열 번호: 112-115) 또는 문헌[Chylinski et al., RNA Biology 2013 10:5, 727-737; Hou et al., PNAS Early Edition 2013, 1-6]에 기재된 임의의 Cas9 분자 서열과 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 상동성을 갖거나; 이와 비교할 경우 2, 5, 10, 15, 20, 30 또는 40% 이내의 아미노산 잔기가 상이하거나; 이와 1, 2, 5, 10 또는 20 개 이상의 아미노산이 상이하거나 100, 80, 70, 60, 50, 40 또는 30 개 이내의 아미노산이 상이하거나; 또는 이와 동일한; 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는: 니카제 활성; 이중 가닥 절단 활성(예를 들어, 엔도뉴클레아제 및/또는 엑소뉴클레아제 활성); 헬리카제 활성; 또는 gRNA 분자와 함께 표적 핵산으로 귀소하는 능력; 중 하나 이상의 활성을 포함한다.

[0322] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 2A-2G]의 컨센서스 서열의 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 “\*”는 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 및 *L. innocua* Cas9 분자의 아미노산 서열 중 대응하는 위치에서 발견되는 임의의 아미노산을 나타내고, “-”는 임의의 아미노산을 나타낸다. 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 서열 번호: 112-117의 컨센서스 서열 또는 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열의 서열과 1 이상이나 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 아미노산 잔기가 상이하다. 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 서열 번호: 117 또는 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 7A-7B]에 기재된 바와 같은 아미노산 서열을 포함하고, 여기서 “\*”는 *S. pyogenes* 또는 *N. meningitidis* Cas9 분자의 아미노산 서열 중 대응하는 위치에서 발견되는 임의의 아미노산을 나타내고, “-”는 임의의 아미노산을 나타내며 “-”는 임의의 아미노산 또는 부재를 나타낸다. 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 서열 번호: 116 또는 117 또는 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 7A-7B]에 기재된 바와 같은 서열과 1 이상이나 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 아미노산 잔기가 상이하다.

[0323] 많은 Cas9 분자의 서열 비교는 특정 영역이 보존되고 있음을 나타낸다. 상기는 영역 1(1 내지 180 잔기 또는 영역 1'의 경우 120 내지 180 잔기); 영역 2(360 내지 480 잔기); 영역 3(660 내지 720 잔기); 영역 4(817 내지 900 잔기); 및 영역 5(900 내지 960 잔기);로 확인된다.

[0324] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 생물학적 활성 분자, 예를 들어 여기에 기재된 하나 이상의 활성을 갖는 Cas9 분자를 제공하기에 충분한 추가 Cas9 분자 서열과 함께 영역 1-5를 포함한다. 일부 구현예에서, 영역 1-6 각각은 독립적으로, 예를 들어 서열 번호: 112-117에 제시되거나 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 2A-2G 또는 도면 7A-7B]에 개시된 서열, 여기에 기재된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드의 대응 잔기와 50%, 60%, 70% 또는 80%의 상동성을 갖는다.

[0325] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는, *S. pyogenes* Cas9의 아미노산 중 1-180 아미노산(넘버링은 국제 출원 WO 2015/161276의 도면 2A-2G에 있는 모티프 서열에 따르고; 국제 출원 WO 2015/161276의 도면 2A-2G에 있는 4 개의 Cas9 서열의 잔기 중 52%가 보존됨)과 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 상동성을 갖거나; *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 중 1-180 아미노산과 1, 2, 5, 10 또는 20 개 이상이나 90, 80, 70, 60, 50, 40 또는 30 개 이내의 아미노산이 상이하거나; 또는 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 1-180과 동일한; 영역 1로 지칭되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0326] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는, *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 120-180 아미노산(국제 출원

WO 2015/161276의 도면 2A-2G에 있는 4 개의 Cas9 서열의 잔기 중 55%가 보존됨)과 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 상동성을 갖거나; *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 120-180 아미노산과 1, 2, 또는 5 개 이상이나 35, 30, 25, 20 또는 10 개 이내의 아미노산이 상이하거나; 또는 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 120-180과 동일한; 영역 1'로 지칭되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0327] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는, *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 360-480 아미노산(국제 출원 WO 2015/161276의 도면 2A-2G에 있는 4 개의 Cas9 서열의 잔기 중 52%가 보존됨)과 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 상동성을 갖거나; *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 360-480 아미노산과 1, 2, 또는 5 개 이상이나 35, 30, 25, 20 또는 10 개 이내의 아미노산이 상이하거나; 또는 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 360-480과 동일한; 영역 2로 지칭되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0328] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는, *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 660-720 아미노산(국제 출원 WO 2015/161276의 도면 2A-2G에 있는 4 개의 Cas9 서열의 잔기 중 56%가 보존됨)과 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 상동성을 갖거나; *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 660-720 아미노산과 1, 2, 또는 5 개 이상이나 35, 30, 25, 20 또는 10 개 이내의 아미노산이 상이하거나; 또는 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 660-720과 동일한; 영역 3으로 지칭되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0329] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는, *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 817-900 아미노산(국제 출원 WO 2015/161276의 도면 2A-2G에 있는 4 개의 Cas9 서열의 잔기 중 55%가 보존됨)과 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 상동성을 갖거나; *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 817-900 아미노산과 1, 2, 또는 5 개 이상이나 35, 30, 25, 20 또는 10 개 이내의 아미노산이 상이하거나; 또는 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 817-900과 동일한; 영역 4로 지칭되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0330] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는, *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 900-960 아미노산(국제 출원 WO 2015/161276의 도면 2A-2G에 있는 4 개의 Cas9 서열의 잔기 중 60%가 보존됨)과 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99%의 상동성을 갖거나; *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 900-960 아미노산과 1, 2, 또는 5 개 이상이나 35, 30, 25, 20 또는 10 개 이내의 아미노산이 상이하거나; 또는 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans* 또는 *L. innocua* Cas9의 아미노산 서열 중 900-960과 동일한; 영역 5로 지칭되는 아미노산 서열을 포함한다.

[0331] (h) 조작되거나 변경된 Cas9 분자 및 Cas9 폴리펩티드

[0332] 여기에 기재된 Cas9 분자 및 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, 자연 발생 Cas9 분자는: 니카제 활성, 뉴클레아제 활성(예를 들어, 엔도뉴클레아제 및/또는 엑소뉴클레아제 활성); 헬리카제 활성; gRNA 분자와 기능적으로 결합하는 능력; 및 핵산 상의 부위를 표적화(또는 국소화)하는 능력(예를 들어, PAM 인식 및 특이성);을 포함한 다수의 특성 중 어느 하나를 보유할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 상기 특성의 전부 또는 하위 세트를 포함할 수 있다. 전형적인 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 gRNA 분자와 상호 작용하고, gRNA 분자와 협력하여 핵산 부위로 국소화하는 능력을 갖는다. 다른 활성, 예를 들어 PAM 특이성, 절단 활성 또는 헬리카제 활성이 Cas9 분자 및 Cas9 폴리펩티드에서 보다 광범위하게 달라질 수 있다.

[0333] Cas9 분자는 조작된 Cas9 분자 및 조작된 Cas9 폴리펩티드를 포함한다(상기 문맥에 사용된 바와 같은 "조작된(engineered)"은 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드가 참조 서열과 상이함을 단지 의미하며 어떤 프로세스를 암시하거나 기원 제한을 암시하지 않음). 조작된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 변경된 효소 특성, 예를 들어 변경된 뉴클레아제 활성(자연 발생 또는 다른 참조 Cas9 분자와 비교된 바와 같음) 또는 변경된 헬리카제 활성을 포함할 수 있다. 여기서 논의된 바와 같이, 조작된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 (이중 가닥 뉴클레아제 활성과 반대되는) 니카제 활성을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 이의 크기를 변경하는 변경, 예를 들어 하나 이상 또는 임의의 Cas9 활성에 대한 유의미한 영향없이 이의 크기

를 감소시키는 예를 들어, 아미노산 서열의 결실을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 PAM 인식에 영향을 미치는 변형을 포함할 수 있다. 예를 들어, 조작된 Cas9 분자는 내인성 야생형 PI 도메인에 의해 인식되는 것이 아닌 PAM 서열을 인식하도록 변경될 수 있다. 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 자연 발생 Cas9 분자와 서열이 상이할 수 있으나 하나 이상의 Cas9 활성에 있어 유의미한 변형을 갖지 않을 수 있다.

[0334] 원하는 특성을 갖는 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드가 다양한 방식으로, 예를 들어 모체, 예를 들어 자연 발생 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드의 변경에 의해 만들어져 원하는 특성을 갖는 변경된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드를 제공할 수 있다. 예를 들어, 모체 Cas9 분자, 예를 들어 자연 발생 또는 조작된 Cas9 분자와 관련하여 하나 이상의 돌연변이 또는 차이가 도입될 수 있다. 상기 돌연변이 및 차이는: 치환(예를 들어, 보존적 치환 또는 비필수 아미노산의 치환); 삽입; 또는 결실;을 포함한다. 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 참조, 예를 들어 모체 Cas9 분자와 관련하여 하나 이상의 돌연변이 또는 차이, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 30, 40 또는 50 개 이상이나 200, 100 또는 80 개 미만의 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0335] 일부 구현예에서, 돌연변이 또는 돌연변이들은 Cas9 활성, 예를 들어 여기에 기재된 Cas9 활성에 실질적인 영향을 미치지 않는다. 일부 구현예에서, 돌연변이 또는 돌연변이들은 Cas9 활성, 예를 들어 여기에 기재된 Cas9 활성에 실질적인 영향을 미친다.

[0336] (i) 비절단 및 변형 절단 Cas9 분자 및 Cas9 폴리펩티드

[0337] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 자연 발생 Cas9 분자와 상이한, 예를 들어 가장 가까운 상동성을 갖는 자연 발생 Cas9 분자와 상이한 절단 특성을 포함한다. 예를 들어, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는: 조절, 예를 들어, 자연 발생 Cas9 분자(예를 들어, *S. pyogenes*의 Cas9 분자)에 비해 이중 가닥 핵산의 절단(엔도뉴클레아제 및/또는 엑소뉴클레아제 활성)을, 예를 들어, 감소 또는 증가시키는 능력; 예를 들어, 자연 발생 Cas9 분자(예를 들어, *S. pyogenes*의 Cas9 분자)에 비해 핵산의 단일 가닥, 예를 들어, 핵산 분자의 비상보성 가닥 또는 핵산 분자의 상보성 가닥의 절단(니카제 활성)을 조절, 예를 들어, 감소 또는 증가시키는 능력; 또는 핵산 분자, 예를 들어, 이중 가닥 또는 단일 가닥 핵산 분자를 절단하는 능력이 제거될 수 있는 것;과 같이, 자연 발생 Cas9 분자, 예를 들어 *S. pyogenes*의 Cas9 분자와 상이할 수 있다.

[0338] (j) 변형 절단 eaCas9 분자 및 eaCas9 폴리펩티드

[0339] 일부 구현예에서, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는, N-말단 RuvC 유사 도메인과 관련된 절단 활성; HNH 유사 도메인과 관련된 절단 활성; HNH 유사 도메인과 관련된 절단 활성 및 N-말단 RuvC 유사 도메인과 관련된 절단 활성; 중 하나 이상을 포함한다.

[0340] 일부 구현예에서, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는, 활성 또는 절단 능력이 있는 HNH 유사 도메인 및 비활성 또는 절단 능력이 없는 N-말단 RuvC 유사 도메인을 포함한다. 예시적인 비활성 또는 절단 능력이 없는 N-말단 RuvC 유사 도메인은, N-말단 RuvC 유사 도메인에서 아스파르트산의 돌연변이를 가질 수 있는데, 예를 들어, 서열번호: 112-117의 컨센서스 서열 또는 문헌[국제 출원 WO2015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열의 9번 위치의 아스파르트산 또는 서열번호: 117의 10번 위치의 아스파르트산이 예를 들어, 알라닌으로 치환될 수 있다. 일부 구현예에서, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는 N-말단 RuvC 유사 도메인의 야생형과 상이하며, 표적 핵산을 절단하지 않거나 또는 예를 들어 여기 기재된 분석에 의해 측정된 바와 같이, 유의미하게 보다 낮은 효율, 예를 들어, 참조 Cas9 분자의 20, 10, 5, 1 또는 0.1% 미만의 절단 활성으로 절단한다. 참조 Cas9 분자는 자연 발생 비변형 Cas9 분자, 예를 들어, *S. pyogenes* 또는 *S. thermophilus*의 Cas9 분자와 같은 자연 발생 Cas9 분자에 의할 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 Cas9 분자는 가장 가까운 서열 동일성 또는 상동성을 갖는 자연 발생 Cas9 분자이다.

[0341] 일부 구현예에서, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는 비활성 또는 절단 능력이 없는 HNH 도메인 및 활성 또는 절단 능력이 있는 N-말단 RuvC 유사 도메인을 포함한다. 예시적인 비활성 또는 절단 능력이 없는 HNH 유사 도메인은: HNH 유사 도메인의 히스티딘, 예를 들어, 서열 번호: 112-117의 컨센서스 서열 또는 문헌[국제 출원 WO2015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열의 856번 위치에 도식된 히스티딘이 예를 들어, 알라닌으로 치환될 수 있고; HNH 유사 도메인에서 하나 이상의 아스파라긴, 예를 들어, 서열 번호: 112-117의 컨센서스 서열 또는 문헌[국제 출원 WO2015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열의 870번 위치 및/또는 서열 번호: 112-117의 컨센서스 서열 또는 문헌[국제 출원 WO2015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열의 879번 위치에 도식된 아스파라긴이 예를 들어, 알라닌

으로 치환될 수 있는; 것 중 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, eaCas9는 HNH 유사 도메인에서 야생형과 상이하며, 예를 들어 여기 기재된 분석에 의해 측정된 바와 같이, 표적 핵산을 절단하지 않거나 또는 유의미하게 보다 낮은 효율 예를 들어, 참조 Cas9 분자의 20, 10, 5, 1 또는 0.1% 미만의 절단 활성으로 절단한다. 참조 Cas9 분자는 자연 발생 비변형 Cas9 분자, 예를 들어, *S. pyogenes* 또는 *S. thermophilus*의 Cas9 분자와 같은 자연 발생 Cas9 분자에 의할 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 Cas9 분자는 가장 가까운 서열 동일성 또는 상동성을 갖는 자연 발생 Cas9 분자이다.

[0342] 일부 구현예에서, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드는 비활성 또는 절단 능력이 없는 HNH 도메인 및 활성 또는 절단 능력이 있는 N-말단 RuvC 유사 도메인을 포함한다. 예시적인 비활성 또는 절단 능력이 없는 HNH 유사 도메인은: HNH 유사 도메인의 히스티딘, 예를 들어, 서열 번호: 112-117의 컨센서스 서열 또는 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열의 856번 위치에 도시된 히스티딘이 예를 들어, 알라닌으로 치환될 수 있고; HNH 유사 도메인에서 하나 이상의 아스파라긴, 예를 들어, 서열 번호: 112-117의 컨센서스 서열 또는 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열의 870번 위치 및/또는 서열 번호: 112-117의 컨센서스 서열 또는 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열의 879번 위치에 도시된 아스파라긴이 예를 들어, 알라닌으로 치환될 수 있는; 것 중 하나 이상의 돌연변이를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, eaCas9는 HNH 유사 도메인에서 야생형과 상이하며, 예를 들어 여기 기재된 분석에 의해 측정된 바와 같이, 표적 핵산을 절단하지 않거나 또는 유의미하게 보다 낮은 효율 예를 들어, 참조 Cas9 분자의 20, 10, 5, 1 또는 0.1% 미만의 절단 활성으로 절단한다. 참조 Cas9 분자는 자연 발생 비변형 Cas9 분자, 예를 들어, *S. pyogenes* 또는 *S. thermophilus*의 Cas9 분자와 같은 자연 발생 Cas9 분자에 의할 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 Cas9 분자는 가장 가까운 서열 동일성 또는 상동성을 갖는 자연 발생 Cas9 분자이다.

[0343] **(k) 표적 핵산의 하나 또는 양쪽 가닥 모두를 절단하는 능력의 변경**

[0344] 일부 구현예에서, 예시적인 Cas9 활성은 PAM 특이성, 절단 활성 및 헬리카제 활성 중 하나 이상을 포함한다. 예를 들어, 하나 이상의 RuvC 유사 도메인, 예를 들어, N-말단 RuvC 유사 도메인; HNH 유사 도메인; RuvC 유사 도메인 및 HNH 유사 도메인의 외부 영역;에 돌연변이(들)가 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, RuvC 유사 도메인, 예를 들어, N-말단 RuvC 유사 도메인에 돌연변이(들)가 존재한다. 일부 구현예에서, HNH 유사 도메인에 돌연변이(들)가 존재한다. 일부 구현예에서, RuvC 유사 도메인, 예를 들어, N-말단 RuvC 유사 도메인 모두 및 HNH 유사 도메인에 돌연변이가 존재한다.

[0345] *S. pyogenes* 서열과 관련하여 RuvC 도메인 또는 HNH 도메인에서 이루어질 수 있는 예시적인 돌연변이는: D10A, E762A, H840A, N854A, N863A 및/또는 D986A를 포함한다.

[0346] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 참조 Cas9 분자에 비해, RuvC 도메인 및/또는 HNH 도메인에서 하나 이상의 차이를 포함하는 eiCas9 분자 또는 eiCas9 폴리펩티드이고, 상기 eiCas9 분자 또는 eiCas9 폴리펩티드는 예를 들어, 여기 기재된 바와 같이 예를 들어, 절단 분석에서 야생형과 비교했을 때, 핵산을 절단하지 않거나 또는 야생형의 절단보다 유의미하게 덜 효율적으로 절단하거나, 여기 기재된 분석에 의해 측정된 바와 같이, 참조 Cas9 분자의 50, 25, 10 또는 1% 미만으로 절단한다.

[0347] 특정 서열, 예를 들어, 치환이 표적화 활성, 절단 활성 등과 같은 하나 이상의 활성에 영향을 미칠 수 있는지 여부가, 예를 들어, 돌연변이가 보존적인지 여부를 평가함으로써 평가 또는 예측될 수 있다. 일부 구현예에서, Cas9 분자의 상황에서 사용된 바와 같은 "비필수(non-essential)" 아미노산 잔기는, Cas9 활성(예를 들어, 절단 활성)을 없애지 않거나 보다 바람직하게는 실질적으로 변경하지 않으면서, Cas9 분자, 예를 들어, 자연 발생 Cas9 분자, 예를 들어, eaCas9 분자의 야생형 서열로부터 변경될 수 있는 잔기인 반면, "필수(essential)" 아미노산 잔기의 변경은 활성(예를 들어, 절단 활성)의 실질적인 상실을 초래한다.

[0348] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 자연 발생 Cas9 분자와 상이한, 예를 들어 가장 가까운 상동성을 갖는 자연 발생 Cas9 분자와 상이한 절단 특성을 포함한다. 예를 들어, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는: 예를 들어, 자연 발생 Cas9 분자(예를 들어, *S. aureus*, *S. pyogenes* 또는 *C. jejuni*의 Cas9 분자)에 비해 이중 가닥 파손의 절단(엔도뉴클레아제 및/또는 엑소뉴클레아제 활성)을 조절, 예를 들어 감소 또는 증가시키는 능력; 예를 들어, 자연 발생 Cas9 분자(예를 들어, *S. aureus*, *S. pyogenes* 또는 *C. jejuni*의 Cas9 분자)에 비해 핵산의 단일 가닥, 예를 들어, 핵산 분자의 비상보성 가닥 또는 핵산 분자의 상보성 가닥의 절단(닉카제 활성)을 조절, 예를 들어, 감소 또는 증가시키는 능력; 또는 핵산 분자, 예를 들어, 이중 가닥 또는 단일 가닥 핵산 분자를 절단하는 능력이 제거될 수 있는 것;과 같이, 자연 발생 Cas9 분자, 예를 들어 *S. aureus*, *S.*

*pyogenes* 또는 *C. jejuni*의 Cas9 분자와 상이할 수 있다.

- [0349] 일부 구현예에서, 변경된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는: RuvC 도메인과 관련된 절단 활성; HNH 도메인과 관련된 절단 활성; HNH 도메인과 관련된 절단 활성 및 RuvC 도메인과 관련된 절단 활성; 중 하나 이상을 포함하는 eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드이다.
- [0350] 일부 구현예에서, 변경된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는, 핵산 분자(이중 가닥 또는 단일 가닥 핵산 분자 중 하나)를 절단하지 않거나 또는 예를 들어, 여기 기재된 분석에 의해 측정된 바와 같이, 유의미하게 보다 낮은 효율, 예를 들어, 참조 Cas9 분자의 20, 10, 5, 1 또는 0.1% 미만의 절단 활성으로 핵산 분자를 절단하는 eiCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드이다. 참조 Cas9 분자는 자연 발생 비변형 Cas9 분자, 예를 들어, *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, *C. jejuni* 또는 *N. meningitidis*의 Cas9 분자와 같은 자연 발생 Cas9 분자일 수 있다. 일부 구현예에서, 참조 Cas9 분자는 가장 가까운 서열 동일성 또는 상동성을 갖는 자연 발생 Cas9 분자이다. 일부 구현예에서, eiCas9 분자 또는 eiCas9 폴리펩티드는 HNH 도메인과 관련된 절단 활성 및 RuvC 도메인과 관련된 실질적인 절단 활성이 없다.
- [0351] 일부 구현예에서, 변경된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는, 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 2A-2G ]에 개시된 컨센서스 서열에 도시된 *S. pyogenes*의 고정 아미노산 잔기를 포함하는 eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드이고, 문헌[국제 출원 W02015/161276, 예를 들어, 그 안의 도면 2A-2G ]에 개시된 컨센서스 서열에 “-” 로 나타난 잔기 또는 서열 번호: 117에서 하나 이상의 잔기(예를 들어, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 100, 200 개의 아미노산 잔기)에서 *S. pyogenes*의 아미노산 서열과 상이한(예를 들어, 치환을 갖는) 하나 이상의 아미노산을 갖는다.
- [0352] 일부 구현예에서, 변경된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는: 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열의 고정 서열에 대응하는 서열이 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열 중 고정 잔기의 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 또는 20% 이내로 상이하고; 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열에서 “\*” 로 확인된 잔기에 대응하는 서열이 자연 발생 Cas9 분자, 예를 들어 *S. pyogenes* Cas9 분자의 대응하는 서열 유래 “\*” 잔기의 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40% 이내로 상이하고; 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열에서 “-” 로 확인된 잔기에 대응하는 서열이 자연 발생 Cas9 분자, 예를 들어 *S. pyogenes* Cas9 분자의 대응하는 서열 유래 “-” 잔기의 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 또는 60% 이내로 상이한; 서열을 포함한다.
- [0353] 일부 구현예에서, 변경된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는, 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G ]에 개시된 컨센서스 서열에 도시된 *S. thermophilus*의 고정 아미노산 잔기를 포함하는 eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드이고, 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G ]에 개시된 컨센서스 서열에서 “-” 로 나타난 하나 이상의 잔기(예를 들어, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 100, 200 개의 아미노산 잔기)에서 *S. thermophilus*의 아미노산 서열과 상이한(예를 들어, 치환을 갖는) 하나 이상의 아미노산을 갖는다.
- [0354] 일부 구현예에서, 변경된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는: 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열의 고정 서열에 대응하는 서열이 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열 중 고정 잔기의 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 또는 20% 이내로 상이하고; 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열에서 “\*” 로 확인된 잔기에 대응하는 서열이 자연 발생 Cas9 분자, 예를 들어 *S. thermophilus* Cas9 분자의 대응하는 서열 유래 “\*” 잔기의 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40% 이내로 상이하고; 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열에서 “-” 로 확인된 잔기에 대응하는 서열이 자연 발생 Cas9 분자, 예를 들어 *S. thermophilus* Cas9 분자의 대응하는 서열 유래 “-” 잔기의 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 또는 60% 이내로 상이한; 서열을 포함한다.
- [0355] 일부 구현예에서, 변경된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는, 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G ]에 개시된 컨센서스 서열에 도시된 *S. mutans*의 고정 아미노산 잔기를 포함하는 eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드이고, 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G ]에 개시된 컨센서스 서열에서 “-” 로 나타난 하나 이상의 잔기(예를 들어, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 100, 200 개의 아미노산 잔기)에서 *S. mutans*의 아미노산 서열과 상이한(예를 들어, 치환을 갖는) 하나 이상의 아미노산을 갖는다.
- [0356] 일부 구현예에서, 변경된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는: 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에

개시된 컨센서스 서열의 고정 서열에 대응하는 서열이 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열 중 고정 잔기의 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 또는 20% 이내로 상이하고; 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열에서 “\*” 로 확인된 잔기에 대응하는 서열이 자연 발생 Cas9 분자, 예를 들어 *S. mutans* Cas9 분자의 대응하는 서열 유래 “\*” 잔기의 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40% 이내로 상이하고; 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열에서 “-” 로 확인된 잔기에 대응하는 서열이 자연 발생 Cas9 분자, 예를 들어 *S. mutans* Cas9 분자의 대응하는 서열 유래 “-” 잔기의 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 또는 60% 이내로 상이한; 서열을 포함한다.

[0357] 일부 구현예에서, 변경된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는, 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G ]에 개시된 컨센서스 서열에 도시된 *L. innocula*의 고정 아미노산 잔기를 포함하는 eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드이고, 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G ]에 개시된 컨센서스 서열에서 “-” 로 나타낸 하나 이상의 잔기(예를 들어, 2, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 100, 200 개의 아미노산 잔기)에서 *L. innocula*의 아미노산 서열과 상이한(예를 들어, 치환을 갖는) 하나 이상의 아미노산을 갖는다. 일부 구현예에서, 변경된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는: 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열의 고정 서열에 대응하는 서열이 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열 중 고정 잔기의 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 또는 20% 이내로 상이하고; 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열에서 “\*” 로 확인된 잔기에 대응하는 서열이 자연 발생 Cas9 분자, 예를 들어 *L. innocula* Cas9 분자의 대응하는 서열 유래 “\*” 잔기의 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 또는 40% 이내로 상이하고; 문헌[국제 출원 W02015/161276의 도면 2A-2G]에 개시된 컨센서스 서열에서 “-” 로 확인된 잔기에 대응하는 서열이 자연 발생 Cas9 분자, 예를 들어 *L. innocula* Cas9 분자의 대응하는 서열 유래 “-” 잔기의 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 55, 또는 60% 이내로 상이한; 서열을 포함한다.

[0358] 일부 구현예에서, 변경된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, eaCas9 분자는, 예를 들어 2 개 이상의 상이한 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, 상이한 종의 2 개 이상의 자연 발생 Cas9 분자의 융합일 수 있다. 예를 들어, 한 종의 자연 발생 Cas9 분자의 단편이 제2 종의 Cas9 분자의 단편에 융합될 수 있다. 예로서, N-말단 RuvC 유사 도메인을 포함하는 *S. pyogenes*의 Cas9 분자 단편이 HNH 유사 도메인을 포함하는 *S. pyogenes*이 아닌 종(예를 들어, *S. Thermophilus*)의 Cas9 분자의 단편에 융합될 수 있다.

[0359] (l) 변경된 PAM 인식 또는 PAM을 인식하지 못하는 Cas9 분자

[0360] 자연 발생 Cas9 분자는 특정 PAM 서열, 예를 들어, *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. mutans*, *S. aureus* 및 *N. meningitidis*에 대한 예를 들어, 여기 기재된 PAM 인식 서열을 인식할 수 있다.

[0361] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 자연 발생 Cas9 분자와 동일한 PAM 특이성을 갖는다. 다른 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는, 자연 발생 Cas9 분자와 결합하지 않는 PAM 특이성 또는 가장 가까운 서열 상동성을 갖는 자연 발생 Cas9 분자와 결합하지 않는 PAM 특이성을 갖는다. 예를 들어, 자연 발생 Cas9 분자는 변경, 예를 들어 PAM 인식의 변경, 예를 들어, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드가 인식하는 PAM 서열이 변경되어 표적 외 부위 감소 및/또는 특이성 개선; 또는 PAM 인식 요건이 제거될 수 있다. 일부 구현예에서, Cas9 분자가 변경되어, 예를 들어, PAM 인식 서열 길이의 증가 및/또는 Cas9 특이성이 높은 수준의 동일성으로 개선, 예를 들어 표적 외 부위의 감소 및 특이성이 증가할 수 있다. 일부 구현예에서, PAM 인식 서열의 길이는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 15 개 이상의 아미노산 길이이다.

[0362] 상이한 PAM 서열을 인식하고/거나 표적 외 활성이 감소된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드가 유도 진화를 이용하여 생성될 수 있다. Cas9 분자의 유도 진화에 사용될 수 있는 예시적인 방법 및 시스템이 예를 들어, 문헌 [Esvelt et al. Nature 2011, 472(7344): 499-503]에 기재되어 있다. 후보 Cas9 분자는 예를 들어, 여기에 기재된 방법에 의해 평가될 수 있다.

[0363] PAM 인식을 매개하는 PI 도메인의 변경이 여기서 논의된다.

[0364] (m) 변경된 PI 도메인을 갖는 합성 Cas9 분자 및 Cas9 폴리펩티드

[0365] 현재 게놈 편집 방법은 활용된 Cas9 분자에 의해 인식되는 PAM 서열에 의해 표적화될 수 있는 표적 서열의 다양성에 있어 제한적이다. 여기서 사용되는 바와 같은 용어, 합성 Cas9 분자(또는 Syn-Cas9 분자) 또는 합성 Cas9 폴리펩티드(또는 Syn-Cas9 폴리펩티드)는, 하나의 세균 종 유래 Cas9 코어 도메인 및 Cas9 코어 도메인과 자연적으로 결합하지 않는 PI 도메인, 예를 들어, 상이한 세균 종 유래의 변경된 기능성 PI 도메인을 포함하는 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드를 지칭한다.

- [0366] 일부 구현예에서, 변경된 PI 도메인은 Cas9 코어 도메인이 유래된 자연 발생 Cas9에 의해 인식되는 PAM 서열과 상이한 PAM 서열을 인식한다. 일부 구현예에서, 변경된 PI 도메인은 Cas9 코어 도메인이 유래된 자연 발생 Cas9에 의해 인식되는 PAM 서열과 동일하나 상이한 친화도 또는 특이성으로 PAM 서열을 인식한다. Syn-Cas9 분자 또는 Syn-Cas9 폴리펩티드는 각각 Syn-eaCas9 분자 또는 Syn-eaCas9 폴리펩티드 또는 Syn-eiCas9 분자, Syn-eiCas9 폴리펩티드일 수 있다.
- [0367] 예시적인 Syn-Cas9 분자 또는 Syn-Cas9 폴리펩티드는: a) Cas9 코어 도메인, 예를 들어 Cas9 코어 도메인, 예를 들어 *S. aureus*, *S. pyogenes* 또는 *C. jejuni* Cas9 코어 도메인; 및 b) 종 X Cas9 서열 유래 변경된 PI 도메인;을 포함한다.
- [0368] 일부 구현예에서, 상기 변경된 PI 도메인의 RKR 모티프(PAM 결합 모티프)는: Cas9 코어 도메인과 결합하는 천연 또는 내인성 PI 도메인의 RKR 모티프 서열과 비교하여, 1, 2 또는 3 개 아미노산 잔기의 차이; 제1, 제2 또는 제3 위치에서 아미노산 서열의 차이; 제1 및 제2 위치, 제1 및 제3 위치 또는 제2 및 제3 위치에서 아미노산 서열의 차이;를 포함한다.
- [0369] 일부 구현예에서, Syn-Cas9 분자 또는 Syn-Cas9 폴리펩티드는 또한 크기 최적화될 수 있으며, 예를 들어, Syn-Cas9 분자 또는 Syn-Cas9 폴리펩티드는 하나 이상의 결실 및 선택적으로, 상기 결실 측면에 있는 아미노산 잔기 사이에 배치된 하나 이상의 링커를 포함한다. 일부 구현예에서, Syn-Cas9 분자 또는 Syn-Cas9 폴리펩티드는 REC 결실을 포함한다.
- [0370] **(n) 크기 최적화된 Cas9 분자 및 Cas9 폴리펩티드**
- [0371] 여기에 기재된 조작된 Cas9 분자 및 조작된 Cas9 폴리펩티드는 원하는 Cas9 특성, 예를 들어 기본적으로 천연 형태, Cas9 뉴클레아제 활성 및/또는 표적 핵산 분자의 인식을 여전히 보유하는 반면, 분자의 크기를 감소시키는 결실을 포함하는 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드를 포함한다. 제공된 구현예의 상황에 사용된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 하나 이상의 결실 및 선택적으로 하나 이상의 링커를 포함할 수 있고, 여기서 링커는 결실 측면에 있는 아미노산 잔기 사이에 배치된다.
- [0372] 결실을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어 *S. aureus*, *S. pyogenes* 또는 *C. jejuni* Cas9 분자는 대응하는 자연 발생 Cas9 분자보다 더 작으며, 예를 들어 감소된 아미노산 수를 갖는다. 보다 작은 크기의 Cas9 분자는 전달 방법에 대한 유연성을 증가시키고, 이로써 게놈 편집에 대한 유용성을 증가시킨다. Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 여기에 기재된 생성된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드의 활성에 실질적으로 영향을 주거나 이를 감소시키지 않는 하나 이상의 결실을 포함할 수 있다. 여기에 기재된 바와 같은 결실을 포함하는 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드에 보유된 활성은: 니카제 활성, 즉 단일 가닥, 예를 들어 핵산 분자의 비상보성 가닥 또는 상보성 가닥을 절단하는 능력; 이중 가닥 뉴클레아제 활성, 즉 이중 가닥 핵산의 양쪽 가닥을 절단하고 이중 가닥 파손을 형성하는 능력 - 이는 일부 구현예에서 2 개의 니카제 활성의 존재임 - ; 엔도뉴클레아제 활성; 엑소뉴클레아제 활성; 헬리카제 활성, 즉 이중 가닥 핵산의 나선 구조를 푸는 능력; 및 핵산 분자, 예를 들어 표적 핵산 또는 gRNA의 인식 활성; 중 하나 이상을 포함한다.
- [0373] 여기에 기재된 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드의 활성은 여기에 기재되거나 또는 공지된 활성 분석을 이용하여 평가될 수 있다.
- [0374] **(o) 결실에 적합한 영역 확인**
- [0375] 결실에 적합한 Cas9 분자 영역이 다양한 방법으로 확인될 수 있다. 다양한 세균 종 유래 자연 발생 직교성 (orthologous) Cas9 분자를 *S. pyogenes* Cas9의 결정 구조(Nishimasu et al., Cell, 156:935-949, 2014)로 모델링하여 단백질의 3 차원 구조와 관련하여 선택된 Cas9 직교성(orthologs)에 걸친 보존 수준을 검사할 수 있다. Cas9 활성에 관련된 영역, 예를 들어 표적 핵산 분자 및/또는 gRNA와의 인터페이스로부터 공간적으로 떨어져 위치하는 덜 보존되거나 보존되지 않은 영역은, Cas9 활성에 실질적으로 영향을 주거나 이를 감소시키지 않으면서 결실에 대한 후보 영역 또는 도메인을 나타낸다.
- [0376] **(p) REC 최적화된 Cas9 분자 및 Cas9 폴리펩티드**
- [0377] 여기에 사용된 바와 같은 용어 REC-최적화 Cas9 분자 또는 REC-최적화 Cas9 폴리펩티드는, REC2 도메인 및 RE1<sub>CT</sub> 도메인(집합적으로 REC 결실) 중 하나 또는 둘 다에서 결실을 포함하는 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드를 지칭하고, 여기서 결실이 같은 기원 도메인에서 10 % 이상의 아미노산 잔기를 포함한다. REC-최적화 Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드 또는 eiCas9 분자 또는 eiCas9 폴리펩티드일 수

있다. 예시적인 REC-최적화 Cas9 분자 또는 REC-최적화 Cas9 폴리펩티드는: a) i) REC2 결실; ii) REC1<sub>CT</sub> 결실; 또는 iii) REC1<sub>SUB</sub> 결실;에서 선택된 결실을 포함한다.

- [0378] 선택적으로, 링커는 결실 측면에 있는 아미노산 잔기 사이에 배치된다. 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 단 하나의 결실 또는 단지 2 개의 결실을 포함한다. Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 REC2 결실 및 REC1<sub>CT</sub> 결실을 포함할 수 있다. Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드는 REC2 결실 및 REC1<sub>SUB</sub> 결실을 포함할 수 있다.
- [0379] 일반적으로, 결실이 같은 기원 도메인에서 10 % 이상의 아미노산을 함유할 것이며, 예를 들어, REC2 결실이 REC2 도메인에서 10 % 이상의 아미노산을 포함할 것이다. 결실은: 이의 같은 기원 도메인의 아미노산 잔기 중 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 또는 90 % 이상; 이의 같은 기원 도메인의 모든 아미노산 잔기; 이의 같은 기원 도메인 외부의 아미노산 잔기; 이의 같은 기원 도메인 외부에 복수의 아미노산 잔기; 이의 같은 기원 도메인에 대해 N 말단 직후의 아미노산 잔기; 이의 같은 기원 도메인에 대해 C 말단 직전의 아미노산 잔기; 이의 같은 기원 도메인에 대해 N 말단 직후의 아미노산 잔기 및 이의 같은 기원 도메인에 대해 C 말단 직전의 아미노산 잔기; 이의 같은 기원 도메인에 대해 복수, 예를 들어, 최대 5, 10, 15 또는 20 개의 N 말단 아미노산 잔기; 이의 같은 기원 도메인에 대해 복수, 예를 들어, 최대 5, 10, 15 또는 20 개의 C 말단 아미노산 잔기; 이의 같은 기원 도메인에 대해 복수, 예를 들어, 최대 5, 10, 15 또는 20 개의 N 말단 아미노산 잔기 및 이의 같은 기원 도메인에 대해 복수, 예를 들어, 최대 5, 10, 15 또는 20 개의 C 말단 아미노산 잔기;를 포함할 수 있다.
- [0380] 일부 구현예에서, 결실은: 이의 같은 기원 도메인; 이의 같은 기원 도메인의 N 말단 아미노산 잔기; 이의 같은 기원 도메인의 C 말단 아미노산 잔기;를 넘어 확장되지 않는다.
- [0381] REC-최적화 Cas9 분자 또는 REC-최적화 Cas9 폴리펩티드는 결실 측면에 있는 아미노산 잔기 사이에 배치된 링커를 포함할 수 있다. REC-최적화 Cas9 분자에서 REC 결실 측면에 있는 아미노산 잔기 사이에 사용하기 적합한 링커가 여기에 기재되어 있다.
- [0382] 일부 구현예에서, REC-최적화 Cas9 분자 또는 REC-최적화 Cas9 폴리펩티드는, 임의의 REC 결실 및 관련 링커가 아닌, 자연 발생 Cas9, 예를 들어, *S. aureus* Cas9 분자, *S. pyogenes* Cas9 분자 또는 *C. jejuni* Cas9 분자의 아미노산 서열과 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99% 이상 또는 100% 상동성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0383] 일부 구현예에서, REC-최적화 Cas9 분자 또는 REC-최적화 Cas9 폴리펩티드는, 임의의 REC 결실 및 관련 링커가 아닌, 자연 발생 Cas9, 예를 들어, *S. aureus* Cas9 분자, *S. pyogenes* Cas9 분자 또는 *C. jejuni* Cas9 분자의 아미노산 서열과 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25 개 이내의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0384] 일부 구현예에서, REC-최적화 Cas9 분자 또는 REC-최적화 Cas9 폴리펩티드는, 임의의 REC 결실 및 관련 링커가 아닌, 자연 발생 Cas9, 예를 들어, *S. aureus* Cas9 분자, *S. pyogenes* Cas9 분자 또는 *C. jejuni* Cas9 분자의 아미노산 서열과 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 또는 25% 이내의 아미노산 잔기가 상이한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0385] 서열 비교를 위해, 전형적으로 하나의 서열이, 테스트 서열이 비교되는 참조 서열로 작용한다. 서열 비교 알고리즘을 사용하는 경우, 테스트 및 참조 서열을 컴퓨터에 입력하고, 필요에 따라 하위 서열 좌표를 지정하고, 서열 알고리즘 프로그램 매개 변수를 지정한다. 기본 프로그램 매개 변수를 사용할 수 있거나, 대안적인 매개 변수를 지정할 수 있다. 이어서, 서열 비교 알고리즘이, 프로그램 매개 변수에 근거하여 참조 서열과 관련하여 테스트 서열에 대한 서열 동일성 백분율을 계산한다. 비교를 위한 서열 정렬 방법이 잘 알려져 있다. 비교를 위한 최적의 서열 정렬이, 예를 들어 문헌[Smith and Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c]의 국소 상동성 알고리즘에 의해, 문헌[Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443]의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌[Pearson and Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444]의 유사성 검색 방법에 의해, 상기 알고리즘의 컴퓨터화된 구현(GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)에 의해 또는 수동 정렬 및 시각적 검사(예를 들어, 문헌[Brent et al., (2003) Current Protocols in Molecular Biology] 참조)에 의해 수행될 수 있다.
- [0386] 서열 동일성 및 서열 유사성 백분율을 결정하는 데 적합한 2 가지 알고리즘의 예는 BLAST 및 BLAST 2.0 알고리즘이고, 이는 문헌[Altschul et al., (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402]; 및 문헌[Altschul et al.,

(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410]에 각각 기재되어 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립 생명공학 정보센터를 통해 공개적으로 이용 가능하다.

- [0387] 2 개의 아미노산 서열 사이의 동일성 백분율은, ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 통합된 E. Meyers 및 W. Miller(1988, Comput. Appl. Biosci. 4:11-17)의 알고리즘을 사용하고, PAM120 중량 잔기표, 갭 길이 페널티 12 및 갭 페널티 4를 사용하여 또한 결정될 수 있다. 또한, 2 개의 아미노산 서열 사이의 동일성 백분율은, GCG 소프트웨어 패키지(www.gcg.com에서 사용 가능)에서 GAP 프로그램에 통합된 Needleman 및 Wunsch(1970, J. Mol. Biol. 48:444-453) 알고리즘을 사용하고, Blossom 62 매트릭스 또는 PAM250 매트릭스 중 하나, 및 16, 14, 12, 10, 8, 6 또는 4의 갭 중량 및 1, 2, 3, 4, 5 또는 6의 길이 중량을 사용하여 결정될 수 있다.
- [0388] 예시적인 REC 결실에 대한 서열 정보가, 예를 들어, 문헌[PCT 국제 출원 공개 번호 W02015/161276, W02017/193107 및 W02017/093969]에 기재된 83 개의 자연 발생 Cas9 직교성에 대해 제공된다.
- [0389] **(q) Cas9 분자를 암호화하는 핵산**
- [0390] Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드, 예를 들어, eaCas9 분자 또는 eaCas9 폴리펩티드를 암호화하는 핵산이 여기에 제공된 임의의 구현예와 관련하여 사용될 수 있다.
- [0391] Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드를 암호화하는 예시적인 핵산이, 문헌[Cong et al., Science 2013, 399(6121):819-823; Wang et al., Cell 2013, 153(4):910-918; Mali et al., Science 2013, 399(6121):823-826; Jinek et al., Science 2012, 337(6096):816-821 및 국제 출원 W02015/161276, 예를 들어 그안의 도면 8]에 기재되어 있다.
- [0392] 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 합성 핵산 서열일 수 있다. 예를 들어, 합성 핵산 분자는 화학적으로 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, Cas9 mRNA는 캡핑, 폴리아데닐화, 5-메틸시티딘 및/또는 슈도유리딘으로의 치환 중 하나 이상의(예를 들어, 모든) 특성을 갖는다.
- [0393] 또한 또는 대안적으로, 합성 핵산 서열이 코돈 최적화될 수 있으며, 예를 들어, 하나 이상의 비일반적인 코돈 또는 덜 일반적인 코돈이 일반적인 코돈으로 대체되었다. 예를 들어, 합성 핵산은, 최적화된 예를 들어, 여기에 기재된, 예를 들어, 포유류 발현 시스템에서의 발현에 최적화된 메신저 mRNA의 합성을 지시할 수 있다.
- [0394] 또한 또는 대안적으로, Cas9 분자 또는 Cas9 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 핵 국소화 서열(nuclear localization sequence, NLS)을 포함할 수 있다. 핵 국소화 서열이 공지되어 있다.
- [0395] 일부 구현예에서, Cas9 분자는 서열 번호: 121, 123 또는 125 중 어느 하나 또는 서열 번호: 121, 123 또는 125 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열이거나 이를 포함하는 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, Cas9 분자는 서열 번호: 122, 124 또는 125 중 어느 하나 또는 서열 번호: 122, 123 또는 125 중 어느 하나에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열이거나 이를 포함한다. 서열 번호: 121은 *S. pyogenes*의 Cas9 분자를 암호화하는 예시적인 코돈 최적화된 핵산 서열이다. 서열 번호: 122는 *S. pyogenes* Cas9 분자의 대응하는 아미노산 서열이다. 서열 번호: 123은 *N. meningitidis*의 Cas9 분자를 암호화하는 예시적인 코돈 최적화된 핵산 서열이다. 서열 번호: 124는 *N. meningitidis* Cas9 분자의 대응하는 아미노산 서열이다. 서열 번호: 125는 *S. aureus* Cas9의 Cas9 분자를 암호화하는 예시적인 코돈 최적화된 핵산 서열이다. 서열 번호: 126은 *S. aureus* Cas9 분자의 아미노산 서열이다.
- [0396] 임의의 전술한 Cas9 서열이 C-말단에서 펩티드 또는 폴리펩티드와 융합된 경우, 정지 코돈이 제거될 것으로 이해된다.
- [0397] **(r) 기타 Cas 분자 및 Cas 폴리펩티드**
- [0398] 다양한 유형의 Cas 분자 또는 Cas 폴리펩티드가 여기에 개시된 발명을 실행하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유형 II Cas 시스템의 Cas 분자가 사용된다. 다른 구현예에서, 다른 Cas 시스템의 Cas 분자가 사용된다. 예를 들어, 유형 I 또는 유형 III Cas 분자가 사용될 수 있다. 예시적인 Cas 분자(및 Cas 시스템)가 예를 들어, 문헌[Haft et al., PLoS Computational Biology 2005, 1(6): e60 및 Makarova et al., Nature Review Microbiology 2011, 9:467-477]에 기재되어 있고, 두 참조의 내용 전문이 여기에 참조로 포함된다. 예시적인 Cas 분자(및 Cas 시스템)가 표 3에 또한 도시된다.

표 3

Cas 시스템

유전자 명칭 <sup>‡</sup>	시스템 유형 또는 하위유형	Haft <i>et al.</i> 유래 명칭 <sup>§</sup>	암호화된 단백질 구조(PDB 액세스) <sup>¶</sup>	암호화된 단백질의 패밀리(및 슈퍼패밀리) <sup>***</sup>	대표
<i>cas1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유형 I</li> <li>• 유형 II</li> <li>• 유형 III</li> </ul>	<i>cas1</i>	3GOD, 3LFX 및 2YZS	COG1518	SERP2463, SPy1047 및 <i>ygbT</i>
<i>cas2</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유형 I</li> <li>• 유형 II</li> <li>• 유형 III</li> </ul>	<i>cas2</i>	2IVY, 2I8E 및 3EXC	COG1343 및 COG3512	SERP2462, SPy1048, SPy1723 (N-말단 도메인) 및 <i>ygbF</i>
<i>cas3</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 유형 I<sup>**</sup></li> </ul>	<i>cas3</i>	NA	COG1203	APE1232 및 <i>ygcB</i>
<i>cas3'</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 하위유형 I-A</li> <li>• 하위유형 I-B</li> </ul>	NA	NA	COG2254	APE1231 및 BH0336
<i>cas4</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 하위유형 I-A</li> <li>• 하위유형 I-B</li> <li>• 하위유형 I-C</li> <li>• 하위유형 I-D</li> <li>• 하위유형 II-B</li> </ul>	<i>cas4</i> 및 <i>csa1</i>	NA	COG1468	APE1239 및 BH0340

[0399]

유전자 명칭 <sup>†</sup>	시스템 유형 또는 하위유형	Haft <i>et al.</i> 유래 명칭 <sup>‡</sup>	암호화된 단백질 구조(PDB 액세스) <sup>¶</sup>	암호화된 단백질의 패밀리(및 슈퍼패밀리) <sup>***</sup>	대표
<i>cas5</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 하위유형 I-A</li> <li>• 하위유형 I-B</li> <li>• 하위유형 I-C</li> <li>• 하위유형 I-E</li> </ul>	<i>cas5a, cas5d, cas5e, cas5h, cas5p, cas5t</i> 및 <i>cmx5</i>	3KG4	COG1688 (RAMP)	APE1234, BH0337, <i>devS</i> 및 <i>ygcl</i>
<i>cas6</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 하위유형 I-A</li> <li>• 하위유형 I-B</li> <li>• 하위유형 I-D</li> <li>• 하위유형 III-A</li> <li>• 하위유형 III-B</li> </ul>	<i>cas6</i> 및 <i>cmx6</i>	3I4H	COG1583 및 COG5551 (RAMP)	PF1131 및 slr7014
<i>cas6e</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 하위유형 I-E</li> </ul>	<i>cse3</i>	1WJ9	(RAMP)	<i>ygch</i>
<i>cas6f</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 하위유형 I-F</li> </ul>	<i>csy4</i>	2XLJ	(RAMP)	y1727
<i>cas7</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 하위유형 I-A</li> <li>• 하위유형 I-B</li> <li>• 하위유형 I-C</li> <li>• 하위유형 I-E</li> </ul>	<i>csa2, csd2, cse4, csh2, csp1</i> 및 <i>cst2</i>	NA	COG1857 및 COG3649 (RAMP)	<i>devR</i> 및 <i>ygcl</i>
<i>cas8a1</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 하위유형 I-A<sup>††</sup></li> </ul>	<i>cmx1, cst1, csx8, csx13</i> 및 CXXC-CXXC	NA	BH0338-유사	LA3191 <sup>§§</sup> 및 PG2018 <sup>§§</sup>

[0400]

유전자 명칭 <sup>‡</sup>	시스템 유형 또는 하위유형	Haft <i>et al.</i> 유래 명칭 <sup>§</sup>	암호화된 단백질 구조(PDB 액세스) <sup>†</sup>	암호화된 단백질의 패밀리(및 슈퍼패밀리) <sup>***</sup>	대표
<i>cas8a2</i>	• 하위유형 I-A <sup>††</sup>	<i>csa4</i> 및 <i>csx9</i>	NA	PH0918	AF0070, AF1873, MJ0385, PF0637, PH0918 및 SSO1401
<i>cas8b</i>	• 하위유형 I-B <sup>††</sup>	<i>csH1</i> 및 TM1802	NA	BH0338-유사	MTH1090 및 TM1802
<i>cas8c</i>	• 하위유형 I-C <sup>††</sup>	<i>csd1</i> 및 <i>csp2</i>	NA	BH0338-유사	BH0338
<i>cas9</i>	• 유형 III <sup>††</sup>	<i>csn1</i> 및 <i>csx12</i>	NA	COG3513	FTN_0757 및 SPy1046
<i>cas10</i>	• 유형 III <sup>††</sup>	<i>cmr2</i> , <i>csm1</i> 및 <i>csx11</i>	NA	COG1353	MTH326, Rv2823c <sup>§§</sup> 및 TM1794 <sup>§§</sup>
<i>cas10d</i>	• 하위유형 I-D <sup>††</sup>	<i>csc3</i>	NA	COG1353	slr7011
<i>csy1</i>	• 하위유형 I-F <sup>††</sup>	<i>csy1</i>	NA	y1724-유사	y1724-유사
<i>csy2</i>	• 하위유형 I-F	<i>csy2</i>	NA	(RAMP)	y1725
<i>csy3</i>	• 하위유형 I-F	<i>csy3</i>	NA	(RAMP)	y1726
<i>cse1</i>	• 하위유형 I-E <sup>††</sup>	<i>cse1</i>	NA	YgcL-유사	<i>ygcL</i>
<i>cse2</i>	• 하위유형 I-E	<i>cse2</i>	2ZCA	YgcK-유사	<i>ygcK</i>

[0401]

유전자 명칭 <sup>†</sup>	시스템 유형 또는 하위유형	Haft <i>et al.</i> 유래 명칭 <sup>‡</sup>	암호화된 단백질 구조(PDB 액세스) <sup>††</sup>	암호화된 단백질의 패밀리(및 슈퍼패밀리) <sup>***</sup>	대표
<i>csc1</i>	• 하위유형 I-D	<i>csc1</i>	NA	alr1563-유사 (RAMP)	alr1563
<i>csc2</i>	• 하위유형 I-D	<i>csc1</i> 및 <i>csc2</i>	NA	COG1337 (RAMP)	slr7012
<i>csa5</i>	• 하위유형 I-A	<i>csa5</i>	NA	AF1870	AF1870, MJ0380, PF0643 및 SSO1398
<i>csn2</i>	• 하위유형 II-A	<i>csn2</i>	NA	SPy1049-유사	SPy1049-유사
<i>csm2</i>	• 하위유형 III-A <sup>††</sup>	<i>csm2</i>	NA	COG1421	MTH1081 및 SERP2460
<i>csm3</i>	• 하위유형 III-A <sup>††</sup>	<i>csc2</i> 및 <i>csm3</i>	NA	COG1337 (RAMP)	MTH1080 및 SERP2459
<i>csm4</i>	• 하위유형 III-A <sup>††</sup>	<i>csm4</i>	NA	COG1567 (RAMP)	MTH1079 및 SERP2458
<i>csm5</i>	• 하위유형 III-A <sup>††</sup>	<i>csm5</i>	NA	COG1332 (RAMP)	MTH1078 및 SERP2457
<i>csm6</i>	• 하위유형 III-A <sup>††</sup>	APE2256 및 <i>csm6</i>	2WTE	COG1517	APE2256 및 SSO1445
<i>cmr1</i>	• 하위유형 III-B	<i>cmr1</i>	NA	COG1367 (RAMP)	PF1130

[0402]

유전자 명칭*	시스템 유형 또는 하위유형	Haft <i>et al.</i> 유래 명칭 <sup>§</sup>	암호화된 단백질 구조(PDB 액세스) <sup>¶</sup>	암호화된 단백질의 패밀리(및 슈퍼패밀리) <sup>***</sup>	대표
<i>cmr3</i>	• 하위유형 III-B	<i>cmr3</i>	NA	COG1769 (RAMP)	PF1128
<i>cmr4</i>	• 하위유형 III-B	<i>cmr4</i>	NA	COG1336 (RAMP)	PF1126
<i>cmr5</i>	• 하위유형 III-B <sup>††</sup>	<i>cmr5</i>	2ZOP 및 2OEB	COG3337	MTH324 및 PF1125
<i>cmr6</i>	• 하위유형 III-B	<i>cmr6</i>	NA	COG1604 (RAMP)	PF1124
<i>csb1</i>	• 하위유형 I-U	GSU0053	NA	(RAMP)	Balac_1306 및 GSU0053
<i>csb2</i>	• 하위유형 I-U <sup>§§</sup>	NA	NA	(RAMP)	Balac_1305 및 GSU0054
<i>csb3</i>	• 하위유형 I-U	NA	NA	(RAMP)	Balac_1303 <sup>§§</sup>
<i>csx17</i>	• 하위유형 I-U	NA	NA	NA	Btus_2683
<i>csx14</i>	• 하위유형 I-U	NA	NA	NA	GSU0052
<i>csx10</i>	• 하위유형 I-U	<i>csx10</i>	NA	(RAMP)	Caur_2274
<i>csx16</i>	• 하위유형 III-U	VVA1548	NA	NA	VVA1548
<i>csaX</i>	• 하위유형 III-U	<i>csaX</i>	NA	NA	SSO1438
<i>csx3</i>	• 하위유형 III-U	<i>csx3</i>	NA	NA	AF1864

[0403]

유전자 명칭*	시스템 유형 또는 하위유형	Haft <i>et al.</i> 유래 명칭 <sup>§</sup>	암호화된 단백질 구조(PDB 액세스) <sup>¶</sup>	암호화된 단백질의 패밀리(및 슈퍼패밀리) <sup>***</sup>	대표
<i>csx1</i>	• 하위유형 III-U	<i>csa3</i> , <i>csx1</i> , <i>csx2</i> , DXTHG, NE0113 및 TIGR02710	1XMX 및 2I71	COG1517 및 COG4006	MJ1666, NE0113, PF1127 및 TM1812
<i>csx15</i>	• 알려져 있지 않음	NA	NA	TTE2665	TTE2665
<i>csf1</i>	• 유형 U	<i>csf1</i>	NA	NA	AFE_1038
<i>csf2</i>	• 유형 U	<i>csf2</i>	NA	(RAMP)	AFE_1039
<i>csf3</i>	• 유형 U	<i>csf3</i>	NA	(RAMP)	AFE_1040
<i>csf4</i>	• 유형 U	<i>csf4</i>	NA	NA	AFE_1037

[0404]

[0405]

(iii) *Cpf1*

[0406]

일부 구현예에서, 가이드 RNA 또는 gRNA는, 세포 내 계놈 또는 에피솜 서열과 같은 표적 서열로 Cas9 또는 Cpf1 과 같은 RNA 가이드 뉴클레아제를 표적화하는 특이적 결합을 촉진한다. 일반적으로, gRNA는, (단일 RNA 분자를 포함하고, 대안적으로 키메라로 지칭되는) 단분자 또는 (crRNA 및 tracrRNA와 같은 하나 이상 및 전형적으로 2 개의 분리된 RNA 분자를 포함하며, 이는 보통 일부 구현예에서 이중화에 의해 서로 결합하는) 모듈식일 수 있다. gRNA 및 이의 구성 요소 부분이 일부 구현예에서, 참조로 포함된 문헌[Briner *et al.* (Molecular Cell 56(2), 333-339, October 23, 2014 (Briner))] 및 문헌[Cotta-Ramusino] 전반에 걸쳐 기재되어 있다.

[0407]

단분자이든 모듈식이든 가이드 RNA는 일반적으로 표적에 완전히 또는 부분적으로 상보적인 표적화 도메인을 포함하고, 전형적으로 10-30 개의 뉴클레오티드 길이이며, 특정 구현예에서는 16-24 개의 뉴클레오티드 길이(일부 구현예에서, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24 개의 뉴클레오티드 길이)이다. 일부 측면에서, 표적화 도메인은 Cas9 gRNA의 경우 gRNA의 5' 말단 또는 근처에 있으며, Cpf1 gRNA의 경우 3' 말단 또는 근처에 있다. 상기 설명은 Cas9와 함께 사용하기 위한 gRNA에 초점을 맞추었으나, 지금까지 기재된 것과 어떤 면에서 상이한 gRNA를 이용하는 다른 RNA 가이드 뉴클레아제가 발견되었거나(또는 미래에 발견될 수 있거나) 발명되었다는 점이 인식되어야 한다. 일부 구현예에서, Cpf1("Prevotella 및 Francisella1 유래 CRISPR")은 기능에 tracrRNA를 필요로하지 않는 최근에 발견된 RNA 가이드 뉴클레아제이다(여기에 참조로 포함된 Zetsche *et al.*, 2015, Cell 163, 759-771 October 22, 2015 (Zetsche I)). Cpf1 계놈 편집 시스템에 사용하기 위한 gRNA는 일반적으로 표적화 도메인 및 상보성 도메인을 포함한다(교대로 "핸들(handle)"로 지칭됨). Cpf1과 함께 사용하기 위한 gRNA에서, 표적화 도메인은 보통 Cas9 gRNA와 관련하여 상기 기재된 바와 같이 5' 말단보다는 3' 말단 또는 근처에 존재한다는 점에 또한 유의해야 한다(핸들은 Cpf1 gRNA의 5' 말단 또는 근처에 존재함).

[0408]

상이한 원핵 생물 중 유래 gRNA 사이 또는 Cpf1과 Cas9 gRNA 사이에 구조적 차이가 존재할 수 있으나, gRNA가 작동하는 원리는 일반적으로 일관적이다. 이러한 작동의 일관성 때문에, gRNA는 광범위한 관점에서 이의 표적화 도메인 서열에 의해 정의될 수 있으며, 당업자는 주어진 표적화 도메인 서열이, 단분자 또는 키메라 gRNA 또는 하나 이상의 화학적 변형 및/또는 순차적 변형(치환, 추가 뉴클레오티드, 절단 등)을 포함하는 gRNA를 포함한 임의의 적합한 gRNA에 통합될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 본 발명의 일부 측면에서, gRNA는 이의 표적화

도메인 서열의 관점에서만 기재될 수 있다.

- [0409] 보다 일반적으로, 본 발명의 일부 측면은 다중 RNA 가이드 뉴클레아제를 사용하여 구현될 수 있는 시스템, 방법 및 조성물에 관한 것이다. 달리 명시되지 않는 한, gRNA 용어는 임의의 RNA 가이드 뉴클레아제와 함께 사용될 수 있는 임의의 적합한 gRNA 및 특정 종의 Cas9 또는 Cpf1과 양립 가능한 gRNA도 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 예시로, gRNA 용어는, 특정 구현예에서, 유형 II 또는 유형 V 또는 CRISPR 시스템과 같은 클래스 2 CRISPR 시스템에서 발생하는 임의의 RNA 가이드 뉴클레아제 또는 이로부터 유래되거나 개조된 RNA 가이드 뉴클레아제와 함께 사용하기 위한 gRNA를 포함한다.
- [0410] 본 섹션에서 논의된 특정 예시적인 변형은 비제한적으로 5' 말단 또는 이의 근처(예를 들어, 5' 말단의 1-10, 1-5 또는 1-2 뉴클레오티드 내) 및/또는 3' 말단 또는 이의 근처(예를 들어, 3' 말단의 1-10, 1-5 또는 1-2 뉴클레오티드 내)를 포함한 gRNA 서열 내 임의의 위치에 포함될 수 있다. 일부 경우에, 변형은 Cas9 gRNA의 반복-항-반복 이중 영역, Cas9 또는 Cpf1 gRNA의 줄기 루프 구조 및/또는 gRNA의 표적화 도메인과 같은 기능성 모티프 내에 배치된다.
- [0411] RNA 가이드 뉴클레아제는 Cas9 및 Cpf1과 같은 자연 발생 클래스 2 CRISPR 뉴클레아제뿐만 아니라 이로부터 유래되거나 이로부터 획득된 다른 뉴클레아제를 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 기능적 측면에서, RNA 가이드 뉴클레아제는: (a) gRNA와 상호 작용(예를 들어 이와 복합체를 형성)하고; (b) gRNA와 함께, (i) gRNA의 표적화 도메인에 대해 상보적인 서열 및 선택적으로 (ii) 하기에 보다 상세하게 기재될 "프로토스페이서 인접 모티프 (protospacer adjacent motif)" 또는 "PAM"으로 지칭되는 추가 서열을 포함하는 DNA 표적 영역과 결합 및 선택적으로 이를 절단 또는 변형시키는; 뉴클레아제로 정의된다. 하기 실시예로 설명되는 바와 같이, 동일한 PAM 특이성 또는 절단 활성을 공유하는 개별 RNA 가이드 뉴클레아제 사이에 변이가 존재할 수 있으나, RNA 가이드 뉴클레아제는 넓은 의미에서 이의 PAM 특이성 및 절단 활성에 의해 정의될 수 있다. 당업자는 본 발명의 일부 측면이 특정 PAM 특이성 및/또는 절단 활성을 갖는 임의의 적합한 RNA 가이드 뉴클레아제를 사용하여 구현될 수 있는 시스템, 방법 및 조성물과 관련된 것임을 인식할 것이다. 상기 이유로, 달리 명시되지 않는한, RNA 가이드 뉴클레아제 용어는 일반적인 용어로 이해되어야 하며, RNA 가이드 뉴클레아제의 임의의 특정 유형(예를 들어, Cas9 대 Cpf1), 종(예를 들어, *S. pyogenes* 대 *S. aureus*) 또는 변이(예를 들어, 전장 대 절단형 또는 분할; 자연 발생 PAM 특이성 대 조작된 PAM 특이성, 등)로 제한되어서는 않된다.
- [0412] PAM 및 프로토스페이서의 특정 순차적 방향을 인식하는 것 외에도, 일부 구현예에서 RNA 가이드 뉴클레아제는 특정 PAM 서열을 또한 인식할 수 있다. *S. aureus* Cas9는 일부 구현예에서, 일반적으로 NNGRRT 또는 NNGRRV의 PAM 서열을 인식하며, 여기서 N 잔기는 gRNA 표적화 도메인에 의해 인식되는 영역의 3' 바로 앞이다. *S. pyogenes* Cas9는 일반적으로 NGG PAM 서열을 인식한다. 그리고 *F. novicida* Cpf1은 일반적으로 TTN PAM 서열을 인식한다.
- [0413] TTTN PAM 서열을 포함한 crRNA 및 이중 가닥(double-stranded, ds) DNA 표적과 복합체를 형성한 *Acidaminococcus sp.* Cpf1의 결정 구조가 문헌[여기에 참조로 통합된 Yamano et al. (Cell. 2016 May 5; 165(4): 949-962 (Yamano))]에서 밝혀졌다. Cas9와 같은 Cpf1은 2개의 로브: REC(인식) 로브 및 NUC(뉴클레아제) 로브를 갖는다. REC 로브는 임의의 공지된 단백질 구조와 유사성이 없는 REC1 및 REC2 도메인을 포함한다. 한편, NUC 로브는 3개의 RuvC 도메인(RuvC-I, -II 및 -III)과 BH 도메인을 포함한다. 그러나, Cas9와 대조적으로, Cpf1 REC 로브는 HNH 도메인이 없고, 공지된 단백질 구조와 유사성이 또한 없는 다른 도메인: 구조적으로 유일한 PI 도메인, 3 개의 웨지(Wedge, WED) 도메인(WED-I, -II 및 -III) 및 뉴클레아제(Nuc) 도메인을 포함한다.
- [0414] Cas9 및 Cpf1은 구조와 기능에 있어 유사성을 공유하나, 특정 Cpf1 활성이 어떠한 Cas9 도메인과도 유사하지 않은 구조 도메인에 의해 매개된다는 점이 인식되어야 한다. 일부 구현예에서, 표적 DNA의 상보성 가닥의 절단이 Cas9의 HNH 도메인과 순차적으로 및 공간적으로 상이한 Nuc 도메인에 의해 매개되는 것으로 보인다. 또한, Cpf1 gRNA의 비표적화 부분(헨들)은 Cas9 gRNA에서 반복-항반복 이중 영역에 의해 형성된 줄기 루프 구조가 아닌의 사 매듭 구조를 채택한다.
- [0415] RNA 가이드 뉴클레아제 예를 들어, Cas9, Cpf1 또는 이의 기능성 단편을 암호화하는 핵산이 여기에 제공된다. RNA 가이드 뉴클레아제를 암호화하는 예시적인 핵산이 상기에 기재되었다(예를 들어, 문헌[Cong 2013; Wang 2013; Mali 2013; Jinek 2012] 참조).
- [0416] b. 계놈 편집 접근법

- [0417] 일반적으로, 여기에 기재된 방법에 따른 임의의 유전자의 변경이 임의의 메카니즘에 의해 매개될 수 있고, 임의의 방법이 특정 메카니즘에 국한되지 않음을 이해해야 한다. 유전자 변경과 관련될 수 있는 예시적인 메카니즘은, 비상동성 말단 연결(예를 들어, 고전적 또는 대안적), 미세상동성 매개 말단 연결(microhomology-mediated end joining, MMEJ), 상동성 지시 수선(예를 들어, 내인성 도너 주형 매개), 합성 의존적 가닥 어닐링(synthesis dependent strand annealing, SDSA), 단일 가닥 어닐링, 단일 가닥 침입, 단일 가닥 파손 수선(single strand break repair, SSB), 미스매치 수선(mismatch repair, MMR), 염기 절제 수선(base excision repair, BER), 가닥간 교차결합(Interstrand Crosslink, ICL), 손상통과 합성(Translesion synthesis, TLS) 또는 무오류 복제 후 수선(Error-free post-replication repair, PRR)을 포함하나 이에 국한되지 않는다. *TGFBR2* 유전자 좌 중 하나 또는 둘 다의 대립 유전자의 표적화된 녹아웃을 위한 예시적인 방법이 여기에 기재된다.
- [0418] 1) 유전자 표적화를 위한 NHEJ 접근법
- [0419] 여기에 기재된 바와 같이, 뉴클레아제 유도된 비상동성 말단 연결(NHEJ)이 사용되어 유전자 특이적 녹아웃이 표적화될 수 있다. 뉴클레아제 유도된 NHEJ가 또한 사용되어 관심 유전자의 서열 삽입을 제거(예를 들어, 결실)할 수 있다.
- [0420] 이론에 구속되지 바라지 않으나, 일부 구현예에서, 여기에 기재된 방법과 관련된 유전자 변경이 뉴클레아제 유도된 NHEJ 및 NHEJ 수선 경로의 오류가 발생하기 쉬운 성질에 의존하는 것으로 여겨진다. NHEJ 수선은 2 개의 말단을 서로 연결함으로써 DNA의 이중 가닥 파손을 수선하나; 일반적으로, 원래의 서열은, 정확하게 이중 가닥 파손에 의해 형성되었던 것과 같이 2 개의 양립 가능한 말단이 완벽하게 결찰된 경우에만 회복된다. 이중 가닥 파손의 DNA 말단이 빈번하게 효소적 프로세싱의 대상이 되어, 말단의 재연결 전에 하나 또는 둘 다의 가닥에서 뉴클레오티드의 추가 또는 제거를 초래한다. 상기는 NHEJ 수선 부위에서 DNA 서열의 삽입 및/또는 결실(인델(indel)) 돌연변이의 존재를 초래한다. 상기 돌연변이의 2/3가 전형적으로 판독 프레임을 변경하고, 따라서 비기능성 단백질을 생성한다. 또한, 판독 프레임을 보유하나 유의미한 양의 서열을 삽입 또는 결실하는 돌연변이는 단백질의 기능을 파괴할 수 있다. 상기는, 매우 중요한 기능성 도메인의 돌연변이가 단백질의 중요하지 않은 영역에서의 돌연변이보다 덜 허용 가능한 것 같기 때문에 유전자 좌 의존적이다. NHEJ에 의해 생성된 인델 돌연변이는 자연에서 예측 불가능하나; 주어진 파손 부위에서 특정 인델 서열이, 아마도 적은 영역의 미세 상동성으로 인해 유리하고, 집단에서 과표현된다. 결실의 길이가 매우 다양할 수 있고; 대부분이 일반적으로 1-50 bp 범위 내이나 100-200 bp를 용이하게 초과할 수 있다. 삽입은 더 짧아지는 경향이 있고, 파손 부위를 바로 둘러싼 서열의 짧은 복제를 종종 포함하는 경향이 있다. 그러나, 광범위한 삽입을 수득하는 것이 가능하고, 상기 경우에 삽입된 서열이 게놈의 다른 영역 또는 세포에 존재하는 플라스미드 DNA로 종종 추적되었다.
- [0421] NHEJ가 돌연변이가 발생 프로세스이기 때문에, 특정 최종 서열의 생성이 필수적이지 않는 한 작은 서열 모티프를 결실하는 데 또한 사용될 수 있다. 이중 가닥 파손이 짧은 표적 서열 근처에서 표적화되는 경우, NHEJ 수선에 의해 야기된 결실 돌연변이는 원치 않는 뉴클레오티드를 종종 포괄하여 제거한다. 보다 큰 DNA 세그먼트의 결실의 경우, 서열의 양쪽에 하나씩 2 개의 이중 가닥 파손의 도입이 말단 사이에서 NHEJ를 초래하고, 개재된 전체 서열을 제거할 수 있다. 일부 구현예에서, 한 쌍의 gRNA가 2 개의 이중 가닥 파손을 도입하는 데 사용되어 2 개의 파손 사이 개재 서열의 결실을 초래할 수 있다.
- [0422] 상기 접근법 둘 다가 사용되어 특정 DNA 서열을 결실시킬 수 있으나; NHEJ의 오류가 발생하기 쉬운 성질이 수선 부위의 인델 돌연변이를 여전히 생성할 수 있다.
- [0423] 이중 가닥 절단 eaCas9 분자 및 단일 가닥 또는 닉카제 eaCas9 분자 둘 다가 여기에 기재된 방법 및 조성물에 사용되어 NHEJ 매개 인델을 생성할 수 있다. 관심 유전자, 예를 들어, 코딩 영역, 예를 들어 유전자의 초기 코딩 영역으로 표적화된 NHEJ 매개 인델이 사용되어 관심 유전자를 녹아웃(즉, 발현의 제거)시킬 수 있다. 예를 들어, 관심 유전자의 초기 코딩 영역은, 코딩 영역의 제1 엑손 내 또는 전사 시작 부위의 500 bp 이내(예를 들어, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만) 전사 시작 부위 직후의 서열을 포함한다.
- [0424] 일부 구현예에서, NHEJ 매개 인델이 *TGFBR2* 유전자 좌로 도입된다. 유전자를 표적화하는 개별 gRNA 또는 gRNA 쌍이 Cas9 이중 가닥 뉴클레아제 또는 단일 가닥 닉카제와 함께 제공된다.
- [0425] (1) 표적 위치와 관련된 이중 가닥 또는 단일 가닥 파손의 배치
- [0426] 일부 구현예에서, gRNA 및 Cas9 뉴클레아제가 NHEJ 매개 인델을 유도할 목적으로 이중 가닥 파손을 생성하고, gRNA, 예를 들어 단분자(또는 키메라) 또는 모듈식 gRNA 분자는 표적 위치의 뉴클레오티드에 매우 근접하여 1 개의 이중 가닥 파손이 위치하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 절단 부위는 표적 위치로부터 0-30 bp(예를 들

어, 표적 위치로부터 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 bp 미만) 떨어져 존재한다.

[0427] 일부 구현예에서, Cas9 니카제와 복합체를 이룬 2 개의 gRNA가 NHEJ 매개 인델을 유도할 목적으로 2 개의 단일 가닥 파손을 유도하고, 2 개의 gRNA, 예를 들어 독립적으로 단분자(또는 키메라) 또는 모듈식 gRNA가 2 개의 단일 가닥 파손이 위치하도록 구성되어 NHEJ 수선을 위한 표적 위치의 뉴클레오티드를 제공한다. 일부 구현예에서, gRNA가, 상이한 가닥 상에 동일한 위치 또는 서로 몇 개의 뉴클레오티드 이내에 절단이 위치하도록 구성되며, 이는 본질적으로 이중 가닥 파손을 모방한다. 일부 구현예에서, 보다 가까운 닉이 표적 위치로부터 0-30 bp(예를 들어, 표적 위치로부터 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1 bp 미만) 떨어져 존재하고, 2 개의 닉이 서로 25-55 bp(예를 들어, 25 내지 50, 25 내지 45, 25 내지 40, 25 내지 35, 25 내지 30, 50 내지 55, 45 내지 55, 40 내지 55, 35 내지 55, 30 내지 55, 30 내지 50, 35 내지 50, 40 내지 50, 45 내지 50, 35 내지 45, 또는 40 내지 45 bp 사이) 이내 및 서로 100 bp 이내(예를 들어, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 또는 10 bp 이내)로 떨어져 존재한다. 일부 구현예에서, gRNA가 표적 위치의 뉴클레오티드 양쪽에 단일 가닥 파손을 배치하도록 구성된다.

[0428] 이중 가닥 절단 eaCas9 분자 및 단일 가닥 또는 니카제 eaCas9 분자 둘 다가 여기에 기재된 방법 및 조성물에 사용되어 표적 위치 양쪽에 파손을 생성할 수 있다. 이중 가닥 또는 쌍을 이룬 단일 가닥 파손이 표적 위치의 양쪽에 생성되어 2 개의 절단 사이 핵산 서열(예를 들어, 결실되는 2 개의 파손 사이 영역)을 제거할 수 있다. 일부 구현예에서, 2 개의 gRNA, 예를 들어, 독립적으로, 단분자(또는 키메라) 또는 모듈식 gRNA가, 표적 위치의 양쪽에 이중 가닥 파손이 위치하도록 구성된다. 대안적인 구현예에서, 3 개의 gRNA, 예를 들어 독립적으로 단분자(또는 키메라) 또는 모듈식 gRNA가, 표적 위치의 양쪽에서 이중 가닥 파손(즉, cas9 뉴클레아제와 복합체를 이룬 1 개의 gRNA) 및 2 개의 단일 가닥 파손 또는 쌍을 이룬 단일 가닥 파손(즉, Cas9 니카제와 복합체를 이룬 2 개의 gRNA)이 위치하도록 구성된다. 또 다른 구현예에서, 4 개의 gRNA, 예를 들어 독립적으로 단분자(또는 키메라) 또는 모듈식 gRNA가, 표적 위치의 양쪽에서 2 쌍의 단일 가닥 파손(즉, Cas9 니카제와 복합체를 이룬 2 쌍의 2 개의 gRNA)을 생성하도록 구성된다. 이중 가닥 파손(들) 또는 쌍으로 보다 가까운 2 개의 단일 가닥 닉이 표적 위치의 0-500 bp(예를 들어, 표적 위치로부터 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50 또는 25 bp 이내) 내에 이상적으로 존재할 것이다. 니카제가 사용되는 경우, 쌍으로 2 개의 닉이 서로 25-55 bp(예를 들어, 25 내지 50, 25 내지 45, 25 내지 40, 25 내지 35, 25 내지 30, 50 내지 55, 45 내지 55, 40 내지 55, 35 내지 55, 30 내지 55, 30 내지 50, 35 내지 50, 40 내지 50, 45 내지 50, 35 내지 45, 또는 40 내지 45 bp 사이) 이내 및 서로 100 bp 이내(예를 들어, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 또는 10 bp 이내) 떨어져 존재한다.

[0429] 2) 표적화된 녹다운(Knockdown)

[0430] DNA 수준에서 유전자를 돌연변이시킴으로써 영구적으로 발현을 제거 또는 감소시키는 CRISPR/Cas 매개 유전자 녹아웃과 달리, CRISPR/Cas 녹다운은 인공적인 전사 인자의 사용을 통해 유전자 발현의 일시적인 감소를 허용한다. Cas9 단백질의 양쪽 DNA 절단 도메인에서 핵심 잔기의 돌연변이(예를 들어, D10A 및 H840A 돌연변이)가 촉매적 비활성 Cas9(즉, Cas9 또는 dCas9으로도 공지된 eiCas9)의 생성을 초래한다. 촉매적 비활성 Cas9는 gRNA와 복합체를 형성하고 상기 gRNA의 표적화 도메인에 의해 구체화된 DNA 서열로 국소화되나, 표적 DNA를 절단하지 않는다. 이펙터 도메인, 예를 들어 전사 억제 도메인과 dCas9의 융합은 gRNA에 의해 구체화된 임의의 DNA 부위로 이펙터의 보충을 가능하게 한다. 코딩 서열의 초기 영역으로 보충될 경우 eiCas9 자체가 전사를 차단할 수 있는 것으로 나타났으나, 보다 강력한 억제제 Cas9에 전사 억제 도메인(예를 들어, KRAB, SID 또는 ERD)을 융합하고 이를 유전자의 프로모터 영역으로 보충함으로써 달성될 수 있다. 프로모터의 DNA 분해효소 I 과민성 영역을 표적화하면 상기 영역이 Cas9 단백질에 대한 접근 가능성이 크고, 내인성 전사 인자에 대한 정박 부위일 가능성이 또한 크기 때문에 보다 효율적인 유전자 억제 또는 활성화를 초래할 수 있는 것 같다. 특히 유전자 억제의 경우, 내인성 전사 인자의 결합 부위 차단이 유전자 발현의 하향 조절을 보조할 것으로 여기서 고려된다. 또 다른 구현예에서, eiCas9가 염색질 변형 단백질에 융합될 수 있다. 염색질 상태의 변경이 표적 유전자의 발현 감소를 초래할 수 있다.

[0431] 일부 구현예에서, gRNA 분자는 공지된 전사 반응 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서 등), 공지된 상류 활성화 서열(upstream activating sequence, UAS) 및/또는 표적 DNA의 발현을 제어할 수 있는 것으로 의심되는 비공지 또는 공지된 기능의 서열로 표적화될 수 있다.

[0432] 일부 구현예에서, CRISPR/Cas 매개 유전자 녹다운을 사용하여 하나 이상의 T 세포 발현된 유전자의 발현을 감소시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 여기에 기재된 eiCas9 또는 eiCas9 융합 단백질이 *TGFB2* 유전자 좌를 녹다운

하는 데 사용되며, 개별 gRNA 또는 둘 다 또는 모든 유전자를 표적화하는 gRNA 쌍이 eiCas9 또는 eiCas9 융합 단백질과 함께 제공된다.

[0433] 3) 단일 가닥 어닐링(annealing)

[0434] 단일 가닥 어닐링(single strand annealing, SSA)은, 표적 핵산에 존재하는 2 개의 반복 서열 사이 이중 가닥 파손을 수선하는 또 다른 DNA 수선 프로세스이다. SSA 경로에 의해 이용되는 반복 서열은 일반적으로 30 뉴클레오티드 길이를 초과한다. 파손 말단에서 절제가 발생하여 표적 핵산의 양쪽 가닥 상의 반복 서열을 드러낸다. 절제 후, 반복 서열을 함유하는 단일 가닥 오버행이 RPA 단백질로 코팅되어 반복 서열이, 예를 들어 자기 자신에 부적절하게 어닐링하는 것이 방지된다. RAD52가 오버행 상의 각 반복 서열에 결합하고, 상보성 반복 서열의 어닐링이 가능하도록 서열을 정렬한다. 어닐링 후, 오버행의 단일 가닥 늘어진 부분이 절단된다. 새로운 DNA 합성이 임의의 갭을 채우고, 절찰이 DNA 이중 영역을 회복한다. 프로세싱의 결과로, 2 개의 반복 사이 DNA 서열이 결실된다. 결실의 길이가 이용된 2 개의 반복 위치 및 절제의 경로 또는 진행도를 포함한 많은 인자에 좌우될 수 있다.

[0435] HDR 경로와는 대조적으로, SSA는 표적 핵산 서열을 변경 또는 수정하기 위해 주형 핵산을 필요로 하지 않는다. 대신에 상보성 반복 서열이 이용된다.

[0436] 4) 다른 DNA 수선 경로

[0437] A) SSB(*single strand break repair, 단일 가닥 파손 수선*)

[0438] 계놈의 단일 가닥 파손(Single-stranded break, SSB)은 상기에서 논의된 DSB 수선 메카니즘과는 구별되는 메카니즘인 SSBR 경로에 의해 수선된다. SSBR 경로는 4 개의 주요 단계: SSB 검출, DNA 말단 프로세싱, DNA 갭 필링(gap filling) 및 DNA 절찰을 갖는다. 보다 상세한 설명이 문헌[Caldecott, Nature Reviews Genetics 9, 619-631 (August 2008)]에 제공되고, 요약이 여기에 제공된다.

[0439] 제1 단계에서, SSB가 형성될 경우, PARP1 및/또는 PARP2가 파손을 인식하고 수선 기구를 모집한다. DNA 파손에서 PARP1의 결합 및 활성화는 일시적이고, 병소에서 SSB 단백질 복합체의 중심 축적 또는 안정성을 촉진함으로써 SSB를 가속화하는 것으로 보인다. 상기 SSB 중 틀림없이 가장 중요한 단백질은 XRCC1이고, 이는 3' 및 5' 말단 DNA의 청소를 담당하는 단백질을 포함하여 SSB 프로세스의 다중 효소적 구성 요소와 상호 작용, 안정화 및 자극하는 분자 스캐폴드로서 작용한다. 일부 구현예에서, XRCC1은 말단 프로세싱을 촉진하는 몇몇 단백질(DNA 중합효소 베타, PNK 및 3 개의 뉴클레아제, APE1, APTX 및 APLF)과 상호 작용한다. APE1은 엔도뉴클레아제 활성을 갖는다. APLF는 엔도뉴클레아제 및 3'에서 5' 방향의 엑소뉴클레아제 활성을 나타낸다. APTX는 엔도뉴클레아제 및 3'에서 5' 방향의 엑소뉴클레아제 활성을 갖는다.

[0440] 상기 말단 프로세싱은, 모든 SSB는 아니더라도 대부분 SSB의 3'- 및/또는 5'-말단이 손상되기 때문에 SSBR 중 중요한 단계이다. 말단 프로세싱은 일반적으로 손상된 3' 말단을 수산화 상태 및/또는 손상된 5' 말단을 인산 모이어티로 회복시키는 것을 포함하여 말단이 절찰 가능해진다. 손상된 3' 말단을 프로세싱할 수 있는 효소는 PNKP, APE1, 및 TDP1을 포함한다. 손상된 5' 말단을 프로세싱할 수 있는 효소는 PNKP, DNA 중합효소 베타 및 APTX를 포함한다. LIG3(DNA 리가제 III)이 말단 프로세싱에 또한 관여할 수 있다. 말단이 청소되면, 갭 필링이 발생할 수 있다.

[0441] DNA 갭 필링 단계에서, 전형적으로 존재하는 단백질은 PARP1, DNA 중합효소 베타, XRCC1, FEN1(플랩 엔도뉴클레아제 1), DNA 중합효소 델타/엡실론, PCNA 및 LIG1이다. 갭 필링의 2 가지 방식, 짧은 패치 수선 및 긴 패치 수선이 존재한다. 짧은 패치 수선은 누락된 단일 뉴클레오티드의 삽입을 수반한다. 일부 SSB에서, "갭 필링(gap filling)" 이 2 개 이상의 뉴클레오티드의 대체(최대 12 개 염기의 대체가 보고되었음)를 계속할 수 있다. FEN1은 대체된 5' 잔기를 제거하는 엔도뉴클레아제이다. PoI β를 포함한 다중 DNA 중합효소가 SSB의 수선에 관여하고, DNA 중합효소의 선택은 SSB의 출처 및 유형에 의해 영향을 받는다.

[0442] 제4 단계에서, DNA 리가제, 예컨대 LIG1(리가제 I) 또는 LIG3(리가제 III)이 말단의 연결을 촉매한다. 짧은 패치 수선은 리가제 III을 사용하고, 긴 패치 수선은 리가제 I을 사용한다.

[0443] 때때로, SSBR은 복제와 결합된다. 상기 경로는 CtIP, MRN, ERCC1, 및 FEN1 중 하나 이상을 수반할 수 있다. SSBR을 촉진할 수 있는 추가 인자는: PARP, PARP1, PARP2, PARG, XRCC1, DNA 중합효소 b, DNA 중합효소 d, DNA 중합효소 e, PCNA, LIG1, PNK, PNKP, APE1, APTX, APLF, TDP1, LIG3, FEN1, CtIP, MRN, 및 ERCC1을 포함한다.

- [0444] B) MMR(*mismatch repair*, *미스매치 수선*)
- [0445] 세포는 3 가지 절제 수선 경로: MMR, BER, 및 NER을 함유한다. 절제 수선 경로는, DNA 중 하나의 가닥 상의 병소를 전형적으로 인식한 뒤 엑소/엔도뉴클레아제가 상기 병소를 제거하고 DNA 중합효소에 의해 하위 순서로 채워지는 1-30 개의 뉴클레오티드 갭을 남겨두고 최종적으로 리가제로 봉인된다는 점에서 공통적인 특징을 갖는다. 보다 완벽한 묘사가 문헌[Li, Cell Research (2008) 18:85-98]에 제공되고, 요약이 여기에 제공된다.
- [0446] 미스매치 수선(Mismatch repair, MMR)이 잘못 짝지어진 DNA 염기 상에서 작동한다. MSH2/6 또는 MSH2/3 복합체 둘 다는 미스매치 인식 및 수선의 개시에 중요한 역할을 하는 ATP아제 활성을 갖는다. MSH2/6은 염기-염기 미스매치를 우선적으로 인식하고, 1 또는 2 개의 뉴클레오티드의 잘못된 쌍을 확인하나, MSH2/3은 보다 큰 ID 잘못된 쌍을 우선적으로 인식한다.
- [0447] HMLH1은 hPMS2와 이중2량체화하여 ATP아제 활성을 보유하고 MMR의 다중 단계에 중요한 hMutL $\alpha$ 를 형성한다. 상기는 EXO1을 수반하는 3' 닉 지시된 MMR에서 중요한 역할을 하는 PCNA/복제 인자 C(replication factor C, RFC) 의존 엔도뉴클레아제 활성을 보유하고, (EXO1은 HR 및 MMR 둘 다에 관여한다.) 상기는 미스매치 유발 절제의 종결을 조절한다. 리가제 I은 상기 경로에 대한 관련 리가제이다. MMR을 촉진할 수 있는 추가 인자는: EXO1, MSH2, MSH3, MSH6, MLH1, PMS2, MLH3, DNA Pol  $\delta$ , RPA, HMGB1, RFC, 및 DNA 리가제 I을 포함한다.
- [0448] C) 염기 절제 수선(*Base excision repair*, *BER*)
- [0449] 염기 절제 수선(Base excision repair, BER) 경로는 세포 주기 내내 활성이고; 게놈으로부터 작은, 비-나선형 왜곡 염기 병소의 제거를 주로 담당한다. 그에 반해, 관련된 (다음 섹션에서 논의되는) 뉴클레오티드 절제 수선 경로는 부피가 큰 나선형 왜곡 병소를 수선한다. 보다 상세한 설명이 문헌[Caldecott, Nature Reviews Genetics 9, 619-631 (August 2008)]에 제공되고, 요약이 여기에 제공된다.
- [0450] DNA 염기 손상 시, 염기 절제 수선(BER)이 개시되고, 상기 프로세스는 5 개의 주요 단계: (a) 손상된 DNA 염기의 제거; (b) 후속적인 염기 부위의 절개; (c) DNA 말단의 청소; (d) 수선 갭으로 올바른 뉴클레오티드의 삽입; 및 (e) DNA 백본에서 나머지 닉의 결찰;로 단순화될 수 있다. 상기 마지막 단계가 SSB와 유사하다.
- [0451] 제1 단계에서, 손상 특이적 DNA 글리코실라제가 당 인산 백본에 염기를 연결하는 N-글리코시드 결합의 절단을 통해 손상된 염기를 잘라낸다. 이어서 결합된 리아제 활성을 갖는 AP 엔도뉴클레아제-1(AP endonuclease-1, APE1) 또는 이중기능성 DNA 글리코실라제가 인산디에스테르 백본을 절개하여 DNA 단일 가닥 파손(SSB)을 형성한다. BER의 제3 단계는 DNA 말단의 청소를 수반한다. BER의 제4 단계는 수선 갭으로 새로운 상보성 뉴클레오티드를 추가하는 Pol  $\beta$ 에 의해 시행되고, 마지막 단계에서 XRCC1/리가제 III이 DNA 백본에서 나머지 닉을 봉합한다. 상기가 손상된 DNA 염기의 대부분(~80%)이 수선되는 짧은 패치 BER 경로를 완성한다. 그러나, 3 단계에서 5' 말단이 말단 프로세싱 활성에 내성이 있는 경우, Pol  $\beta$ 에 의해 1 개의 뉴클레오티드 삽입 후 이어서 복제 DNA 중합효소, Pol  $\delta$ /으로 중합효소의 전환이 있고, 이어서 상기가 DNA 수선 갭으로 ~2-8 개 이상의 뉴클레오티드를 추가한다. 상기는, 진행성 인자 증식 세포 핵 항원(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)과 공동으로 플랩 엔도뉴클레아제-1(flap endonuclease-1, FEN-1)에 의해 인식 및 삭제되는 5'-플랩 구조를 형성한다. 이어서 DNA 리가제 I이 DNA 백본에 있는 나머지 닉을 봉합하고 긴 패치 BER을 완료한다. BER 경로를 촉진할 수 있는 추가 인자는: DNA 글리코실라제, APE1, Pol $\beta$ , Pol $\delta$ , Pol $\epsilon$ , XRCC1, 리가제 III, FEN-1, PCNA, RECQL4, WRN, MYH, PNKP, 및 APTX를 포함한다.
- [0452] D) 뉴클레오티드 절제 수선(*Nucleotide excision repair*, *NER*)
- [0453] 뉴클레오티드 절제 수선(Nucleotide excision repair, NER)은 DNA로부터 부피가 큰 나선형 왜곡 병소를 제거하는 중요한 절제 메카니즘이다. NER에 대한 추가 세부 사항이 문헌[Marteijn et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology 15, 465-481 (2014)]에 제공되고, 요약이 여기에 제공된다. NER은 2 개의 보다 작은 경로: 게놈 전체의 NER(global genomic NER, GG-NER) 및 전사 결합 수선 NER(transcription coupled repair NER, TC-NER)을 포괄하는 폭넓은 경로이다. GG-NER 및 TC-NER은 DNA 손상을 인식하기 위해 상이한 인자를 사용한다. 그러나, 상기는 병소 절개, 수선 및 결찰을 위해 동일한 기구를 이용한다.
- [0454] 손상이 인식되면, 세포가 병소를 함유하는 짧은 단일 가닥 DNA 세그먼트를 제거한다. (ERCC5에 의해 암호화된) XPF/ERCC1 및 XPG 엔도뉴클레아제가 병소의 양쪽에서 손상된 가닥을 절단함으로써 병소를 제거하여 22-30 개 뉴클레오티드의 단일 가닥 갭을 초래한다. 다음에, 세포가 DNA 갭 필링 합성 및 결찰을 수행한다. PCNA, RFC, DNA Pol  $\delta$ , DNA Pol  $\epsilon$  또는 DNA Pol  $\kappa$ , 및 DNA 리가제 I 또는 XRCC1/리가제 III이 상기 프로세스에 관여한다.

복제 세포는 DNA pol  $\epsilon$  및 DNA 리가제 I을 사용하는 경향이 있으나, 비복제 세포는 DNA Pol  $\delta$ , DNA Pol  $\kappa$ 를 사용하는 경향이 있으며, XRCC1/리가제 III이 복합체를 형성하여 결찰 단계를 수행한다.

[0455] NER은 XPA-G, POLH, XPF, ERCC1, XPA-G, 및 LIG1 인자를 포함할 수 있다. 전사 결합 NER(TC-NER)은 CSA, CSB, XPB, XPD, XPG, ERCC1, 및 TTDA 인자를 포함할 수 있다. NER 수선 경로를 촉진할 수 있는 추가 인자는 XPA-G, POLH, XPF, ERCC1, XPA-G, LIG1, CSA, CSB, XPA, XPB, XPC, XPD, XPF, XPG, TTDA, UVSSA, USP7, CETN2, RAD23B, UV-DDB, CAK 하위 복합체, RPA, 및 PCNA를 포함한다.

[0456] E) 가닥간 교차결합(Interstrand Crosslink, ICL)

[0457] ICL 수선 경로로 명명되는 전용 경로가 가닥간 교차결합을 수선한다. 가닥간 교차결합 또는 상이한 DNA 가닥 내 염기 사이 공유 교차결합이 복제 또는 전사 중 발생할 수 있다. ICL 수선은 다중 수선 프로세스, 특히 핵산 분해 활성, 손상통과 합성(TLS) 및 HDR의 공동 작용을 수반한다. 뉴클레아제가 모집되어 교차결합된 염기의 양쪽에서 ICL을 잘라내나, TLS 및 HDR이 공동 작용하여 절단 가닥을 수선한다. ICL 수선은 엔도뉴클레아제, 예를 들어 XPF 및 RAD51C, RAD51과 같은 엔도뉴클레아제, 손상통과 중합효소, 예를 들어 DNA 중합효소 제타 및 Rev1 및 판코니 빈혈(Fanconi anemia, FA) 단백질, 예를 들어 FancJ 인자를 포함할 수 있다.

[0458] F) 기타 경로

[0459] 몇몇 기타 DNA 수선 경로가 포유류에 존재한다. 손상통과 합성(TLS)은 결함이 있는 복제 이벤트 후에 남겨진 단일 가닥 파손을 수선하기 위한 경로이고, 손상통과 중합효소, 예를 들어 DNA pol  $\zeta$  및 Rev1을 수반한다. 무오류 복제 후 수선(post replication repair, PRR)은 결함이 있는 복제 이벤트 후에 남겨진 단일 가닥 파손을 수선하기 위한 또 다른 경로이다.

[0460] 5) 게놈 편집 방법에서 gRNA의 예

[0461] 여기에 기재된 바와 같은 임의의 gRNA 분자가 이중 가닥 파손 또는 단일 가닥 파손을 생성하여 표적 핵산, 예를 들어, 표적 위치 또는 표적 유전자 특징 서열을 변경하는 임의의 Cas9 분자와 함께 사용될 수 있다. 일부 실시예에서, 표적 핵산은 기재된 임의의 것과 같은 *TGFB2* 유전자 좌 또는 근처에 존재한다. 일부 구현예에서, gRNA 분자와 같은 리보핵산 분자 및 Cas9 단백질 또는 이의 변이체와 같은 단백질이 여기 제공된 임의의 조작된 세포로 도입된다. 상기 방법에 유용한 gRNA 분자가 여기에 기재된다.

[0462] 일부 구현예에서, gRNA, 예를 들어 키메라 gRNA는:

[0463] a) 예를 들어, 이중 가닥 파손을 만드는 Cas9 분자를 표적화하는 경우, (i) 표적 위치의 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 개의 뉴클레오티드 내 또는 (ii) 상기 표적 위치가 말단 절제 영역 내에 존재하도록 충분히 가깝게 이중 가닥 파손을 위치시킬 수 있고;

[0464] b) 16 개 이상의 뉴클레오티드의 표적화 도메인, 예를 들어, (i) 16, (ii) 17, (iii) 18, (iv) 19, (v) 20, (vi) 21, (vii) 22, (viii) 23, (ix) 24, (x) 25, 또는 (xi) 26 개의 뉴클레오티드의 표적화 도메인을 갖고;

[0465] c) (i) 근위 및 꼬리 도메인이 함께 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 및 근위 도메인 유래 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 포함하거나;

[0466] (ii) 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 3' 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* gRNA의 대응 서열 유래 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열이 존재하거나;

[0467] (iii) 제1 상보성 도메인의 대응하는 뉴클레오티드에 상보적인 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51, 또는 54 개 이상의 3' 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* gRNA의 대응 서열 유래 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51, 또는 54 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열이 존재하거나;

[0468] (iv) 꼬리 도메인이 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 개 이상의 뉴클레오티드 길이며, 예를 들어, 상기가 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 도메인 유래 10, 15, 20, 25,

30, 35 또는 40 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 포함하거나; 또는

- [0469] (v) 꼬리 도메인이 자연 발생 꼬리 도메인, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 도메인의 대응하는 부분의 15, 20, 25, 30, 35, 40 개 뉴클레오티드 또는 전부를 포함하는;
- [0470] 특성 중 하나 이상을 포함하도록 구성된다.
- [0471] 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(iii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(iv) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(v) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(vi) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(vii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(viii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(ix) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(x) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(xi) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 c 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a, b 및 c 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(i), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(i), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iv), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iv), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(v), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(v), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vi), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vi), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(viii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(viii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ix), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ix), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(x), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(x), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(xi), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(xi), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다.
- [0472] 일부 구현예에서, gRNA, 예를 들어 키메라 gRNA는:
- [0473] a) 예를 들어, 단일 가닥 파손을 만드는 Cas9 분자를 표적화하는 경우, (i) gRNA 중 하나 또는 둘 다가 (i) 표적 위치의 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 개의 뉴클레오티드 내 또는 (ii) 상기 표적 위치가 말단 절제 영역 내에 존재하도록 충분히 가깝게 단일 가닥 파손을 위치시킬 수 있고;
- [0474] b) 하나 또는 둘 다가 16 개 이상의 뉴클레오티드의 표적화 도메인, 예를 들어, (i) 16, (ii) 17, (iii) 18, (iv) 19, (v) 20, (vi) 21, (vii) 22, (viii) 23, (ix) 24, (x) 25, 또는 (xi) 26 개 뉴클레오티드의 표적화 도메인을 갖고;
- [0475] c) (i) 근위 및 꼬리 도메인이 함께 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 및 근위 도메인 유래 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 포함하거나;
- [0476] (ii) 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 3' 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* gRNA의 대응 서열 유래 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열이 존재하거나;
- [0477] (iii) 제1 상보성 도메인의 대응하는 뉴클레오티드에 상보적인 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51, 또는 54 개 이상의 3' 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생

*S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* gRNA의 대응 서열 유래 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51, 또는 54 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열이 존재하거나;

- [0478] (iv) 꼬리 도메인이 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 개 이상의 뉴클레오티드 길이이며, 예를 들어, 상기가 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 도메인 유래 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 포함하거나; 또는
- [0479] (v) 꼬리 도메인이 자연 발생 꼬리 도메인, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 도메인의 대응하는 부분의 15, 20, 25, 30, 35, 40 개 뉴클레오티드 또는 전부를 포함하는;
- [0480] 특성 중 하나 이상을 포함하도록 구성된다.
- [0481] 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(iii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(iv) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(v) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(vi) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(vii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(viii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(ix) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(x) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 b(xi) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a 및 c 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a, b 및 c 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(i), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(i), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iv), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(iv), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(v), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(v), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vi), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vi), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(vii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(viii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(viii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ix), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(ix), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(x), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(x), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(xi), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA는 a(i), b(xi), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다.
- [0482] 일부 구현예에서, gRNA는 HNH 활성을 갖는 Cas9 니카제 분자, 예를 들어, 비활성화된 RuvC 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, D10에서의 돌연변이, 예를 들어, D10A 돌연변이를 갖는 Cas9 분자와 함께 사용된다.
- [0483] 일부 구현예에서, gRNA는 RuvC 활성을 갖는 Cas9 니카제 분자, 예를 들어, 비활성화된 HNH 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, H840, 예를 들어, H840A에서의 돌연변이를 갖는 Cas9 분자와 함께 사용된다.
- [0484] 일부 구현예에서, 제1 및 제2 gRNA를 포함하는 gRNA 쌍, 예를 들어 키메라 gRNA의 쌍은:
- [0485] a) 예를 들어, 단일 가닥 파손을 만드는 Cas9 분자를 표적화하는 경우, (i) gRNA 중 하나 또는 둘 다가 (i) 표적 위치의 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 개의 뉴클레오티드 내 또는 (ii) 상기 표적 위치가 말단 절제 영역 내에 존재하도록 충분히 가깝게 단일 가닥 파손을 위치시킬 수 있고;
- [0486] b) 하나 또는 둘 다가 16 개 이상의 뉴클레오티드의 표적화 도메인, 예를 들어, (i) 16, (ii) 17, (iii) 18, (iv) 19, (v) 20, (vi) 21, (vii) 22, (viii) 23, (ix) 24, (x) 25, 또는 (xi) 26 개 뉴클레오티드의 표적화 도메인을 갖고;

- [0487] c) 하나 또는 둘다에 대해:
- [0488] (i) 근위 및 꼬리 도메인이 함께 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 및 근위 도메인 유래 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 포함하거나;
- [0489] (ii) 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 3' 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* gRNA의 대응 서열 유래 15, 18, 20, 25, 30, 31, 35, 40, 45, 49, 50, 또는 53 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열이 존재하거나;
- [0490] (iii) 제1 상보성 도메인의 대응하는 뉴클레오티드에 상보적인 제2 상보성 도메인의 마지막 뉴클레오티드에 대해 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51, 또는 54 개 이상의 3' 뉴클레오티드, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* gRNA의 대응 서열 유래 16, 19, 21, 26, 31, 32, 36, 41, 46, 50, 51, 또는 54 개 이상의 뉴클레오티드 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열이 존재하거나;
- [0491] (iv) 꼬리 도메인이 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 개 이상의 뉴클레오티드 길이이며, 예를 들어, 상기가 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 도메인 유래 10, 15, 20, 25, 30, 35 또는 40 개 이상의 뉴클레오티드; 또는 상기와 1, 2, 3, 4, 5; 6, 7, 8, 9 또는 10 개 이내의 뉴클레오티드가 상이한 서열을 포함하거나; 또는
- [0492] (v) 꼬리 도메인이 자연 발생 꼬리 도메인, 예를 들어, 자연 발생 *S. pyogenes*, *S. thermophilus*, *S. aureus*, 또는 *N. meningitidis* 꼬리 도메인의 대응하는 부분 중 15, 20, 25, 30, 35, 40 개 뉴클레오티드 또는 전부를 포함하고;
- [0493] d) gRNA가, 표적 핵산에 혼성화될 경우, 0-50, 0-100, 0-200, 10 이상, 20 이상, 30 이상 또는 50 개 이상의 뉴클레오티드에 의해 분리되도록 구성되고;
- [0494] e) 제1 gRNA 및 제2 gRNA에 의해 만들어진 파손이 상이한 가닥 상에 존재하고;
- [0495] f) PAM이 외부를 향하는;
- [0496] 특성 중 하나 이상을 포함하도록 구성된다.
- [0497] 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a 및 b(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a 및 b(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a 및 b(iii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a 및 b(iv) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a 및 b(v) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a 및 b(vi) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a 및 b(vii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a 및 b(viii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a 및 b(ix) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a 및 b(x) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a 및 b(xi) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a, b 및 c 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(i), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(i), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(i), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(i), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ii), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ii), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(iii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다.

록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(iii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(iii), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(iii), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(iii), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(iv), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(iv), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(iv), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(iv), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(iv), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(v), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(v), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(v), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(v), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(v), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(vi), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(vi), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(vi), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(vi), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(vii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(vii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(vii), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(vii), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(vii), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(viii), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(viii), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(viii), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(viii), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(viii), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ix), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ix), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ix), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ix), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(ix), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(x), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(x), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(x), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(x), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(x), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(xi), 및 c(i) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(xi), 및 c(ii) 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(xi), c, 및 d 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(xi), c, 및 e 특성을 포함하도록 구성된다. 일부 구현예에서, gRNA 중 하나 또는 둘 다가 a(i), b(xi), c, d 및 e 특성을 포함하도록 구성된다.

- [0498] 일부 구현예에서, gRNA는 HNH 활성을 갖는 Cas9 니카제 분자, 예를 들어, 비활성화된 RuvC 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, D10에서의 돌연변이, 예를 들어, D10A 돌연변이를 갖는 Cas9 분자와 함께 사용된다.
- [0499] 일부 구현예에서, gRNA는 RuvC 활성을 갖는 Cas9 니카제 분자, 예를 들어, 비활성화된 HNH 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, H840, 예를 들어, H840A에서의 돌연변이를 갖는 Cas9 분자와 함께 사용된다. 일부 구현예에서, gRNA는 RuvC 활성을 갖는 Cas9 니카제 분자, 예를 들어, 비활성화된 HNH 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, N863, 예를 들어, N863A에서의 돌연변이를 갖는 Cas9 분자와 함께 사용된다.
- [0500] 6) 유전자 편집을 위한 체계의 기능 분석
- [0501] Cas9 분자, gRNA 분자, Cas9 분자/gRNA 분자 복합체 중 어느 하나가 공지된 방법에 의해 또는 여기 기재된 바와 같이 평가될 수 있다. 예를 들어, Cas9 분자의 엔도뉴클레아제 활성을 평가하기 위한 예시적인 방법이, 예를 들

어 문헌[Jinek *et al.*, Science 2012, 337(6096):816-821]에 기재되어 있다.

[0502] G) 결합 및 절단 분석: Cas9 분자의 엔도뉴클레아제 활성의 테스트

[0503] Cas9 분자/gRNA 분자 복합체가 표적 핵산에 결합 및 절단하는 능력이 플라스미드 절단 분석으로 평가될 수 있다. 상기 분석에서, 합성 또는 시험관 내(*in vitro*) 전사된 gRNA 분자가, 95 °C로 가열 및 실온으로 서서히 냉각시킴으로써 반응 전에 사전 결합된다. 천연 또는 제한 효소 분해로 선형화된 플라스미드 DNA(300 ng (~8 nM))가, 10 mM MgCl<sub>2</sub>와 함께 또는 없이 Cas9 플라스미드 절단 완충제(20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.1 mM EDTA)에서 정제된 Cas9 단백질 분자(50-500 nM) 및 gRNA(50-500 nM, 1:1)와 함께 37 °C에서 60 분 동안 인큐베이션된다. 상기 반응이 5X DNA 로딩 완충제(30% 글리세롤, 1.2% SDS, 250 mM EDTA)로 정지, 0.8 또는 1% 아가로스 겔 전기 영동에 의해 분석 및 에티뮴 브로마이드 염색에 의해 시각화된다. 생성된 절단 생성물이 Cas9 분자가 DNA 가닥 둘 다 또는 2 개의 가닥 중 1 개만 절단하는지 여부를 나타낸다. 예를 들어, 선형 DNA 생성물은 DNA 가닥 둘 다의 절단을 나타낸다. 개방된 고리형 닉 생성물은 2 개의 가닥 중 1 개만 절단됨을 나타낸다.

[0504] 대안적으로, Cas9 분자/gRNA 분자 복합체가 표적 핵산에 결합 및 절단하는 능력이 올리고뉴클레오티드 DNA 절단 분석으로 평가될 수 있다. 상기 분석에서, DNA 올리고뉴클레오티드(10 pmol)가, 50 µL 반응으로 1X T4 폴리뉴클레오티드 키나제 반응 완충제에서 T4 폴리뉴클레오티드 키나제 5 유닛 및 ~3-6 pmol (~20-40 mCi) [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP와 함께 37 °C에서 30 분 동안 인큐베이션에 의해 방사성 표지된다. 가열 비활성화(65 °C에서 20 분 동안) 후, 반응물이 컬럼을 통해 정제되어 삽입되지 않은 표지가 제거된다. 이중 영역 기질(100 nM)은 95 °C에서 3 분 동안 등물 양의 비표지 상보성 올리고뉴클레오티드와 표지된 올리고뉴클레오티드를 어닐링한 뒤 실온으로 서서히 냉각시킴으로써 생성된다. 절단 분석을 위해, gRNA 분자는, 30 s 동안 95 °C까지 가열한 뒤 실온으로 서서히 냉각시킴으로써 어닐링된다. Cas9(최종 농도 500 nM)가, 9 µl의 최종 부피로 절단 분석 완충제(20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 5% 글리세롤)에서 어닐링된 gRNA 분자(500 nM)와 사전 인큐베이션된다. 반응이 1 µl 표적 DNA(10 nM)의 첨가로 개시되고, 37 °C에서 1 h 동안 인큐베이션된다. 반응이 20 µl의 로딩 염료(포름아미드 중 5 mM EDTA, 0.025% SDS, 5% 글리세롤)의 첨가로 정지되고, 5 분 동안 95 °C까지 가열된다. 절단 생성물이 7 M 요소를 함유하는 12 % 변성 폴리아크릴아미드 겔 상에서 분석되고, 인산화이미징에 의해 시각화된다. 생성된 절단 생성물이 상보성 가닥, 비상보성 가닥 또는 둘 다가 절단되는지 여부를 나타낸다.

[0505] 상기 분석 중 하나 또는 둘 다가 이용되어 제공된 gRNA 분자 또는 Cas9 분자 중 어느 하나의 적합성을 평가할 수 있다.

[0506] H) 결합 분석: 표적 DNA에 대한 Cas9 분자의 결합 테스트

[0507] 표적 DNA에 대한 Cas9 분자의 결합을 평가하기 위한 예시적인 방법이, 예를 들어 문헌[Jinek *et al.*, Science 2012, 337(6096):816-821]에 기재되어 있다.

[0508] 예를 들어, 전기 영동 이동성 전환 분석에서, 표적 DNA가 탈이온 수 내 각 가닥(10 nmol)의 혼합, 3 분 동안 95 °C까지 가열 및 실온으로 서서히 냉각시킴으로써 형성된다. 모든 DNA가 1X TBE를 함유하는 8% 천연 겔 상에서 정제된다. DNA 밴드가 UV 쉐도잉에 의해 시각화, 절제 및 DEPC 처리된 H<sub>2</sub>O에 겔 조각을 침지시킴으로써 용출된다. 용출된 DNA가 에탄올 침전되고, DEPC 처리된 H<sub>2</sub>O로 분석된다. DNA 샘플이 37 °C에서 30 분 동안 T4 폴리뉴클레오티드 키나제를 사용하여 [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP로 5' 말단 표지된다. 폴리뉴클레오티드 키나제가 65 °C에서 20 분 동안 열 변성되고, 삽입되지 않은 방사성 표지가 컬럼을 사용하여 제거된다. 결합 분석이 10 µl의 총 부피로 20 mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT 및 10% 글리세롤을 함유하는 완충제에서 수행된다. Cas9 단백질 분자가 사전 어닐링된 gRNA 분자의 등물 양으로 프로그램되고, 100 pM 내지 1 µM로 적정된다. 방사성 표지된 DNA가 20 pM의 최종 농도로 첨가된다. 샘플이 37 °C에서 1 h 동안 인큐베이션되고, 1X TBE 및 5 mM MgCl<sub>2</sub>를 함유하는 8% 천연 폴리아크릴아미드 겔 상에서 4 °C로 분석된다. 겔이 건조되고, DNA가 인산화이미징에 의해 시각화된다.

[0509] I) Cas9/gRNA 복합체의 열안정성을 측정하기 위한 기술

[0510] Cas9-gRNA 리보핵산단백질(ribonucleoprotein, RNP) 복합체의 열안정성이 시차 주사 형광측정법(differential scanning fluorimetry, DSF) 및 기타 기술에 의해 검출될 수 있다. 단백질의 열안정성이 RNA 분자, 예를 들어 gRNA 결합의 추가와 같은 유리한 조건 하에서 증가할 수 있다. 따라서, Cas9/gRNA 복합체의 열안정성에 관한 정

보가 상기 복합체가 안정한지 여부를 결정하는 데 유용하다.

[0511] J) 시차 주사 형광측정법(*differential scanning fluorimetry, DSF*)

[0512] Cas9-gRNA 리보핵산단백질(RNP) 복합체의 열안정성이 DSF를 통해 측정될 수 있다. 하기 기재된 바와 같이 RNP 복합체는, RNA 또는 gRNA와 같은 리보뉴클레오티드의 서열 및 Cas9 단백질 또는 이의 변이체와 같은 단백질을 포함한다. 상기 기술은 RNA 분자, 예를 들어 gRNA 결합의 추가와 같은 유리한 조건 하에서 증가할 수 있는 단백질의 열안정성을 측정한다.

[0513] 분석이 여러 가지 방법으로 적용될 수 있다. 예시적인 프로토콜은, RNP 형성을 위한 바람직한 용액 조건을 결정하는 프로토콜(분석 1, 하기 참조), gRNA:Cas9 단백질의 바람직한 화학량론 비율을 테스트하는 프로토콜(분석 2, 하기 참조), Cas9 분자, 예를 들어 야생형 또는 돌연변이 Cas9 분자에 대한 효과적인 gRNA 분자를 스크리닝하는 프로토콜(분석 3, 하기 참조) 및 표적 DNA의 존재 하에 RNP 형성을 검사하는 프로토콜을 포함하나, 이에 국한되지 않는다. 일부 구현예에서, 분석은 2 가지 상이한 프로토콜, gRNA:Cas9 단백질의 최상의 화학량론 비율을 테스트하는 것 및 RNP 형성을 위한 최상의 용액 조건을 결정하기 위한 또 다른 것을 이용하여 수행된다.

[0514] RNP 복합체를 형성하는 최상의 용액을 결정하기 위해, 물+10x SYPRO Orange®(Life Technologies cat#S-6650) 내 2 M 용액의 Cas9를 384 웰 플레이트로 분주했다. 이어서 다양한 pH 및 염 용액으로 희석된 등물 양의 gRNA가 추가된다. 실온에서 10' 동안 인큐베이션 및 임의의 버블을 제거하기 위한 짧은 원심분리 후에, Bio-Rad CFX Manager 소프트웨어를 갖춘 Bio-Rad CFX384™ 실시간 시스템 C1000 Touch™ Thermal Cycler가 사용되어 10 초당 1°의 온도 증가로 20 °C 내지 90 °C 변화도로 작동된다.

[0515] 제2 분석은, 상기 분석 1의 최적의 완충제에서 2 M Cas9와 함께 다양한 농도의 gRNA를 혼합 및 384 웰 플레이트에서 10' 동안 RT에서 인큐베이션하는 것으로 구성된다. 같은 부피의 최적의 완충제 + 10x SYPRO Orange®(Life Technologies cat#S-6650)가 첨가되고 플레이트가 Microseal® B 접착제(MSB-1001)로 밀봉된다. 임의의 버블을 제거하기 위한 짧은 원심분리 후에, Bio-Rad CFX Manager 소프트웨어를 갖춘 Bio-Rad CFX384™ 실시간 시스템 C1000 Touch™ Thermal Cycler가 사용되어 10 초당 1°의 온도 증가로 20 °C 내지 90 °C 변화도로 작동된다.

[0516] 제3 분석에서, 관심 Cas9 분자(예를 들어, Cas9 단백질, 예를 들어 Cas9 변이체 단백질)이 정제된다. 변이체 gRNA 분자의 라이브러리가 합성되고 20 M의 농도로 재현탁된다. Cas9 분자가, 5x SYPRO Orange®(Life Technologies cat#S-6650)의 존재 하에 미리 결정된 완충제에서 각각 1 M의 최종 농도로 gRNA 분자와 인큐베이션된다. 실온에서 10 분 동안 인큐베이션 및 임의의 버블을 제거하기 위해 2 분 동안 2000 rpm으로 원심분리 후에, Bio-Rad CFX Manager 소프트웨어를 갖춘 Bio-Rad CFX384™ 실시간 시스템 C1000 Touch™ Thermal Cycler가 사용되어 10 초당 1 °C의 온도 증가로 20 °C 내지 90 °C 변화도로 작동된다.

[0517] 제4 분석에서, DSF 실험이: Cas9 단백질 단독, gRNA와 Cas9 단백질, gRNA 및 표적 DNA와 Cas9 단백질 및 표적 DNA와 Cas9 단백질 샘플로 수행된다. 구성 요소의 혼합 순서는: 반응 용액, Cas9 단백질, gRNA, DNA 및 SYPRO Orange이다. 반응 용액은 MgCl<sub>2</sub>의 부재 또는 존재 하에 10 mM HEPES pH 7.5, 100 mM NaCl을 함유한다. 임의의 버블을 제거하기 위해 2 분 동안 2000 rpm으로 원심분리 후에, Bio-Rad CFX Manager 소프트웨어를 갖춘 Bio-Rad CFX384™ 실시간 시스템 C1000 Touch™ Thermal Cycler가 사용되어 10 초당 1°의 온도 증가로 20 °C 내지 90 °C 변화도로 작동된다.

[0518] **3. 유전자 파괴를 위한 제제의 전달**

[0519] 일부 구현예에서, 인간의 (TGFBRII를 암호화하는) 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 표적화된 유전자 파괴, 예를 들어, DNA 파손이, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들), 예를 들어, Cas9 및/또는 gRNA 구성 요소를, 세포로 도입 또는 전달하기 위한 많은 공지된 전달 방법 또는 비히클 중 어느 하나를 사용하여, 예를 들어, Cas9 분자 및 gRNA를 전달하기 위한 바이러스, 예를 들어, 렌티바이러스 전달 벡터 또는 임의의 공지된 방법 또는 비히클을 사용하여, 세포로 전달 또는 도입함으로써 수행된다. 예시적인 방법, 예를 들어 문헌 [Wang et al. (2012) *J. Immunother.* 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) *Blood.* 101:1637-1644; Verhoeyen et al. (2009) *Methods Mol Biol.* 506: 97-114; 및 Cavalieri et al. (2003) *Blood.* 102(2): 497-505]에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴, 예를 들어 DNA 파손을 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)의 하나 이상의 구성 요소를 암호화하는 핵산 서열이, 예를 들어, 여기 기재되거나 공지된 세포로 핵산을 도입하는 임의의 방법에 의해 세포로 도입된다. 일부 구현예에서, CRISPR 가이드 RNA 및/또는 Cas9 효소와 같은 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)의 구성 요소를 암호화하는 벡터가 세포로 전달될 수 있다.

[0520] 일부 구현예에서, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들), 예를 들어 Cas9/gRNA인 하나 이상의 제제(들)이 리보핵산단백질(RNP) 복합체로 세포에 도입된다. RNP 복합체는 RNA 또는 gRNA 분자와 같은 리보뉴클레오티드의 서열 및 Cas9 단백질 또는 이의 변이체와 같은 단백질을 포함한다. 예를 들어, Cas9 단백질은 표적 서열을 표적화하는 Cas9 단백질 및 gRNA 분자를 포함하는 RNP 복합체로서 예를 들어, 전기천공 또는 기타 물리적 전달 방법을 이용하여 전달된다. 일부 구현예에서, RNP는 전기 천공 또는 기타 물리적 수단, 예를 들어 입자 총, 인산 칼슘 형질 감염, 세포 압축 또는 압착을 통해 세포로 전달된다. 일부 구현예에서, RNP는 추가 전달 제제(예를 들어, 소분자 제제, 지질 등)를 필요로 하지 않고 세포의 혈장 막을 가로질러 수 있다. 일부 구현예에서, RNP로서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들), 예를 들어, CRISPR/Cas9의 전달은, 표적화된 파괴가 예를 들어, RNP가 도입되는 세포에서 세포의 자손으로 제제가 전달되지 않으면서 일시적으로 발생한다는 이점을 제공한다. 예를 들어, RNP에 의한 전달은 제제가 자손으로 계승되는 것을 최소화하고, 이로써 자손에서 표적 외 유전자 파괴의 기회를 줄인다. 상기 경우에, 유전자 파괴 및 전이 유전자의 통합은 자손 세포에 의해 계승될 수 있으나, 제제 자체없이 자손 세포로 전달되면서 표적 외 유전자 파괴를 더 도입할 수 있다.

[0521] 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제(들) 및 구성 요소, 예를 들어, Cas9 분자 및 gRNA 분자는 표 4 및 표 5에 제시된 바와 같은 다양한 전달 방법 및 제형 또는 예를 들어, 문헌[국제 출원 WO 2015/161276; 미국 출원 US 2015/0056705, US 2016/0272999, US 2017/0211075; 또는 US 2017/0016027]에 기재된 방법을 사용하여 다양한 형태로 표적 세포에 도입될 수 있다. 여기에 더 기재된 바와 같이, 전달 방법 및 제형을 사용하여 여기에 기재된 방법의 이전 또는 후속 단계에서 세포에 주형 폴리뉴클레오티드 및/또는 다른 제제(예컨대 세포를 조작하는데 필요한 것)를 전달할 수 있다. Cas9 또는 gRNA 구성 요소가 전달을 위한 DNA로 암호화되는 경우, 상기 DNA는 발현에 영향을 미치는, 예를 들어 프로모터를 포함하는 제어 영역을 반드시는 아니나 전형적으로 포함할 수 있다. Cas9 분자 서열을 위한 유용한 프로모터는, 예를 들어 CMV, EF-1 $\alpha$ , EFS, MSCV, PGK, 또는 CAG 프로모터를 포함한다. gRNA에 대한 유용한 프로모터는, 예를 들어 H1, EF-1 $\alpha$ , tRNA 또는 U6 프로모터를 포함한다. 유사하거나 유사하지 않은 강도를 갖는 프로모터가 선택되어 구성 요소의 발현이 조율될 수 있다. Cas9 분자를 암호화하는 서열이 핵 국소화 신호(nuclear localization signal, NLS), 예를 들어 SV40 NLS를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Cas9 분자 또는 gRNA 분자에 대한 프로모터가, 독립적으로 유도성, 조직 특이적 또는 세포 특이적 일 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제가 RNP 복합체로 도입된다.

표 4

예시적인 전달 방법

요소		설명
Cas9 분자(들)	gRNA 분자(들)	
DNA	DNA	본 구현예에서, Cas9 분자 및 gRNA 가 DNA 에서 전사된다. 본 구현예에서, 상기는 별도의 분자에 암호화된다.
DNA		본 구현예에서, Cas9 분자 및 gRNA 가 DNA 로부터, 여기에서 단일 분자로부터 전사된다.
DNA	RNA	본 구현예에서, Cas9 분자는 DNA 에서 전사되고, gRNA 는 시험관 내 전사되거나 또는 합성된 RNA 로 제공된다.
mRNA	RNA	본 구현예에서, Cas9 분자는 시험관 내 전사된 mRNA 에서 번역되고, gRNA 는 시험관 내 전사되거나 또는 합성된 RNA 로 제공된다.
mRNA	DNA	본 구현예에서, Cas9 분자는 시험관 내 전사된 mRNA 에서 번역되고, gRNA 는 DNA 에서 전사된다.
Protein	DNA	본 구현예에서, Cas9 분자는 단백질로 제공되고, gRNA 는 DNA 에서 전사된다.
Protein	RNA	본 구현예에서, Cas9 분자는 단백질로 제공되고, gRNA 는 전사되거나 또는 합성된 RNA 로 제공된다.

[0522]

표 5

예시적인 전달 방법의 비교

전달 벡터/모드		비분열 세포로 전달	발현 기간	게놈 통합	전달된 분자 유형
물리적(예를 들어, 전기 천공, 입자 총, 인산 칼슘 형질 감염, 세포 압축 또는 압착)		예	일시적	아니요	핵산 및 단백질
바이러스	레트로바이러스	아니요	안정적	예	RNA
	렌티바이러스	예	안정적	변형을 갖는 예/아니오	RNA
	아데노바이러스	예	일시적	아니요	DNA
	아데노 관련 바이러스(Adeno- Associated Virus, AAV)	예	안정적	아니요	DNA
	백시니아 바이러스	예	매우 일시적	아니요	DNA
	헤르페스 심플렉스 바이러스	예	안정적	아니요	DNA
비-바이러스	양이온 리포솜	예	일시적	전달되는 것에 따라 다름	핵산 및 단백질
	중합체 나노 입자	예	일시적	전달되는 것에 따라 다름	핵산 및 단백질
약화된 세균		예	일시적	아니요	핵산

[0523]

전달 벡터/모드		비분열 세포로 전달	발현 기간	게놈 통합	전달된 분자 유형
생물학적 비- 바이러스 전달 비히클	조작된 박테리오파지	예	일시적	아니요	핵산
	포유류 바이러스 유사 입자	예	일시적	아니요	핵산
	생물학적 리포솜: 적혈구 고스트 및 엑소솜	예	일시적	아니요	핵산

[0524]

[0525]

일부 구현예에서, Cas9 분자 및/또는 gRNA 분자를 암호화하는 DNA 또는 Cas9 분자 및/또는 gRNA 분자를 포함하는 RNP 복합체가, 공지된 방법에 의해 또는 여기에 기재된 바와 같이 세포로 전달될 수 있다. 예를 들어, Cas9 암호화 및/또는 gRNA 암호화 DNA가, 예를 들어, 벡터(예를 들어, 바이러스 또는 비바이러스 벡터), 비벡터 기반 방법(예를 들어, 있는 그대로의 DNA 또는 DNA 복합체 사용) 또는 이의 조합물에 의해 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 제제(들) 및/또는 이의 구성 요소를 함유하는 폴리뉴클레오티드가 벡터(예를 들어, 바이러스 벡터/바이러스 또는 플라스미드)에 의해 전달된다. 벡터는 여기에 기재된 임의의 것일 수 있다.

[0526]

일부 측면에서, 가이드 서열과 조합하여(및 선택적으로 이와는 별개로) CRISPR 효소(예를 들어, Cas9 뉴클레아제)가 세포로 전달된다. 예를 들어, CRISPR 시스템 중 하나 이상의 요소가 I 유형, II 유형 또는 III 유형 CRISPR 시스템에서 유래된다. 예를 들어, CRISPR 시스템 중 하나 이상의 요소가 *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* 또는 *Neisseria meningitidis*와 같은 내인성 CRISPR 시스템을 포함하는 특정 유기체에서 유래된다.

[0527]

일부 구현예에서, Cas9 뉴클레아제(예를 들어, *Staphylococcus aureus* 유래 또는 *Streptococcus pyogenes* 유래 mRNA에 의해 암호화된 것, 예를 들어 pCW-Cas9, Addgene #50661, Wang et al. (2014) *Science*, 3:343-80-4; 또는 카탈로그 번호 K002, K003, K005 또는 K006으로 Applied Biological Materials (ABM; Canada)로부터 구매 가능한 뉴클레아제 또는 니카제 렌티바이러스 벡터) 및 표적 유전자 좌(예를 들어, 인간의 *TGFBR2* 유전자 좌)에 특이적인 가이드 RNA가 세포로 도입된다.

[0528]

일부 구현예에서, 제제(들) 및/또는 이의 구성 요소를 함유하는 폴리뉴클레오티드 또는 RNP 복합체가 비-벡터 기반 방법(예를 들어, 있는 그대로의 DNA 또는 DNA 복합체 사용)에 의해 전달된다. 예를 들어, DNA 또는 RNA 또는 단백질 또는 이의 조합물, 예를 들어, 리보핵산단백질(RNP) 복합체가, 예를 들어, 유기적으로 변형된 실리카 또는 규산염(Ormosil), 전기 천공, 일시적인 세포 압축 또는 압착(예컨대, 문헌[Lee, et al. (2012) *Nano Lett* 12: 6322-27, Kollmannsperger et al (2016) *Nat Comm* 7, 10372]에 기재됨), 유전자 총, 소노포레이션(sonoporation), 자성 감염, 지질 매개 형질 감염, 덴드리머(dendrimer), 무기 나노 입자, 인산 칼슘 또는 이의 조합물에 의해 전달될 수 있다.

[0529]

일부 구현예에서, 전기 천공을 통한 전달은 카트리지, 챔버 또는 큐벳에서 Cas9- 및/또는 gRNA- 암호화 DNA 또는 RNP 복합체와 세포를 혼합하고 정의된 지속 시간 및 진폭의 1회 이상의 전기적 자극을 적용하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 전기 천공을 통한 전달은, 카트리지, 챔버 또는 큐벳으로 혼합물을 공급하는 장치(예를 들어, 펌프)에 연결된 용기에서 Cas9- 및/또는 gRNA- 암호화 DNA와 세포가 혼합되는 시스템을 사용하여 수행되며, 여기서 정의된 지속 시간 및 진폭의 1회 이상의 전기적 자극이 적용되고, 이 후 세포가 제2 용기로 전달된다.

[0530]

일부 구현예에서, 전달 비히클은 비-바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 비-바이러스 벡터는 무기 나노입자이다. 예시적인 무기 나노 입자는, 예를 들어, 자성 나노 입자(예를 들어,  $Fe_3MnO_2$ ) 및 실리카를 포함한다. 나노입자의 외부 표면은 페이로드(payload)의 부착(예를 들어, 접합 또는 포집)을 허용하는 양전하 중합체(예를 들어, 폴리에틸렌아민, 폴리에틸렌, 폴리세린)로 접합될 수 있다. 일부 구현예에서, 비-바이러스 벡터는 유기 나노입자

이다. 예시적인 유기 나노입자는, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(polyethylene glycol, PEG)로 코팅된 중성 헬퍼 지질과 함께 양이온 지질을 함유하는 SNALP 리포솜 및 지질로 코팅된 프로타민(protamine)-핵산 복합체를 포함한다. 유전자 전달을 위한 예시적인 지질이 하기 표 6에 도시된다.

표 6

유전자 전달을 위해 사용되는 지질

지질	약어	특징
1,2-디올레오일-sn-글리세롤-3-포스파티딜콜린	DOPC	헬퍼
1,2-디올레오일-sn-글리세롤-3-포스파티딜에탄올아민	DOPE	헬퍼
콜레스테롤		헬퍼
<i>N</i> -[1-(2,3-디올레일옥시)프로필] <i>N,N,N</i> -트리메틸암모늄 클로라이드	DOTMA	양이온
1,2-디올레오일옥시-3-트리메틸암모늄-프로판	DOTAP	양이온
디옥타데실아미도글리실스퍼민	DOGS	양이온
<i>N</i> -(3-아미노프로필)- <i>N,N</i> -디메틸-2,3-비스(도데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드	GAP-DLRIE	양이온
세틸트리메틸암모늄 브로마이드	CTAB	양이온
6-라우록시헥실 오르니티네이트	LHON	양이온
1-(2,3-디올레오일옥시프로필)-2,4,6-트리메틸피리디늄	2Oc	양이온
2,3-디올레일옥시- <i>N</i> -[2(스퍼민카르복사미도-에틸)- <i>N,N</i> -디메틸-1-프로판아미늄 트리플루오로아세테이트	DOSPA	양이온
1,2-디올레일-3-트리메틸암모늄-프로판	DOPA	양이온
<i>N</i> -(2-히드록시에틸)- <i>N,N</i> -디메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드	MDRIE	양이온
디미리스토옥시프로필 디메틸 히드록시에틸 암모늄 브로마이드	DMRI	양이온
3β-[ <i>N,N,N</i> -디메틸아미노에탄]-카르바모일]콜레스테롤	DC-Chol	양이온
비스-구아니듐-트렌-콜레스테롤	BGTC	양이온
1,3-디오디옥시-2-(6-카르복시-스퍼밀)-프로필아미드	DOSPER	양이온
디메틸옥타데실암모늄 브로마이드	DDAB	양이온
디옥타데실아미도글리실스퍼미딘	DSL	양이온

[0531]

지질	약어	특징
rac-[(2,3-디옥타데실옥시프로필)(2-히드록시에틸)-디메틸암모늄 클로라이드	CLIP-1	양이온
Rac-[2(2,3-디헥사데실옥시프로필-옥시메틸옥시)에틸]트리메틸암모늄 브로마이드	CLIP-6	양이온
에틸디미리스토일포스파티딜콜린	EDMPC	양이온
1,2-디스테아릴옥시-N,N-디메틸-3-아미노프로판	DSDMA	양이온
1,2-디미리스토일-트리메틸암모늄 프로판	DMTAP	양이온
O,O'-디미리스틸-N-리실 아스파르테이트	DMKE	양이온
1,2-디스테아로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린	DSEPC	양이온
N-팔미토일 D-에리트로-스핑고실 카르바모일-스퍼민	CCS	양이온
N-t-부틸-N0-테트라데실-3-테트라데실아미노프로피온아미딘	디 C14-아미딘	양이온
옥타데세노일옥시[에틸-2-헵타데세닐-3-히드록시에틸] 이미다졸리늄 클로라이드	DOTIM	양이온
M1-콜레스테릴옥시카르보닐-3,7-디아자노난-1,9-디아민	CDAN	양이온
2-(3-[비스(3-아미노-프로필)-아미노]프로필아미노)-N-디테트라데실카르바모일메-에틸-아세트아미드	RPR209120	양이온
1,2-디리놀레일옥시-3-디메틸아미노프로판	DLinDMA	양이온
2,2-디리놀레일-4-디메틸아미노에틸-[1,3]-디옥솔란	DLin-KC2-DMA	양이온
디리놀레일-메틸-4-디메틸아미노부티레이트	DLin-MC3-DMA	양이온

[0532]

[0533] 유전자 전달을 위한 예시적인 중합체가 하기 표 7에 도시된다.

표 7

유전자 전달을 위해 사용되는 중합체

중합체	약어
폴리(에틸렌)글리콜(Poly(ethylene)glycol)	PEG
폴리에틸렌이미드(Polyethylenimine)	PEI
디티오비스(숙신이미딜프로피오네이트)(Dithiobis(succinimidylpropionate))	DSP
디메틸-3,3'-디티오비스프로피오니미데이트(Dimethyl-3,3'-dithiobispropionimide)	DTBP
폴리(에틸렌이민) 비스카르바메이트(Poly(ethylene imine) biscarbamate)	PEIC
폴리(L-리신)(Poly(L-lysine))	PLL
히스티딘 변형 PLL	
폴리(N-비닐피롤리돈)(Poly(N-vinylpyrrolidone))	PVP
Poly(propylenimine)	PPI
폴리(아미도아민)(Poly(amidoamine))	PAMAM
폴리(아미도 에틸렌이민)(Poly(amido ethylenimine))	SS-PAEI
트리에틸렌테트라아민(Triethylenetetramine)	TETA
폴리(β-아미노에스테르)(Poly(β-aminoester))	
폴리(4-히드록시-L-프롤린 에스테르)(Poly(4-hydroxy-L-proline ester))	PHP
폴리(알릴아민)(Poly(allylamine))	
폴리(α-[4-아미노부틸]-L-글리콜산)(Poly(α-[4-aminobutyl]-L-glycolic acid))	PAGA
폴리(D,L-락틱-코-글리콜산)(Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid))	PLGA
폴리(N-에틸-4-비닐피리디늄 브로마이드)(Poly(N-ethyl-4-vinylpyridinium bromide))	
폴리(포스파젠)(Poly(phosphazene))	PPZ

[0534]

중합체	약어
폴리(포스포에스테르)(Poly(phosphoester))	PPE
폴리(포스포라미데이트)(Poly(phosphoramidate))	PPA
폴리( <i>N</i> -2-히드록시프로필메타크릴아미드)(Poly( <i>N</i> -2-hydroxypropylmethacrylamide))	pHPMA
폴리(2-(디메틸아미노)에틸 메타크릴레이트)(Poly (2-(dimethylamino)ethyl methacrylate))	pDMAEMA
폴리(2-아미노에틸 프로필렌 포스페이트)(Poly(2-aminoethyl propylene phosphate))	PPE-EA
키토산	
갈락토실화 키토산	
<i>N</i> -도다실화 키토산	
히스톤	
콜라겐	
덱스트란-스퍼민(Dextran-spermine)	D-SPM

[0535]

[0536]

일부 구현예에서, 비히클은 나노입자 및 리포솜의 표적 세포 갱신을 증가시키는 표적화 변형, 예를 들어, 세포 특이적 항원, 단클론 항체, 단일 사슬 항체, 압타머, 중합체, 자당 및 세포 침투성 펩티드를 갖는다. 일부 구현예에서, 비히클은 융합생성(fusogenic) 및 엔도솜 불안정화 펩티드/중합체를 사용한다. 일부 구현예에서, 비히클은 (예를 들어, 카고의 엔도솜 탈출을 가속화하도록) 산 유발성 구조적 변화를 겪는다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 세포의 구획 내 방출을 위해 자극 절단 가능 중합체가 사용된다. 예를 들어, 환원성 세포 환경에서 절단되는 이황화물 기반 양이온 중합체를 사용할 수 있다.

[0537]

일부 구현예에서, 전달 비히클은 생물학적 비-바이러스 전달 비히클이다. 일부 구현예에서, 비히클은, (예를 들어, 침투적이나 약화되도록 자연적 또는 인위적으로 조작되어 발병 및 전이 유전자의 발현이 방지된) 약화된 세균(예를 들어, *Listeria monocytogenes*, 특정 *Salmonella* 균주, *Bifidobacterium longum* 및 변형된 *Escherichia coli*), 영양 및 조직 특이적 친화성(tropism)을 가져서 특정 세포를 표적화하는 세균, 변형된 표면 단백질을 가져서 표적 세포 특이성이 변경된 세균이다. 일부 구현예에서, 비히클은 유전자 변형 박테리오파지(예를 들어, 대형 패키징 용량, 보다 작은 면역원성을 갖고, 포유류 플라스미드 보유 서열을 함유하고 통합된 표적화 리간드를 갖는 조작된 파지)이다. 일부 구현예에서, 비히클은 포유류 바이러스 유사 입자이다. 예를 들어, 변형된 바이러스 입자가 (예를 들어, “빈(empty)” 입자의 정제 후 원하는 카고를 갖는 바이러스의 생체 외 조립에 의해) 생성될 수 있다. 비히클은 표적화 리간드를 통합하도록 조작되어 표적 조직 특이성이 또한 변경될 수 있다. 일부 구현예에서, 비히클은 생물학적 리포솜이다. 예를 들어, 생물학적 리포솜은 인간 세포(예를 들어, 대상체로부터 유래된 구형 구조로 파괴된 적혈구인 적혈구 고스트) 유래 인지질계 입자(예를 들어, 조직 표적화는 다양한 조직 또는 세포 특이적 리간드의 부착에 의해 달성될 수 있음) 또는 분비성 엑소솜 - 식균 작용 기원의 대상체 유래 막 결합 나노소포체(30-100 nm)(예를 들어, 다양한 세포 유형으로부터 생성될 수 있고 따라서 표적화 리간드 필요없이 세포에 의해 흡수될 수 있음)이다.

[0538]

일부 구현예에서, Cas9 분자 및/또는 gRNA 분자를 암호화하는 RNA가, 공지된 방법에 의해 또는 여기에 기재된 바와 같이 세포, 예를 들어 여기에 기재된 표적 세포로 전달될 수 있다. 예를 들어, Cas9 암호화 및/또는 gRNA 암호화 RNA가, 예를 들어, 미세 주입법, 전기 천공, 일시적인 세포 압축 또는 압착(예컨대, 문헌[Lee, et al.

(2012) *Nano Lett* 12: 6322-27]에 기재됨), 지질 매개 형질 감염, 펩티드 매개 전달, 예를 들어 세포 투과 펩티드 또는 이의 조합물에 의해 전달될 수 있다.

- [0539] 일부 구현예에서, 전기 천공을 통한 전달은 카트리지, 챔버 또는 큐벳에서 Cas9 분자를 암호화하는 RNA 및/또는 gRNA 분자를 세포와 혼합하고 정의된 지속 기간 및 진폭의 1회 이상의 전기적 자극을 적용하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 전기 천공을 통한 전달은, 카트리지, 챔버 또는 큐벳으로 혼합물을 공급하는 장치(예를 들어, 펌프)에 연결된 용기에서 Cas9 분자를 암호화하는 RNA 및/또는 gRNA 분자가 세포와 혼합되는 시스템을 이용하여 수행되며, 여기서 정의된 지속 기간 및 진폭의 1회 이상의 전기적 자극이 적용되고, 이 후 세포는 제2 용기로 전달된다.
- [0540] 일부 구현예에서, Cas9 분자는 공지된 방법에 의해 또는 여기에 기재된 바와 같이 세포로 전달될 수 있다. 예를 들어, Cas9 단백질 분자는, 예를 들어, 미세 주입법, 전기 천공, 일시적인 세포 압축 또는 압착(예컨대, 문헌 [Lee, et al. (2012) *Nano Lett* 12: 6322-27]에 기재됨), 지질 매개 형질 감염, 펩티드 매개 전달 또는 이의 조합물에 의해 전달될 수 있다. 전달은 gRNA를 암호화하는 DNA 또는 gRNA를 동반할 수 있다.
- [0541] 일부 구현예에서, 절단을 도입할 수 있는 하나 이상의 제제(들), 예를 들어 Cas9/gRNA 시스템이 리보핵산단백질(RNP) 복합체로 세포 내에 도입된다. RNP 복합체는 RNA 또는 gRNA 분자와 같은 리보뉴클레오티드의 서열 및 Cas9 단백질 또는 이의 변이체와 같은 단백질을 포함한다. 예를 들어, Cas9 단백질은 표적 서열을 표적화하는 Cas9 단백질 및 gRNA 분자를 포함하는 RNP 복합체로서 예를 들어, 전기천공 또는 기타 물리적 전달 방법을 이용하여 전달된다. 일부 구현예에서, RNP는 전기 천공 또는 기타 물리적 수단, 예를 들어 입자 총, 인산 칼슘 형질 감염, 세포 압축 또는 압착을 통해 세포로 전달된다.
- [0542] 일부 구현예에서, 전기 천공을 통한 전달은, 카트리지, 챔버 또는 큐벳에서 gRNA 분자를 갖는 Cas9 분자 또는 gRNA 분자를 갖지 않는 Cas9 분자와 세포를 혼합하는 단계 및 정의된 지속 기간 및 진폭의 1회 이상의 전기적 자극을 적용하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 전기 천공을 통한 전달은, 카트리지, 챔버 또는 큐벳으로 혼합물을 공급하는 장치(예를 들어, 펌프)에 연결된 용기에서 gRNA 분자를 갖는 Cas9 분자 또는 gRNA 분자를 갖지 않는 Cas9 분자와 세포가 혼합되는 시스템을 사용하여 수행되며, 여기서 정의된 지속 기간 및 진폭의 1회 이상의 전기적 자극이 적용되고, 이 후 세포는 제2 용기로 전달된다.
- [0543] 일부 구현예에서, 전기 천공을 통한 전달은, 카트리지, 챔버 또는 큐벳에서 gRNA 분자를 갖거나 또는 갖지 않는 Cas9 분자(예를 들어, eaCas9 분자, eiCas9 분자 또는 eiCas9 융합 단백질)와 세포를 혼합하는 단계 및 정의된 지속 기간 및 진폭의 1회 이상의 전기적 자극을 적용하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 전기 천공을 통한 전달은 Cas9 분자(예를 들어, eaCas9 분자, eiCas9 분자 또는 eiCas9 융합 단백질)와 세포가 혼합되는 시스템을 사용하여 수행된다.
- [0544] 일부 구현예에서, 제제(들) 및/또는 이의 구성 요소를 함유하는 폴리뉴클레오티드가 벡터 및 비-벡터 기반 방법의 조합에 의해 전달된다. 예를 들어, 비로솜(virosome)은 비활성화 바이러스(예를 들어, HIV 또는 인플루엔자 바이러스)와 조합된 리포솜을 포함하며, 이는 바이러스 방법 또는 리포솜 방법 중 어느 하나 단독보다 더 효율적인 유전자 전달을 초래할 수 있다.
- [0545] 일부 구현예에서, 하나 이상의 이의 제제(들) 및/또는 이의 구성 요소가 세포로 전달된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 게놈 내 2 개 이상의 위치, 예컨대 (TGFBR1를 암호화하는) *TGFBR2* 유전자 좌 내 2 개 이상의 부위에서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제(들)이 세포로 전달된다. 일부 구현예에서, 제제(들) 및 이의 구성 요소가 1 가지 방법을 사용하여 전달된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, *TGFBR2* 유전자 좌의 유전자 파괴를 유도하는 제제(들)가 유전자 파괴를 위한 구성 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드로서 전달된다. 일부 구현예에서, 하나의 폴리뉴클레오티드가 *TGFBR2* 유전자 좌를 표적화하는 제제를 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 2 개 이상의 상이한 폴리뉴클레오티드가 *TGFBR2* 유전자 좌를 표적화하는 제제를 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제가 리보핵산단백질(RNP) 복합체로 전달될 수 있고, 2 개 이상의 상이한 RNP 복합체가 혼합물로서 함께 또는 별도로 전달될 수 있다.
- [0546] 일부 구현예에서, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들) 및/또는 이의 구성 요소, 예를 들어 Cas9 분자 구성 요소 및/또는 gRNA 분자 구성 요소가 아닌 하나 이상의 핵산 분자, 예컨대 HDR-지시 통합을 위한 주형 폴리뉴클레오티드(예컨대 여기, 예를 들어, 섹션 I.B에 기재된 임의의 주형 폴리뉴클레오티드)가 전달된다. 일부 구현예에서, 핵산 분자, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드가 Cas 시스템의 구성 요소 중 하나 이상과 동시에 전달된다. 일부 구현예에서, Cas 시스템의 구성 요소 중 하나 이상이 전달되기 전 또는 후(예를

들어, 약 1 분, 5 분, 10 분, 15 분, 30 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 6 시간, 9 시간, 12 시간, 1 일, 2 일, 3 일, 1 주, 2 주 또는 4 주 미만)에 핵산 분자가 전달된다. 일부 구현예에서, 핵산 분자, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드가, Cas 시스템의 구성 요소, 예를 들어 Cas9 분자 구성 요소 및/또는 gRNA 분자 구성 요소 중 하나 이상과 상이한 방법에 의해 전달된다. 핵산 분자, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드가 여기에 기재된 임의의 전달 방법에 의해 전달될 수 있다. 예를 들어, 핵산 분자, 예를 들어, 주형 폴리뉴클레오티드가 바이러스 벡터, 예를 들어 레트로바이러스 또는 렌티바이러스에 의해 전달될 수 있고, Cas9 분자 구성 요소 및/또는 gRNA 분자 구성 요소는 전기 친공에 의해 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 외인성 서열, 예를 들어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 서열 및/또는 기타 외인성 유전자 핵산 서열을 포함한다.

**[0547] B. 상동성 지시 수선(Homology-directed Repair, HDR)을 통한 표적화된 통합**

**[0548]** 일부 측면에서, 제공된 구현예는, 게놈 내 특정 위치(예컨대 표적 부위 또는 표적 위치)에서 *TGFBR2*를 암호화하는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 함유하는 주형 폴리뉴클레오티드의 일부와 같은 폴리뉴클레오티드의 특정 부분의 표적화된 통합을 수반한다. 일부 측면에서, 상동성 지시 수선(HDR)이 표적 부위에서 전이 유전자 서열의 부위 특이적 통합을 매개할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴(예를 들어, 섹션 I.A에 기재된 바와 같은 DNA 파손) 및 (예를 들어, 유전자 파괴 주변 서열에 상동성인 핵산 서열을 함유하는) 하나 이상의 상동성 암을 함유하는 주형 폴리뉴클레오티드의 존재가, HDR을 유도 또는 지시할 수 있고, 상동성 서열이 DNA 수선을 위한 주형으로 작용한다. 유전자 파괴를 둘러싼 내인성 유전자 서열과 주형 폴리뉴클레오티드에 포함된 5' 및/또는 3' 상동성 암 사이의 상동성에 근거하여, 세포의 DNA 수선 기구가 주형 폴리뉴클레오티드를 사용하여 DNA 손상을 수선하고 유전자 파괴의 부위에서 유전 정보를 재합성(예를 들어, 카피)할 수 있어서, 유전자 파괴 부위 또는 근처에서 주형 폴리뉴클레오티드 내 전이 유전자 서열을 효과적으로 삽입하거나 통합할 수 있다. 일부 구현예에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서의 유전자 파괴가, 여기, 예를 들어 섹션 I.A에 기재된 표적화된 유전자 파괴를 생성하기 위한 임의의 방법에 의해 생성될 수 있다.

**[0549]** 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 여기에 기재된 주형 폴리뉴클레오티드 및 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 키트가 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 제공된 폴리뉴클레오티드 및/또는 키트가 예를 들어, HDR을 수반하는 여기 기재된 방법에 이용되어 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 표적화할 수 있다.

**[0550]** 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, 재조합 수용체 또는 이의 일부(예를 들어, 재조합 수용체의 하나 이상의 영역(들) 또는 도메인(들))를 암호화하는 전이 유전자, 예컨대 외인성 또는 이중 핵산 서열 및 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 내인성 게놈 부위 또는 근처 서열에 상동성인 상동성 서열(예를 들어, 상동성 암)을 함유하는 폴리뉴클레오티드이거나 이를 포함한다. 일부 측면에서, 주형 폴리뉴클레오티드 내 전이 유전자 서열은 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열의 표적화된 통합 시, 조작된 세포 내 *TGFBR2* 유전자 좌가 변형되어 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 전이 유전자 서열을 함유한다. 일부 측면에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 *TGFBR2* 폴리펩티드의 우성 음성 형태 및 재조합 수용체, 예를 들어, CAR을 암호화한다.

**[0551]** 일부 측면에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 선형 DNA 단편으로 도입되거나 벡터 내에 포함된다. 일부 측면에서, (예를 들어, 주형 폴리뉴클레오티드의 도입에 의해) 유전자 파괴를 유도하기 위한 단계 및 표적화된 통합을 위한 단계가 동시에 또는 순차적으로 수행된다.

**[0552] 1. 상동성 지시 수선(Homology-directed Repair, HDR)**

**[0553]** 일부 구현예에서, 상동성 지시 수선(HDR)이, 게놈 내 하나 이상의 표적 부위(들)에서 *TGFBR2* 유전자 좌에서 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 하나 이상의 핵산 서열, 예를 들어 전이 유전자 서열의 표적화된 통합 또는 삽입을 위해 이용될 수 있다. 일부 구현예에서, 뉴클레아제-유도 HDR을 사용하여 표적 서열 변경, 특정 표적 위치에 전이 유전자 서열의 통합 및/또는 특정 표적 유전자 내 돌연변이를 편집하거나 또는 수선할 수 있다.

**[0554]** 표적 부위에서 핵산 서열의 변경이, 외인성으로 제공된 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드(“도너 폴리뉴클레오티드(donor polynucleotide)” 또는 “주형 서열(template sequence)”로도 지칭됨)로 HDR에 의해 발생할 수 있다. 예를 들어, 주형 폴리뉴클레오티드가 주형 폴리뉴클레오티드 내에 함유된 전이 유전자 서

열의 삽입과 같은 표적 서열의 변경을 제공한다. 일부 구현예에서, 플라스미드 또는 벡터가 상동성 재조합을 위한 주형으로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 선형 DNA 단편이 상동성 재조합을 위한 주형으로 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 단일 가닥 주형 폴리뉴클레오티드가 표적 서열과 주형 폴리뉴클레오티드 사이의 상동성 지시 수선의 대안적인 방법(예를 들어, 단일 가닥 어닐링)에 의해 표적 서열의 변경을 위한 주형으로 사용될 수 있다. 표적 서열의 주형 폴리뉴클레오티드로 달성된 변경은 뉴클레아제, 예를 들어 CRISPR/Cas9와 같은 표적화된 뉴클레아제에 의한 절단에 좌우된다. 뉴클레아제에 의한 절단은 이중 가닥 파손 또는 2 개의 단일 가닥 파손을 포함할 수 있다.

[0555] 일부 구현예에서, "재조합(recombination)"은 2 개의 폴리뉴클레오티드 사이의 유전 정보 교환 프로세스를 포함한다. 일부 구현예에서, "상동성 재조합(homologous recombination, HR)"은, 예를 들어, 상동성-지시 수선 메카니즘을 통해 세포 내 이중 가닥 파손의 수선 중 발생하는 상기 교환 중 특정 형태를 포함한다. 상기 프로세스는 뉴클레오티드 서열 상동성을 필요로 하고, 표적 DNA(즉, 내인성 유전자 내 표적 부위와 같이 이중 가닥 파손을 경험한 DNA)의 수선을 주형화하기 위한 주형 폴리뉴클레오티드를 사용하며, 주형 폴리뉴클레오티드에서 표적으로 유전 정보의 전달을 초래하기 때문에 "비-교차 유전자 전환(non-crossover gene conversion)" 또는 "짧은 트랙 유전자 전환(short tract gene conversion)"으로 다양하게 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 상기 전달은 파손된 표적과 주형 폴리뉴클레오티드 사이에 형성되는 이중 이중체 DNA의 미스매치 교정 및/또는 주형 폴리뉴클레오티드가 사용되어 표적 및/또는 관련 프로세스의 일부가 될 유전 정보를 재합성하는 "합성 의존적 가닥 어닐링(synthesis-dependent strand annealing)"을 수반할 수 있다. 상기 특수화된 HR은 종종 표적 분자 서열의 변경을 초래하여 주형 폴리뉴클레오티드 서열의 일부 또는 전부가 표적 폴리뉴클레오티드 내로 통합된다.

[0556] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예컨대 주형 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 전이 유전자를 함유하는 폴리뉴클레오티드의 일부가, 상동성 독립적 메카니즘을 통해 세포의 게놈 내로 통합된다. 방법은 세포의 게놈 내 이중 가닥 파손(double-stranded break, DSB)을 형성하는 단계 및 뉴클레아제를 사용하여 주형 폴리뉴클레오티드 분자를 절단하는 단계를 포함하여, 상기 주형 폴리뉴클레오티드가 DSB 부위에서 통합된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 비-상동성 의존적 방법(예를 들어, NHEJ)을 통해 통합된다. 생체 내 절단시, 주형 폴리뉴클레오티드가 표적화된 방식으로 DSB 위치에서 세포의 게놈 내로 통합될 수 있다. 주형 폴리뉴클레오티드는 DSB를 생성하는 데 사용되는 하나 이상의 뉴클레아제에 대해 하나 이상의 동일한 표적 부위를 포함할 수 있다. 따라서, 주형 폴리뉴클레오티드가 통합이 요청되는 내인성 유전자를 절단하는 데 사용되는 하나 이상의 동일한 뉴클레아제에 의해 절단될 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 DSB를 유도하는 데 사용된 뉴클레아제와 상이한 뉴클레아제 표적 부위를 포함한다. 여기에 기재된 바와 같이, 표적 부위 또는 표적 위치의 유전자 파괴가, ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 시스템 또는 TtAgo 뉴클레아제와 같은 임의의 공지된 방법 또는 여기 기재된 임의의 방법에 의해 형성될 수 있다.

[0557] 일부 구현예에서, DNA 수선 메카니즘이, (1) 단일 이중 가닥 파손, (2) 2 개의 단일 가닥 파손, (3) 표적 부위 양쪽에서 발생한 파손이 있는 2 개의 이중 가닥 파손, (4) 1 개의 이중 가닥 파손 및 이중 가닥 파손이 있는 2 개의 단일 가닥 파손 및 표적 부위 양쪽에 발생한 2 개의 단일 가닥 파손, (5) 표적 부위 양쪽에 발생한 한 쌍의 단일 가닥 파손이 있는 4 개의 단일 가닥 파손 또는 (6) 1 개의 단일 가닥 파손 후에 뉴클레아제에 의해 유도될 수 있다. 일부 구현예에서, 단일 가닥 주형 폴리뉴클레오티드가 사용되며, 표적 부위는 대안적인 HDR에 의해 변경될 수 있다.

[0558] 표적 부위의 주형 폴리뉴클레오티드로 달성된 변경은 뉴클레아제 분자에 의한 절단에 좌우된다. 뉴클레아제에 의한 절단은, 이중 가닥 파손 또는 2 개의 단일 가닥 파손, 예를 들어 표적 부위에서 각각의 DNA 가닥 상에 하나를 포함할 수 있다. 표적 부위 상에 파손이 도입된 후, 파손 말단에서 절제가 발생하여 단일 가닥의 돌출된 DNA 영역을 초래한다.

[0559] 정규 HDR에서, 표적 부위에 직접 통합되거나 전이 유전자를 삽입하거나 표적 부위의 서열을 수정하기 위한 주형으로 사용될 표적 부위에 대해 상동성 서열을 포함하는 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드가 도입된다. 파손에서 절제 후, 상이한 경로, 예를 들어, 이중 홀리데이 접점 모델(또는 이중 가닥 파손 수선, DSB, 경로) 또는 합성 의존적 가닥 어닐링(synthesis-dependent strand annealing, SDSA) 경로에 의해 수선이 진행될 수 있다.

[0560] 이중 홀리데이 접점 모델에서, 주형 폴리뉴클레오티드 내 상동성 서열에 대해 표적 부위의 2 개의 단일 가닥 오버행에 의한 가닥 침입이 발생하여, 2 개의 홀리데이 접합을 갖는 중간체 형성을 초래한다. 새로운 DNA가 침입 가닥의 말단에서 합성되면서 접점이 이동하여 절제에서 발생하는 갭을 채운다. 새로 합성된 DNA의 말단이 절제된 말단에 결합되고, 접점이 풀어져, 표적 부위에서의 삽입, 예를 들어, 주형 폴리뉴클레오티드 내 전이 유전자

의 삽입을 초래한다. 주형 폴리뉴클레오티드와의 교차가 접점이 풀어질 때 발생할 수 있다.

- [0561] SDSA 경로에서, 하나의 단일 가닥 오버행만이 주형 폴리뉴클레오티드를 침입하고 새로운 DNA가 침입 가닥의 말단에서 합성되어 절제에서 발생한 갭을 채운다. 이어서 새로 합성된 DNA가 남은 단일 가닥 오버행에 어닐링하고, 새로운 DNA가 합성되어 갭을 채우고, 가닥들이 결합되어 변형된 DNA 이중 영역을 생성한다.
- [0562] 대안적인 HDR에서, 단일 가닥 주형 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드가 도입된다. 원하는 표적 부위를 변경하기 위한 표적 부위의 Nick, 단일 가닥 파손 또는 이중 가닥 파손이 뉴클레아제 분자에 의해 매개되고, 파손에서 절제가 발생하여 단일 가닥 오버행을 드러낸다. DNA의 표적 부위를 수정 또는 변경하기 위한 주형 폴리뉴클레오티드 서열의 통합이 여기에 기재된 바와 같은 SDSA 경로에 의해 전형적으로 발생한다.
- [0563] 일부 구현예에서, "대안적인 HDR(alternative HDR)" 또는 대안적인 상동성 지시 수선은, 상동성 핵산(예를 들어, 내인성 상동성 서열, 예를 들어, 자매 크로마티드 또는 외인성 핵산, 예를 들어, 주형 폴리뉴클레오티드)을 사용하여 DNA 손상을 수선하는 프로세스를 지칭한다. 대안적인 HDR은, 프로세스가 정규 HDR과 상이한 경로를 이용하며, 정규 HDR 매개자, RAD51 및 BRCA2에 의해 억제될 수 있다는 점에서 정규 HDR과 구별된다. 또한 대안적인 HDR은 파손의 수선을 위해 단일 가닥 또는 Nick 상동성 핵산을 사용한다. 일부 구현예에서, "정규 HDR(canonical HDR)" 또는 정규 상동성 지시 수선은 상동성 핵산(예를 들어, 내인성 상동성 서열, 예를 들어, 자매 크로마티드 또는 외인성 핵산, 예를 들어, 주형 핵산)을 사용하여 DNA 손상을 수선하는 프로세스를 지칭한다. 정규 HDR은 이중 가닥 파손에 유의미한 절제가 존재할 경우 전형적으로 작용하여, 하나 이상의 단일 가닥 DNA 부분을 형성한다. 정상 세포에서, HDR은 전형적으로 파손의 인식, 파손의 안정화, 절제, 단일 가닥 DNA의 안정화, DNA 교차 중간체의 형성, 교차 중간체의 풀어짐 및 결합과 같은 일련의 단계를 수반한다. 프로세스는 RAD51 및 BRCA2를 필요로 하며, 상동성 핵산은 전형적으로 이중 가닥이다. 달리 명시하지 않는 한, 일부 구현예에서 "HDR" 용어는 정규 HDR 및 대안적인 HDR을 포괄한다.
- [0564] 일부 구현예에서, 이중 가닥 절단이 뉴클레아제, 예를 들어, HNH 유사 도메인과 관련된 절단 활성 및 RuvC 유사 도메인, 예를 들어 N-말단 RuvC 유사 도메인과 관련된 절단 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, 야생형 Cas9에 의해 달성된다. 상기 구현예는 단일 gRNA만을 필요로 한다.
- [0565] 일부 구현예에서, 하나의 단일 가닥 파손 또는 Nick은 Nick아제 활성을 갖는 뉴클레아제 분자, 예를 들어, Cas9 Nick아제에 의해 달성된다. 표적 부위에서 Nick된 DNA는 대안적인 HDR을 위한 기질이 될 수 있다.
- [0566] 일부 구현예에서, 2 개의 단일 가닥 파손 또는 Nick이, 뉴클레아제, 예를 들어, Nick아제 활성, 예를 들어 HNH 유사 도메인과 관련된 절단 활성 또는 N-말단 RuvC 유사 도메인과 관련된 절단 활성을 갖는 Cas9 분자에 의해 달성된다. 상기 구현예는 일반적으로 각각의 단일 가닥 파손의 배치를 위해 하나씩, 2 개의 gRNA를 필요로 한다. 일부 구현예에서, Nick아제 활성을 갖는 Cas9 분자가, gRNA가 혼성화한 가닥을 절단하나 gRNA가 혼성화한 가닥에 대해 상보성인 가닥은 절단하지 않는다. 일부 구현예에서, Nick아제 활성을 갖는 Cas9 분자가, gRNA가 혼성화한 가닥을 절단하지 않고, 그보다 상기 gRNA가 혼성화한 가닥에 대해 상보성인 가닥을 절단한다. 일부 구현예에서, Nick아제는 HNH 활성, 예를 들어, 비활성화된 RuvC 활성을 갖는 Cas9 분자, 예를 들어, D10에서의 돌연변이, 예를 들어, D10A 돌연변이를 갖는 Cas9 분자를 갖는다. D10A가 RuvC를 비활성화시키고; 따라서, Cas9 Nick아제는 HNH 활성(만)을 가지며, gRNA가 혼성화하는 가닥(예를 들어, 가닥 상에 NGG PAM을 갖지 않는 상보성 가닥)을 절단할 것이다. 일부 구현예에서, H840, 예를 들어, H840A 돌연변이를 갖는 Cas9 분자가 Nick아제로 사용될 수 있다. H840A가 HNH를 비활성화시키고; 따라서, Cas9 Nick아제는 RuvC 활성(만)을 가지며, 비상보성 가닥(예를 들어, NGG PAM을 갖고 이의 서열이 gRNA와 동일한 가닥)을 절단한다. 일부 구현예에서, Cas9 분자는 N-말단 RuvC 유사 도메인 Nick아제이며, 예를 들어, Cas9 분자는 N863, 예를 들어, N863A에서 돌연변이를 포함한다.
- [0567] 일부 구현예에서, Nick아제 및 2 개의 gRNA가 사용되어 2 개의 단일 가닥 Nick을 배치하며, 하나의 Nick은 표적 DNA의 + 가닥 상에 있고, 하나의 Nick은 표적 DNA의 - 가닥 상에 있다. PAM은 바깥쪽으로 향하고 있다. gRNA는, 상기 gRNA가 약 0-50, 0-100 또는 0-200 개의 뉴클레오티드만큼 분리되도록 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 2 개의 gRNA의 표적화 도메인에 상보성인 표적 서열 사이에 중복이 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, gRNA는 중복되지 않고, 50, 100 또는 200 개의 뉴클레오티드만큼 분리된다. 일부 구현예에서, 2 개의 gRNA의 사용은, 예를 들어, 표적 외 결합을 감소시킴으로써 특이성을 증가시킬 수 있다(Ran et al., Cell 2013).
- [0568] 일부 구현예에서, 단일 Nick이 사용되어 HDR, 예를 들어 대안적인 HDR을 유도할 수 있다. 단일 Nick이 사용되어 주어진 절단 부위, 예컨대 표적 부위에서 NHEJ에 대한 HR의 비율을 증가시킬 수 있음이 여기에서 고려된다. 일부 구현예에서, 단일 가닥 파손이 상기 gRNA의 표적화 도메인이 상보성인 표적 부위의 DNA 가닥 내에 형성된다. 일

부 구현예에서, 단일 가닥 파손이, 상기 gRNA의 표적화 도메인이 상보성인 가닥이 아닌 표적 부위의 DNA 가닥 내에 형성된다.

[0569] 일부 구현예에서, 단일 가닥 어닐링(ingle strand annealing, SSA), 단일 가닥 파손 수선(single-stranded break repair, SSB), 미스매치 수선(mismatch repair, MMR), 염기 절제 수선(base excision repair, BER), 뉴클레오티드 절제 수선(nucleotide excision repair, NER), 가닥간 교차 연결(interstrand cross-link, ICL), 손상 통과 합성(translesion synthesis, TLS), 무오류 복제 후 수선(post replication repair, PRR)과 같은 기타 DNA 수선 경로가 세포에 의해 이용되어 뉴클레아제에 의해 형성된 이중 가닥 또는 단일 가닥 파손을 수선할 수 있다.

[0570] 표적화된 통합이 게놈 내 *TGFBR2* 유전자 좌 내로 통합된 전이 유전자, 예를 들어 상동성 암 사이 서열을 초래한다. 전이 유전자는 하나 이상의 표적 부위(들) 또는 게놈 내 부위 중 하나 또는 근처 어디에든 통합될 수 있다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는 하나 이상의 표적 부위(들) 중 하나 또는 근처, 예를 들어, 절단 부위의 상류 또는 하류에서 300, 250, 200, 150, 100, 50, 10, 5, 4, 3, 2, 1 이하의 염기쌍 이내, 예컨대 표적 부위 양쪽의 100, 50, 10, 5, 4, 3, 2, 1 염기쌍 이내, 예컨대 표적 부위 양쪽의 50, 10, 5, 4, 3, 2, 1 염기쌍 이내에서 통합된다. 일부 구현예에서, 전이 유전자를 포함하는 통합 서열은 임의의 벡터 서열(예를 들어, 바이러스 벡터 서열)을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 통합 서열은 벡터 서열(예를 들어, 바이러스 벡터 서열)의 일부를 포함한다.

[0571] 전이 유전자의 삽입 또는 돌연변이의 수정 발생하는 것과 같이 원하는 영역에서 변경이 생성되도록 가닥들 중 하나에서 이중 가닥 파손 또는 단일 가닥 파손(예컨대 표적 부위)이 표적 통합 부위, 예를 들어 표적화된 통합을 위한 부위에 충분히 가까이 있어야 한다. 일부 구현예에서, 거리가 10, 25, 50, 100, 200, 300, 350, 400 또는 500 개의 뉴클레오티드 이내이다. 일부 구현예에서, 파손이 말단 절제 중에 엑소뉴클레아제 매개 제거되는 영역 내에 있도록 파손이 표적 통합 부위에 충분히 가까이 있어야 할 것으로 여겨진다. 일부 구현예에서, 표적화 도메인은, 절단 이벤트, 예를 들어, 이중 가닥 또는 단일 가닥 파손이 변경될, 예를 들어 표적화된 삽입을 위한 부위가 될 바람직한 영역의 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 350, 400 또는 500 개의 뉴클레오티드 내에 위치하도록 구성된다. 파손, 예를 들어, 이중 가닥 또는 단일 가닥 파손은, 변경될, 예를 들어 표적화된 삽입을 위한 부위가 될 바람직한 영역의 상류 또는 하류에 위치할 수 있다. 일부 구현예에서, 변경될 바람직한 영역 내, 예를 들어 2 개 이상의 돌연변이 뉴클레오티드에 의해 정의된 영역 내에 파손이 위치한다. 일부 구현예에서, 변경될 바람직한 영역에 바로 인접한, 예를 들어 표적 통합 부위의 바로 상류 또는 하류에 파손이 위치한다.

[0572] 일부 구현예에서, 단일 가닥 파손이 제2 gRNA 분자에 의해 위치된 추가 단일 가닥 파손에 동반된다. 예를 들어, 표적화 도메인은, 절단 이벤트, 예를 들어, 2 개의 단일 가닥 파손이 표적 통합 부위의 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 300, 350, 400 또는 500 개의 뉴클레오티드 내에 위치하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 gRNA 분자가, Cas9 니카제를 가이드할 경우, 단일 가닥 파손이 서로 충분히 가깝고, 제2 gRNA에 의해 위치된 추가 단일 가닥 파손이 동반되어 원하는 영역의 변경을 초래하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 gRNA 분자가, 예를 들어, Cas9가 니카제인 경우, 상기 제2 gRNA에 의해 위치된 단일 가닥 파손이 상기 제1 gRNA 분자에 의해 위치된 파손의 10, 20, 30, 40 또는 50 개 뉴클레오티드 내에 존재하도록 구성된다. 일부 구현예에서, 2 개의 gRNA 분자가, 예를 들어, 본질적으로 이중 가닥 파손을 모방한, 상이한 가닥 상에 동일한 위치 또는 서로 몇 개의 뉴클레오티드 이내에 절단이 위치하도록 구성된다.

[0573] 일부 구현예에서, gRNA(단분자(또는 키메라) 또는 모듈식 gRNA) 및 Cas9 뉴클레아제가 HDR 매개 전이 유전자의 삽입 또는 수정을 유도하기 위한 목적으로 이중 가닥 파손을 유도하며, 절단 부위, 예컨대 표적 부위가 표적 통합 부위로부터 0-200 bp(예를 들어, 0 내지 175, 0 내지 150, 0 내지 125, 0 내지 100, 0 내지 75, 0 내지 50, 0 내지 25, 25 내지 200, 25 내지 175, 25 내지 150, 25 내지 125, 25 내지 100, 25 내지 75, 25 내지 50, 50 내지 200, 50 내지 175, 50 내지 150, 50 내지 125, 50 내지 100, 50 내지 75, 75 내지 200, 75 내지 175, 75 내지 150, 75 내지 125, 75 내지 100 bp) 떨어져 있다. 일부 구현예에서, 절단 부위, 예컨대 표적 부위가 표적화된 통합을 위한 부위로부터 0 내지 100 bp(예를 들어, 0 내지 75, 0 내지 50, 0 내지 25, 25 내지 100, 25 내지 75, 25 내지 50, 50 내지 100, 50 내지 75 또는 75 내지 100 bp) 떨어져 있다.

[0574] 일부 구현예에서, 오버행을 갖는 파손을 생성하기 위해 니카제를 사용함으로써 HDR을 촉진할 수 있다. 일부 구현예에서, 오버행의 단일 가닥 성질이 예를 들어 NHEJ와는 반대로 세포가 HDR에 의한 파손을 수선할 가능성을

향상시킬 수 있다.

[0575] 일부 구현예에서, 특이적으로, HDR은 제1 표적 부위에 대해 제1 니카제를 표적화하는 제1 gRNA 및 제1 표적 부위로부터 반대 DNA 가닥 상에 있고 제1 니카제를 상쇄하는, 제2 표적 부위에 대해 제2 니카제를 표적화하는 제2 gRNA를 선택함으로써 촉진된다. 일부 구현예에서, gRNA 분자의 표적화 도메인이 절단 이벤트가 미리 선택된 뉴클레오티드, 예를 들어, 코딩 영역의 뉴클레오티드로부터 충분히 멀리 떨어져 위치하도록 구성되어 뉴클레오티드가 변경되지 않는다. 일부 구현예에서, gRNA 분자의 표적화 도메인이 인트론의 절단 이벤트가 인트론/엑손 경계 또는 자연 발생 스플라이스 신호로부터 충분히 멀리 떨어져 위치하도록 구성되어 엑손 서열의 변경 또는 원하지 않는 스플라이스 이벤트를 피한다. 일부 구현예에서, gRNA 분자의 표적화 도메인이 초기 엑손에 위치하도록 구성되어 하나 이상의 표적 부위(들) 중 하나 또는 근처에서 전이 유전자의 인-프레임 통합을 허용한다.

[0576] 일부 구현예에서, 이중 가닥 파손이 제2 gRNA 분자에 의해 위치된, 추가 이중 가닥 파손에 동반될 수 있다. 일부 구현예에서, 이중 가닥 파손이 제2 gRNA 분자 및 제3 gRNA 분자에 의해 위치된, 2 개의 추가 단일 가닥 파손에 동반될 수 있다. 일부 구현예에서, 2 개의 gRNA, 예를 들어, 독립적으로, 단분자(또는 키메라) 또는 모듈식 gRNA가, 표적 통합 부위, 예를 들어 표적화된 통합을 위한 부위의 양쪽 모두에 이중 가닥 파손이 위치하도록 구성된다.

[0577] **2. 주형 폴리뉴클레오티드**

[0578] 일부 구현예에서, 재조합 수용체, 키메라 수용체 또는 이의 일부 중 하나 이상의 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 주형 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 외인성 또는 이중 핵산 서열과 같은 전이 유전자를 함유하는 폴리뉴클레오티드 및 표적화된 통합을 위한 내인성 게놈 부위 또는 근처의 서열에 상동성인 상동성 서열(예를 들어, 상동성 암)은, 수선 주형으로 상동성 재조합과 같은 세포의 DNA 수선 프로세스에 수반되는 분자 및 기구를 이용할 수 있다. 일부 측면에서, 내인성 DNA 내 하나 이상의 표적 부위(들) 또는 근처의 서열과 상동성을 갖는 주형 폴리뉴클레오티드를 사용하여 전이 유전자, 이중 또는 외인성 서열, 예를 들어 재조합 수용체 또는 이의 일부의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 외인성 핵산 서열의 표적화된 삽입을 위한 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에 있는 표적 부위와 같은 표적 DNA의 구조를 변경할 수 있다. 예를 들어, 전이 유전자 서열의 상동성 지시 수선(HDR) 매개 표적화된 통합을 위한 주형으로 여기에 제공된 방법에 사용하기 위한 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드가 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 재조합 수용체 또는 이의 일부의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 전이 유전자와 같은 핵산 서열; 및 상기 핵산 서열에 연결된 하나 이상의 상동성 암(들);을 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 상동성 암(들)은 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 영역(들)에 대한 상동 서열을 포함한다.

[0579] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, 재조합 수용체 또는 이의 일부의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 전이 유전자(외인성 또는 이중 핵산 서열) 측면이 있고/거나 이에 연결된 하나 이상의 상동성 서열(예를 들어, 상동성 암)을 함유한다. 일부 구현예에서, 상동성 서열이 사용되어 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 외인성 서열을 표적화한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, 세포의 게놈 내로 삽입 또는 통합을 위해 상동성 암 사이에 전이 유전자와 같은 핵산 서열을 포함한다. 주형 폴리뉴클레오티드 내 전이 유전자는 프로모터 또는 다른 조절 요소가 있거나 없는 기능성 폴리펩티드(예를 들어, cDNA)를 암호화하는 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다.

[0580] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 부위의 구조를 변경시키기 위해 유전자 파괴를 도입할 수 있는 하나 이상의 제제(들)와 함께 사용될 수 있는 핵산 서열이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 상동성 지시 수선 이벤트에 의해, 예를 들어, 전이 유전자의 삽입으로 표적 부위의 구조를 변경한다.

[0581] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 표적 부위의 서열을 변경하며, 예를 들어 세포의 게놈 내로 상동성 암 사이에서 전이 유전자 서열의 삽입 또는 통합을 초래한다. 일부 측면에서, 표적화된 통합이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 엑손을 갖는 전이 유전자 서열의 코딩 부분의 인-프레임 통합, 예를 들어 통합 부위에서 인접한 엑손과의 인-프레임을 초래한다. 예를 들어, 일부 경우에, 인-프레임 통합은 선택적으로 2A 요소와 같은 다중 시스טר론 요소에 의해 분리된 발현될 재조합 수용체 또는 이의 일부 및 내인성 개방형 판독 프레임의 일부를 초래한다. 따라서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 TGFBR1의 일부 및 재조합 수용체 또는 이의 일부를 함유하는 폴리펩티드를 발현할 수 있고, 이는 다중 시스טר론 요소에 의해 2 개의 상이한 폴리펩티드로 분리될 수 있다.

[0582] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 유전자 파괴를 도입할 수 있는 하나 이상의 제제(들)에

의해 절단되는 표적 서열 상의 부위에 대응하거나 이에 상동성인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, 유전자 파괴를 도입할 수 있는 제1 제제로 절단되는 표적 서열 상의 제1 부위 및 유전자 파괴를 도입할 수 있는 제2 제제로 절단되는 표적 서열 상의 제2 부위 둘 다에 대응하거나 이에 상동성인 서열을 포함한다.

[0583] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, [5' 상동성 암]-[전이 유전자 서열(예를 들어, 재조합 수용체 또는 이의 일부의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 외인성 또는 이중 핵산 서열)]-[3' 상동성 암] 구성 요소를 포함한다. 상동성 암은 염색체 내로 재조합을 제공하여 절단 부위, 예컨대, 표적 부위(들) 또는 근처에서 게놈 DNA 내로 예를 들어, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자를 효과적으로 삽입 또는 통합한다. 일부 구현예에서, 상동성 암은 유전자 파괴의 표적 부위에서 서열의 측면에 위치한다.

[0584] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 부분 및 이중 가닥 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 벡터 내에 포함된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 DNA이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 RNA이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥 DNA이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 DNA이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥 RNA이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 RNA이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 부분 및 이중 가닥 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 벡터 내에 포함된다.

[0585] 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 주형 폴리뉴클레오티드는 재조합 수용체, 예를 들어, CAR 또는 이의 일부의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 전이 유전자를 함유하고/거나 포함한다. 특정 구현예에서, 전이 유전자는 TGFBR2를 암호화하는 내인성 유전자, 유전자 좌 또는 개방형 판독 프레임 내에 있는 표적 부위(들)에서 표적화된다. 일부 구현예에서, 전이 유전자가, 예컨대 TGFBR2 폴리펩티드의 우성 음성 형태를 암호화하는 코딩 서열을 초래하도록 내인성 TGFBR2 개방형 판독 프레임 내에서 통합을 위해 표적화된다.

[0586] 삽입을 위한 폴리뉴클레오티드는 "전이 유전자(transgene)" 또는 "외인성 서열(exogenous sequences)" 또는 "도너(donor)" 폴리뉴클레오티드 또는 분자로 또한 지칭될 수 있다. 주형 폴리뉴클레오티드는 DNA, 단일 가닥 및/또는 이중 가닥일 수 있으며, 선형 또는 원형 형태로 세포 내로 도입될 수 있다. 주형 폴리뉴클레오티드는 DNA, 단일 가닥 및/또는 이중 가닥일 수 있으며, 선형 또는 원형 형태로 세포 내로 도입될 수 있다. 주형 폴리뉴클레오티드는 RNA 단일 가닥 및/또는 이중 가닥일 수 있으며, RNA 분자(예를 들어, RNA 바이러스의 일부)로 도입될 수 있다. 문헌[미국 특허 공개 번호 20100047805 및 20110207221]을 또한 참조한다. 주형 폴리뉴클레오티드는 DNA 형태로 또한 도입될 수 있으며, 이는 원형 또는 선형 형태로 세포 내로 도입될 수 있다. 선형 형태로 도입되는 경우, 주형 폴리뉴클레오티드의 말단이 공지된 방법에 의해 (예를 들어, 엑소뉴클레오티틱(exonucleolytic) 분해로부터) 보호될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 디데옥시뉴클레오티드 잔기가 선형 분자의 3' 말단에 추가되고/거나 자가 상보성 올리고뉴클레오티드가 한쪽 또는 양쪽 말단에 결합된다. 예를 들어, 문헌[Chang et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4959-4963; Nehls et al. (1996) Science 272:886-889]을 참조한다. 외인성 폴리뉴클레오티드를 분해로부터 보호하기 위한 추가 방법은, 말단 아미노기(들)의 첨가 및 예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포라미데이트 및 O-메틸 리보스 또는 데옥시리보스 잔기와 같은 변형된 뉴클레오티드 간 연결의 사용을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 이중 가닥 형태로 도입되는 경우, 주형 폴리뉴클레오티드는, 하나 이상의 뉴클레아제 표적 부위(들), 예를 들어 세포의 게놈 내로 통합될 전이 유전자 측면에 위치한 뉴클레아제 표적 부위를 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[미국 특허 출원 공개 번호 20130326645]을 참조한다.

[0587] 일부 구현예에서, 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드는, 길이가 1kb 초과, 예를 들어 2 내지 200 kb, 2 내지 10 kb(또는 이들 사이의 임의의 값)의 서열(전이 유전자로도 지칭)을 포함한다. 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 하나 이상의 뉴클레아제 표적 부위를 또한 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 한 쌍의 ZFN 또는 TALEN에 대한 2 개 이상의 표적 부위를 포함한다. 전형적으로, 뉴클레아제 표적 부위는, 전이 유전자의 절단을 위해 전이 유전자 서열의 외부에, 예를 들어 전이 유전자 서열에 대해 5' 및/또는 3'에 있다. 뉴클레아제 절단 부위(들), 예컨대 표적 부위(들)는 임의의 뉴클레아제(들)에 대한 것일 수 있다. 일부 구현예에서, 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드에 함유된 뉴클레아제 표적 부위(들)는, 절단된 주형 폴리뉴클레오티드가 상동성-독립적 방법을 통해 통합된 내인성 표적을 절단하는 데 사용된 동일한 뉴클레아제(들)에 대한 것이다.

- [0588] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥 핵산이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥 핵산이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 서열, 예를 들어, 표적 DNA에 추가되거나 표적 DNA에서 변화의 주형이 될 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 부위를 변형하는 데 사용될 수 있는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 뉴클레오티드 서열, 예를 들어, 표적 DNA, 예를 들어, 표적 부위의 야생형 서열에 대응하는 하나 이상의 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0589] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 선형 이중 가닥 DNA이다. 길이는 예를 들어, 약 200 내지 약 5000 개의 염기 쌍, 예를 들어, 약 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 4000 또는 5000 개의 염기 쌍일 수 있다. 길이는 예를 들어, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 4000 또는 5000 개 이상의 염기 쌍일 수 있다. 일부 구현예에서, 길이는 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 4000 또는 5000 개 이하의 염기 쌍이다. 일부 구현예에서, 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드는, 약 160 개의 염기 쌍, 예를 들어, 약 200 내지 4000, 300 내지 3500, 400 내지 3000, 500 내지 2500, 600 내지 2000, 700 내지 1900, 800 내지 1800, 900 내지 1700, 1000 내지 1600, 1100 내지 1500 또는 1200 내지 1400 개의 염기 쌍 길이를 갖는다.
- [0590] 여기에 기재된 주형 폴리뉴클레오티드 상에 함유된 전이 유전자는 PCR과 같은 공지된 표준 기술을 사용하여 플라스미드, 세포 또는 기타 출처에서 분리될 수 있다. 사용을 위한 주형 폴리뉴클레오티드는, 원형 슈퍼코일(circular supercoiled), 원형의 풀린(circular relaxed), 선형 등을 포함한 다양한 유형의 토폴로지(topology)를 포함할 수 있다. 대안적으로, 상기는 표준 올리고뉴클레오티드 합성 기술을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 또한, 주형 폴리뉴클레오티드는 메틸화될 수 있거나 메틸화가 없을 수 있다. 주형 폴리뉴클레오티드는 세균 또는 효모의 인공 염색체(BAC 또는 YAC)의 형태일 수 있다.
- [0591] 주형 폴리뉴클레오티드는 선형의 단일 가닥 DNA일 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, (i) 표적 DNA의 Nick 가닥에 어닐링할 수 있는 선형의 단일 가닥 DNA, (ii) 표적 DNA의 손상되지 않은 가닥에 어닐링할 수 있는 선형의 단일 가닥 DNA, (iii) 표적 DNA의 전사 가닥에 어닐링할 수 있는 선형의 단일 가닥 DNA, (iv) 표적 DNA의 비-전사 가닥에 어닐링할 수 있는 선형의 단일 가닥 DNA 또는 상기 중 하나 이상이다.
- [0592] 길이는 예를 들어, 약 200 내지 5000 개의 뉴클레오티드, 예를 들어, 약 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 4000 또는 5000 개의 뉴클레오티드일 수 있다. 길이는 예를 들어, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 4000 또는 5000 개 이상의 뉴클레오티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 길이는 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400, 1600, 1800, 2000, 2500, 3000, 4000 또는 5000 개 이하의 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 단일 가닥 주형 폴리뉴클레오티드는, 약 160 개의 뉴클레오티드, 예를 들어, 약 200 내지 4000, 300 내지 3500, 400 내지 3000, 500 내지 2500, 600 내지 2000, 700 내지 1900, 800 내지 1800, 900 내지 1700, 1000 내지 1600, 1100 내지 1500 또는 1200 내지 1400 개의 뉴클레오티드 길이를 갖는다.
- [0593] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 원형 이중 가닥 DNA, 예를 들어, 플라스미드이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 전이 유전자 및/또는 표적 부위의 양쪽에 약 500 내지 1000 개의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, 표적 부위 또는 전이 유전자의 5', 표적 부위 또는 전이 유전자의 3' 또는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5' 및 3' 둘 다에 약 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 또는 2000 개의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, 표적 부위 또는 전이 유전자의 5', 표적 부위 또는 전이 유전자의 3' 또는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5' 및 3' 둘 다에 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 또는 2000 개 이상의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, 표적 부위 또는 전이 유전자의 5', 표적 부위 또는 전이 유전자의 3' 또는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5' 및 3' 둘 다에 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 또는 2000 개 이내의 상동성 염기 쌍을 포함한다.
- [0594] a. 전이 유전자 서열
- [0595] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, 여기, 예를 들어 섹션 III.B에 기재된 임의의 재조합 수용체와 같은 재조합 수용체, 키메라 수용체 또는 이의 일부의 하나 이상의 사슬 또는 상기 재조합 수용체의 하나 이상의

영역, 도메인 또는 사슬을 암호화하는 전이 유전자 서열을 함유한다.

[0596] 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은 세포 외 결합 영역, 막관통 도메인 및/또는 세포 내 영역을 포함하는 재조합 수용체를 암호화한다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은 재조합 수용체의 전부 또는 일부를 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은 여기, 예를 들어 섹션 III.B에 기재된 임의의 재조합 수용체 또는 이의 하나 이상의 영역, 도메인 또는 사슬을 암호화한다. 일부 측면에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내로 전이 유전자 서열의 통합 시, 생성된 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체, 예컨대 여기, 예를 들어 섹션 III.B에 기재된 임의의 재조합 수용체 또는 이의 하나 이상의 영역, 도메인 또는 사슬을 암호화한다. 예를 들어, 전이 유전자 서열은, 세포 외 영역, 막관통 도메인 및 공자극 신호 전달 도메인을 포함할 수 있는 세포 내 영역 및 기타 도메인 또는 이의 일부 중 하나 이상을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0597] 일부 측면에서, 게놈 내 표적 위치에 삽입되거나 통합되는 코딩 및/또는 비-코딩 서열 및/또는 이의 부분 코딩 서열을 포함한 재조합 수용체 또는 이의 일부의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 관심 핵산 서열인 전이 유전자 서열은, “전이 유전자(transgene)”, “전이 유전자 서열(transgene sequences)”, “외인성 핵산 서열(exogenous nucleic acids sequences)”, “이종 서열(heterologous sequences)” 또는 “도너 서열(donor sequences)”로도 지칭될 수 있다. 일부 측면에서, 전이 유전자는, T 세포, 예를 들어 인간 T 세포의 게놈 내 특정 표적 유전자 좌 또는 표적 위치의 내인성 게놈 서열과 같은 내인성 게놈 서열에 대해 외인성 또는 이종인 핵산 서열이다. 일부 측면에서, 전이 유전자는, T 세포, 예를 들어 인간 T 세포의 표적 유전자 좌 또는 표적 위치의 내인성 게놈 서열과 비교하여 변형되거나 상이한 서열이다. 일부 측면에서, 전이 유전자는 상이한 유전자, 종 및/또는 기원 유래 핵산 서열과 비교하여 이로부터 유래하거나 변형된 핵산 서열이다. 일부 측면에서, 전이 유전자는, 동일한 종의 상이한 유전자 좌, 예를 들어, 상이한 게놈 영역 또는 상이한 유전자로부터의 서열에서 유래된 서열이다. 일부 측면에서, 예시적인 재조합 수용체는 여기, 예를 들어, 섹션 III.B에 기재된 임의의 것을 포함한다.

[0598] 일부 구현예에서, 뉴클레아제-유도 HDR은, 표적화된 삽입에 대한 전이 유전자의 발현을 위해 전이 유전자("외인성 서열(exogenous sequence)" 또는 "전이 유전자 서열(transgene sequence)"로도 명명)의 삽입을 초래한다. 주형 폴리뉴클레오티드 서열은 그것이 배치된 게놈 서열과 전형적으로 동일하지 않다. 주형 폴리뉴클레오티드 서열은 2 개의 상동성 영역이 측면 배치된 비상동성 서열을 함유하여 관심 위치에서 효율적인 HDR을 허용할 수 있다. 또한, 주형 폴리뉴클레오티드 서열은 세포 염색질 내 관심 영역과 상동성이 아닌 서열을 함유하는 벡터 분자를 포함할 수 있다. 주형 폴리뉴클레오티드 서열은 세포 염색질에 대해 몇몇 불연속적인 상동성 영역을 함유할 수 있다. 예를 들어, 관심 영역에 정상적으로 존재하지 않는 서열의 표적화된 삽입의 경우, 상기 서열은 전이 유전자에 존재할 수 있고, 관심 영역의 서열에 대한 상동성 영역이 측면 배치될 수 있다.

[0599] 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은, T 세포, 선택적으로 인간 T 세포의 내인성 게놈 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임에 대해 외인성 또는 이종인 서열이다. 일부 측면에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 표적 부위 근처 서열에 상동성인 하나 이상의 상동성 암(들)에 연결된 전이 유전자 서열을 함유하는 주형 폴리뉴클레오티드의 존재 하에 HDR은, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 초래한다.

[0600] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은, 재조합 수용체의 다양한 영역, 도메인 또는 사슬, 예컨대 여기 섹션 III.B에 기재된 재조합 수용체 또는 다양한 영역, 도메인 또는 사슬의 전부 또는 일부를 암호화한다.

[0601] 일부 측면에서, 전이 유전자는 상이한 유전자, 종 및/또는 기원 유래 상이한 핵산 서열을 연결함으로써 생성된 서열을 포함하는 키메라 서열이다. 일부 측면에서, 전이 유전자는 이어지거나 연결된 상이한 유전자, 코딩 서열 또는 엑손 또는 이의 일부 유래 상이한 영역 또는 도메인 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 함유한다. 일부 측면에서, 표적화된 통합을 위한 전이 유전자 서열은 폴리펩티드 또는 이의 단편을 암호화한다.

[0602] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은, 키메라 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 이의 일부, 예컨대 이의 도메인 또는 영역인 재조합 수용체를 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은, 재조합 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체(CAR)의 다양한 영역 또는 도메인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는 CAR의 세포 내 영역과 같은 세포 내 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는 CAR의 막관통 영역과 같은 막관통 영역 또는 막 결합 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 또한 포함한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는 CAR의 세포 외 영역과 같은 세포 외 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 또한 포함한다. 예시적인 키메라 수용체는 하기 섹션 B.1 및 B.3에 기재된 것을 포함한다.

- [0603] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은, 재조합 수용체, 예컨대 재조합 T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 일부, 예컨대 이의 도메인, 영역 또는 사슬을 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체는 재조합 TCR이다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체, 예컨대 재조합 TCR은 2 개 이상의 별개의 폴리펩티드 사슬, 예컨대 TCR 알파(TCR $\alpha$ ) 및 TCR 베타(TCR $\beta$ ) 사슬을 포함한다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은 재조합 TCR의 하나 이상의 사슬, 예컨대 TCR $\alpha$  또는 TCR $\beta$  또는 둘 다를 암호화할 수 있다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은 재조합 TCR의 하나 이상의 영역 또는 도메인, 예컨대 TCR $\alpha$  또는 TCR $\beta$  또는 둘 다의 세포 내 영역, 막관통 영역 및/또는 세포 외 영역을 암호화할 수 있다. 일부 측면에서, TCR $\alpha$  및 TCR $\beta$ 를 암호화하는 서열은 2A 요소와 같은 다중 시스트론 요소에 의해 선택적으로 분리된다. 예시적인 재조합 TCR은 하기 섹션 III.B.4에 기재된 것을 포함한다.
- [0604] 일부 측면에서, 전이 유전자는, 비-코딩, 조절 또는 제어 서열, 예를 들어 암호화된 폴리펩티드 또는 이의 단편의 발현을 허용, 조정 및/또는 조절하는 데 필요한 서열 또는 폴리펩티드의 변형에 필요한 서열을 또한 함유한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자가 게놈 서열에서 유래된 경우, 전이 유전자는 게놈 내 대응하는 핵산과 비교하여 인트론을 포함하지 않거나 하나 이상의 인트론이 부족하다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은 인트론을 포함하지 않는다. 구현예 중 일부에서, 전이 유전자는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 서열을 함유하고, 여기서 상기 전이 유전자 서열의 전부 또는 일부는, 예를 들어 인간 세포 내 발현을 위해 코돈 최적화된다.
- [0605] 일부 구현예에서, 코딩 및 비-코딩 영역을 포함한 전이 유전자 서열의 길이는, (약) 100 내지 약 10,000 개의 염기 쌍, 예컨대 약 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 또는 10000 개의 염기 쌍이다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열의 길이는, 세포 또는 바이러스 벡터의 용량 내로 제조, 합성 또는 조립 및/또는 도입될 수 있는 폴리뉴클레오티드의 최대 길이로 제한된다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열의 길이는, 필요한 주형 폴리뉴클레오티드의 길이 및/또는 하나 이상의 상동성 암(들)의 최대 길이에 따라 다를 수 있다.
- [0606] 일부 구현예에서, 유전자 파괴 유도된 HDR은 게놈 내 표적 위치에서 전이 유전자 서열의 삽입 또는 통합을 초래한다. 주형 폴리뉴클레오티드 서열은 그것이 표적화되는 게놈 서열과 전형적으로 동일하지 않다. 주형 폴리뉴클레오티드 서열은 2 개의 상동성 영역이 측면 배치된 전이 유전자 서열을 함유하여 관심 위치에서 효율적인 HDR을 허용할 수 있다. 주형 폴리뉴클레오티드 서열은 게놈 DNA에 대한 몇몇 불연속적인 상동성 영역을 함유할 수 있다. 예를 들어, 관심 영역에 정상적으로 존재하지 않는 서열의 표적화된 삽입의 경우, 상기 서열은 전이 유전자에 존재할 수 있고, 관심 영역의 서열에 대한 상동성 영역이 측면 배치될 수 있다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은, 재조합 수용체 또는 이의 일부, 예를 들어 세포 외 결합 영역, 막관통 도메인 및/또는 세포 내 영역의 일부 중 하나 이상을 암호화한다.
- [0607] 일부 측면에서, HDR에 의한 전이 유전자의 표적화된 통합 시, 세포의 게놈은, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 *TGFB2* 유전자 좌를 함유한다. 일부 측면에서, 전체 재조합 수용체가 전이 유전자 서열에 의해 암호화된다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은, 기타 분자 및/또는 조절 또는 제어 요소, 예를 들어, 외인성 프로모터 및/또는 다중 시스트론 요소를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 또한 함유한다.
- [0608] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은, 신호 펩티드, 조절 또는 제어 요소, 예컨대 프로모터 및/또는 하나 이상의 다중 시스트론 요소, 예를 들어 리보솜 건너뛰기 요소 또는 내부 리보솜 도입 부위(internal ribosome entry site, IRES)를 암호화하는 신호 서열을 또한 포함한다. 일부 구현예에서, 신호 서열은 재조합 수용체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 배치될 수 있다.
- [0609] 전이 유전자 서열에 의해 암호화된 예시적인 영역, 도메인 또는 사슬이 하기에 기재되고, 또한 여기 섹션 III.B에 기재된 임의의 영역 또는 도메인일 수 있다.
- [0610] (i) 신호 서열
- [0611] 일부 구현예에서, 전이 유전자는 신호 펩티드를 암호화하는 신호 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 신호 서열은 이종 또는 비천연 신호 펩티드, 예를 들어, 상이한 유전자 또는 종 유래 신호 펩티드 또는 내인성 *TGFB2* 유전자 좌의 신호 펩티드와 상이한 신호 펩티드를 암호화할 수 있다. 일부 측면에서, 예시적인 신호 서열은, 서열 번호: 24에 제시된 GMCSFR 알파 사슬의 신호 서열 및 서열 번호: 25에 제시된 암호화 신호 펩티드 또는 서열 번호: 26에 제시된 CD8 알파 신호 펩티드를 포함한다. 발현된 재조합 수용체의 성숙한 형태에서, 신호 서열이 폴

리펍티드의 나머지 부분에서 절단된다. 일부 측면에서, 신호 서열이, 조절 또는 제어 요소, 예를 들어 프로모터, 예컨대 이중 프로모터, 예를 들어 *TGFBR2* 유전자 좌에서 유래되지 않은 프로모터의 3'에 배치된다. 일부 측면에서, 신호 서열이 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들), 예를 들어, 리보솜 건너뛰기 서열 및/또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 3'에 배치된다. 일부 측면에서, 신호 서열이 전이 유전자의 세포 외 영역의 하나 이상의 구성 요소를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 배치될 수 있다. 일부 구현예에서, 신호 서열이 전이 유전자 내 최대한 5' 영역에 존재하고, 상동성 암 중 하나에 연결된다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열에 의해 암호화된 신호 서열은 여기, 예를 들어 섹션 III.B에 기재된 임의의 신호 서열을 포함한다.

[0612] (ii) 예시적인 키메라 수용체 암호화 서열

[0613] 일부 측면에서, 표적화된 통합을 위한 전이 유전자 서열은, 키메라 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 키메라 자가 항체 수용체(chimeric auto antibody receptor, CAAR)인 재조합 수용체를 암호화하는 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 전이 유전자는, 이어지거나 연결된 상이한 유전자, 코딩 서열 또는 엑손 또는 이의 일부 유래일 수 있는 재조합 수용체의 상이한 영역 또는 도메인 또는 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 함유한다.

[0614] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체, 예컨대 CAR은, 하나 이상의 영역 또는 도메인, 예컨대 (예를 들어, 하나 이상의 세포 외 결합 도메인(들) 및/또는 스페이서를 함유하는) 세포 외 영역, 막관통 도메인 및/또는 (예를 들어, 1차 신호 전달 영역 또는 도메인 및/또는 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인을 함유하는) 세포 내 영역 중 하나 이상을 함유한다. 일부 측면에서, 암호화된 CAR은 기타 도메인, 예컨대 다량체화 도메인 또는 링커를 더 함유한다.

[0615] 일부 측면에서, 전이 유전자에서, 세포 외 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 신호 서열과 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 사이에 배치된다. 일부 측면에서, 전이 유전자에서, 세포 외 다량체화 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 결합 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 배치된다. 일부 측면에서, 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 결합 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 배치된다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는 5'에서 3'순서로, 세포 외 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열, 막관통 도메인(또는 막 결합 도메인)의 뉴클레오티드 서열 및 세포 내 영역의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0616] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 CAR이고, 세포 외 영역을 암호화하는 전이 유전자는 5'에서 3'순서로, 세포 외 결합 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 및 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는 결합 도메인 및/또는 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 중 어느 하나의 5' 또는 3' 및/또는 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 배치될 수 있는 하나 이상의 세포 외 다량체화 도메인(들)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 또한 포함한다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은 세포 외 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 전형적으로 배치되는 신호 서열을 또한 포함한다.

[0617] 일부 측면에서, 전이 유전자에서, 결합 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 신호 서열과 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 사이에 배치된다. 일부 측면에서, 전이 유전자에서, 세포 외 다량체화 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 결합 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 배치된다. 일부 측면에서, 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 결합 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 배치된다.

[0618] 일부 구현예에서, 전이 유전자는, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들) 및/또는 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있는 세포 내 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 함유한다.

[0619] 일부 구현예에서, 전이 유전자는 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들), 예를 들어 리보솜 건너뛰기 서열 및/또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 또한 포함한다. 일부 측면에서, 전이 유전자는 전형적으로 전이 유전자 서열의 최대 5' 영역, 예를 들어 신호 서열의 5'에 프로모터와 같은 조절 또는 제어 요소를 또한 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 추가 분자(들) 또는 추가 도메인 또는 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 폴리뉴클레오티드의 전이 유전자 부분에 포함될 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 추가 분자(들) 또는 추가 도메인 또는 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 CAR의 하나 이상의 영역(들) 또는 도메인(들) 또는 사슬(들)을 암호

화하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 추가 분자(들) 또는 추가 도메인, 영역 또는 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 CAR의 하나 이상의 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 상류에 존재한다.

[0620] 전이 유전자 서열에 의해 암호화된 키메라 수용체의 예시적인 도메인 또는 영역이 하기에 기재되고, 하기 섹션 III.B.1 및 III.B.3에 기재된 예시적인 키메라 수용체의 임의의 영역 또는 도메인을 또한 포함할 수 있다.

[0621] **(a) 결합 도메인**

[0622] 일부 구현예에서, 전이 유전자가, 특정 세포 유형의 표면 상에 발현된 항원과 같은 특정 항원(또는 리간드)에 대한 특이성을 갖는 CAR과 같은 재조합 수용체의 일부를 암호화한다. 일부 구현예에서, 항원은, 예를 들어 건강한 세포 또는 조직의 정상 또는 비-표적화 세포 또는 조직과 비교하여, 질병 또는 병태의 세포, 예를 들어 종양 또는 병원성 세포 상에서 선택적으로 발현되거나 과발현된다.

[0623] 일부 측면에서, 전이 유전자가 재조합 수용체의 세포 외 영역을 암호화한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열이 항원 또는 리간드에 특이적으로 결합하는 결합 도메인과 같은 세포 외 결합 도메인을 암호화한다.

[0624] 일부 구현예에서, 결합 도메인은, 폴리펩티드, 리간드, 수용체, 리간드 결합 도메인, 수용체 결합 도메인, 항원, 에피토프, 항체, 항원 결합 도메인, 에피토프 결합 도메인, 항체 결합 도메인, 태그 결합 도메인 또는 상기 중 어느 하나의 단편이거나 이를 포함한다. 다른 구현예에서, 항원은 정상 세포 상에서 발현되고/거나 조작된 세포 상에서 발현된다. 일부 측면에서, 항원이 결합 도메인, 예컨대 리간드 결합 도메인 또는 항원 결합 도메인에 의해 인식된다. 일부 측면에서, 전이 유전자가 하나 이상의 결합 도메인(들)을 함유하는 세포 외 영역을 암호화한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자에 의해 암호화된 예시적인 결합 도메인이 scFv 또는 sdAb를 포함한 항체 및 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 단편은 가요성 링커에 의해 연결된 항체 가변 영역을 포함한다.

[0625] 일부 구현예에서, 결합 도메인은 단일 사슬 가변 단편(single chain variable fragments, scFv)이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 결합 도메인은 단일 도메인 항체(single domain antibody, sdAb)이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 결합 도메인은 질병, 장애 또는 병태의 세포 또는 조직과 연관된, 이에 특이적인 및/또는 상에서 발현되는 표적 항원에 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 질병, 장애 또는 병태는 감염병 질병 또는 장애, 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 종양 또는 암이다. 일부 구현예에서, 표적 항원은 종양 항원이다.

[0626] 전이 유전자 서열에 의해 암호화된 예시적인 항원 및 항원- 또는 리간드-결합 도메인은 여기 섹션 III.B.1에 기재된 것을 포함한다. 일부 측면에서, 암호화된 재조합 수용체는, 주요 조직적합성 복합체(major histocompatibility complex, MHC)-펩티드 복합체로 세포 표면 상에 제시된 종양 관련 항원과 같은 세포 내 항원을 특이적으로 인식하는 scFv와 같은 TCR 유사 항체 또는 이의 단편이거나 이를 포함하는 결합 도메인을 함유한다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열이 TCR 유사 항체 또는 이의 단편인 결합 도메인을 암호화할 수 있다. 따라서, 암호화된 재조합 수용체는 여기 섹션 III.B에 기재된 임의의 것과 같은 TCR 유사 CAR이다. 일부 구현예에서, 결합 도메인은 다중 특이적, 예컨대 이중 특이적 결합 도메인이다. 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 자가 항체에 결합하는 항원인 결합 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체는 여기 섹션 III.B.3에 기재된 임의의 것과 같은 키메라 자가 항체 수용체(CAAR)이다.

[0627] 일부 측면에서, 하나 이상의 결합 도메인(들)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 존재할 경우 전이 유전자 내 신호 서열의 3'에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 결합 도메인(들)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이, 전이 유전자 내 하나 이상의 조절 또는 제어 요소(들)를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 3'에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 결합 도메인(들)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 존재할 경우 전이 유전자 내 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 결합 도메인(들)을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 전이 유전자 내 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 배치될 수 있다.

[0628] **(b) 스페이서 및 막관통 도메인**

[0629] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 CAR이고, 전이 유전자는 스페이서를 암호화하는 서열 및/또는 막관통 도메인 또는 이의 일부를 암호화하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체의 세포 외 영역이 스페이서를 포함하고, 선택적으로 여기서 상기 스페이서는 결합 도메인과 막관통 도메인 사이에서 작동 가능하게 연결된다. 일부 측면에서, 스페이서 및/또는 막관통 도메인이, 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인을 함유하는 세포 외 부분과 (예를 들어, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들), 세포 내 다량체화 도메

인 및/또는 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 함유하는) 세포 내 영역과 같은 재조합 수용체의 다른 영역 또는 도메인을 연결할 수 있다.

[0630] 일부 구현예에서, 전이 유전자는 항원 결합 도메인과 막관통 도메인을 분리하는 스페이서 및/또는 힌지 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 더 포함한다. 일부 측면에서, 스페이서는, 면역 글로불린 불변 영역 또는 이의 변이체 또는 변형된 버전의 적어도 일부, 예컨대 힌지 영역, 예를 들어 IgG4 힌지 영역 및/또는 C<sub>H</sub>1/C<sub>L</sub> 및/또는 Fc 영역이거나 이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 일부는 IgG4 또는 IgG1과 같은 인간 IgG의 것이다. 일부 측면에서, 불변 영역의 일부가 결합 도메인, 예를 들어, scFv와 막 관통 도메인 사이에서 스페이서 영역으로 기능한다. 전이 유전자에 의해 암호화될 수 있는 예시적인 스페이서는 IgG4 힌지 단독, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인에 연결된 IgG4 힌지 또는 C<sub>H</sub>3 도메인에 연결된 IgG4 힌지 및 문헌[Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, Hudecek *et al.* (2015) *Cancer Immunol Res.* 3(2): 125-135 또는 국제 특허 출원 공개 번호 W02014031687]에 기재된 것 또는 여기 섹션 III.B.1에 기재된 임의의 것을 포함한다.

[0631] 일부 측면에서, 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이, 전이 유전자 내 하나 이상의 결합 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 3'에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이, 전이 유전자 내 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 배치될 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이, 하나 이상의 결합 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 배치된다.

[0632] 일부 구현예에서, 전이 유전자가, 예를 들어 하나 이상의 결합 도메인 및/또는 스페이서를 함유하는 세포 외 영역과 예를 들어, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들), 세포 내 다량체화 도메인 및/또는 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 함유하는 세포 내 영역을 연결할 수 있는 막관통 도메인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자가 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 선택적으로 여기서 상기 막관통 도메인은 인간이거나 인간 단백질 유래 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD4, CD28, 또는 CD8에서 유래된, 선택적으로 인간 CD4, 인간 CD28 또는 인간 CD8에서 유래된 막관통 도메인이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 CD28에서 유래된, 선택적으로 인간 CD28에서 유래된 막관통 도메인이거나 이를 포함한다.

[0633] 일부 구현예에서, 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 세포 외 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 융합된다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 세포 내 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열에 융합된다. 일부 측면에서, 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이, 전이 유전자 내 하나 이상의 결합 도메인 및/또는 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 3'에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이, 예를 들어, 전이 유전자 내 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들), 세포 내 다량체화 도메인 및/또는 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 함유하는 세포 내 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열에 의해 암호화된 막관통 도메인이 여기, 예를 들어 섹션 III.B.1에 기재된 임의의 막관통 도메인을 포함한다.

[0634] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체가 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 포함하는 세포 내 영역을 포함하나 막관통 도메인 및/또는 세포 외 영역을 포함하지 않는 경우, 전이 유전자가 여기, 예를 들어 섹션 III.B에 기재된 임의의 것과 같은 막 결합 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다.

[0635] (c) 세포 내 영역

[0636] 일부 구현예에서, 전이 유전자는 세포 내 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자가 CAR을 암호화하고, 일부 측면에서, 세포 내 영역은 하나 이상의 2차 또는 공자극 신호 전달 영역을 포함한다. 일부 측면에서, 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이, 전이 유전자 내 하나 이상의 결합 도메인 및/또는 스페이서를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 3'에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 3'에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 세포 내 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 전이 유전자 내 최대 3' 영역에 있고, 이어서 이는 상동성 압 중 하나, 예를 들어 3' 상동성 압 서열에 연결된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이, 전이 유전자 내 막관통 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 3'에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열에 의해 암호화된 공자극 신호 전달 영

역 또는 1차 신호 전달 도메인 또는 영역은, 여기, 예를 들어 섹션 III.B.1에 기재된 임의의 공자극 신호 전달 영역 또는 임의의 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 포함한다.

[0637] (1) 공자극 신호 전달 도메인

[0638] 일부 구현예에서, 전이 유전자는, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들)을 포함할 수 있는 세포 내 영역의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인은 T 세포 공자극 분자의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분을 포함하고, 선택적으로 여기서 상기 T 세포 공자극 분자 또는 이의 신호 전달 부분은 인간이다.

[0639] 일부 구현예에서, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인은 T 세포 공자극 분자의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, T 세포 공자극 분자 또는 이의 신호 전달 부분은 인간이다. 일부 구현예에서, 전이 유전자에 의해 암호화된 예시적인 공자극 신호 전달 도메인은, 하나 이상의 공자극 수용체, 예컨대 CD28, CD137 (4-1BB), OX40 (CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS 및/또는 여기 섹션 III.B에 기재된 임의의 것과 같은 기타 공자극 수용체 유래 신호 전달 영역 또는 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인은 CD28, 4-1BB 또는 ICOS의 세포내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인은 인간 CD28, 인간 4-1BB, 인간 ICOS의 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인은 인간 4-1BB의 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다.

[0640] (2) 1차 신호 전달 영역 또는 도메인

[0641] 일부 구현예에서, 재조합 수용체, 예를 들어 CAR을 암호화하는 전이 유전자 서열은, 1차 신호 전달 영역 또는 도메인, 예컨대 CD3제타(CD3 $\zeta$ )의 세포질 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 1차 신호 전달 영역은, T 세포에서 1차 활성화 신호를 자극할 수 있고/거나 유도할 수 있는 신호 전달 도메인, T 세포 수용체(TCR) 구성 요소의 신호 전달 도메인(예를 들어, CD3-제타(CD3 $\zeta$ ) 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 영역 또는 이의 기능성 변이체 또는 신호 전달 부분) 및/또는 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM)를 포함하는 신호 전달 도메인이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 여기, 예를 들어 섹션 III.B에 기재된 임의의 것이다.

[0642] 일부 측면에서, 전이 유전자는 TCR 복합체의 1차 자극 및/또는 활성화를 조절하는 1차 세포질 신호 전달 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호 전달 영역(들)은 면역 수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호 전달 모티프를 함유할 수 있다. 1차 세포질 신호 전달 영역(들)을 함유하는 ITAM의 예는 TCR 또는 CD3 제타(CD3 $\zeta$ ), Fc 수용체(FcR) 감마 또는 FcR 베타에서 유래된 것을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR의 세포질 신호 전달 영역 또는 도메인은 CD3 제타에서 유래된 세포질 신호 전달 도메인, 이의 일부 또는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 세포 내 (또는 세포질) 신호 전달 영역은, 인간 CD3 사슬, 선택적으로 CD3 제타 자극성 신호 전달 도메인 또는 이의 기능성 변이체, 예컨대 인간 CD3 $\zeta$ 의 동형 단백질 3의 112 AA 세포질 도메인(수탁 번호: P20963.2) 또는 문헌[미국 특허 번호 7,446,190 또는 미국 특허 번호 8,911,993]에 기재된 바와 같은 CD3 제타 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 신호 전달 영역은, 서열 번호: 13, 14 또는 15에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 13, 14 또는 15에 대해 (약) 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0643] 일부 측면에서, 전이 유전자 서열에 의해 암호화된 1차 신호 전달 도메인 또는 영역은 여기, 예를 들어 섹션 III.B.1에 기재된 임의의 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 포함한다.

[0644] (d) 추가 도메인, 예를 들어, 다량체화 도메인

[0645] 일부 구현예에서, 전이 유전자는 하나 이상의 다량체화 도메인(들), 예를 들어 2량체화 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 또한 포함한다. 일부 측면에서, 암호화된 다량체화 도메인은 세포 외 또는 세포 내일 수 있다. 일부 구현예에서, 암호화된 다량체화 도메인은 세포 외일 수 있다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열에 의해 암호화된 세포 내 영역의 일부는 다량체화 도메인, 선택적으로 2량체화 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는 세포 외 영역을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 외 영역은 다량체화 도메인, 선택적으로 2량체화 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인은 유도제에 결합 시 2량체화할 수 있다.

- [0646] 일부 측면에서, 재조합 수용체는 다중 사슬 재조합 수용체, 예컨대 다중 사슬 CAR이다. 일부 구현예에서, 다중 사슬 재조합 수용체의 하나 이상의 사슬 또는 이의 일부는 전이 유전자 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, 다중 사슬 재조합 수용체의 하나 이상의 사슬이 재조합 수용체의 각 사슬에 포함된 다량체화 도메인의 다량체화를 통해 기능성 또는 활성 재조합 수용체를 함께 형성할 수 있다.
- [0647] 일부 측면에서, 다량체화 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 다른 도메인의 5' 또는 3'에 존재한다. 예를 들어 일부 구현예에서, 암호화된 다량체화 도메인은 세포 외에 존재하고, 다량체화 도메인을 암호화하는 서열은 스페이서를 암호화하는 서열의 5'에 존재한다. 일부 구현예에서, 암호화된 다량체화 도메인은 세포 내에 존재하고, 다량체화 도메인을 암호화하는 서열은 1차 신호 전달 영역 또는 도메인을 암호화하는 서열의 5'에 존재한다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인은 세포 내에 존재하고, 다량체화 도메인을 암호화하는 서열은 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들)을 암호화하는 서열의 5' 또는 3'에 존재한다. 일부 구현예에서, 암호화된 다량체화 도메인은 유도제의 결합 시 다량체화(예를 들어, 2량체화)할 수 있다. 예시적인 암호화된 다량체화 도메인은 여기, 예를 들어 섹션 III.B에 기재된 임의의 다량체화 도메인을 포함한다.
- [0648] *(iii) 예시적인 T 세포 수용체(TCR) 암호화 서열*
- [0649] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열에 의해 암호화된 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(TCR)이다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은 재조합 TCR의 전부 또는 일부를 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은 재조합 TCR의 하나 이상의 사슬, 영역 또는 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 전이 유전자 서열에 의해 암호화된 예시적인 재조합 TCR이 하기 기재되고, 하기 섹션 B.4에 기재된 예시적인 재조합 TCR의 임의의 사슬, 영역 또는 도메인을 또한 포함할 수 있다.
- [0650] 일부 구현예에서, TCR은 2 개 이상의 별개의 폴리펩티드 사슬, 예컨대 TCR 알파(TCR $\alpha$ ) 및 TCR 베타(TCR $\beta$ ) 사슬을 포함한다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은 재조합 TCR의 하나 이상의 사슬, 예컨대 TCR $\alpha$  또는 TCR $\beta$  또는 둘 다를 암호화할 수 있다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은 TCR $\alpha$  및 TCR $\beta$  사슬 둘 다를 암호화할 수 있다. 일부 측면에서, TCR $\alpha$  및 TCR $\beta$ 를 암호화하는 서열은 2A 요소와 같은 다중 시스트론 요소에 의해 선택적으로 분리된다.
- [0651] 특정 구현예에서, 전이 유전자는 재조합 TCR 또는 이의 항원 결합 단편인 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은 가변 도메인 및 불변 도메인을 함유하는 재조합 TCR의 사슬을 암호화할 수 있다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은 하나 이상의 가변 도메인 및 하나 이상의 불변 도메인을 함유하는 재조합 TCR의 사슬을 암호화한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는 TCR $\alpha$  및 TCR $\beta$  사슬을 암호화하는 서열을 함유한다.
- [0652] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR $\alpha$  사슬 및 TCR $\beta$  사슬은 링커 영역에 의해 분리된다. 일부 구현예에서, TCR $\alpha$  및 TCR $\beta$  사슬을 연결하여 단일 폴리펩티드 가닥을 형성하는 링커 서열이 포함된다. 일부 구현예에서, 링커는  $\alpha$  사슬의 C 말단과  $\beta$  사슬의 N 말단(또는 그 반대) 사이의 거리를 가로지르기에 충분한 길이이나, 링커 길이가 표적 펩티드-MHC 복합체에 대한 결합을 차단하거나 감소시킬 정도로 길지 않은 것을 또한 보장한다. 일부 구현예에서, 링커는 TCR 결합 특이성을 보유하면서 단일 폴리펩티드 가닥을 형성할 수 있는 임의의 링커일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 (약) 10 내지 45 개의 아미노산, 예컨대 10 내지 30 개의 아미노산 또는 26 내지 41 개의 아미노산 잔기, 예를 들어 29, 30, 31 또는 32 개의 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 화학식 -PGGG-(SGGGG) $n$ -P-를 갖고, 여기서  $n$ 은 5 또는 6이고, P는 프롤린이고, G는 글리신이며 S는 세린이다(서열 번호: 22). 일부 구현예에서, 링커는 서열 GSADDAKKDAKKDGKS(서열 번호: 23)을 갖는다. 일부 구현예에서, TCR $\alpha$  사슬 또는 이의 일부 및 TCR $\beta$  사슬 또는 이의 일부 사이의 링커는 프로테아제에 의해 인식되고/거나 이에 의해 절단될 수 있다. 특정 구현예에서, TCR $\alpha$  사슬 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열 및 TCR $\beta$  사슬 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열 사이의 링커는 다중 시스트론 요소를 함유한다.
- [0653] 일부 구현예에서, 전이 유전자는 [TCR $\beta$  사슬]-[링커 또는 다중 시스트론 요소]-[TCR $\alpha$  사슬] 구조이거나 이를 포함하는 뉴클레오티드 서열이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는 [TCR $\alpha$  사슬]-[링커 또는 다중 시스트론 요소]-[TCR $\beta$  사슬] 구조이거나 이를 포함하는 뉴클레오티드 서열이거나 이를 포함한다. 일부 측면에서, 다중 시스트론 요소는 여기에 기재된 임의의 것과 같은 리보솜 건너뛰기 요소/자가 절단 요소(예를 들어, 2A 요소 또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES))를 포함한다.
- [0654] *(iv) 추가 분자, 예를 들어 마커*
- [0655] 일부 구현예에서, 전이 유전자는, 하나 이상의 추가 분자, 예컨대 항체, 항원, 다중 사슬 재조합 수용체의 추가

키메라 또는 추가 폴리펩티드 사슬(예를 들어, 여기, 예를 들어 섹션 III.B.2에 기재된 다중 사슬 제조합 수용체 시스템 또는 섹션 III.B.3에 기재된 제조합 T 세포 수용체(TCR)의 다중 사슬 CAR, 키메라 공자극 수용체, 억제 수용체, 조절 가능 키메라 항원 수용체 또는 기타 구성 요소), 형질 도입 마커 또는 대리 마커(예를 들어, 절단형 세포 표면 마커), 효소, 인자, 전사 인자, 억제 펩티드, 성장 인자, 핵 수용체, 호르몬, 림포카인, 사이토카인, 케모카인, 가용성 수용체, 가용성 사이토카인 수용체, 가용성 케모카인 수용체, 리포터, 상기 중 어느 하나의 기능성 단편 또는 기능성 변이체 및 상기의 조합물을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 또한 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 추가 분자를 암호화하는 상기 뉴클레오티드 서열은 제조합 수용체의 영역 또는 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 5'에 배치될 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 기타 분자를 암호화하는 서열 및 제조합 수용체의 영역 또는 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 조절 서열, 예컨대 2A 리보솜 건너뛰기 요소 및/또는 프로모터 서열에 의해 분리된다.

[0656] 일부 구현예에서, 전이 유전자는 하나 이상의 추가 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 또한 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 추가 분자는 하나 이상의 마커(들)를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 마커(들)는 형질 도입 마커, 대리 마커 및/또는 선택 마커를 포함한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는, 예컨대 전달된 세포의 생존 능력 및/또는 기능을 촉진함으로써 요법의 효능을 개선할 수 있는 핵산 서열; 예컨대 생체 내에서 생존 또는 국소화를 분석하기 위해 세포의 선택 및/또는 평가를 위한 유전자 마커를 제공하는 핵산 서열; 문헌[Lupton S. D. et al., *Mol. and Cell Biol.*, 11:6 (1991); 및 Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992); 우성 양성 선택 가능 마커의 음성 선택 가능 마커와의 융합에서 유래된 2작용성 선택 가능 융합 유전자의 용도를 기재한 문헌[국제 출원 WO 1992008796 및 WO 1994028143] 및 미국 특허 번호 제 6,040,177호를 또한 참조]에 기재된 바와 같이, 예를 들어 생체 내에서 음성 선택에 세포를 예민하게 만들어 안정성을 개선하기 위한 핵산 서열;을 또한 포함한다. 일부 측면에서, 마커는 여기, 예를 들어 본 섹션 또는 섹션 II 또는 III.B에 기재된 임의의 마커 또는 여기, 예를 들어 섹션 III.B.2에 기재된 임의의 추가 분자 및/또는 수용체 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가 분자는 대리 마커, 선택적으로 절단형 수용체이고, 선택적으로 여기서 상기 절단형 수용체는 세포 내 신호 전달 도메인이 없고/거나 리간드에 의해 결합될 경우 세포 내 신호 전달을 매개할 수 없다.

[0657] 일부 구현예에서, 마커는 형질 도입 마커 또는 대리 마커이다. 형질 도입 마커 또는 대리 마커가 사용되어 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 제조합 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 도입된 세포를 검출할 수 있다. 일부 구현예에서, 형질 도입 마커는 세포의 변형을 나타내거나 이를 확증할 수 있다. 일부 구현예에서, 대리 마커는 제조합 수용체, 예를 들어 TCR 또는 CAR과 함께 세포 표면 상에 공발현되도록 제조된 단백질이다. 특정 구현예에서, 상기 대리 마커는 변형되어 거의 또는 전혀 활성을 갖지 않는 표면 단백질이다. 특정 구현예에서, 대리 마커는 제조합 수용체를 암호화하는 동일한 폴리뉴클레오티드 상에 암호화된다. 일부 구현예에서, 제조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열은, 선택적으로 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 또는 자가 절단 펩티드 또는 리보솜 건너뛰기를 야기하는 펩티드, 예컨대 2A 서열, 예컨대, T2A, P2A, E2A 또는 F2A를 암호화하는 핵산에 의해 분리된, 마커를 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다. 외인성 마커 유전자는 일부 경우에, 세포의 검출 또는 선택을 가능하게 하고, 일부 경우에 세포 제거 및/또는 세포 자살을 또한 촉진하도록 조작된 세포와 관련하여 사용될 수 있다.

[0658] 예시적인 대리 마커는, 세포 표면 폴리펩티드의 절단 형태, 예컨대 비기능성이며 전장 형태의 세포 표면 폴리펩티드에 의한 신호 또는 이에 의해 일반적으로 전달되는 신호를 전달하지 않거나 전달할 수 없고/거나 내재화되지 않거나 내재화될 수 없는 절단 형태를 포함할 수 있다. 예시적인 절단형 세포 표면 폴리펩티드는, 성장 인자 또는 다른 수용체의 절단 형태, 예컨대 절단된 인간 표피 성장 인자 수용체 2(truncated human epidermal growth factor receptor 2, tHER2), 절단된 표피 성장 인자 수용체(tEGFR, 서열 번호: 7 또는 16에 제시된 예시적인 tEGFR 서열) 또는 전립선 특이적 막 항원(prostate-specific membrane antigen, PSMA) 또는 이의 변형된 형태를 포함한다. tEGFR은 항체 세톡시맵(Erbixub®) 또는 다른 치료용 항-EGFR 항체 또는 결합 분자에 의해 인식되는 에피토프를 함유할 수 있으며, 이는 tEGFR 작제물 및 암호화된 외인성 단백질로 조작된 세포를 확인 또는 선택 및/또는 암호화된 외인성 단백질을 발현하는 세포를 제거 또는 분리하는 데 사용될 수 있다. 문헌[미국 특허 번호 8,802,374 및 Liu et al., *Nature Biotech.* 2016 April; 34(4): 430-434]을 참조한다. 일부 측면에서, 마커, 예를 들어, 대리 마커는 CD34의 전부 또는 일부(예를 들어, 절단 형태), NGFR, CD19 또는 절단형 CD19, 예를 들어 절단형 비-인간 CD19 또는 표피 성장 인자 수용체(예를 들어, tEGFR)를 포함한다.

[0659] 일부 구현예에서, 마커는 검출 가능한 단백질, 예컨대 형광 단백질, 예컨대 그린 형광 단백질(green fluorescent protein, GFP), 강화된 그린 형광 단백질(enhanced green fluorescent protein, EGFP), 예컨대 수

퍼-폴드 GFP(super-fold GFP, sfGFP), 레드 형광 단백질(red fluorescent protein, RFP), 예컨대 tdTomato, mCherry, mStrawberry, AsRed2, DsRed 또는 DsRed2, 시안 형광 단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 블루 그린 형광 단백질(blue green fluorescent protein, BFP), 강화된 블루 형광 단백질(enhanced blue fluorescent protein, EBFP) 및 옐로우 형광 단백질(yellow fluorescent protein, YFP) 및 형광 단백질의 중 변이체, 단량체 변이체 및 코돈-최적화되고 안정화된 및/또는 강화된 변이체를 포함한 이의 변이체이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 마커는 효소, 예컨대 루시페라제, 대장균 유래 lacZ 유전자, 알칼리 포스파타제, 분비 배아 알칼리 포스파타제(secreted embryonic alkaline phosphatase, SEAP), 클로람페니콜 아세틸 트랜스퍼라제(chloramphenicol acetyl transferase, CAT)이거나 이를 포함한다. 예시적인 발광 리포터 유전자는 루시페라제(luciferase, luc),  $\beta$ -갈락토시다제, 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT),  $\beta$ -글루쿠로니다제( $\beta$ -glucuronidase, GUS) 또는 이의 변이체를 포함한다. 일부 측면에서, 효소의 발현은, 효소의 발현 및 기능적 활성 시 검출될 수 있는 기질의 첨가로 검출될 수 있다.

[0660] 일부 구현예에서, 마커는 선택 마커이다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 외인성 제제 또는 약물에 대한 내성을 부여하는 폴리펩티드이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 포유류 세포에 대해 항생제 내성을 부여하는 항생제 내성 유전자이다. 일부 구현예에서, 선택 마커는 퓨로마이신 내성 유전자, 히그로마이신 내성 유전자, 블라스티사이드인 내성 유전자, 네오마이신 내성 유전자, 게네티신 내성 유전자 또는 제오신 내성 유전자 또는 이의 변형된 형태이거나 이를 포함한다.

[0661] 일부 구현예에서, 분자는 비자기 분자, 예를 들어 비자기 단백질, 즉 세포가 입양으로 전달될 숙주의 면역 시스템에 의해 “자기(self)” 로 인식되지 않는 것이다.

[0662] 일부 구현예에서, 마커는 치료 기능을 제공하지 않고/거나 유전자 조작, 예를 들어 성공적으로 조작된 세포를 선택하기 위한 마커로서 사용되는 것이 아닌 다른 효과를 생성하지 않는다. 기타 구현예에서, 마커는 치료 분자 또는 그렇지 않으면 일부 원하는 효과를 나타내는 분자, 예컨대 생체 내에서 세포가 조우하게 될 리간드, 예컨대 입양 전달 및 리간드와의 조우 시 세포의 반응을 강화하고/거나 약화시키는 공자극 또는 면역 체크 포인트 분자일 수 있다.

[0663] 일부 구현예에서, 전이 유전자는 면역 조절 제제인 하나 이상의 추가 분자를 암호화하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 면역 조절 분자는 면역 체크포인트 조절제, 면역 체크포인트 억제제, 사이토카인 또는 케모카인에 선택된다. 일부 구현예에서, 면역 조절 제제는 면역 체크포인트 분자의 기능 또는 면역 체크포인트 분자를 수반하는 신호 전달 경로를 억제 또는 차단할 수 있는 면역 체크포인트 억제제이다. 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 분자는 PD-1, PD-L1, PD-L2, CTLA-4, LAG-3, TIM3, VISTA, 아데노신 수용체 또는 세포 외 아데노신, 선택적으로 아데노신 2A 수용체(adenosine 2A Receptor, A2AR) 또는 아데노신 2B 수용체(adenosine 2B receptor, A2BR) 또는 아데노신 또는 상기 중 어느 하나를 수반하는 경로 중에서 선택된다. 기타 예시적인 추가 분자는, 에피토프 태그, 검출 가능한 분자, 예컨대 형광 또는 발광 단백질 또는 세포 성장 및/또는 유전자 증폭의 향상을 매개하는 분자(예를 들어, 디히드로엽산 환원 효소)를 포함한다. 에피토프 태그는, 예를 들어, FLAG, His, myc, Tap, HA 또는 임의의 검출 가능한 아미노산 서열 중 하나 이상의 카피를 포함한다. 일부 구현예에서, 추가 분자는 비-코딩 서열, 억제 핵산 서열, 예컨대 안티센스 RNA, RNAi, shRNA 및 마이크로 RNA(miRNA) 또는 뉴클레아제 인식 서열을 포함할 수 있다.

[0664] 일부 측면에서, 추가 분자는, 예를 들어 섹션 III.B.2에 기재된 바와 같은 다중 사슬 재조합 수용체의 임의의 추가 폴리펩티드 사슬과 같은 여기에 기재된 임의의 추가 수용체 폴리펩티드를 포함할 수 있다.

[0665] (v) 다중 시스트론 요소 및 조절 또는 제어 요소

[0666] 일부 구현예에서, 전이 유전자(예를 들어, 외인성 핵산 서열)는, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 조절 또는 제어 요소가 아닌 또는 이와 상이한 하나 이상의 이종 또는 외인성 조절 또는 제어 요소, 예를 들어 시스-조절 요소(cis-regulatory element)를 또한 함유한다. 일부 측면에서, 이종 조절 또는 제어 요소는, 예컨대 프로모터, 인핸서, 인트론, 절연체, 폴리아데닐화 신호, 전사 종료 서열, 코작 컨센서스 서열(Kozak consensus sequence), 다중 시스트론 요소(예를 들어, 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 2A 서열), 메신저 RNA(mRNA)의 비번역 영역(untranslated region, UTR)에 대응하는 서열 및 스플라이스 수용체 또는 공여체 서열, 예컨대 *TGFBR2* 유전자 좌의 조절 또는 제어 요소가 아닌 또는 이와 상이한 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 이종 조절 또는 제어 요소는 프로모터, 인핸서, 인트론, 폴리아데닐화 신호, 코작 컨센서스 서열, 스플라이스 수용체 서열 및/또는 스플라이스 공여체 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는 이종성이고/거나 표적 부위 또는 근처에 전 형적으로 존재하지 않는 프로모터를 포함한다. 일부 측면에서, 조절 또는 제어 요소는 *TGFBR2* 유전자 좌에 통합

될 경우 재조합 수용체의 발현을 조절 또는 제어하는 데 필요한 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은 이중 유전자 또는 유전자 좌의 5' 및/또는 3' 비번역 영역(UTR)에 대응하는 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은 본 섹션 및 섹션 II에 기재된 것을 포함한 여기 기재된 임의의 조절 또는 제어 요소를 포함할 수 있다.

[0667] 재조합 수용체의 하나 이상의 사슬 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자를 포함한 전이 유전자는, 이의 발현이 통합 부위에서 내인성 프로모터, 즉 내인성 *TGFBR2* 유전자의 발현을 구동하는 프로모터에 의해 구동되도록 삽입될 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드 암호화 서열이 프로모터가 없으며, 이어서 통합된 전이 유전자의 발현이 관심 영역 내 내인성 프로모터 또는 다른 제어 요소에 의해 구동된 전사에 의해 보장된다. 예를 들어, 재조합 수용체의 일부를 암호화하는 전이 유전자가 프로모터 없이 그러나 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 코딩 서열과 인-프레임으로 삽입될 수 있어서, 통합된 전이 유전자의 발현이 통합 부위의 내인성 프로모터 및/또는 기타 조절 요소의 전사에 의해 제어된다. 일부 구현예에서, 다중 시스트론 요소, 예컨대 리보솜 건너뛰기 요소/자가 절단 요소(예를 들어, 2A 요소 또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES))가 재조합 수용체의 일부를 암호화하는 전이 유전자의 상류에 배치되어, 상기 다중 시스트론 요소가 *TGFBR2* 유전자 좌에서 내인성 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 엑손과 인-프레임으로 배치되며, 재조합 수용체를 암호화하는 전이 유전자의 발현이 내인성 *TGFBR2* 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은 3' UTR을 암호화하는 서열을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내로 전이 유전자의 통합 시, 전이 유전자가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 3' UTR의 상류에서 통합되어, 재조합 수용체를 암호화하는 메시지가 예를 들어, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 또는 이의 부분 서열 유래 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 3' UTR을 함유한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체의 나머지 부분을 암호화하는 개방형 판독 프레임 또는 이의 부분 서열이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 3' UTR을 포함한다.

[0668] 일부 구현예에서, “탠덤(tandem)” 카세트가 선택 부위 내로 통합된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 “탠덤” 카세트가 하나 이상의 폴리펩티드 또는 인자를 암호화하며, 각각 독립적으로 조절 요소에 의해 제어되거나 모두가 다중-시스트론 발현 시스템으로 제어된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드가 제1 및 제2 핵산 서열을 함유하는 것과 같이 각각의 상이한 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 코딩 서열이 동일하거나 상이할 수 있는 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 핵산 분자가 2 개 이상의 상이한 폴리펩티드 사슬의 발현을 구동하는 프로모터를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 핵산 분자는 다중 시스트론(이중 시스트론 또는 삼중 시스트론, 예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 6,060,273] 참조)일 수 있다. 일부 구현예에서, 전사 단위가, 단일 프로모터 유래 메시지에 의한 유전자 생성물의 공발현을 허용하는 IRES(내부 리보솜 진입 부위)를 함유하는 이중 시스트론 단위로 조작될 수 있다. 대안적으로, 일부 경우에, 단일 프로모터가, 여기 기재된 바와 같은 자가 절단 펩티드(예를 들어, 2A 서열) 또는 프로테아제 인식 부위(예를 들어, 푸린)를 암호화하는 서열에 의해 서로 분리된, 2 개 또는 3 개의 폴리펩티드를 단일 개방형 판독 프레임(ORF)으로 함유하는 RNA의 발현을 지시할 수 있다. 따라서, ORF는 번역 중(2A의 경우) 또는 후에 개별 단백질로 프로세싱되는 단일 폴리펩티드를 암호화한다. 일부 구현예에서, “탠덤 카세트(tandem cassette)”는 프로모터가 없는 서열을 포함하는 카세트의 제1 구성 요소 뒤에 전사 종료 서열 및 자율 발현 카세트 또는 다중-시스트론 발현 서열을 암호화하는 제2 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 탠덤 카세트는 2 개 이상의 상이한 폴리펩티드 또는 인자, 예를 들어 재조합 수용체의 2 개 이상의 사슬 또는 도메인을 암호화한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체의 2 개 이상의 사슬 또는 도메인을 암호화하는 핵산 서열이 하나의 표적 DNA 통합 부위 내로 탠덤 발현 카세트 또는 이중- 또는 다중-시스트론 카세트로 도입된다.

[0669] 일부 경우에, T2A와 같은 다중 시스트론 요소가, 2A 요소의 C-말단에서 펩티드 결합의 합성을 리보솜이 건너뛰도록(리보솜 건너뛰기) 유발할 수 있어서, 2A 서열의 말단과 다음 펩티드 하류 사이의 분리로 이어진다(예를 들어, 문헌[de Felipe, *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) 및 de Felipe et al. *Traffic* 5:616-626 (2004)] 참조; 자가-절단 요소로도 지칭됨). 상기는 삽입된 전이 유전자가 통합 부위의 내인성 프로모터, 예컨대 *TGFBR2* 프로모터의 전사에 의해 제어되는 것을 허용한다. 예시적인 다중 시스트론 요소는, 문헌[미국 특허 공개 번호 20070116690]에 기재된 바와 같은 구체역 바이러스(F2A, 예를 들어, 서열번호: 21), 말 비염 A 바이러스(E2A, 예를 들어, 서열번호: 20), 토세아 아시그나 바이러스(T2A, 예를 들어, 서열번호: 6 또는 17) 및 돼지 테스코 바이러스-1(P2A, 예를 들어, 서열번호: 18 또는 19) 유래 2A 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 전이 유전자, 예를 들어, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산의 상류에 P2A 리보솜 건너뛰기 요소(서열 번호: 18 또는 19에 제시된 서열)를 포함한다.

[0670] 일부 구현예에서, 재조합 수용체 또는 이의 일부의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 전이 유전자 및/또는 추가

분자를 암호화하는 서열은 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)를 독립적으로 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열 및/또는 추가 분자를 암호화하는 서열의 상류에 존재한다. 일부 구현예에서, 다중 시스트론 요소(들)는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열 및/또는 추가 분자를 암호화하는 서열 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, 다중 시스트론 요소(들)는 재조합 수용체의 일부 또는 사슬을 암호화하는 핵산 서열 사이에 위치한다.

[0671] 일부 구현예에서, 이종 조절 또는 제어 요소는 이종 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 이종 프로모터는 구성 프로모터, 유도 가능 프로모터, 억제 가능 프로모터 및/또는 조직 특이적 프로모터 중에서 선택된다. 일부 구현예에서, 조절 또는 제어 요소는, 프로모터 및/또는 인핸서, 예를 들어 구성 프로모터 또는 유도 가능 또는 조직 특이적 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터가 RNA pol I, pol II 또는 pol III 프로모터 중에서 선택된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 RNA 중합효소 II(예를 들어, CMV, SV40 초기 영역 또는 아데노바이러스 주요 후기 프로모터)에 의해 인식된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 RNA 중합효소 III(예를 들어, U6 또는 H1 프로모터)에 의해 인식된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 구성 프로모터이거나 이를 포함한다. 예시적인 구성 프로모터는, 예를 들어 시미안 바이러스 40 초기 프로모터(SV40), 사이토메갈로바이러스 초기 직후 프로모터(CMV), 인간 유비퀴틴 C 프로모터(UBC), 인간 신장 인자 1 $\alpha$  프로모터(EF1 $\alpha$ ), 마우스 포스포글리세린산 키나제 1 프로모터(PGK) 및 CMV 초기 인핸서와 결합된 닭  $\beta$ -액틴 프로모터(CAGG)를 포함한다. 일부 구현예에서, 이종 프로모터는 인간 신장 인자 1 알파(EF1 $\alpha$ ) 프로모터 또는 MND 프로모터 또는 이의 변이체이거나 이를 포함한다.

[0672] 일부 구현예에서, 프로모터는 조절 프로모터(예를 들어, 유도 가능 프로모터)이다. 일부 구현예에서, 프로모터가 유도 가능 프로모터 또는 억제 가능 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 Lac 오퍼레이터 서열, 테트라사이클린 오퍼레이터 서열, 갈락토오스 오퍼레이터 서열, 독시사이클린 오퍼레이터 서열 또는 형질 전환 성장 인자 베타(transforming growth factor beta, TGF $\beta$ ) 반응 요소를 포함하거나 이의 유사체이거나 Lac 억제제 또는 테트라사이클린 억제제 또는 TGF $\beta$  반응 전사 인자 또는 이의 유사물과 결합 또는 이에 의해 인식될 수 있다. 예시적인 TGF $\beta$  반응 요소는, 예를 들어 문헌[Mostert et al., (2001) Eur. J. Biochem 268:6176-6181; Denissova et al., (2000) Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 6;97(12):6397-402; Riccio et al., (1992) Mol. Cell. Boil. 12(4):1846-1855; 및 Boon et al., (2007) Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology 27:532-539]에 기재된 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 조직 특이적 프로모터이다. 일부 경우에, 프로모터는 특정 세포 유형에서만 발현된다(예를 들어, T 세포 또는 B 세포 또는 NK 세포 특이적 프로모터).

[0673] 일부 구현예에서, 프로모터는 구성 프로모터이거나 이를 포함한다. 예시적인 구성 프로모터는, 예를 들어 시미안 바이러스 40 초기 프로모터(SV40), 사이토메갈로바이러스 초기 직후 프로모터(CMV), 인간 유비퀴틴 C 프로모터(UBC), 인간 신장 인자 1 $\alpha$  프로모터(EF1 $\alpha$ ), 마우스 포스포글리세린산 키나제 1 프로모터(PGK) 및 CMV 초기 인핸서와 결합된 닭  $\beta$ -액틴 프로모터(CAGG)를 포함한다. 일부 구현예에서, 구성 프로모터는 합성 또는 변형된 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 MND 프로모터, 골수 증식 육종 바이러스 인핸서를 갖는 변형된 MoMuLV LTR의 U3 영역을 함유하는 합성 프로모터이거나 이를 포함한다(문헌[Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755] 참조). 일부 구현예에서, 프로모터는 조직 특이적 프로모터이다. 일부 경우에, 프로모터는 특정 세포 유형에서만 발현을 구동한다(예를 들어, T 세포 또는 B 세포 또는 NK 세포 특이적 프로모터).

[0674] 일부 구현예에서, 프로모터는 바이러스 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 비-바이러스 프로모터이다. 일부 경우에, 프로모터는 인간 신장 인자 1 알파(EF1 $\alpha$ ) 프로모터(예컨대 서열 번호: 77 또는 118에 제시됨) 또는 이의 변형된 형태(HTLV1 인핸서를 갖는 EF1 $\alpha$  프로모터; 예컨대 서열 번호: 119에 제시됨) 또는 MND 프로모터(예컨대 서열 번호: 186에 제시됨) 중에서 선택된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 이종 또는 외인성 조절 요소, 예를 들어, 프로모터를 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 프로모터는 양방향 프로모터이다(예를 들어, 국제 출원 WO2016/022994 참조).

[0675] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은 스플라이스 수용체 서열을 또한 포함할 수 있다. 예시적인 공지된 스플라이스 수용체 부위 서열은, 예를 들어, CTGACCTCTCTCTCTCCACAG(서열 번호: 78, 인간 HBB 유전자 유래) 및 TTTCTCTCCACAG(서열 번호: 79, 인간 IgG 유전자 유래)를 포함한다.

[0676] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은 전사 종료 및/또는 폴리아데닐화 신호에 필요한 서열을 또한 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 예시적인 폴리아데닐화 신호는 SV40, hGH, BGH, 및 rbGlob 전사 종료 신호 및/또는 폴리아데닐화 신호에서 선택된다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는 SV40 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 내에 존재할 경우, 전사 종료 신호 및/또는 폴리아데닐화 신호는 전이 유전자 내 최대 3'

서열에 전형적으로 존재하고, 상동성 암 중 하나에 연결된다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열은 3' UTR 또는 전사 종결자를 암호화하는 서열을 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내로 전이 유전자의 통합 시, 전이 유전자가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 3' UTR 및/또는 전사 종결자의 상류에서 통합되어, 재조합 수용체를 암호화하는 메시지가 예를 들어, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 또는 이의 부분 서열 유래 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 3' UTR을 함유한다. 따라서, 일부 구현예에서, 재조합 수용체의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열의 통합 시, 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 3' UTR, 전사 종결자 및/또는 기타 조절 요소의 제어 하에 작동 가능하게 연결된다.

[0677] (vi) 예시적인 전이 유전자 서열

[0678] 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자는 5'에서 3' 순서로: 막관통 도메인(또는 막 결합 도메인) 및 세포 내 영역을 각각 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자는 5'에서 3' 순서로: 세포 외 영역, 막관통 도메인 및 세포 내 영역을 각각 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0679] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 CAR이고, 예시적인 전이 유전자 서열은 5'에서 3' 방향으로: 신호 펩티드, 세포 외 결합 도메인, 스페이서, 막관통 도메인 및 1차 신호 전달 도메인 또는 영역 및/또는 공자극 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 내 영역을 각각 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자 서열은 5'에서 3' 방향으로: 신호 펩티드, 세포 외 결합 도메인, 스페이서, 막관통 도메인 및 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인을 각각 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자 서열은 5'에서 3' 방향으로: 신호 펩티드, 세포 외 결합 도메인, 스페이서, 막관통 도메인 및 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인 및 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 각각 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0680] 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자 서열은 5'에서 3' 방향으로: 막관통 도메인(또는 막 결합 도메인), 세포 내 다량체화 도메인, 선택적으로 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들) 및 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 각각 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자 서열은 5'에서 3' 방향으로: 세포 외 다량체화 도메인, 막관통 도메인, 선택적으로 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들) 및 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 각각 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0681] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은, 세포 외 결합 도메인, 선택적으로 scFv; 선택적으로 인간 면역 글로불린 힌지, 선택적으로 IgG1, IgG2 또는 IgG4 또는 이의 변형된 버전 유래 서열을 포함하고, 선택적으로 C<sub>H</sub>2 영역 및/또는 C<sub>H</sub>3 영역을 더 포함하는, 스페이서; 및 선택적으로 인간 CD28 유래 막관통 도메인; 선택적으로 인간 4-1BB 유래 공자극 신호 전달 도메인; 및 세포 내 신호 전달 영역, 선택적으로 CD3ζ 사슬 또는 이의 일부;를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 순서로 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체의 암호화된 세포 내 영역은 N 말단에서 C 말단 순서로: 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들) 및 예컨대 CD3제타 사슬 또는 이의 단편을 함유하는 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 포함한다.

[0682] 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자는 5'에서 3' 순서로: 막관통 도메인(또는 막 결합 도메인) 및 세포 내 영역을 각각 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자는 5'에서 3' 순서로: 세포 외 영역, 막관통 도메인 및 세포 내 영역을 각각 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0683] 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자 서열은 TCR α 사슬의 전부 또는 일부를 암호화한다. 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자 서열은 TCR β 사슬의 전부 또는 일부를 암호화한다. 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자 서열은 TCR α 사슬 및 TCR β 사슬 둘 다의 전부 또는 일부를 암호화한다. 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(TCR)이고, 예시적인 전이 유전자는 5'에서 3' 순서로 [TCR β 사슬]-[링커 또는 다중 시스트론 요소]-[TCR α 사슬]을 포함한다. 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 재조합 TCR이고, 예시적인 전이 유전자는 5'에서 3' 순서로 [TCR α 사슬]-[링커 또는 다중 시스트론 요소]-[TCR β 사슬]을 포함한다.

[0684] 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자 서열은, 신호 펩티드 및/또는 세포 외 영역을 암호화하는 서열의 5'에 배치된 다중 시스트론 요소, 예를 들어 2A 요소 또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 및/또는 조절 또는 제어 요소, 예를 들어 프로모터를 또한 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자 서열은 추가 서열, 예를 들어 하나 이상의 추가 분자, 예컨대 마커, 추가 재조합 수용체, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 면역 조절 분자, 리간드, 사이토카인 또는 케모카인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 또한 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 하나 이상의 기타 분자를 암호화하는 서열 및 재조합 수용체의 영역 또는 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드

드 서열이 조절 서열, 예컨대 2A 리보솜 건너뛰기 요소 및/또는 프로모터 서열에 의해 분리된다. 일부 측면에서, 예시적인 전이 유전자에서, 하나 이상의 추가 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 신호 펩티드 및/또는 세포 외 영역을 암호화하는 서열의 5'에 배치된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이, 다중 시스트론 요소 및/또는 조절 또는 제어 요소와 재조합 수용체의 영역 또는 도메인을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 배치된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열이 2 개의 요소 및/또는 조절 또는 제어 요소 사이에 배치된다. 일부 구현예에서, 예시적인 전이 유전자 서열은 5'에서 3' 방향으로: 다중 시스트론 요소 및/또는 조절 요소, 추가 분자를 암호화하는 뉴클레오티드 서열, 다중 시스트론 요소 및/또는 조절 요소, 신호 펩티드, 재조합 수용체의 영역 또는 도메인(예를 들어, 세포 외 영역, 막관통 도메인, 세포 내 영역)을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0685] b. 상동성 암(homology arm)

[0686] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, 재조합 수용체의 하나 이상의 사슬 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열에 연결되거나 이를 둘러싼 5' 및/또는 3' 말단 상에 하나 이상의 상동성 서열(“상동성 암(homology arm)”으로도 명명)을 함유한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 상동성 암은 5' 및/또는 3' 상동성 암을 포함한다. 상동성 암이 DNA 수선 메카니즘, 예를 들어 상동성 재조합 기구가 상동성을 인식하고 수선을 위한 주형으로 주형 폴리뉴클레오티드를 사용하는 것을 허용하고, 상동성 암 사이 핵산 서열이 수선될 DNA 내로 카피되어, 상동성의 위치 사이 게놈에서 통합의 표적 부위 내로 전이 유전자 서열을 효과적으로 삽입 또는 통합한다.

[0687] 일부 측면에서, 전이 유전자 서열의 통합 시, 전체 재조합 수용체가 전이 유전자 서열에 의해 암호화되고, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 전체 코딩 서열 또는 코딩 서열 중 일부가 결실된다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열은, 하나 이상의 상동성 암(들)에 포함된 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 엑손과 인-프레임인 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 전체 재조합 수용체가 전이 유전자 서열에 의해 암호화되고, *TGFBR2* 유전자 좌의 일부만이 결실되고, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 나머지 부분이 발현된다. 일부 측면에서, 발현된 *TGFBR2* 유전자 좌의 나머지 부분이, 일부 경우에 *TGFBRII*의 우성 음성 형태를 암호화한다.

[0688] 일부 구현예에서, 상동성 암 서열이 유전자 파괴, 예를 들어 *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위를 둘러싼 게놈 서열에 대해 상동성인 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, [5' 상동성 암]-[전이 유전자 서열(예를 들어, 재조합 수용체의 하나 이상의 사슬 또는 이의 일부를 암호화하는 외인성 또는 이중 핵산 서열)]-[3' 상동성 암] 구성 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 5' 상동성 암 서열은 5' 쪽 유전자 파괴 근처에 위치한 서열에 상동성인 인접 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' 상동성 암 서열은 3' 쪽 유전자 파괴 근처에 위치한 서열에 상동성인 인접 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 표적 부위는, *TGFBR2* 유전자 좌 내 특정 부위를 표적화하는 유전자 파괴를 도입할 수 있는 하나 이상의 제제(들), 예를 들어 Cas9 및 gRNA의 표적화에 의해 결정된다.

[0689] 일부 측면에서, 주형 폴리뉴클레오티드 내의 전이 유전자가 사용되어 표적 부위 및/또는 상동성 암의 위치를 안내할 수 있다. 일부 측면에서, 유전자 파괴의 표적 부위가 가이드로서 사용되어 HDR을 위해 사용되는 주형 폴리뉴클레오티드 및/또는 상동성 암을 설계할 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴가 전이 유전자 서열의 표적화된 통합의 바람직한 부위 근처에서 표적화될 수 있다. 일부 측면에서, 상동성 암이 설계되어 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 내에서 통합이 표적화되고, 상동성 암 서열이 유전자 파괴를 둘러싼 엑손 및 인트론 서열을 포함한 유전자 파괴를 둘러싼 바람직한 통합 위치에 근거하여 결정된다. 일부 구현예에서, 표적 부위의 위치, 하나 이상의 상동성 암(들)의 상대적 위치 및 삽입을 위한 전이 유전자(외인성 핵산 서열)가, 효율적인 표적화를 위한 요건 및 사용될 수 있는 주형 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 길이에 따라 설계될 수 있다. 일부 측면에서, 상동성 암이 설계되어 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 인트론 내에서 통합이 표적화된다. 일부 측면에서, 상동성 암이 설계되어 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 내에서 통합이 표적화된다.

[0690] 일부 측면에서, *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 통합 부위(표적화된 통합을 위한 부위)가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 내에 위치된다. 일부 구현예에서, 표적 통합 부위가 여기, 예를 들어 섹션 I.A에 기재된 임의의 표적 부위 또는 근처에 존재한다. 일부 측면에서, 통합을 위한 표적 위치가 유전자 파괴를 위한 표적 부위 또는 주변, 예를 들어 유전자 파괴를 위한 표적 부위의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내에 존재한다.

[0691] 일부 측면에서, 표적 통합 부위가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 내에 있다. 일부 측면

에서, 표적 통합 부위가 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 인트론 내에 있다. 일부 측면에서, 표적 통합 부위가 *TGFBR2* 유전자 좌의 조절 또는 제어 요소, 예를 들어, 프로모터 내에 존재한다. 일부 구현예에서, 표적 통합 부위가, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 초기 코딩 영역에 대응하는 엑손, 예를 들어 엑손 1, 2, 3, 4 또는 5 내 또는 이와 매우 근접하여 존재하거나 또는 (여기 표 1 또는 2에 기재된 바와 같은) 엑손 1, 2, 3, 4 또는 5 내 또는 엑손 1, 2, 3, 4 또는 5의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내의 전사 시작 부위 직후 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 통합이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 2에 또는 엑손 2 근처, 또는 엑손 2의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내에 존재한다. 일부 측면에서, 표적 통합 부위가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 1 또는 엑손 1 근처, 예를 들어 엑손 1의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내에 존재한다. 일부 구현예에서, 표적 통합 부위가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 2 또는 엑손 2 근처, 또는 엑손 2의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내에 존재한다. 일부 측면에서, 표적 통합 부위가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 3 또는 엑손 3 근처, 예를 들어 엑손 3의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내에 존재한다. 일부 측면에서, 표적 통합 부위가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 4 또는 엑손 4 근처, 예를 들어 엑손 4의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내에 존재한다. 일부 측면에서, 표적 통합 부위가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 5 또는 엑손 5 근처, 예를 들어 엑손 5의 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100 또는 50 bp 미만 이내에 존재한다. 일부 측면에서, 표적 통합 부위가 *TGFBR2* 유전자 좌의 조절 또는 제어 요소, 예를 들어, 프로모터 내에 존재한다.

[0692] 일부 구현예에서, 5' 상동성 암 서열이, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 표적 부위 근처에서 시작하여 유전자 파괴를 위한 표적 부위의 5'에서 약 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 또는 5000 개 염기 쌍의 인접 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 3' 상동성 암 서열이, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 표적 부위 근처에서 시작하여 유전자 파괴를 위한 표적 부위의 3'에서 약 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 또는 5000 개 염기 쌍의 인접 서열을 포함한다. 따라서, HDR을 통한 통합 시, 전이 유전자 서열이 유전자 파괴를 위한 표적 부위, 예를 들어 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 엑손 또는 인트론 내 표적 부위 또는 근처에서 통합을 위해 표적화된다.

[0693] 일부 측면에서, 상동성 암이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 서열의 일부에 상동성인 서열을 함유한다. 일부 측면에서, 상동성 암 서열이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 엑손 및 인트론을 포함한 개방형 판독 프레임 서열의 인접한 부분에 상동성인 서열을 함유한다. 일부 측면에서, 상동성 암이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 엑손 및 인트론을 포함한 개방형 판독 프레임 서열의 인접한 부분과 동일한 서열을 함유한다.

[0694] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌(여기 표 1 또는 2에 기재된 예시적인 게놈 유전자 좌 서열; 서열 번호: 61, NCBI 참조 서열: NM\_003242.5 또는 서열 번호: 62, NCBI 참조 서열: NM\_001024847.2에 제시된 예시적인 인간 *TGFBRII* mRNA 서열)에서 전이 유전자 서열의 통합을 표적화하기 위한 상동성 암을 함유한다. 일부 구현예에서, 유전자 파괴가 유전자 파괴를 위한 임의의 체제, 예를 들어 여기 기재된 표적화된 뉴클레아제 및/또는 gRNA를 사용하여 도입된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적화된 뉴클레아제 및/또는 gRNA에 의해 도입된 유전자 파괴의 양쪽에 약 500 내지 1000, 예를 들어, 500 내지 900 또는 600 내지 700 개의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는, *TGFBR2* 유전자 좌에서 유전자 파괴의 5' 서열 중 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000 개 염기 쌍에 상동성인 약 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000 개 염기 쌍의 5' 상동성 암 서열, 전이 유전자 및 *TGFBR2* 유전자 좌에서 유전자 파괴의 3' 서열 중 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000 개 염기 쌍에 상동성인 약 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000 개 염기 쌍의 3' 상동성 암 서열을 포함한다.

[0695] 일부 측면에서, 전이 유전자 및 하나 이상의 상동성 암 서열 사이 경계가, HDR 및 전이 유전자 서열의 표적화된 통합 시, 재조합 수용체의 하나 이상의 폴리펩티드, 예를 들어 사슬(들), 도메인(들) 또는 영역(들)을 암호화하는 전이 유전자 내 서열이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 서열의 하나 이상의 엑손과 인-프레임으로 통합되고/거나 폴리펩티드 및 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 서열의 하나 이상의 엑손을 암호화하는 전이 유전자의 인-프레임 융합을 생성하도록 설계된다. 일부 구현예에서, *TGFBRII* 폴리펩티드의 우성 음성(DN) 형태가, 내인성 개방형 판독 프레임의 핵산 서열에 의해 암호화되고, 재조합 수용체 또는 이의 일부의 폴리펩티드가 선택적으로 다중 시스트론, 예컨대 2A 요소에 의해 분리된 통합된 전이 유전자 서열에 의해 암호화된다.

[0696] 일부 구현예에서, 하나 이상의 상동성 암 서열이, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 서열 내에 있

는 표적 부위를 둘러싸거나 측면 배치된 서열에 상동성, 실질적으로 동일하거나 동일한 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 상동성 암 서열이, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 개방형 판독 프레임의 부분 서열의 인트론 및 엑손을 함유한다. 일부 측면에서, 5' 상동성 암 서열 및 전이 유전자의 경계가, 이중 프로모터를 함유하지 않는 전이 유전자의 경우, 전이 유전자 서열의 코딩 부분이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 상류 엑손 또는 이의 일부, 예를 들어 표적화된 통합의 위치에 따라 엑손 1, 2, 3, 4 또는 5와 인-프레임으로 융합되도록 존재한다.

[0697] 일부 측면에서, 5' 상동성 암 서열 및 전이 유전자의 경계가, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 상류 엑손 또는 이의 일부, 예를 들어 엑손 1, 2, 3, 4 또는 5가 전이 유전자 서열의 코딩 부분과 인-프레임으로 융합되도록 존재한다. 따라서, 표적화된 통합, 전사 및 번역 시, 인접한 폴리펩티드인 암호화된 재조합 수용체가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 서열 및 전이 유전자의 융합 DNA 서열로부터 생성된다. 일부 측면에서, 상류 엑손 또는 이의 일부가 *TGFBRII* 폴리펩티드의 우성 음성 형태를 암호화한다. 일부 측면에서, 표적화된 통합 시, 다중 시스트론 요소, 예를 들어 2A 요소 또는 내부 리보솜 진입 부위(IRES)가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 서열 및 재조합 수용체를 암호화하는 전이 유전자 서열을 분리한다. 일부 측면에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌로부터 발현 및 번역될 경우, 폴리펩티드가 절단되어 *TGFBRII* 폴리펩티드의 우성 음성 형태 및 재조합 수용체가 생성된다.

[0698] 일부 구현예에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 통합을 표적화하기 위한 예시적인 5' 상동성 암은, 서열 번호: 69-71에 제시된 서열 또는 서열 번호: 69-71 또는 이의 부분 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 전이 유전자의 통합을 표적화하고 우성 음성 *TGFBRII*를 암호화하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 생성하기 위한 예시적인 5' 상동성 암은, 서열 번호: 70에 제시된 서열 또는 서열 번호: 70 또는 이의 부분 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0699] 일부 구현예에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 통합을 표적화하기 위한 예시적인 3' 상동성 암은, 서열 번호: 72에 제시된 서열 또는 서열 번호: 72 또는 이의 부분 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0700] 일부 측면에서, 표적 부위가 상동성 암의 상대적인 위치 및 서열을 결정할 수 있다. 상동성 암은, 예를 들어, 절제된 단일 가닥 오버행이 주형 폴리 뉴클레오티드 내에서 상보성 영역을 찾는 것을 허용하도록 유전자 파괴, 예를 들어 DSB가 도입된 후 적어도 DNA 수선 메커니즘에 의한 말단 절제가 발생할 수 있는 영역까지 멀리 전형적으로 확장될 수 있다. 전체 길이가 플라스미드 크기 또는 바이러스 패키징 한계 또는 작제물 크기 제한과 같은 파라미터에 의해 제한될 수 있다.

[0701] 일부 구현예에서, 상동성 암은 내인성 유전자에서 표적 부위의 양쪽에 약 500 내지 1000, 예를 들어, 600 내지 900 또는 700 내지 800 개의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 상동성 암은 *TGFBR2* 유전자 좌에서 표적 부위의 5', 표적 부위의 3' 또는 표적 부위의 5' 및 3' 둘 다에 약 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 또는 1000 개 (이상) 또는 미만의 상동성 염기 쌍을 포함한다.

[0702] 일부 구현예에서, 상동성 암은 *TGFBR2* 유전자 좌에서 표적 부위의 3'에 (약) 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 또는 5000 개의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 상동성 암은 *TGFBR2* 유전자 좌에서 전이 유전자 및/또는 표적 부위의 3'에 (약) 100 내지 500, 200 내지 400 또는 250 내지 350 개의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 상동성 암은 *TGFBR2* 유전자 좌에서 표적 부위의 5'에 약 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15 또는 10 개 미만의 상동성 염기 쌍을 포함한다.

[0703] 일부 구현예에서, 상동성 암은 *TGFBR2* 유전자 좌에서 표적 부위의 5'에 (약) 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 또는 5000 개의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 상동성 암은 *TGFBR2* 유전자 좌에서 전이 유전자 및/또는 표적 부위의 5'에 (약) 100 내지 500, 200 내지 400 또는 250 내지 350 개의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 상동성 암은 *TGFBR2* 유전자 좌에서 표적 부위의 3'에 약 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 15, 또는 10 개 미만의 상동성 염기 쌍을 포함한다.

[0704] 일부 구현예에서, 5' 상동성 암의 3' 말단은 전이 유전자의 5' 말단 옆에 위치한다. 일부 구현예에서, 5' 상동

성 암은 전이 유전자의 5' 말단으로부터 (약) 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 또는 5000 개 이상의 5' 뉴클레오티드까지 확장될 수 있다.

[0705] 일부 구현예에서, 3' 상동성 암의 5' 말단은 전이 유전자의 3' 말단 옆에 위치한다. 일부 구현예에서, 3' 상동성 암은 전이 유전자의 3' 말단으로부터 (약) 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 또는 5000 개 이상의 3' 뉴클레오티드까지 확장될 수 있다.

[0706] 일부 구현예에서, 표적화된 삽입을 위해, 상동성 암, 예를 들어, 5' 및 3' 상동성 암은 가장 먼 표적 부위에 측면 배치된 서열 중 약 1000 개의 염기 쌍(bp)(예를 들어, 돌연변이의 양쪽에 1000 bp의 서열)을 각각 포함할 수 있다.

[0707] 예시적인 상동성 암 길이는 (약) 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000 또는 5000 개 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 상동성 암 길이는 (약) 50-100, 100-250, 250-500, 500-750, 750-1000, 1000-2000, 2000-3000, 3000-4000 또는 4000-5000 개의 뉴클레오티드이다. 예시적인 상동성 암 길이는 (약) 50, 100, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700, 750, 800, 900, 1000, 2000, 3000, 4000 또는 5000 개 (미만)의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 상동성 암 길이는 (약) 50-100, 100-250, 250-500, 500-750, 750-1000, 1000-2000, 2000-3000, 3000-4000 또는 4000-5000 개의 뉴클레오티드이다. 예시적인 상동성 암 길이는 (약) 100 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 300 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 200 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 300 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 750 뉴클레오티드 또는 750 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0708] 상기 임의의 구현예 중 일부에서, 전이 유전자는 복수의 T 세포 각각으로 도입된 주형 폴리뉴클레오티드에 의해 통합된다. 특정 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 [5' 상동성 암]-[전이 유전자]-[3' 상동성 암] 구조를 포함한다. 특정 구현예에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 (약) 하나 이상의 표적 부위 주변 핵산 서열에 상동성인 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 5' 상동성 암은 표적 부위의 5' 핵산 서열에 상동성인 핵산 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 3' 상동성 암은 표적 부위의 3' 핵산 서열에 상동성인 핵산 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 또는 2000 개 이상의 뉴클레오티드 또는 (약) 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 또는 2000 개 미만의 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 50 내지 (약) 100, 100 내지 (약) 250, 250 내지 (약) 500, 500 내지 (약) 750, 750 내지 (약) 1000, 1000 내지 (약) 2000 개의 뉴클레오티드이다. 상기 임의의 구현예 중 일부에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 50 내지 (약) 100 개의 뉴클레오티드 길이, (약) 100 내지 (약) 250 개의 뉴클레오티드 길이, (약) 250 내지 (약) 500 개의 뉴클레오티드 길이, (약) 500 내지 (약) 750 개의 뉴클레오티드 길이, (약) 750 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드 길이 또는 (약) 1000 내지 (약) 2000 개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0709] 특정 구현예에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 100 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 300 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 200 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 300 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 750 뉴클레오티드 또는 (약) 750 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드이다. 특정 구현예에서, 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 100 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 300 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 200 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 300 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 750 뉴클레오티드 또는 (약) 750 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드이다.

600 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 300 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 400 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 750 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 600 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 1000 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 750 뉴클레오티드 또는 (약) 750 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 구현예에서, 5' 상동성 압 및 3' 상동성 압은 독립적으로 (약) 200, 300, 400, 500, 600, 700 또는 800 개의 뉴클레오티드 길이 또는 상기 중 어느 하나 사이의 임의의 값이다. 일부 구현예에서, 5' 상동성 압 및 3' 상동성 압은 독립적으로 (약) 300 개의 뉴클레오티드 길이를 초과하고, 선택적으로 여기서 5' 상동성 압 및 3' 상동성 압은 독립적으로 (약) 400, 500 또는 600 개의 뉴클레오티드 길이이거나 또는 상기 중 어느 하나 사이의 임의의 값이다. 일부 구현예에서, 5' 상동성 압 및 3' 상동성 압은 독립적으로 (약) 300 개의 뉴클레오티드 길이를 초과한다.

[0710] 일부 구현예에서, 하나 이상의 상동성 압은 TGFBR1 또는 이의 단편을 암호화하는 서열에 상동성인 뉴클레오티드 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 상동성 압은 제조할 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열과 인-프레임으로 연결되거나 연관된다.

[0711] 일부 구현예에서, 대안적인 HDR이 이용된다. 일부 구현예에서, 대안적인 HDR은 주형 폴리뉴클레오티드가 표적 부위에 대해 5' 상동성이 (즉, 표적 부위 가닥의 5' 방향으로) 확장되었을 경우 보다 효율적으로 진행된다. 따라서, 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 보다 긴 상동성 압 및 보다 짧은 상동성 압을 가지며, 여기서 보다 긴 상동성 압이 표적 부위의 5'에 어닐링할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 부위에 대해 5'에서 어닐링할 수 있는 압은 표적 부위 또는 전이 유전자의 5' 또는 3' 말단으로부터 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, or 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 또는 5000 개 이상의 뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 표적 부위에 대해 5'에서 어닐링할 수 있는 압은, 표적 부위에 대해 3'에서 어닐링할 수 있는 압보다 10%, 20%, 30%, 40% 또는 50% 이상 더 길다. 일부 구현예에서, 표적 부위에 대해 5'에서 어닐링할 수 있는 압은, 표적 부위에 대해 3'에서 어닐링할 수 있는 압보다 2x, 3x, 4x 또는 5x 이상 더 길다. ssDNA 주형이 손상되지 않은 가닥 또는 표적화된 가닥에 어닐링할 수 있는지 여부에 따라, 표적 부위에 대해 5'에서 어닐링하는 상동성 압은 각각 ssDNA 주형의 5' 말단 또는 ssDNA 주형의 3' 말단에 존재할 수 있다.

[0712] 유사하게, 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 5' 상동성 압, 전이 유전자 및 3' 상동성 압을 가져서, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 부위의 5'에 대해 확장된 상동성을 함유한다. 예를 들어, 5' 상동성 압 및 3' 상동성 압이 실질적으로 동일한 길이일 수 있으나, 전이 유전자는 표적 부위의 3'보다 표적 부위의 5'에서 더 멀리 확장될 수 있다. 일부 구현예에서, 상동성 압이 표적 부위의 3' 말단보다 표적 부위의 5' 말단에 대해 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 2x, 3x, 4x 또는 5x 이상 더 확장된다.

[0713] 일부 구현예에서, 대안적인 HDR이 주형 폴리뉴클레오티드가 표적 부위 상에 집중될 경우 보다 효율적으로 진행된다. 따라서, 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 본질적으로 동일한 크기인 2 개의 상동성 압을 갖는다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드의 제1 상동성 압(예를 들어, 5' 상동성 압)이 주형 폴리뉴클레오티드의 제2 상동성 압(예를 들어, 3' 상동성 압)의 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% 또는 1% 이내의 길이를 가질 수 있다.

[0714] 유사하게, 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 5' 상동성 압, 전이 유전자 및 3' 상동성 압을 가져서, 주형 폴리뉴클레오티드가 표적 부위의 양쪽에서 실질적으로 동일한 거리까지 확장된다. 예를 들어, 상동성 압이 상이한 길이를 가질 수 있으나, 전이 유전자가 선택되어 이를 보상할 수 있다. 예를 들어, 전이 유전자가 표적 부위의 3'에서보다 표적 부위로부터 5'에서 더 멀리 확장될 수 있으나, 보상을 위해 표적 부위의 5' 상동성 압이 표적 부위의 3' 상동성 압보다 더 짧다. 반대로 가능하여, 예를 들어, 전이 유전자가 표적 부위의 5'에서보다 표적 부위로부터 3'에서 더 멀리 확장될 수 있으나, 보상을 위해 표적 부위의 3' 상동성 압이 표적 부위의 5' 상동성 압보다 더 짧다.

[0715] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열 및 하나 이상의 상동성 압을 포함한 주형 폴리뉴클레오티드의 길이가, (약) 1000 내지 약 20,000 염기 쌍, 예컨대 약 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000, 10000, 11000, 12000, 13000, 14000, 15000, 16000, 17000, 18000, 19000 또는 20000 개의 염기 쌍이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드의 길이가, 세포 내로 제조, 합성 또는 조립 및/또는 도입될 수 있는 폴리뉴클레오티드의 최대 길이 또는 바이러스 벡터의 용량 및 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 유형에 의해 제한된다. 일부 측면에서, 주형 폴리뉴클레오티드의 제한된 용량이 전이 유전자 및/또는 하나 이상의 상동성 압의 길이를 결정할 수 있다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열 및 하나 이상의 상동성 압의 조합된 총

길이가 폴리뉴클레오티드 또는 벡터의 최대 길이 또는 용량 내에 있어야 한다. 예를 들어, 일부 측면에서, 주형 폴리뉴클레오티드의 전이 유전자 부분이 약 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500 또는 4000 개의 염기 쌍이고, 주형 폴리뉴클레오티드의 최대 길이가 약 5000 개의 염기 쌍인 경우 서열의 나머지 부분이 하나 이상의 상동성 암 중에 나뉘어질 수 있어서, 예를 들어 3' 또는 5' 상동성 암이 약 500, 750, 1000, 1250, 1500, 1750 또는 2000 개의 염기 쌍일 수 있다.

[0716] **3. 주형 폴리뉴클레오티드 전달**

[0717] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 재조합 수용체의 하나 이상의 사슬(예를 들어, 여기 섹션 I.B.2에 기재됨)을 암호화하는 전이 유전자 서열을 함유하는 주형 폴리뉴클레오티드와 같은 폴리뉴클레오티드가 뉴클레오티드 형태, 예를 들어 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로 세포 내에 도입된다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드가 재조합 수용체의 하나 이상의 사슬 또는 이의 일부 및 하나 이상의 상동성 암을 암호화하는 전이 유전자를 함유하고, 전이 유전자 서열의 상동성 지시 수선(HDR) 매개 통합을 위해 세포 내로 도입될 수 있다.

[0718] 일부 측면에서, 제공된 구현예는 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들) 또는 이의 구성 요소 및 주형 폴리뉴클레오티드를 도입하여 전이 유전자 서열의 HDR 및 표적화된 통합을 유도함으로써 세포의 유전자 조작에 관한 것이다. 일부 측면에서, 하나 이상의 제제(들) 및 주형 폴리뉴클레오티드가 동시에 전달된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 제제(들) 및 주형 폴리뉴클레오티드가 순차적으로 전달된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 제제(들)가 폴리뉴클레오티드의 전달 전에 전달된다.

[0719] 일부 구현예에서, 표적화된 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제(들), 예를 들어, 뉴클레아제 및/또는 gRNA외에 조작을 위해 주형 폴리뉴클레오티드가 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드(들)가, 표적화된 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제(들)의 하나 이상의 구성요소가 세포 내로 도입되기 전, 동시에 또는 후에 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드(들)가 제제와 동시에 전달된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 제제 전에, 예를 들어 제제 전 1 내지 60 분(또는 그 사이의 임의의 시간), 제제 전 1 내지 24 시간(또는 그 사이의 임의의 시간) 또는 제제 전 24 시간 이상을 포함하나 이에 국한되지 않으면서 주형 폴리뉴클레오티드 전 수 초 내지 수 시간 내지 수 일에 전달된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가, 제제 후, 제제 전달 후 즉시, 예를 들어, 제제 전달 후 30 초 내지 4 시간, 예컨대 약 30 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 6 분, 6 분, 8 분, 9 분, 10 분, 15 분, 20 분, 30 분, 40 분, 50 분, 60 분, 90 분, 2 시간, 3 시간 또는 4 시간 및/또는 바람직하게는 제제 전달 후 4 시간 이내를 포함한, 주형 폴리뉴클레오티드 후 수 초 내지 수 시간 내지 수 일에 전달된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 제제 전달 후 4 시간 이상에 전달된다.

[0720] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 표적화된 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제(들), 예를 들어, 뉴클레아제 및/또는 gRNA와 동일한 전달 시스템을 사용하여 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 표적화된 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제(들), 예를 들어, 뉴클레아제 및/또는 gRNA와 상이한 전달 시스템을 사용하여 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 제제(들)와 동시에 전달된다. 다른 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 제제(들)의 전달 전 또는 후, 상이한 시간에 전달된다. 표적화된 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제(들), 예를 들어, 뉴클레아제 및/또는 gRNA로 핵산을 전달하기 위해 여기 섹션 I.A.3(예를 들어, 표 4 및 5)에 기재된 임의의 전달 방법이 사용되어 주형 폴리뉴클레오티드를 전달할 수 있다.

[0721] 일부 구현예에서, 하나 이상의 제제(들) 및 주형 폴리뉴클레오티드가 동일한 형식 또는 방법으로 전달된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 하나 이상의 제제(들) 및 주형 폴리뉴클레오티드가 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터에 둘 다 포함된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 Cas9 및 gRNA와 동일한 벡터 백본, 예를 들어, AAV 계통, 플라스미드 DNA 상에 암호화된다. 일부 측면에서, 하나 이상의 제제(들) 및 주형 폴리뉴클레오티드가 상이한 형식, 예를 들어 Cas9-gRNA 제제의 경우 리보핵산-단백질 복합체(RNP) 및 주형 폴리뉴클레오티드의 경우 선형 DNA이나 이들은 동일한 방법을 사용하여 전달된다.

[0722] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 선형 또는 원형 DNA 또는 선형 RNA와 같은 선형 또는 원형 핵산 분자이고, 핵산 분자를 세포 내로 전달하기 위해 여기 섹션 I.A.3에 기재된(예를 들어, 여기 표 4 및 5) 임의의 방법을 사용하여 전달될 수 있다.

[0723] 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 주형 폴리뉴클레오티드가, 예를 들어 비-바이러스 벡터로 또는 비-바이러스 벡터 내 뉴클레오티드 형태로 세포에 도입된다. 일부 구현예에서, 비-바이러스 벡터는, 예컨대 미

세 주입, 전기 천공, 일시적인 세포 압축 또는 압착(예컨대, 문헌[Lee, et al. (2012) *Nano Lett* 12: 6322-27]에 기재됨), 지질 매개 형질 감염, 펩티드 매개 전달, 예를 들어, 세포-침투 펩티드 또는 이의 조합물로 국한되지 않는, 유전자 전달을 위한 임의의 적합한 및/또는 공지된 비-바이러스 방법에 의한 형질 도입 및/또는 형질 감염에 적합한 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 비-바이러스 폴리뉴클레오티드가 여기 표 5에 열거된 비-바이러스 방법과 같이 여기에 기재된 비-바이러스 방법에 의해 세포 내로 전달된다.

[0724] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드 서열이 게놈 DNA의 관심 영역에 대해 상동성이 아닌 서열을 함유하는 벡터 분자에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스는 DNA 바이러스(예를 들어, dsDNA 또는 ssDNA 바이러스)이다. 일부 구현예에서, 바이러스는 RNA 바이러스(예를 들어, ssRNA 바이러스)이다. 예시적인 바이러스 벡터/바이러스는, 예를 들어, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스(AAV), 백시니아 바이러스, 폭스바이러스 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 또는 여기 다른 곳에 기재된 임의의 바이러스를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어 복제 기점, 프로모터 및 항생제 내성을 암호화하는 유전자와 같은 추가 서열을 갖는 벡터 분자의 일부로 세포에 도입될 수 있다. 또한, 주형 폴리뉴클레오티드가 있는 그대로의 핵산으로, 리포솜, 나노입자 또는 폴록사머와 같은 물질과 복합체를 이룬 핵산으로 도입될 수 있거나 또는 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스, AAV, 헤르페스바이러스, 레트로바이러스, 렌티바이러스 및 인테그라제 결함 렌티바이러스(integrase defective lentivirus, IDLV))에 의해 전달될 수 있다.

[0725] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 예를 들어, 시미안 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스(AAV)에서 유래된 벡터와 같은 재조합 감염성 바이러스 입자를 사용하여 세포 내로 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터, 예컨대 감마-레트로바이러스 벡터(예를 들어, 문헌[Koste et al. (2014) *Gene Therapy* 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25; Carlens et al. (2000) *Exp Hematol* 28(10): 1137-46; Alonso-Camino et al. (2013) *Mol Ther Nucl Acids* 2, e93; Park et al., *Trends Biotechnol.* 2011 November 29(11): 550-557] 참조) 또는 HIV-1 유래 렌티바이러스 벡터를 사용하여 T 세포 내로 전달된다.

[0726] 다른 측면에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 바이러스 및/또는 비-바이러스 유전자 전달 방법에 의해 전달된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 아데노 관련 바이러스(AAV)를 통해 세포로 전달된다. AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8 및 이들의 조합물을 포함하나 이에 국한되지 않는 임의의 AAV 벡터가 사용될 수 있다. 일부 경우에, AAV는 캡시드 혈청형과 비교하여 이중 혈청형의 LTR을 포함한다(예를 들어, AAV5, AAV6 또는 AAV8 캡시드를 갖는 AAV2 ITR). 주형 폴리뉴클레오티드가 뉴클레아제 전달에 사용된 것과 동일한 유전자 전달 시스템(동일한 벡터 포함)을 사용하여 전달될 수 있거나 뉴클레아제에 대해 사용된 상이한 전달 시스템을 사용하여 전달될 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 바이러스 벡터(예를 들어, AAV)를 사용하여 전달되고, 뉴클레아제(들)는 mRNA 형태로 전달된다. 세포가, (예를 들어, 뉴클레아제(들) 및/또는 주형 폴리뉴클레오티드를 운반하는) 바이러스 벡터를 전달하기 전, 동시에 및/또는 후에 여기 기재된 바와 같이 세포 표면 수용체에 바이러스 벡터의 결합을 억제하는 하나 이상의 분자로 또한 처리될 수 있다.

[0727] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는, 긴 말단 반복 서열(long terminal repeat sequence, LTR), 예를 들어, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스(Moloney murine leukemia virus, MoMLV), 골수 증식육종 바이러스(myeloproliferative sarcoma virus, MPSV), 뮤린 배아 줄기 세포 바이러스(murine embryonic stem cell virus, MESV), 뮤린 줄기 세포 바이러스(murine stem cell virus, MSCV) 또는 비장 초점 형성 바이러스(spleen focus forming virus, SFFV)에서 유래된 재조합 레트로바이러스 벡터를 갖는다. 대부분의 레트로바이러스 벡터는 뮤린 레트로바이러스에서 유래된다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 임의의 조류 또는 포유류 세포 출처에서 유래된 것을 포함한다. 레트로바이러스는 전형적으로 인간을 포함하여 몇몇 종의 숙주 세포를 감염시킬 수 있음을 의미하는, 암포트로픽(amphotropic)이다. 일 구현예에서, 발현될 유전자가 레트로바이러스의 gag, pol 및/또는 env 서열을 대체한다. 다수의 예시적인 레트로바이러스 시스템이 문헌[예를 들어, 미국 특허 번호 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; Miller and Rosman (1989) *BioTechniques* 7:980-990; Miller, A. D. (1990) *Human Gene Therapy* 1:5-14; Scarpa et al. (1991) *Virology* 180:849-852; Burns et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8033-8037; 및 Boris-Lawrie and Temin (1993) *Cur. Opin. Genet. Develop.* 3:102-109]에 기재되었다.

[0728] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 AAV 벡터를 사용하여 전달되고, 표적화된 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제(들), 예컨대, 뉴클레아제 및/또는 gRNA가 상이한 형태, 예컨대, 뉴클레아제 및/또는 gRNA를 암호화하는 mRNA로 전달된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드 및 뉴클레아제가, 바이러스 벡터와 같이 동일한

유형의 방법이나 별개의 벡터를 사용하여 전달된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제, 예컨대 뉴클레아제 및/또는 gRNA와 상이한 전달 시스템으로 전달된다. 전달을 위한 유형 또는 핵산 및 벡터는 여기 섹션 III에 기재된 것 중 어느 하나를 포함한다.

[0729] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드 및 뉴클레아제가 동일한 벡터, 예를 들어 AAV 벡터(예컨대, AAV6) 상에 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 AAV 벡터를 사용하여 전달되고, 표적화된 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제(들), 예컨대, 뉴클레아제 및/또는 gRNA가 상이한 형태, 예컨대, 뉴클레아제 및/또는 gRNA를 암호화하는 mRNA로 전달된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드 및 뉴클레아제가, 바이러스 벡터와 같이 동일한 유형의 방법이나 별개의 벡터를 사용하여 전달된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제, 예컨대 뉴클레아제 및/또는 gRNA와 상이한 전달 시스템으로 전달된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 생체 내에서, 예컨대 gRNA 인식 서열에 의해 측면 배치된 벡터 백본으로부터 절제된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 Cas9 및 gRNA와 별도의 폴리뉴클레오티드 분자 상에 있다. 일부 구현예에서, Cas9 및 gRNA가 리보핵산단백질(RNP) 복합체의 형태로 도입되고, 주형 폴리뉴클레오티드가 폴리뉴클레오티드 분자, 예컨대 벡터 또는 선형 핵산 분자, 예컨대 선형 DNA로 도입된다. 전달을 위한 유형 또는 핵산 및 벡터는 여기 섹션 II에 기재된 것 중 어느 하나를 포함한다.

[0730] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 아테노바이러스 벡터, 예를 들어 AAV 벡터, 예를 들어 AAV 캡시드 내 패키징이 허용되는 길이 및 서열의 ssDNA 분자이다. 벡터는 예를 들어 5kb 미만일 수 있으며, 캡시드 내로 패키징을 촉진하는 ITR 서열을 함유할 수 있다. 벡터는 통합 결함(integration-deficient)일 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 전이 유전자 및/또는 표적 부위의 양쪽에 약 150 내지 1000 개의 상동성 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5', 표적 부위 또는 전이 유전자의 3' 또는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5' 및 3' 둘 다에 약 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 또는 2000 개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5', 표적 부위 또는 전이 유전자의 3' 또는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5' 및 3' 둘 다에 약 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 또는 2000 개 이상의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5', 표적 부위 또는 전이 유전자의 3' 또는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5' 및 3' 둘 다에 최대 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 또는 2000 개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0731] 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 렌티바이러스 벡터, 예를 들어 IDLV(integration deficiency lentivirus, 통합 결함 렌티바이러스)이다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 전이 유전자 및/또는 표적 부위의 양쪽에 약 500 내지 1000 개의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5', 표적 부위 또는 전이 유전자의 3' 또는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5' 및 3' 둘 다에 약 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 또는 2000 개의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5', 표적 부위 또는 전이 유전자의 3' 또는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5' 및 3' 둘 다에 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 또는 2000 개 이상의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5', 표적 부위 또는 전이 유전자의 3' 또는 표적 부위 또는 전이 유전자의 5' 및 3' 둘 다에 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500 또는 2000 개 이내의 상동성 염기 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 Cas9가 주형 폴리뉴클레오티드를 인식하고 절단하는 것을 방지하는 하나 이상의 돌연변이, 예를 들어 침묵 돌연변이를 포함한다. 주형 폴리뉴클레오티드가, 예를 들어, 변경될 세포의 게놈 내 대응하는 서열에 관해 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 또는 30 개 이상의 침묵 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 변경될 세포의 게놈 내 대응하는 서열에 관해 최대 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 또는 50 개의 침묵 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, cDNA가 Cas9가 주형 폴리뉴클레오티드를 인식하고 절단하는 것을 방지하는 하나 이상의 돌연변이, 예를 들어 침묵 돌연변이를 포함한다. 주형 폴리뉴클레오티드가, 예를 들어, 변경될 세포의 게놈 내 대응하는 서열에 관해 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 또는 30 개 이상의 침묵 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 변경될 세포의 게놈 내 대응하는 서열에 관해 최대 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 또는 50 개의 침묵 돌연변이를 포함한다.

[0732] 여기에 기재된 이중 가닥 주형 폴리뉴클레오티드가 하나 이상의 비-천연 염기 및/또는 백본을 포함할 수 있다. 특히, 메틸화된 시토신을 갖는 주형 폴리뉴클레오티드의 삽입이 여기 기재된 방법을 사용하여 수행되어 관심 영역에서 전사 정지 상태를 달성할 수 있다.

[0733] II. 핵산, 벡터 및 전달

[0734] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예컨대 재조합 수용체의 하나 이상의 사슬 또는 이의 일부를 암호화하는 주형 폴리뉴클레오티드와 같은 폴리뉴클레오티드가 뉴클레오티드 형태, 예컨대 폴리뉴클레오티드 또는 벡터로 세포 내에 도입된다. 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드가 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자를 함유한다. 특정 구현예에서, 유전자 파괴를 위한 하나 이상의 제제(들) 또는 구성 요소가 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터와 같은 핵산 형태로 세포 내에 전달된다. 일부 구현예에서, 조작을 위한 구성 요소가, 여기 섹션 I.A.3 및 표 4 및 5에 기재된 바와 같은 제제(들)의 전달에 사용된 임의의 적합한 방법을 포함한 다양한 전달 방법을 사용하여 다양한 형태로 전달될 수 있다. 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)의 하나 이상의 구성 요소(예를 들어, 여기 섹션 I.A에 기재된 어느 하나)를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(예컨대 핵산 분자)가 또한 제공된다. 전이 유전자(예를 들어, 여기 섹션 I.B.2에 기재된 어느 하나)를 함유하는 하나 이상의 주형 폴리뉴클레오티드 및 주형 폴리뉴클레오티드 또는 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)의 하나 이상의 구성 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드와 같이 전이 유전자의 표적화된 통합을 위해 세포를 유전자 조작하기 위한 벡터가 또한 제공된다.

[0735] 일부 구현예에서, 특정 게놈 표적 위치, 예컨대 *TGFBR2* 유전자 좌에서 전이 유전자를 표적화하기 위한 주형 폴리뉴클레오티드와 같은 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 일부 구현예에서, 여기 섹션 I.B에 기재된 임의의 주형 폴리뉴클레오티드가 제공된다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가, 재조합 수용체 또는 이의 일부 또는 기타 폴리펩티드 및/또는 인자를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 전이 유전자 및 표적화된 통합을 위한 상동성 암을 함유한다. 일부 구현예에서, 주형 폴리뉴클레오티드가 벡터에 함유될 수 있다.

[0736] 일부 구현예에서, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 제제가 하나 이상의 폴리뉴클레오티드에 암호화될 수 있다. 일부 구현예에서, 제제의 구성 요소, 예컨대 Cas9 분자 및/또는 gRNA 분자가 하나 이상의 폴리뉴클레오티드에 암호화될 수 있고 세포 내로 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 제제의 하나 이상의 구성 요소를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가 벡터에 포함될 수 있다.

[0737] 일부 구현예에서, 벡터가 Cas9 분자 및/또는 gRNA 분자 및/또는 주형 폴리뉴클레오티드를 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 벡터가, 예컨대 Cas9 분자 서열에 융합된 (예컨대 핵 국소화, 핵인 국소화, 미토콘드리아 국소화를 위한) 신호 펩티드를 암호화하는 서열을 또한 포함할 수 있다. 예를 들어, 벡터가 Cas9 분자를 암호화하는 서열에 융합된 (예컨대, SV40 유래) 핵 국소화 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 섹션 I.B.2에 기재된 주형 폴리뉴클레오티드와 같은 폴리뉴클레오티드에 함유된 전이 유전자 서열의 표적화된 통합을 위해 세포를 유전자 조작하기 위한 벡터가 제공된다.

[0738] 특정 구현예에서, 하나 이상의 조절/제어 요소, 예컨대, 프로모터, 인핸서, 인트론, 폴리아데닐화 신호, 코작센션스 서열, 내부 리보솜 진입 부위(IRES), 2A 서열 및 스플라이스 수용체 또는 공여체가 벡터에 포함될 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터가 RNA pol I, pol II 또는 pol III 프로모터 중에서 선택된다. 일부 구현예에서, 프로모터가 RNA 중합 효소 II(예컨대 CMV, SV40 초기 영역 또는 아데노바이러스 주요 후기 프로모터)에 의해 인식된다. 또 다른 구현예에서, 프로모터가 RNA 중합 효소 III(예컨대, U6 또는 H1 프로모터)에 의해 인식된다.

[0739] 특정 구현예에서, 프로모터가 조절 프로모터(예컨대, 유도 가능 프로모터)이다. 일부 구현예에서, 프로모터가 유도 가능 프로모터 또는 억제 가능 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터가 Lac 오퍼레이터 서열, 테트라사이클린 오퍼레이터 서열, 갈락토오스 오퍼레이터 서열 또는 독시사이클린 오퍼레이터 서열을 포함하거나, 또는 이의 유사체이거나, 또는 Lac 억제제 또는 테트라사이클린 억제제 또는 이의 유사물에 의해 결합 또는 인식될 수 있다.

[0740] 일부 구현예에서, 프로모터는 구성 프로모터이거나 이를 포함한다. 예시적인 구성 프로모터는, 예를 들어 시미안 바이러스 40 초기 프로모터(SV40), 사이토메갈로바이러스 초기 직후 프로모터(CMV), 인간 유비퀴틴 C 프로모터(UBC), 인간 신장 인자 1 $\alpha$  프로모터(EF1 $\alpha$ ), 마우스 포스포글리세린 키나제 1 프로모터(PGK) 및 CMV 초기 인핸서와 결합된 닭  $\beta$ -액틴 프로모터(CAGG)를 포함한다. 일부 구현예에서, 구성 프로모터는 합성 또는 변형된 프로모터이다. 일부 구현예에서, 프로모터는 MND 프로모터, 골수 증식 육종 바이러스 인핸서를 갖는 변형된 MoMuLV LTR의 U3 영역을 함유하는 합성 프로모터이거나 이를 포함한다(서열 번호: 186에 제시된 서열; 문헌 [Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755] 참조). 일부 구현예에서, 프로모터는 조직 특이적 프로모터이다. 또 다른 구현예에서, 프로모터는 바이러스 프로모터이다. 또 다른 구현예에서, 프로모터는 비-바이러스 프로모터이다. 일부 구현예에서, 예시적인 프로모터가, 인간 신장 인자 1 알파(EF1 $\alpha$ ) 프로모터(예컨대 서열 변

호: 77 또는 118에 제시됨) 또는 이의 변형된 형태(HTLV1 인헨서를 갖는 EF1 $\alpha$  프로모터; 예컨대 서열 번호: 119에 제시됨) 또는 MND 프로모터(예컨대 서열 번호: 186에 제시됨)를 포함할 수 있으나 이에 국한되지 않는다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 및/또는 벡터가 조절 요소, 예를 들어, 프로모터를 포함하지 않는다.

[0741] 특정 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 폴리뉴클레오티드가, 예를 들어 비-바이러스 벡터로 또는 비-바이러스 벡터 내에 뉴클레오티드 형태로 세포에 도입된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드가 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 이중 가닥 또는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드이다. 일부 구현예에서, 비-바이러스 벡터는, 예컨대 미세 주입, 전기 천공, 일시적인 세포 압축 또는 압착(예컨대, 문헌[Lee, et al. (2012) *Nano Lett* 12: 6322-27]에 기재됨), 지질 매개 형질 감염, 펩티드 매개 전달 또는 이의 조합물로 국한되지 않는, 유전자 전달을 위한 임의의 적합한 및/또는 공지된 비-바이러스 방법에 의한 형질 도입 및/또는 형질 감염에 적합한 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 비-바이러스 폴리뉴클레오티드가 표 5에 열거된 비-바이러스 방법과 같이 여기에 기재된 비-바이러스 방법에 의해 세포 내로 전달된다.

[0742] 일부 구현예에서, 벡터 또는 전달 비히클은 (예를 들어, 재조합 바이러스의 생성을 위한) 바이러스 벡터이다. 일부 구현예에서, 바이러스는 DNA 바이러스(예를 들어, dsDNA 또는 ssDNA 바이러스)이다. 일부 구현예에서, 바이러스는 RNA 바이러스(예를 들어, ssRNA 바이러스)이다. 예시적인 바이러스 벡터/바이러스는, 예를 들어, 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스(AAV), 백시니아 바이러스, 폭스바이러스 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 또는 여기 다른 곳에 기재된 임의의 바이러스를 포함한다.

[0743] 일부 구현예에서, 바이러스가 분열 세포를 감염시킨다. 또 다른 구현예에서, 바이러스가 비분열 세포를 감염시킨다. 또 다른 구현예에서, 바이러스가 분열 및 비-분열 세포 둘 다를 감염시킨다. 또 다른 구현예에서, 바이러스가 숙주 계놈 내로 통합될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 바이러스가 조작되어 예를 들어, 인간에서 감소된 면역을 갖는다. 또 다른 구현예에서, 바이러스가 복제능력이 있다. 또 다른 구현예에서, 바이러스는, 예를 들어 비리온 복제의 추가 라운드 및/또는 다른 유전자로 대체되거나 또는 결실된 패키징에 필요한 유전자를 위한 하나 이상의 코딩 영역을 갖는 복제 결함이다. 또 다른 구현예에서, 바이러스는 유전자 파괴의 일시적 유도를 목적으로 Cas9 분자 및/또는 gRNA 분자의 일시적 발현을 야기한다. 또 다른 구현예에서, 바이러스는 Cas9 분자 및/또는 gRNA 분자의 오래 지속되는 예를 들어, 1 주, 2 주, 1 개월, 2 개월, 3 개월, 6 개월, 9 개월, 1 년, 2 년 또는 영구적인 발현을 야기한다. 바이러스의 패키징 용량은, 예를 들어, 약 4 kb 이상 내지 약 30 kb 이상, 예를 들어, 약 5 kb, 10 kb, 15 kb, 20 kb, 25 kb, 30 kb, 35 kb, 40 kb, 45 kb 또는 50 kb 이상으로 다양할 수 있다.

[0744] 일부 구현예에서, 제제(들) 및/또는 주형 폴리뉴클레오티드를 함유하는 폴리뉴클레오티드가 재조합 레트로바이러스에 의해 전달된다. 또 다른 구현예에서, 레트로바이러스(예를 들어, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스)가 예를 들어, 숙주 계놈 내로의 통합을 허용하는 역전사 효소를 포함한다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 복제능력이 있다. 또 다른 구현예에서, 레트로바이러스는, 예를 들어 비리온 복제의 추가 라운드 및 다른 유전자로 대체되거나 또는 결실된 패키징에 필요한 유전자를 위한 하나 이상의 코딩 영역을 갖는 복제 결함이다.

[0745] 일부 구현예에서, 제제(들) 및/또는 주형 폴리뉴클레오티드를 함유하는 폴리뉴클레오티드가 재조합 렌티바이러스에 의해 전달된다. 예를 들어, 렌티바이러스는 예를 들어, 바이러스 복제에 필요한 하나 이상의 유전자를 포함하지 않는 복제 결함이다.

[0746] 일부 구현예에서, 제제(들) 및/또는 주형 폴리뉴클레오티드를 함유하는 폴리뉴클레오티드가 재조합 아데노바이러스에 의해 전달된다. 또 다른 구현예에서, 아데노바이러스가 조작되어 인간에서 감소된 면역을 갖는다.

[0747] 일부 구현예에서, 제제(들) 및/또는 주형 폴리뉴클레오티드를 함유하는 폴리뉴클레오티드가 재조합 AAV에 의해 전달된다. 일부 구현예에서, AAV가 숙주 세포, 예를 들어, 여기 기재된 바와 같은 표적 세포의 계놈 내로 자신의 계놈을 통합할 수 있다. 또 다른 구현예에서, AAV는 자가 상보성 아데노 관련 바이러스(self-complementary adeno-associated virus, scAAV), 예를 들어, 서로 어닐링하는 양쪽 가닥을 패키징하여 이중 가닥 DNA를 형성하는 scAAV이다. 개시된 방법에 사용될 수 있는 AAV 혈청형은, AAV1, AAV2, 변형된 AAV2(예를 들어, Y444F, Y500F, Y730F 및/또는 S662V에서의 변형), AAV3, 변형된 AAV3(예를 들어, Y705F, Y731F 및/또는 T492V에서의 변형), AAV4, AAV5, AAV6, 변형된 AAV6(예를 들어, S663V 및/또는 T492V에서의 변형), AAV7, AAV8, AAV 8.2, AAV9, AAV.rh10, 변형된 AAV.rh10, AAV.rh32/33, 변형된 AAV.rh32/33, AAV.rh43, 변형된 AAV.rh43, AAV.rh64R1, 변형된 AAV.rh64R1을 포함하고, 위형(pseudotyped) AAV, 예컨대 AAV2/8, AAV2/5 및 AAV2/6이 개시된 방법에 또한 사용될 수 있다.

- [0748] 일부 구현예에서, 제제(들) 및/또는 주형 폴리뉴클레오티드를 함유하는 폴리뉴클레오티드가 하이브리드 바이러스, 예를 들어 여기에 기재된 바이러스 중 하나 이상의 하이브리드에 의해 전달된다.
- [0749] 패키징 세포가 사용되어 표적 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스 입자를 형성한다. 상기 세포는 아데노바이러스를 패키징할 수 있는 293 세포 및 레트로바이러스를 패키징할 수 있는  $\psi$ 2 세포 또는 PA317 세포를 포함한다. 유전자 요법에 사용되는 바이러스 벡터가 핵산 벡터를 바이러스 입자로 패키징하는 생산자 세포주에 의해 일반적으로 생성된다. 벡터는 패키징 및 (적용 가능한 경우) 숙주 또는 표적 세포 내로 후속적인 통합에 필요한 최소한의 바이러스 서열을 전형적으로 함유하며, 다른 바이러스 서열이 발현될 단백질, 예를 들어 Cas9를 암호화하는 발현 카세트에 대체된다. 예를 들어, 유전자 요법에 사용되는 AAV 벡터는, 숙주 또는 표적 세포에서 패키징 및 유전자 발현에 필요한 AAV 계놈의 역말단 반복(inverted terminal repeat, ITR) 서열만을 전형적으로 보유한다. 누락된 바이러스 기능은 패키징 세포주에 의해 *트랜스(in trans)*로 공급된다. 이후 바이러스 DNA가, 다른 AAV 유전자, 즉 rep 및 cap을 암호화하나 ITR 서열이 결여된 헬퍼 플라스미드를 함유하는 세포주에서 패키징된다. 세포주가 헬퍼로서 아데노바이러스로 또한 감염된다. 헬퍼 바이러스가 헬퍼 플라스미드로부터 AAV 벡터의 복제 및 AAV 유전자의 발현을 촉진한다. 헬퍼 플라스미드가 ITR 서열의 결여로 인해 유의미한 양으로 패키징되지 않는다. 예를 들어, 아데노바이러스가 AAV보다 더 민감한 열처리에 의해 아데노바이러스로의 오염을 줄일 수 있다.
- [0750] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터가 세포 유형 인식 능력을 갖는다. 예를 들어, 바이러스 벡터가, 상이한/대안적인 바이러스 외피 당단백질로 위형화(pseudotyped); 세포 유형 특이적 수용체로 조작(예를 들어, 펩티드 리간드, 단일 사슬 항체, 성장 인자와 같은 표적화 리간드를 통합하도록 바이러스 외피 당단백질의 유전적 변형); 및/또는 하나의 말단이 바이러스 당 단백질에 인식하고 나머지 다른 하나의 말단이 표적 세포 표면의 모이터티를 인식하는 이중 특이성을 갖는 분자 가교를 갖도록 조작(예를 들어, 리간드-수용체, 단클론 항체, 아비딘-비오틴 및 화학적 접합);될 수 있다.
- [0751] 일부 구현예에서, 바이러스 벡터가 세포 유형 특이적 발현을 달성한다. 예를 들어, 조직 특이적 프로모터가 작제되어 특정 표적 세포에서만 유전자 파괴를 도입할 수 있는 제제(예를 들어, Cas9 및 gRNA)의 발현을 제한할 수 있다. 벡터의 특이성이 발현의 마이크로 RNA 의존적 제어에 의해 또한 매개될 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터가 바이러스 벡터 및 표적 세포막 융합의 증가된 효율을 갖는다. 예를 들어, 융합 능력이 있는 혈구 응집소(hemagglutinin, HA)와 같은 융합 단백질이 통합되어 세포 내로 바이러스 흡수가 증가할 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터가 핵 국소화 능력을 갖는다. 예를 들어, (세포 분열 중) 핵막의 파괴가 필요하고 따라서 비-분열 세포를 감염시키지 않는 바이러스가 바이러스의 매트릭스 단백질 내 핵 국소화 펩티드를 통합하도록 변경될 수 있어서 비-증식 세포의 형질 도입을 가능하게 할 수 있다.
- [0752] **III. 재조합 수용체를 발현하는 조작된 세포 및 세포 조성물**
- [0753] 재조합 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체(CAR)의 하나 이상의 사슬 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자와 같은 핵산 서열을 포함하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 포함하는 유전자 조작된 세포가 여기에 제공된다. 일부 측면에서, 유전자 조작된 세포 내 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내로 통합된 재조합 수용체의 하나 이상의 사슬 또는 이의 일부를 암호화하는 외인성 핵산 서열(예를 들어, 전이 유전자 서열)을 포함한다. 일부 측면에서, 제공된 조작된 세포가, 예를 들어 유전자 파괴를 유도하기 위한 제제(들)(예를 들어, 섹션 I.A에 기재된 바와 같음) 및 수선을 위한 전이 유전자 서열을 함유하는 주형 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 섹션 I.B에 기재됨)를 이용함으로써 상동성 의존적 수선(HDR)을 수반하는 여기 기재된 방법을 사용하여 생성된다. 일부 측면에서, 섹션 I.B에 기재된 임의의 주형 폴리뉴클레오티드와 같은 제공된 폴리뉴클레오티드의 일부, 예를 들어 인접한 세그먼트가, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 통합을 위해 표적화되어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자와 같은 핵산 서열을 포함하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 함유하는 세포를 생성할 수 있다. 일부 구현예에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내로 HDR에 의해 통합된 주형 폴리뉴클레오티드의 일부가, 여기 예를 들어 섹션 I.B에 기재된 어느 하나와 같은 주형 폴리뉴클레오티드의 전이 유전자 서열 부분을 포함한다.
- [0754] 일부 측면에서, 세포가 조작되어 재조합 수용체, 예컨대 CAR 또는 재조합 T 세포 수용체(TCR)를 발현한다. 일부 측면에서, 재조합 수용체가 조작된 세포 내 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 존재하는 핵산 서열에 의해 암호화된다. 일부 측면에서, 세포가 HDR을 통해 재조합 수용체의 전부 또는 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 통합함으로써 생성된다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체가, 리간드 또는 항원, 예를 들어 질병 또는 장애와 관련된 항원에 결합 또는 이를 인식하는 결합 도메인을 함유한다.

- [0755] 일부 측면에서, 조작된 세포는 T 세포와 같은 면역 세포이다. 일부 측면에서, 면역 세포가 조작되어 여기에 기재된 어느 하나와 같은 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체 또는 변형된 재조합 수용체를 발현한다.
- [0756] 일부 구현예에서, 여기에 제공된 방법, 조성물, 제조 물품 및/또는 키트가, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 갖거나 함유하는 유전자 조작된 세포, 예를 들어 유전자 조작된 면역 세포 및/또는 T 세포를 생성, 제조 또는 생산하는데 유용하다. 특정 구현예에서, 여기에 제공된 방법이 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 갖거나 함유하는 유전자 조작된 세포를 초래한다. 일부 구현예에서, 변형된 유전자 좌가, 내인성 *TGFBR2* 유전자의 개방형 판독 프레임에 통합된 전이 유전자 서열, 예를 들어 섹션 I.B에 기재된 전이 유전자 서열이거나 이를 함유한다. 특정 구현예에서, 전이 유전자가 내인성 *TGFBR2* 유전자의 개방형 판독 프레임 내에 인-프레임으로 삽입되어, TGFBR1I 폴리펩티드 일부 및 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 초래한다. 일부 구현예에서, 변형된 유전자 좌에 의해 암호화된 TGFBR1I 폴리펩티드 일부는 TGFBR1I 폴리펩티드의 우성 음성 형태이다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 일부 측면에서, 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(TCR)이다.
- [0757] 일부 경우에, 세포가 조작되어 여기 기재된 치료 분자를 포함한 하나 이상의 추가 분자, 예를 들어 임의의 추가 분자와 같은 추가 인자 및/또는 보조 분자를 발현한다. 일부 구현예에서, 추가 분자는, 마커, 추가 재조합 수용체 폴리펩티드 사슬, 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 면역 조절 분자, 리간드, 사이토카인 또는 케모카인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 추가 인자는 가용성 분자이다. 일부 구현예에서, 추가 인자는 막-결합 분자이다. 일부 측면에서, 추가 인자가 사용되어 종양 미세 환경(tumor microenvironment, TME)과 같은 면역 억제 환경의 효과를 극복하거나 중화시킬 수 있다. 일부 측면에서, 예시적인 추가 분자는 사이토카인, 사이토카인 수용체, 키메라 공자극 수용체, 공자극 리간드 및 T 세포 기능 또는 활성의 다른 조절자를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포에 의해 발현되는 추가 분자는 IL-7, IL-12, IL-15, CD40 리간드(CD40L) 및 4-1BB 리간드(4-1BBL)를 포함한다. 일부 측면에서, 추가 분자는 상이한 분자에 결합하는 추가 수용체, 예를 들어 막-결합 수용체이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 추가 분자는 사이토카인 수용체 또는 케모카인 수용체, 예를 들어 IL-4 수용체 또는 CCL2 수용체이다. 일부 경우에, 조작된 세포는 "무장된 CAR(armored CAR)" 또는 보편적인 사이토카인 사멸을 위해 재지시된 T 세포(T cells redirected for universal cytokine killing, TRUCK)로 명명된다.
- [0758] 복수의 조작된 세포를 함유하는 조성물이 또한 제공된다. 일부 측면에서, 조작된 세포를 함유하는 조성물이, 재조합 수용체가 세포의 계놈 내에 무작위로 도입된 방법과 같이 다른 조작 방법을 사용하여 생성된 세포 또는 세포 조성물에 비해, 재조합 수용체에 의해 개선된, 균일한, 동질의 및/또는 안정한 발현 및/또는 항원 결합을 나타낸다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 또는 조작된 세포를 포함하는 조성물이 요법, 예를 들어 입양 세포 요법에 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 세포 또는 세포 조성물이 여기 기재된 임의의 치료 방법에 또는 여기 기재된 치료 용도를 위해 사용될 수 있다.
- [0759] **A. 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌**
- [0760] 일부 측면에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 포함하는 유전자 조작된 세포가 제공된다. 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 서열이 재조합 수용체의 하나 이상의 사슬 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함하고, 상기 전이 유전자 서열은 선택적으로 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 통합되었다. 일부 측면에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가 여기, 예를 들어 섹션 III.B에 기재된 재조합 수용체 또는 이의 일부, 예컨대 이의 도메인 또는 영역 또는 여기 기재된 다중 사슬 재조합 수용체의 하나 이상의 사슬 중 임의의 하나 이상을 암호화할 수 있다.
- [0761] 일부 측면에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가, 예컨대 HDR 방법을 통해 유전자 파괴 및 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 전이 유전자 서열(예를 들어, 외인성 또는 이중 핵산 서열)의 통합의 결과로 생성된다. 일부 측면에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 존재하는 핵산 서열은, 전장 TGFBR1I를 암호화하는 개방형 판독 프레임을 보통 포함하는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내 영역에 통합된 외인성 서열과 같은 전이 유전자 서열(들)을 포함한다. 일부 측면에서, HDR에 의한 전이 유전자의 표적화된 통합 시, 세포의 계놈은, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하고, 전장 TGFBR1I를 암호화하는 내인성 계놈의 전부 또는 적어도 일부가 결여된 핵산 서열을 포함하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 함유한다. 일부 구현예에서, 표적화된 통합 시, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 내 부위 내로 통합된 전이 유전자를 함유하여 재조합 수용체가 조작된 세포에서 발현되고, 일부 경우에 TGFBR1I의 일부, 예를 들어 부분적 또는 절단형 TGFBR1I가 또한 발현된다.

- [0762] 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열의 통합 시, *TGFBR2* 유전자 좌의 내인성 서열이 유전자 파괴, 예컨대 하나 이상의 아미노산을 암호화하는 핵산 서열의 결실 및/또는 정지 코돈을 도입하는 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열의 통합 시, *TGFBR2* 유전자 좌의 내인성 서열이 기능성 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화하지 않는다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열의 통합 시, *TGFBR2* 유전자 좌의 내인성 서열이 부분적인 TGFBRII 폴리펩티드 또는 절단형 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화한다. 일부 구현예에서, *TGFBR2* 유전자 좌의 내인성 서열에 의해 암호화된 부분적 또는 절단형 TGFBRII 폴리펩티드는 TGFBRII 폴리펩티드의 우성 음성(DN) 형태이다. 일부 측면에서, *TGFBR2*의 우성 음성 형태는, 세포에서 발현될 경우, TGF $\beta$  수용체 복합체에 의한 신호 전달을 억제, 감소 또는 방해할 수 있는 *TGFBR2*의 변이체를 포함한다. 일부 측면에서, TGFBRII의 예시적인 우성 음성 형태는, 절단형 TGFBRII, 예컨대 세포질 도메인의 전부 또는 일부가 결여된 TGFBRII를 포함한다. 일부 구현예에서, 우성 음성 TGFBRII는, 예를 들어 문헌[Wieser et al., (1993) Mol. Cell Biol. 13(12): 7239-247; Brand et al., (1995) JBC 270: 8274-8284; Bottinger et al., (1997) EMBO J 16(10): 2621-2633; Shah et al., (2002) Cancer Res 62:7135-7138; Bollard et al. (2002) Gene Therapy 99(9): 3179-87; 및 Zhang et al., (2013) Gene Therapy 20: 575-580; 및 Pang et al. (2013) Cancer Discov. 3(8): 936-951]에 기재된 것을 포함한다.
- [0763] 일부 구현예에서, 변형된 유전자 좌에서 전사된 mRNA가, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화되고/거나 내인성 *TGFBR2* 유전자좌에서 전사된 mRNA의 3'UTR과 동일한 3'UTR을 함유한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자는 CAR의 일부를 암호화하는 핵산 서열의 상류, 예를 들어, 바로 상류에 리보솜 건너뛰기 요소를 함유한다. 일부 구현예에서, CAR을 암호화하는 mRNA가, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화되고/거나 내인성 *TGFBR2* 유전자좌에서 전사된 mRNA의 5'UTR과 동일한 5'UTR을 함유한다.
- [0764] 일부 측면에서, TGFBRII의 예시적인 우성 음성 형태는, 예를 들어 서열 번호: 59에 제시된 인간 TGFBRII 전구체 서열(동형 단백질 1)의 188-567 아미노산 잔기 또는 서열 번호: 60에 제시된 인간 TGFBRII 전구체 서열(동형 단백질 2)의 213-592 아미노산 잔기를 포함하는 *TGFBR2*의 세포 내 영역 내 하나 이상의 아미노산 잔기, 선택적으로 하나 이상의 인접한 아미노산 잔기의 결실을 함유하는 TGFBRII를 포함한다. 일부 측면에서, TGFBRII의 예시적인 우성 음성 형태는 서열 번호: 59에 제시된 아미노산 서열의 22-191 잔기에 대응하는 아미노산 서열 또는 서열 번호: 60에 제시된 아미노산 서열의 22-216 잔기에 대응하는 아미노산 서열 또는 상기 또는 이의 단편에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.
- [0765] 특정 구현예에서, 전이 유전자가 재조합 수용체를 암호화하고, *TGFBR2* 유전자 좌의 내인성 개방형 판독 프레임 내에 인-프레임으로 삽입된다. 특정 구현예에서, 변형된 유전자 좌의 전사가 재조합 수용체, 예컨대 CAR을 암호화하는 mRNA를 초래한다. 일부 측면에서, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임에 존재하는 핵산 서열이, 부분적 또는 절단형 TGFBRII 폴리펩티드, 예컨대 TGFBRII의 우성 음성 형태를 암호화할 수 있다. 일부 구현예에서, 전이 유전자가, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 엑손과 인-프레임으로 및 바로 하류의 표적 부위에 통합된다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열이, (여기 표 1 및 2에 기재된 것과 같은) 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 1, 2, 3 또는 4의 하류 및 엑손 6, 7 또는 8의 상류에 통합 또는 삽입된다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열이, (여기 표 1 및 2에 기재된 것과 같은) 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 1, 2, 3 또는 4의 하류 및 엑손 6의 상류에 통합 또는 삽입된다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 1의 하류 및 엑손 6의 상류에 존재한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 3의 하류 및 엑손 5의 상류에 존재한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자 서열이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 4의 하류 및 엑손 6의 상류에 존재한다.
- [0766] 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌로부터 암호화된 재조합 수용체는 CAR이다. 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화된 CAR이 표적 항원에 결합하고/거나 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 항원이 질병, 장애 또는 병태와 관련된 세포 또는 조직과 관련된, 특이적인 및/또는 상에서 발현된다. 일부 구현예에서, CAR이, 예컨대 CD3-제타(CD3 $\zeta$ ) 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 영역 또는 이의 기능성 변이체 또는 신호 전달 부분을 통해 T 세포 내 1차 활성화 신호, T 세포 수용체(TCR) 구성 요소의 신호 전달 도메인 및/또는 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 신호 전달 도메인을 자극 및/또는 유도할 수 있다.
- [0767] 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌로부터 암호화된 재조합 수용체는 재조합 TCR이다. 일부 측면에서, 재조합 TCR은 2 개의 폴리펩티드 사슬, 예를 들어 TCR 알파(TCR $\alpha$ ) 및 TCR 베타(TCR $\beta$ ) 사슬; 또는 TCR 감마

(TCR  $\gamma$ ) 및 TCR 델타(TCR  $\delta$ ) 사슬;을 포함한다. 일부 측면에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가 재조합 TCR의 하나 이상의 사슬을 암호화한다. 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가 TCR  $\alpha$ 를 암호화한다. 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가 TCR  $\beta$ 를 암호화한다. 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가 선택적으로 다중 시스트론 요소, 예컨대 2A 요소에 의해 분리된 TCR  $\alpha$  및 TCR  $\beta$ 를 암호화한다.

**[0768] B. 암호화된 재조합 수용체**

**[0769]** 일부 구현예에서, 예를 들어 여기에 기재된 바와 같은 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에서 조작된 세포 또는 여기 제공된 방법에 따라 생성된 조작된 세포에 의해 암호화된 재조합 수용체가, 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 이의 일부 또는 재조합 T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 일부를 포함한다. 재조합 수용체 중 키메라 수용체, 항원 수용체 및 키메라 수용체 또는 항원 수용체의 하나 이상의 구성 요소를 함유하는 수용체가 있다. 재조합 수용체가, 리간드 결합 도메인 또는 이의 결합 단편 및 세포 내 신호 전달 도메인 또는 영역을 함유하는 것을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 조작된 세포에 의해 암호화된 재조합 수용체가, 기능성 비-TCR 항원 수용체, 키메라 항원 수용체(CAR), 키메라 자가항체 수용체(CAAR), 재조합 T 세포 수용체(TCR) 및 상기 중 어느 하나의 영역(들), 사슬(들), 도메인(들) 또는 구성 요소(들)를 포함한다. 일부 측면에서, 재조합 수용체 또는 이의 일부가, 상기 섹션 I.B.2에 기재된 임의의 주형 폴리뉴클레오티드와 같이 여기 제공된 폴리뉴클레오티드에 존재하는 전이 유전자 서열에 의해 암호화된다. 일부 측면에서, 폴리뉴클레오티드에 함유된 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열이 조작된 세포의 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에 통합되어, 다중 사슬 재조합 수용체의 하나 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함한 여기 기재된 임의의 재조합 수용체와 같은 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 야기한다.

**[0770]** 일부 구현예에서, 조작된 세포에서 발현된 예시적인 재조합 수용체가, 일부 경우에 상이한 구성 요소, 도메인 또는 영역을 함유하는 2 개 이상의 수용체 폴리펩티드를 함유하는 다중 사슬 수용체를 포함한다. 일부 측면에서, 재조합 수용체가 기능성 재조합 수용체를 함께 포함하는 2 개 이상의 폴리펩티드를 함유한다. 일부 측면에서, 다중 사슬 수용체는, 기능성 재조합 수용체를 함께 포함하는 2 개의 폴리펩티드를 포함하는 이중 사슬 수용체이다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체는 2 개의 상이한 수용체 폴리펩티드, 예를 들어 TCR 알파(TCR  $\alpha$ ) 및 TCR 베타(TCR  $\beta$ ) 사슬; 또는 TCR 감마(TCR  $\gamma$ ) 및 TCR 델타(TCR  $\delta$ ) 사슬;을 포함하는 TCR이다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체는, 하나 이상의 폴리펩티드가 또 다른 수용체 폴리펩티드의 발현, 활성 또는 기능을 조절, 변형 또는 제어하는 다중 사슬 수용체이다. 일부 측면에서, 다중 사슬 수용체는 수용체의 특이성, 활성, 항원(또는 리간드) 결합, 기능 및/또는 발현의 공간 또는 시간적 조절 또는 제어를 허용한다.

**[0771]** 일부 구현예에서, 여기 제공된 유전자 조작된 세포에 암호화된 재조합 수용체는 막관통 도메인 또는 막결합 도메인을 함유한다. 일부 측면에서, 재조합 수용체는 세포 외 영역을 또한 함유한다. 일부 측면에서, 재조합 수용체는 세포 내 영역을 또한 함유한다. 일부 구현예에서, 여기 제공된 유전자 조작된 세포에 암호화된 재조합 수용체는, 다양한 영역 또는 도메인, 예컨대 (예를 들어, 하나 이상의 세포 외 결합 도메인(들) 및/또는 스페이서를 함유하는) 세포 외 영역, 막관통 도메인 및 (예를 들어, 세포 내 신호 전달 영역 및/또는 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인을 함유하는) 세포 내 영역 중 하나 이상을 함유한다. 일부 측면에서, 암호화된 재조합 수용체는 다른 도메인, 예컨대 다량체화 도메인, 링커 및/또는 조절 요소를 더 함유한다.

**[0772]** 일부 구현예에서, 예시적인 암호화된 재조합 수용체는 N-말단에서 C-말단 순서로: 막관통 도메인(또는 막결합 도메인) 및 세포 내 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 암호화된 재조합 수용체는 N-말단에서 C-말단 순서로: 세포 외 영역, 막관통 도메인 및 세포 내 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 외 영역은 세포 외 결합 도메인이거나 이를 포함하고, 일부 측면에서, 암호화된 재조합 수용체는 N-말단에서 C-말단 순서로: 세포 외 결합 도메인, 막관통 도메인 및 세포 내 영역을 포함한다. 일부 경우에, 스페이서가 세포 외 영역, 예를 들어 세포 외 결합 도메인 및 막관통 도메인을 분리하거나 이들 사이에 위치한다. 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 N 말단에서 C 말단 순서로: 세포 외 결합 도메인, 스페이서, 막관통 도메인 및 세포 내 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체에 존재하는 세포 내 신호 전달 영역은, 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM) 및/또는 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인, 예컨대 1, 2, 또는 3 개의 공자극 신호 전달 도메인을 함유한다.

**[0773]** 일부 구현예에서, 재조합 수용체는, 일부 측면에서 이의 다중 사슬 폴리펩티드의 형성에 영향을 미칠 수 있는 다량체화 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 예시적인 암호화된 재조합 수용체는, N-말단에서 C-말단 순서로: 막관통 도메인(또는 막 결합 도메인), 세포 내 다량체화 도메인, 선택적으로 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들) 및 세포 내 신호 전달 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 재조합 수용체 폴리펩티드

는, N-말단에서 C-말단 순서로: 세포 외 다량체화 도메인, 막관통 도메인, 선택적으로 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들) 및 세포 내 신호 전달 영역을 포함한다.

[0774] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 키메라 수용체, 예컨대 CAR이다. 예시적인 암호화된 CAR 서열은: 세포 외 결합 도메인, 스페이서, 막관통 도메인 및 1차 신호 전달 도메인 또는 영역 및 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 내 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 암호화된 CAR 서열은: 세포 외 결합 도메인, 스페이서, 막관통 도메인 및 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인 및 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 포함한다.

[0775] 일부 구현예에서, 예시적인 암호화된 폴리펩티드, 예컨대 다중 사슬 CAR의 폴리펩티드 사슬 서열은: 막관통 도메인(또는 막 결합 도메인), 세포 내 다량체화 도메인, 선택적으로 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들) 및 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 암호화된 폴리펩티드, 예컨대 다중 사슬 CAR의 폴리펩티드 사슬 서열은: 세포 외 다량체화 도메인, 막관통 도메인, 선택적으로 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들) 및 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 포함한다.

[0776] 일부 구현예에서, 예시적인 암호화된 CAR 서열은, 세포 외 결합 도메인, 선택적으로 scFv; 선택적으로 인간 면역 글로불린 힌지, 선택적으로 IgG1, IgG2 또는 IgG4 또는 이의 변형된 버전 유래 서열을 포함하고, 선택적으로 C<sub>H</sub>2 영역 및/또는 C<sub>H</sub>3 영역을 더 포함하는, 스페이서; 및 선택적으로 인간 CD28 유래 막관통 도메인; 선택적으로 인간 4-1BB 유래 공자극 신호 전달 도메인; 및 세포 내 신호 전달 영역, 선택적으로 CD3 $\zeta$  사슬 또는 이의 일부;를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 순서로 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체의 암호화된 세포 내 영역은 N 말단에서 C 말단 순서로: 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들) 및 예컨대 CD3제타 사슬 또는 이의 단편을 함유하는 1차 신호 전달 도메인 또는 영역을 포함한다.

[0777] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 재조합 TCR이고, 예시적인 암호화된 TCR은 TCR  $\alpha$  사슬 또는 TCR  $\beta$  사슬 또는 둘 다를 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 암호화된 폴리펩티드, 예컨대 재조합 수용체의 폴리펩티드는 TCR  $\alpha$  사슬의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 암호화된 폴리펩티드, 예컨대 재조합 수용체의 폴리펩티드는 TCR  $\beta$  사슬의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 측면에서, 예시적인 암호화된 재조합 수용체는 TCR  $\alpha$  사슬 및 TCR  $\beta$  사슬을 포함하는 재조합 TCR이다.

[0778] **1. 키메라 항원 수용체(CAR)**

[0779] 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화된 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다. 일부 구현예에서, T 세포와 같은 조작된 세포가, 특정 세포 유형의 표면 상에 발현된 항원과 같은 특정 항원(또는 마커 또는 리간드)에 대한 특이성을 갖는 CAR과 같은 재조합 수용체를 발현한다. 일부 측면에서, 다중 사슬 또는 조절 가능한 CAR을 포함한 여기 기재된 임의의 CAR의 적어도 일부가 전이 유전자 서열 내에 암호화된다. 일부 측면에서, 여기 기재된 CAR 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열은 섹션 I.B.2에 기재된 어느 하나일 수 있다. 일부 측면에서, HDR을 통한 전이 유전자 서열의 통합 시, 생성된 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 다중 사슬 또는 조절 가능한 CAR을 포함한 여기 기재된 임의의 CAR과 같은 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 함유한다.

[0780] 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화된 재조합 수용체, 예를 들어 CAR은, (예를 들어, 하나 이상의 세포 외 결합 도메인(들) 및/또는 스페이서를 함유하는) 세포 외 영역, 막관통 도메인 및/또는 (예를 들어, 1차 신호 전달 영역 또는 도메인 및/또는 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인을 함유하는) 세포 내 영역 중 하나 이상을 함유한다. 일부 측면에서, 암호화된 재조합 수용체는 다른 도메인, 예컨대 다량체화 도메인을 더 함유한다. 일부 측면에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 링커 및/또는 조절 요소를 암호화하는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 N 말단에서 C 말단 순서로: 세포 외 결합 도메인, 막관통 도메인 및 예를 들어 1차 신호 전달 영역 또는 도메인 또는 이의 일부 및/또는 공자극 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 내 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 N 말단에서 C 말단 순서로: 세포 외 결합 도메인, 스페이서, 막관통 도메인 및 예를 들어 1차 신호 전달 영역 또는 도메인 또는 이의 일부 및/또는 공자극 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 내 영역을 포함한다.

[0781] **a. 결합 도메인**

[0782] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체의 세포 외 영역이 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 결합 도메인은 세포 외 결합 도메인이다. 일부 구현예에서, 결합 도메인은, 폴리펩티드, 리간드, 수용체, 리간드 결합 도메인, 수용체 결합 도메인, 항원, 에피토프, 항체, 항원 결합 도메인, 에피토프 결합 도메인, 항체 결합

도메인, 태그 결합 도메인 또는 상기 중 어느 하나의 단편이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 결합 도메인은 리간드- 또는 항원-결합 도메인이다.

[0783] 일부 측면에서, 세포 외 리간드 도메인, 예컨대 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 영역 또는 도메인(들) 및 세포 내 영역 또는 도메인(들)이 하나 이상의 링커 및/또는 막관통 도메인(들)을 통해 연결되거나 결합된다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 세포 외 영역과 세포 내 영역 사이에 배치된 막관통 도메인을 포함한다.

[0784] 일부 구현예에서, 항원, 예를 들어 재조합 수용체의 결합 도메인에 결합하는 항원이 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 항원이 탄수화물 또는 다른 분자이다. 일부 구현예에서, 항원이, 예를 들어 건강한 세포 또는 조직 내 정상 또는 비-표적화된 세포 또는 조직과 비교하여, 질병, 장애 또는 병태의 세포, 예를 들어 종양 또는 병원성 세포 상에서 선택적으로 발현되거나 과발현된다. 일부 구현예에서, 질병, 장애 또는 병태는 감염병 질병 또는 장애, 자가면역 질병, 염증성 질병 또는 종양 또는 암이다. 일부 구현예에서, 항원이 정상 세포 상에서 발현되고/거나 조작된 세포 상에서 발현된다. 일부 측면에서, 재조합 수용체, 예를 들어, CAR은, 세포 외 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 또는 영역 또는 도메인, 예를 들어, 여기에 기재된 임의의 항체 또는 단편 및 세포 내 영역에서 선택된 하나 이상의 영역 또는 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 영역 또는 도메인은 scFv 또는 단일 도메인  $V_H$  항체이거나 이를 포함하고, 세포 내 영역은 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 세포 내 신호 전달 영역 또는 도메인을 포함한다.

[0785] CAR을 포함한 예시적인 암호화된 재조합 수용체는, 예를 들어 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO2000/14257, WO2013/126726, WO2012/129514, WO2014/031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, 미국 특허 출원 공개 번호 US2002131960, US2013287748, US20130149337, 미국 특허 번호 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353 및 8,479,118 및 유럽 특허 출원 번호 EP2537416]에 기재된 것 및/또는 문헌[Sadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; 및 Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75]에 기재된 것을 포함한다. 일부 측면에서, 항원 수용체는 문헌[미국 특허 번호 7,446,190]에 기재된 바와 같은 CAR 및 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO 2014/055668]에 기재된 것을 포함한다. CAR의 예는 전술한 간행물 중 어느 하나, 예컨대 문헌[WO2014/031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, US 7,446,190, US 8,389,282, Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; 및 Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177)]에 개시된 바와 같은 CAR을 포함한다.

[0786] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체, 예를 들어, 항원 수용체는 항원, 리간드 및/또는 마커에 예를 들어, 특이적으로 결합하는 세포 외 결합 도메인, 예컨대 항원- 또는 리간드-결합 도메인을 함유한다. 항원 수용체 중 예 기능성 비-TCR 항원 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체(CAR)가 있다. 일부 구현예에서, 항원 수용체는 항원에 특이적으로 결합하는 세포 외 항원 인식 도메인을 함유하는 CAR이다. 일부 구현예에서, 특정 항원, 마커 또는 리간드, 예컨대 입양 요법에 의해 표적화될 특정 세포 유형에서 발현되는 항원, 예를 들어 암 마커 및/또는 감쇠 반응을 유도하도록 의도된 항원, 예컨대 정상 또는 비질병 세포 유형에서 발현된 항원에 대한 특이성을 갖는 CAR이 작제된다. 따라서, CAR은 전형적으로 하나 이상의 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 분자, 예컨대 하나 이상의 항원 결합 단편, 도메인 또는 부분 또는 하나 이상의 항체 가변 도메인 및/또는 항체 분자를 세포 외 부분에 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항체 분자의 항원 결합 부분 또는 부분들, 예컨대 단클론 항체 (monoclonal antibody, mAb)의 가변 중쇄( $V_H$ ) 및 가변 경쇄( $V_L$ )에서 유래된 단일 사슬 항체 단편(scFv) 또는 단일 도메인 항체(single domain antibody, sdAb), 예컨대 sdFv, 나노바디(nanobody),  $V_{HH}$  및  $V_{NAR}$ 을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원 결합 단편은 가요성 링커에 의해 연결된 항체 가변 영역을 포함한다.

[0787] 일부 구현예에서, 암호화된 CAR은 세포의 표면 상에 발현된 온전한 항원과 같은 항원 또는 리간드를 특이적으로 인식하는 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들어 scFv)을 함유한다. 일부 구현예에서, 항원 또는 리간드는 세포의 표면 상에 발현된 단백질이다. 일부 구현예에서, 항원 또는 리간드는 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 상기는 탄수화물 또는 다른 분자이다. 일부 구현예에서, 항원 또는 리간드는 정상 또는 비-표적화 세포 또는 조직과 비교하여 질병 또는 병태의 세포, 예를 들어 종양 또는 병원성 세포 상에서 선택적으로 발현되거나 과발현된다. 다른 구현예에서, 항원은 정상 세포 상에서 발현되고/거나 조작된 세포 상에서 발현된다.

[0788] 일부 구현예에서, 재조합 수용체에 의해 표적화된 항원 중에 입양 세포 요법을 통해 표적화될 질병, 병태 또는

세포 유형의 상황에서 발현되는 것이 있다. 질병 및 병태 중에 증식성, 신생물성 및 악성 질병 및 장애가 있고, 암 및 종양을 포함하며, 혈액암, 면역계 암, 예컨대 림프종, 백혈병 및/또는 골수종, 예컨대 B, T 및 골수성 백혈병, 림프종 및 다발성 골수종을 포함한다.

[0789] 일부 구현예에서, 항원 또는 리간드는 종양 항원 또는 암 마커이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 장애와 관련된 항원은,  $\alpha v \beta 6$  인테그린, B 세포 성숙 항원(BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 탈수 효소 9(CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로 공지), 암 교환 항원, 암/교환 항원 1B(CTAG, 또한 NY-ESO-1 및 LAGE-2로 공지), 암배아 항원(CEA), 사이클린, 사이클린 A2, C-C 모터프 케모카인 리간드 1(CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸 4(CSPG4), 표피 성장 인자 단백질(EGFR), 유형 III 표피 성장 인자 수용체 돌연변이(EGFR vIII), 표피 당단백질 2(EPG-2), 표피 당단백질 40(EPG-40), 에프린B2, 에프린 수용체 A2(EPha2), 에스트로젠 수용체, Fc 수용체 유사 5(FCRL5; Fc 수용체 상동물 5 또는 FCRH5로도 공지), 태아 아세틸콜린 수용체(태아 AchR), 엽산 결합 단백질(FBP), 엽산 수용체 알파, 강글리오사이드 GD2, 0-아세틸화 GD2(OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백질 100(gp100), 글리피칸-3(GPC3), G 단백질 결합 수용체 C 클래스 5 그룹 D 멤버(GPRC5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나제 erb-B2), Her3(erb-B3), Her4(erb-B4), erbB 2량체, 인간 고분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1(HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22R $\alpha$ ), IL-13 수용체 알파 2(IL-13R $\alpha$ 2), 키나제 삽입 도메인 수용체(kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자(L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 패밀리 8 A 멤버를 함유하는 루신 리치 반복(LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종 관련 항원(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, 메소텔린(MSLN), c-Met, 뮤린 시토메갈로 바이러스(CMV), 뮤신 1(MUC1), MUC16, 천연 킬러 2 그룹 D 멤버(NKG2D) 리간드, 멜란 A (MART-1), 신경 세포 부착 분자(NCAM), 종양태아성 항원, 흑색종 우선 발현 항원(PRAME), 프로게스트론 수용체, 전립선 특이적 항원, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1), 서바이빈(survivin), 영양막 당단백질(TPBG, 또한 5T4로 공지), 종양 관련 당단백질 72(TAG72), 티로시나제 관련 단백질 1(TRP1, 또한 TYRP1 또는 gp75로 공지), 티로시나제 관련 단백질 2(TRP2, 또한 도파크롬 타우도메라제, 도파크롬 델타 이성화 효소 또는 DCT로 공지), 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 빌름스 종양 1(WT-1), 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원 또는 범용 태그 관련 항원 및/또는 비오틴화 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체에 의해 발현된 분자이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화된 항원은 다수의 공지된 임의의 B 세포 마커와 같은 B 세포 악성 종양과 관련된 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig카파, Ig람다, CD79a, CD79b 또는 CD30이거나 이를 포함한다.

[0790] 일부 구현예에서, 항원은 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 바이러스 항원(예컨대 HIV, HCV, HBV 등 유래 바이러스 항원), 세균 항원 및/또는 기생충 항원이다.

[0791] 일부 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들어, scFv 또는 V<sub>H</sub> 도메인)이 CD19와 같은 항원을 특이적으로 인식한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편이 CD19에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편에서 유래하거나 이의 변이체이다.

[0792] 일부 구현예에서, scFv가 FMC63에서 유래된다. FMC63은 인간 기원의 CD19를 발현하는 Nalm-1 및 -16 세포에 대하여 발생된 마우스 단클론 IgG1 항체를 일반적으로 지칭한다(Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). 일부 구현예에서, FMC63 항체는, 서열 번호: 38 및 39에 각각 제시된 CDR-H1 및 CDR-H2 및 서열 번호: 40 또는 54에 제시된 CDR-H3; 및 서열 번호: 35에 제시된 CDR-L1 및 서열 번호: 36 또는 55에 제시된 CDR-L2 및 서열 번호: 37 또는 56에 제시된 CDR-L3을 포함한다. 일부 구현예에서, FMC63 항체는, 서열 번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역(V<sub>H</sub>) 및 서열 번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역(V<sub>L</sub>)을 포함한다.

[0793] 일부 구현예에서, scFv는, 서열 번호: 35의 CDR-L1 서열, 서열 번호: 36의 CDR-L2 서열 및 서열 번호: 37의 CDR-L3 서열을 함유하는 가변 경쇄 및/또는 서열 번호: 38의 CDR-H1 서열, 서열 번호: 39의 CDR-H2 서열 및 서열 번호: 40의 CDR-H3 서열을 함유하는 가변 중쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열 번호: 41에 제시된 가변 중쇄 영역 및 서열 번호: 42에 제시된 가변 경쇄 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 서열 번호: 58에 제시된다. 일부 구현예에서, scFv는 V<sub>H</sub>, 링커 및 V<sub>L</sub> 순서로 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 V<sub>L</sub>, 링커 및 V<sub>H</sub> 순서로 포함한다. 일부 구현예에

서, scFv는, 서열 번호: 57에 제시된 뉴클레오티드 서열 또는 서열 번호: 57에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열에 의해 암호화된다. 일부 구현예에서, scFv는, 서열 번호: 43에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 43에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0794] 일부 구현예에서, scFv는 SJ25C1에서 유래된다. SJ25C1은 인간 기원의 CD19를 발현하는 Na1m-1 및 -16 세포에 대하여 발생된 마우스 단클론 IgG1 항체이다(Ling, N. R., *et al.* (1987). *Leucocyte typing III*. 302). 일부 구현예에서, SJ25C1 항체는, 서열 번호: 47-49에 각각 제시된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3 서열 및 서열 번호: 44-46에 각각 제시된 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, SJ25C1 항체는, 서열 번호: 50의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄 가변 영역( $V_H$ ) 및 서열 번호: 51의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄 가변 영역( $V_L$ )을 포함한다.

[0795] 일부 구현예에서, scFv는, 서열 번호: 44의 CDR-L1 서열, 서열 번호: 45의 CDR-L2 서열 및 서열 번호: 46의 CDR-L3 서열을 함유하는 가변 경쇄 및/또는 서열 번호: 47의 CDR-H1 서열, 서열 번호: 48의 CDR-H2 서열 및 서열 번호: 49의 CDR-H3 서열을 함유하는 가변 중쇄를 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는 서열 번호: 50에 제시된 가변 중쇄 영역 및 서열 번호: 51에 제시된 가변 경쇄 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 가변 중쇄 및 가변 경쇄는 링커에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 링커는 서열 번호: 52에 제시된다. 일부 구현예에서, scFv는  $V_H$ , 링커 및  $V_L$  순서로 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는  $V_L$ , 링커 및  $V_H$  순서로 포함한다. 일부 구현예에서, scFv는, 서열 번호: 53에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 53에 대해 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.

[0796] 일부 구현예에서, 항원이 CD20이다. 일부 구현예에서, scFv가 CD20에 특이적인 항체 또는 항체 단편에서 유래된  $V_H$  및  $V_L$ 을 함유한다. 일부 구현예에서, CD20에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 리톡시맵 scFv와 같은 리톡시맵 이거나 이로부터 유래된 항체이다.

[0797] 일부 구현예에서, 항원이 CD22이다. 일부 구현예에서, scFv가 CD22에 특이적인 항체 또는 항체 단편에서 유래된  $V_H$  및  $V_L$ 을 함유한다. 일부 구현예에서, CD22에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 m971 scFv와 같은 m971이거나 이로부터 유래된 항체이다.

[0798] 일부 구현예에서, 항원이 BCMA이다. 일부 구현예에서, scFv는 BCMA에 특이적인 항체 또는 항체 단편에서 유래된  $V_H$  및  $V_L$ 을 함유한다. 일부 구현예에서, BCMA에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO 2016/090327 및 WO 2016/090320]에 제시된 항체 또는 항체 단편 유래  $V_H$  및  $V_L$ 이거나 이를 함유한다.

[0799] 일부 구현예에서, 항원이 GPRC5D이다. 일부 구현예에서, scFv가 GPRC5D에 특이적인 항체 또는 항체 단편에서 유래된  $V_H$  및  $V_L$ 을 함유한다. 일부 구현예에서, GPRC5D에 결합하는 항체 또는 항체 단편은 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO 2016/090329 및 WO 2016/090312]에 제시된 항체 또는 항체 단편 유래  $V_H$  및  $V_L$ 이거나 이를 함유한다.

[0800] 일부 측면에서, 암호화된 CAR은 범용 태그 또는 범용 에피토프에 결합하거나 인식하는, 예를 들어 특이적으로 결합하는 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인을 함유한다. 일부 측면에서, 결합 도메인은, 질병 또는 장애와 관련된 항원을 인식하는 상이한 결합 분자(예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편)에 연결될 수 있는 분자, 태그, 폴리펩티드 및/또는 에피토프에 결합할 수 있다. 예시적인 태그 또는 에피토프는 염료(예를 들어, 플루오레신 이소티오시아네이트) 또는 비오틴을 포함한다. 일부 측면에서, 결합 분자(예를 들어, 항체 또는 항원 결합 단편)가, 태그에 특이적인 CAR을 발현하는 조작된 세포와 관련되고, 질병 또는 장애, 예를 들어 종양 항원과 관련된 항원을 인식하는 태그에 연결되어 조작된 세포의 세포 독성 또는 다른 이펙터 기능을 달성한다. 일부 측면에서, 질병 또는 장애와 관련된 항원에 대한 CAR의 특이성이 태그된 결합 분자(예를 들어, 항체)에 의해 제공되고, 태그된 상이한 결합 분자가 사용되어 상이한 항원을 표적화할 수 있다. 범용 태그 또는 범용 에피토프에 특이적인 예시적인 CAR은, 예를 들어 문헌[U.S. 9,233,125, WO 2016/030414, Urbanska *et al.*, (2012) *Cancer Res* 72: 1844-1852 및 Tamada *et al.*, (2012). *Clin Cancer Res* 18:6436-6445]에 기재된 것을 포함한다.

[0801] 일부 구현예에서, 암호화된 CAR은, 주요 조직적합성 복합체(MHC)-펩티드 복합체로 세포 표면 상에 제시된 종양 관련 항원과 같은 세포 내 항원을 특이적으로 인식하는 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들어 scFv)과 같은 TCR 유사 항체를 함유한다. 일부 구현예에서, MHC 펩티드 복합체를 인식하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 항원

수용체와 같은 재조합 수용체의 일부로 세포 상에 발현될 수 있다. 항원 수용체 중에 기능성 비-T 세포 수용체 (TCR) 항원 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체(CAR)가 있다. 일부 구현예에서, 펩티드 MHC 복합체에 대하여 지시된 TCR 유사 특이성을 나타내는 항체 또는 항원 결합 단편을 함유하는 CAR이 TCR 유사 CAR로 또한 지칭될 수 있다. 일부 구현예에서, CAR이 TCR 유사 CAR이고, 항원은 프로세싱된 펩티드 항원, 예컨대 TCR과 마찬가지로, MHC 분자의 상황에서 세포 표면 상에서 인식되는 세포 내 단백질의 펩티드 항원이다. 일부 구현예에서, TCR 유사 CAR의 MHC-펩티드 복합체에 특이적인 세포 외 항원 결합 도메인이, 일부 측면에서 링커 및/또는 막관통 도메인(들)을 통해 하나 이상의 세포 내 신호 전달 구성 요소에 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 분자가 TCR과 같은 천연 항원 수용체를 통한 신호 및 선택적으로 공자극 수용체와 조합하여 상기 수용체를 통한 신호를 전형적으로 모방하거나 이와 유사할 수 있다.

[0802] 일부 구현예에서, 주요 조직 적합성 복합체(MHC)가, 세포 기구에 의해 처리된 펩티드 항원을 포함한 폴리펩티드의 펩티드 항원과 일부 경우에, 복합체를 형성할 수 있는 다형성 펩티드 결합 부위 또는 결합 그루브(groove)를 함유하는 단백질, 일반적으로 당단백질을 포함한다. 일부 경우에, MHC 분자가 TCR 또는 TCR 유사 항체와 같은 T 세포 상의 항원 수용체에 의해 인식 가능한 형태로 항원 제시를 위해 펩티드와의 복합체로, 즉 MHC 펩티드 복합체를 포함하면서 세포 표면 상에 제시되거나 발현될 수 있다. 일반적으로, MHC 클래스 I 분자는 일부 경우에, 3 개의  $\alpha$  도메인을 갖는 막에 걸쳐있는  $\alpha$  사슬 및 비공유 결합된  $\beta 2$  마이크로글로불린을 갖는 이중 2량체이다. 일반적으로 MHC 클래스 II 분자는 2 개의 막관통 당단백질,  $\alpha$  및  $\beta$ 로 구성되며, 둘 다 전형적으로 막에 걸쳐 있다. MHC 분자는 펩티드에 결합하기 위한 항원 결합 부위 또는 부위들 및 적절한 항원 수용체에 의한 인식에 필요한 서열을 함유하는 MHC의 유효 부분을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 분자가 시토솔에서 유래한 펩티드를 세포 표면으로 전달하고, 여기서 MHC 펩티드 복합체는 T 세포, 예컨대 일반적으로  $CD8^+$  T 세포 이나, 일부 경우에  $CD4^+$  T 세포에 의해 인식된다. 일부 구현예에서, MHC 클래스 II 분자가 소포 시스템에서 유래한 펩티드를 세포 표면으로 전달하며, 여기서 상기는  $CD4^+$  T 세포에 의해 전형적으로 인식된다. 일반적으로, MHC 분자가, 마우스에서 H-2 및 인간에서 인간 백혈구 항원(human leukocyte antigen, HLA)으로 통칭되는 연관된 유전자좌 그룹에 의해 암호화된다. 따라서, 전형적으로 인간 MHC는 인간 백혈구 항원(HLA)으로도 지칭될 수 있다.

[0803] 용어 "MHC 펩티드 복합체(MHC-peptide complex)" 또는 "펩티드 MHC 복합체(peptide-MHC complex)" 또는 이의 변형은, 예컨대 일반적으로 MHC 분자의 결합 그루브(groove) 또는 틈에서 펩티드의 비공유 상호작용에 의한 펩티드 항원 및 MHC 분자의 복합체 또는 결합을 지칭한다. 일부 구현예에서, MHC 펩티드 복합체가 세포의 표면에 존재하거나 제시된다. 일부 구현예에서, MHC 펩티드 복합체가 TCR, TCR 유사 CAR 또는 이의 항원 결합 부분과 같은 항원 수용체에 의해 특이적으로 인식될 수 있다.

[0804] 일부 구현예에서, 폴리펩타이드의 펩티드, 예컨대 펩티드 항원 또는 에피토프가, 예컨대 항원 수용체에 의한 인식을 위해 MHC 분자와 결합할 수 있다. 일반적으로, 펩티드는 폴리펩티드 또는 단백질과 같은 보다 긴 생물학적 분자의 단편에서 유래하거나 이에 근거한다. 일부 구현예에서, 펩티드는 전형적으로 약 8 내지 약 24 개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 펩티드는 MHC 클래스 II 복합체에서 인식을 위해 (약) 9 내지 22 개의 아미노산 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, 펩티드는 MHC 클래스 I 복합체에서 인식을 위해 (약) 8 내지 13 개의 아미노산 길이를 갖는다. 일부 구현예에서, MHC 펩티드 복합체와 같은 MHC 분자의 상황에서 펩티드 인식 시, 항원 수용체, 예컨대 TCR 또는 TCR 유사 CAR이 T 세포 반응, 예컨대 T 세포 증식, 사이토카인 생성, 세포 독성 T 세포 반응 또는 다른 반응을 유도하는 T 세포에 대한 활성화 신호를 생성하거나 유발시킨다.

[0805] 일부 구현예에서, TCR 유사 항체 또는 항원 결합 부분이 공지되어 있거나, 공지된 방법에 의해 생성될 수 있다 (예를 들어, 문헌[미국 특허 출원 공개 번호 US 2002/0150914; US 2003/0223994; US 2004/0191260; US 2006/0034850; US 2007/00992530; US20090226474; US20090304679; 및 국제 출원 공개 번호 WO 03/068201] 참조).

[0806] 일부 구현예에서, MHC 펩티드 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 특정 MHC 펩티드 복합체를 함유하는 유효량의 면역원으로 숙주를 면역화함으로써 생성될 수 있다. 일부 경우에, MHC 펩티드 복합체의 펩티드는 종양 항원, 예를 들어 여기에 기재된 바와 같은 범용 종양 항원, 골수종 항원 또는 기타 항원과 같이 MHC에 결합할 수 있는 항원의 에피토프이다. 일부 구현예에서, 이어서 유효량의 면역원이 면역 반응을 유도하기 위해 숙주에 투여되고, 여기서 면역원은 MHC 분자의 결합 그루브에서 펩티드의 3차원 제시에 대하여 면역 반응을 유도하기에 충분한 기간 동안 이의 3차원 형태를 유지한다. 이어서 숙주에서 수집된 혈청이 분석되어 MHC 분자의 결합 그루브에서 펩티드의 3차원 제시를 인식하는 바람직한 항체가 생성되고 있는지가 결정된다. 일

부 구현예에서, 생성된 항체가 분석되어 항체가 MHC 펩티드 복합체와 MHC 분자 단독, 관심 펩티드 단독 및 MHC와 무관한 펩티드의 복합체를 구별할 수 있는지를 확인할 수 있다. 이어서 원하는 항체를 분리할 수 있다.

[0807] 일부 구현예에서, MHC 펩티드 복합체에 특이적으로 결합하는 항체 또는 이의 항원 결합 부분이 파지 항체 라이브러리와 같은 항체 라이브러리 디스플레이 방법을 이용함으로써 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 돌연변이 Fab, scFv 또는 다른 항체 형태의 파지 디스플레이 라이브러리가 생성될 수 있고, 예를 들어 여기서 상기 라이브러리의 멤버가 CDR 또는 CDR들의 하나 이상의 잔기에서 돌연변이된다. 예를 들어, 문헌[미국 특허 출원 공개 번호 US20020150914, US20140294841; 및 Cohen CJ. *et al.* (2003) *J Mol. Recogn.* 16:324-332]을 참조한다.

[0808] 여기서 용어 "항체(antibody)"는 가장 넓은 의미로 사용되고, 다클론 및 단클론 항체를 포함하며, 온전한 항체 및 기능성(항원-결합) 항체 단편을 포함하고, 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 단편 항원 결합(Fab) 단편, F(ab')<sub>2</sub> 단편, Fab' 단편, Fv 단편, 재조합 IgG(rIgG) 단편, 가변 중쇄(V<sub>H</sub>) 영역, 단일 사슬 항체 단편을 포함하고, 단일 사슬 가변 단편(scFv) 및 단일 도메인 항체(예를 들어, sdAb, sdFv, 나노바디, V<sub>H</sub> 또는 V<sub>NAR</sub>) 또는 단편을 포함한다. 용어는 유전자 조작되고/거나 달리 변형된 형태의 면역 글로불린, 예컨대 인트라바디(intrabodies), 펩티바디(peptibodies), 키메라 항체, 완전한 인간 항체, 인간화된 항체 및 이종 접합 항체, 다중 특이적, 예를 들어, 이종 특이적 항체, 디아바디(diabodies), 트리아바디(triabodies) 및 테트라바디(tetrabodies), 탠덤 디-scFv(tandem di-scFv), 탠덤 트리-scFv를 포괄한다. 달리 언급되지 않는 한, 용어 "항체(antibody)"는 이의 기능성 항체 단편을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 용어는 손상되지 않거나 또는 전장 항체를 또한 포괄하고, 임의의 클래스 또는 하위 클래스의 항체를 포함하며, IgG 및 이의 하위 클래스, IgM, IgE, IgA 및 IgD를 포함한다. 일부 측면에서, CAR은, 예를 들어 상이한 특이성을 갖는 2 개의 항원 결합 도메인을 함유하는 이종 특이적 CAR이다.

[0809] 일부 구현예에서, 항원 결합 단백질, 항체 및 이의 항원 결합 단편은 전장 항체의 항원을 특이적으로 인식한다. 일부 구현예에서, 항체의 중쇄 및 경쇄는 전장일 수 있거나 또는 항원 결합 부분(Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv 또는 단일 사슬 Fv 단편(scFv))일 수 있다. 다른 구현예에서, 항체 중쇄 불변 영역이 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD 및 IgE에서 선택되고, 특히 예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4, 보다 특히, IgG1(예를 들어, 인간 IgG1)에서 선택된다. 일부 구현예에서, 항체 경쇄 불변 영역이 예를 들어, 카파 또는 랩다, 특히 카파에서 선택된다.

[0810] 암호화된 재조합 수용체의 결합 도메인 중에 항체 단편이 있다. "항체 단편(antibody fragment)"은 온전한 항체가 결합하는 항원에 결합하는 온전한 항체의 일부를 포함하는 온전한 항체가 아닌 분자를 지칭한다. 항체 단편의 예는, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; 디아바디; 선형 항체; 가변 중쇄(V<sub>H</sub>) 영역, scFv와 같은 단일 사슬 항체 분자 및 단일 도메인 V<sub>H</sub> 단일 항체; 및 항체 단편에서 형성된 다중 특이적 항체를 포함하나 이에 국한되지 않는다. 특정 구현예에서, 항체는 가변 중쇄 영역 및/또는 가변 경쇄 영역을 포함하는 단일 사슬 항체 단편, 예컨대 scFv이다.

[0811] 용어 "가변 영역(variable region)" 또는 "가변 도메인(riable domain)"은 항체가 항원에 결합하는데 관여하는 항체 중쇄 또는 경쇄의 도메인을 지칭한다. 천연 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인(각각 V<sub>H</sub> 및 V<sub>L</sub>)은 일반적으로 유사한 구조를 가지며, 각각의 도메인이 4 개의 보존된 프레임워크 영역/framework region, FR) 및 3 개의 CDR을 포함한다. (예를 들어, 문헌[Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., 91 페이지 (2007)]을 참조한다.) 단일 V<sub>H</sub> 또는 V<sub>L</sub> 도메인이 항원 결합 특이성을 부여하기에 충분할 수 있다. 또한, 특정 항원에 결합하는 항체가 항원에 결합하는 항체 유래 V<sub>H</sub> 또는 V<sub>L</sub> 도메인을 사용하여 분리되어 각각 상보성 V<sub>L</sub> 또는 V<sub>H</sub> 도메인의 라이브러리를 스크리닝할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)]을 참조한다.

[0812] 단일 도메인 항체(sdAb)가 항체의 중쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부 또는 경쇄 가변 도메인의 전부 또는 일부를 포함하는 항체 단편이다. 특정 구현예에서, 단일 도메인 항체는 인간 단일 도메인 항체이다. 일부 구현예에서, CAR이, 항원, 예컨대 종양 세포 또는 암세포와 같은 표적화될 세포 또는 질병의 암 마커 또는 세포 표면 항원, 예컨대 여기에 기재되거나 공지된 임의의 표적 항원에 특이적으로 결합하는 항체 중쇄 도메인을 포함한다. 예시적인 단일 도메인 항체는 sdFv, 나노바디, V<sub>H</sub> 또는 V<sub>NAR</sub>을 포함한다.

[0813] 항체 단편이 온전한 항체의 단백질 분해 소화 및 재조합 숙주 세포에 의한 생산을 포함하나 이에 국한되지 않는다

다양한 기술에 의해 제조될 수 있다. 일부 구현예에서, 항체는 재조합으로 생성된 단편, 예컨대 합성 링커, 예를 들어 펩티드 링커에 의해 연결된 2 개 이상의 항체 영역 또는 사슬을 갖는 것과 같이 자연적으로 발생하지 않고/거나 자연적으로 발생하는 온전한 항체의 효소 분해에 의해 생성되지 않을 수 있는 배열을 포함하는 단편이다. 일부 구현예에서, 항체 단편은 scFv이다.

[0814] "인간화된(humanized)" 항체는 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 아미노산 잔기가 비인간 CDR에서 유래되고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 아미노산 잔기가 인간 FR에서 유래된 항체이다. 인간화된 항체는 인간 항체에서 유래된 항체 불변 영역의 적어도 일부를 선택적으로 포함할 수 있다. 비인간 항체의 "인간화된 형태(humanized form)"는 인간화를 거쳐 인간에 대한 면역원성이 전형적으로 감소하였으나 모체 비인간 항체의 특이성 및 친화도를 보유한 비인간 항체의 변이체를 지칭한다. 일부 구현예에서, 인간화된 항체의 일부 FR 잔기가 비인간 항체 (예를 들어, CDR 잔기가 유래된 항체) 유래 대응하는 잔기로 치환되어 예를 들어, 항체 특이성 또는 친화도가 회복 또는 개선된다.

[0815] 따라서, 일부 구현예에서, TCR 유사 CAR을 포함한 암호화된 키메라 항원 수용체는 항체 또는 항체 단편을 함유하는 세포 외 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 단편이 scFv를 포함한다. 일부 측면에서, 항체 또는 항원 결합 단편이, 항원 결합 단편 또는 분자 중 복수 예컨대 라이브러리를 스크리닝함으로써, 예컨대 특정 항원 또는 리간드에 대한 결합에 대해 scFv 라이브러리를 스크리닝함으로써 획득될 수 있다.

[0816] 일부 구현예에서, 암호화된 CAR이 다중 특이적 CAR이고, 예를 들어 복수의 상이한 항원에 결합 및/또는 인식할 수 있는, 예를 들어 특이적으로 결합할 수 있는 복수의 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인을 함유한다. 일부 측면에서, 암호화된 CAR이, 예컨대 상이한 특이성을 갖는 2 개의 항원 결합 도메인을 함유함으로써, 예를 들어 2 개의 항원을 표적화하는 이중 특이적 CAR이다. 일부 구현예에서, CAR이, 예를 들어 여기 기재된 바와 같은 임의의 열거된 항원, 예를 들어 CD19 및 CD22 또는 CD19 및 CD20에서 선택된 표적 세포 상의 상이한 표면 항원에 결합하는 하나 이상의 항원 결합 도메인을 함유하는 이중 특이적 결합 도메인, 예를 들어 이중 특이적 항체 또는 이의 단편을 함유한다. 일부 구현예에서, 각각의 에피토프 또는 항원에 대한 이중 특이적 결합 도메인의 결합이, T 세포의 기능, 활성화 및/또는 반응의 자극, 예를 들어, 세포 독성 활성화 및 표적 세포의 후속적인 용해를 초래할 수 있다. 상기 예시적인 이중 특이적 결합 도메인 중 일부 경우에, 예를 들어 가요성 링커를 통해 서로 융합된 탠덤 scFv 분자; 탠덤 디아바디를 포함하는 디아바디 및 이의 유도체(Holliger et al, Prot Eng 9, 299-305 (1996); Kipriyanov et al, J Mol Biol 293, 41-66 (1999)); C-말단 이황화물 가교를 갖는 디아바디 형태를 포함할 수 있는 이중 친화도 재표적화(dual affinity retargeting, DART) 분자; 가요성 링커에 의해 융합된 탠덤 scFv 분자를 함유하는 이중 특이적 T 세포 참여자(bispecific T cell engager, BiTE) 분자(예를 들어, 문헌[Nagorsen and Bauerle, Exp Cell Res 317, 1255-1260 (2011)] 참조); 또는 전체 하이브리드 마우스/랫트 IgG 분자를 포함하는 트리오맵(triomabs)(Seimetz et al, Cancer Treat Rev 36, 458-467 (2010));을 포함할 수 있다. 임의의 상기 결합 도메인이 여기에 기재된 임의의 CAR에 함유될 수 있다.

[0817] b. 스페이서 및 막관통 도메인

[0818] 일부 측면에서, 암호화된 재조합 수용체, 예를 들어 키메라 항원 수용체(CAR)가, 항체 또는 이의 단편과 같은 하나 이상의 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인을 함유하는 세포 외 부분 및 하나 이상의 세포 내 신호 전달 영역 또는 도메인(상호교환적으로 세포질 신호 전달 도메인 또는 영역으로도 명명)을 포함한다. 일부 측면에서, 재조합 수용체, 예를 들어 CAR이 스페이서 및/또는 막관통 도메인 또는 부분을 더 포함한다. 일부 측면에서, 스페이서 및/또는 막관통 도메인이 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인을 함유하는 세포 외 부분과 세포 내 신호 전달 영역(들) 또는 도메인(들)을 연결할 수 있다.

[0819] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체 예컨대 CAR이, 면역 글로불린 불변 영역 또는 이의 변이체 또는 변형된 버전의 적어도 일부, 예컨대 힌지 영역, 예를 들어 IgG4 힌지 영역 및/또는 C<sub>H</sub>1/C<sub>L</sub> 및/또는 Fc 영역이거나 이를 포함할 수 있는 스페이서를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체가 스페이서 및/또는 힌지 영역을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 일부가 IgG4, IgG2 또는 IgG1과 같은 인간 IgG의 것이다. 일부 측면에서, 불변 영역의 일부가 항원 인식 구성 요소, 예를 들어, scFv와 막관통 도메인 사이에서 스페이서 영역으로 기능한다. 스페이서는 스페이서의 부재 시에 비해 항원 결합 후 세포의 증가된 반응성을 제공하는 길이일 수 있다. 일부 예에서, 스페이서는 (약) 12 개 아미노산 길이이거나 또는 12 개 이내의 아미노산 길이이다. 예시적인 스페이서는, 약 10 내지 229 개 아미노산, 약 10 내지 200 개 아미노산, 약 10 내지 175 개 아미노산, 약 10 내지 150 개 아미노산, 약 10 내지 125 개 아미노산, 약 10 내지 100 개 아미노산, 약 10 내지 75 개 아미노산, 약 10 내지 50 개 아미노산, 약 10 내지 40 개 아미노산, 약 10 내지 30 개 아미노산, 약 10 내지 20

개 아미노산, 약 10 내지 15 개 이상의 아미노산을 갖는 것을 포함하고, 열거된 범위 중 임의의 종점 사이 임의의 정수를 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이스 영역은 약 12 개 이하의 아미노산, 약 119 개 이하의 아미노산 또는 약 229 개 이하의 아미노산을 갖는다. 일부 구현예에서, 스페이스는, 250 개 미만의 아미노산 길이, 200 개 미만의 아미노산 길이, 150 개 미만의 아미노산 길이, 100 개 미만의 아미노산 길이, 75 개 미만의 아미노산 길이, 50 개 미만의 아미노산 길이, 25 개 미만의 아미노산 길이, 20 개 미만의 아미노산 길이, 15 개 미만의 아미노산 길이, 12 개 미만의 아미노산 길이 또는 10 개 미만의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 스페이스는, (약) 10 내지 250 개의 아미노산 길이, 10 내지 150 개의 아미노산 길이, 10 내지 100 개의 아미노산 길이, 10 내지 50 개의 아미노산 길이, 10 내지 25 개의 아미노산 길이, 10 내지 15 개의 아미노산 길이, 15 내지 250 개의 아미노산 길이, 15 내지 150 개의 아미노산 길이, 15 내지 100 개의 아미노산 길이, 15 내지 50 개의 아미노산 길이, 15 내지 25 개의 아미노산 길이, 25 내지 250 개의 아미노산 길이, 25 내지 100 개의 아미노산 길이, 25 내지 50 개의 아미노산 길이, 50 내지 250 개의 아미노산 길이, 50 내지 150 개의 아미노산 길이, 50 내지 100 개의 아미노산 길이, 100 내지 250 개의 아미노산 길이, 100 내지 150 개의 아미노산 길이 또는 150 내지 250 개의 아미노산 길이이다. 예시적인 스페이스는 IgG4 힌지 단독, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인에 연결된 IgG4 힌지 또는 C<sub>H</sub>3 도메인에 연결된 IgG4 힌지를 포함한다. 예시적인 스페이스는 문헌[Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, Hudecek *et al.* (2015) *Cancer Immunol. Res.*, 3(2):125-135 또는 국제 특허 출원 공개 번호 W02014031687]에 기재된 것을 포함하나 이에 국한되지 않는다.

[0820] 일부 구현예에서, 스페이스는 IgG4 및/또는 IgG2에서 전부 또는 일부 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이스는 IgG4, IgG2 및/또는 IgG2 및 IgG4에서 유래된 힌지, C<sub>H</sub>2 및/또는 C<sub>H</sub>3 서열(들) 중 하나 이상을 함유하는 키메라 폴리펩티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이스는 하나 이상의 도메인 내 하나 이상의 단일 아미노산 돌연변이와 같은 돌연변이를 함유할 수 있다. 일부 예에서, 아미노산 변형은 IgG4의 힌지 영역에서 세린(S)에 대한 프롤린(P)의 치환이다. 일부 구현예에서, 아미노산 변형은 글리코실화 이질성을 감소시키는 아스파라긴(N)을 글루타민(Q)으로의 치환, 예컨대 서열 번호: 184에 제시된 IgG4 중쇄 불변 영역 서열의 C<sub>H</sub>2 영역 내 177번 위치에 대응하는 위치(Uniprot Accession No. P01861; EU 넘버링에 의한 297번 위치 및 서열 번호: 4에 제시된 힌지-C<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>3 스페이스 서열의 79번 위치에 대응하는 위치)에서 N의 Q로의 치환 또는 서열 번호: 183에 제시된 IgG2 중쇄 불변 영역 서열의 C<sub>H</sub>2 영역 내 176번 위치에 대응하는 위치(Uniprot Accession No. P01859; EU 넘버링에 의한 297번 위치에 대응하는 위치)에서 N의 Q로의 치환이다.

[0821] 일부 측면에서, 스페이스는 IgG의 힌지 영역 단독, 예컨대 IgG4, IgG2 또는 IgG1의 힌지 단독, 예컨대 서열 번호: 1에 제시된 힌지 단독 스페이스를 함유하고, 서열 번호: 2에 제시된 서열에 의해 암호화된다. 다른 구현예에서, 스페이스는 C<sub>H</sub>2 및/또는 C<sub>H</sub>3 도메인에 연결된 Ig 힌지, 예를 들어, IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 스페이스는 서열 번호: 3에 제시된 바와 같은 C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인에 연결된 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 스페이스는 서열 번호: 4에 제시된 바와 같은 C<sub>H</sub>3 도메인에 연결된 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 스페이스는 글리신-세린 풍부 서열 또는 공지된 가요성 링커와 같은 다른 가요성 링커이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 부분은 IgD의 것이다. 일부 구현예에서, 스페이스는 서열 번호: 5에 제시된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 스페이스는, 서열 번호: 1, 3, 4 및 5 중 어느 하나에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 갖는다.

[0822] 일부 측면에서, 스페이스는: (a) 면역 글로불린 힌지 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성되거나, 약 15 개 이하의 아미노산을 포함하고, CD28 세포 외 영역 또는 CD8 세포 외 영역을 포함하지 않거나; (b) 면역글로불린 힌지, 선택적으로 IgG4 힌지 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나, 이로 구성되고/거나 약 15 개 이하의 아미노산을 포함하고, CD28 세포 외 영역 또는 CD8 세포 외 영역을 포함하지 않거나; (c) (약) 12 개의 아미노산 길이고/거나 면역글로불린 힌지, 선택적으로 IgG4 또는 이의 변형된 버전의 전부 또는 일부를 포함하거나 이로 구성되거나; 또는 (d) 서열 번호: 1, 3-5, 또는 27-34에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 상기 중 어느 하나의 변이체로 구성되거나 이를 포함하거나; 또는 (e) 화학식 X<sub>1</sub>PPX<sub>2</sub>P(여기서 X<sub>1</sub>은 글리신, 시스테인 또는 아르기닌이고 X<sub>2</sub>는 시스테인 또는 트레오닌임)을 포함하거나 이로 구성되는; 것에서 선택된 하나 이상과 같은 폴리펩티드 스페이스이다.

[0823] 예시적인 스페이서는, IgG 힌지 도메인과 같은 Ig 힌지를 함유하는 것과 같은 면역 글로불린 불변 영역의 일부(들)를 함유하는 것을 포함한다. 일부 측면에서, 스페이서는 IgG 힌지 단독, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 도메인 중 하나 이상에 연결된 IgG 힌지 또는 C<sub>H</sub>3 도메인에 연결된 IgG 힌지를 포함한다. 일부 구현예에서, IgG 힌지, C<sub>H</sub>2 및/또는 C<sub>H</sub>3 이 IgG4 또는 IgG2로부터 전부 또는 일부 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, 스페이서는 IgG4, IgG2 및/또는 IgG2 및 IgG4에서 유래된 힌지, C<sub>H</sub>2 및/또는 C<sub>H</sub>3 서열(들) 중 하나 이상을 함유하는 키메라 폴리펩티드일 수 있다. 일부 구현예에서, 힌지 영역이, IgG4 힌지 영역 및/또는 IgG2 힌지 영역의 전부 또는 일부를 포함하고/거나 - 여기서 IgG4 힌지 영역은 선택적으로 인간 IgG4 힌지 영역이고 IgG2 힌지 영역은 선택적으로 인간 IgG2 힌지 영역임 - ; C<sub>H</sub>2 영역은 IgG4 C<sub>H</sub>2 영역 및/또는 IgG2 C<sub>H</sub>2 영역의 전부 또는 일부를 포함하고/거나 - 여기서 IgG4 C<sub>H</sub>2 영역은 선택적으로 인간 IgG4 C<sub>H</sub>2 영역이고 IgG2 C<sub>H</sub>2 영역은 선택적으로 인간 IgG2 C<sub>H</sub>2 영역임 - ; 및/또는 C<sub>H</sub>3 영역은 IgG4 C<sub>H</sub>3 영역 및/또는 IgG2 C<sub>H</sub>3 영역의 전부 또는 일부를 포함 - 여기서 IgG4 C<sub>H</sub>3 영역은 선택적으로 인간 IgG4 C<sub>H</sub>3 영역이고 IgG2 C<sub>H</sub>3 영역은 선택적으로 인간 IgG2 C<sub>H</sub>3 영역임 - 한다. 일부 구현예에서, 힌지, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3은 IgG4 유래 힌지 영역, C<sub>H</sub>2 및 C<sub>H</sub>3 각각의 전부 또는 일부를 포함한다. 일부 구현예에서, 힌지 영역이 키메라이고 인간 IgG4 및 인간 IgG2 유래 힌지 영역을 포함하고/거나; C<sub>H</sub>2 영역은 키메라이고 인간 IgG4 및 인간 IgG2 유래 C<sub>H</sub>2 영역을 포함하고/거나; C<sub>H</sub>3 영역은 키메라이고 인간 IgG4 및 인간 IgG2 유래 C<sub>H</sub>3 영역을 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서는, IgG4/2 키메라 힌지 또는 인간 IgG4 힌지 영역과 비교하여 하나 이상의 아미노산 교체를 포함하는 변형된 IgG4 힌지; 인간 IgG2/4 키메라 C<sub>H</sub>2 영역; 및 인간 IgG4 C<sub>H</sub>3 영역;을 포함한다.

[0824] 일부 구현예에서, 스페이서는 IgG4 및/또는 IgG2로부터 전부 또는 일부 유래될 수 있고, 하나 이상의 도메인에서 하나 이상의 단일 아미노산 돌연변이와 같은 돌연변이를 함유할 수 있다. 일부 예에서, 아미노산 변형은 IgG4의 힌지 영역에서 세린(S)에 대한 프롤린(P)의 치환이다. 일부 구현예에서, 아미노산 변형은, 서열 번호: 184에 제시된 전장 IgG4 Fc 서열의 C<sub>H</sub>2 영역에서 177번 위치의 돌연변이 N177Q 또는 서열 번호: 183에 제시된 전장 IgG2 Fc 서열의 C<sub>H</sub>2 영역에서 176번 위치의 N176Q와 같이 글리코실화 이질성을 감소시키는 아스파라긴(N)에 대한 글루타민(Q)의 치환이다. 일부 구현예에서, 스페이서는, IgG4/2 키메라 힌지 또는 변형된 IgG4 힌지; IgG2/4 키메라 C<sub>H</sub>2 영역; 및 IgG4 C<sub>H</sub>3 영역이거나 이를 포함하고, 선택적으로 약 228 개 아미노산 길이거나; 또는 서열 번호: 187에 제시된 스페이서이다. 일부 구현예에서, CAR의 리간드- (예를 들어, 항원-) 결합 또는 인식 도메인이, 예를 들어 하나 이상의 세포 내 신호 전달 구성 요소, 예컨대 세포 내 신호 전달 영역 또는 도메인 및/또는 TCR 복합체와 같은 항원 수용체 복합체를 통한 활성화 및/또는 또 다른 세포 표면 수용체를 통한 신호를 모방하는 신호 전달 구성 요소를 함유하는 세포 내 영역에 연결된다. 따라서, 일부 구현예에서, 예를 들어 항원 결합 구성 요소(예를 들어, 항체)와 같은 결합 도메인을 함유하는 세포 외 영역이, 하나 이상의 막관통 및 세포 내 영역(들) 또는 도메인(들)에 연결된다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인이 세포 외 영역에 융합된다. 일부 구현예에서, 수용체, 예를 들어 CAR에 있는 도메인 중 하나와 자연적으로 결합하는 막관통 도메인이 사용된다. 일부 경우에, 막관통 도메인이 아미노산 치환에 의해 선택되거나 변형되어 수용체 복합체의 다른 멤버와의 상호 작용을 최소화하도록 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인에 대한 상기 도메인의 결합이 회피된다.

[0825] 일부 구현예에서, 막 관통 도메인이 천연 또는 합성 출처에서 유래된다. 출처가 천연인 경우, 일부 측면에서 도메인이 임의의 막결합 또는 막관통 단백질에서 유래된다. 막관통 영역이, T 세포 수용체의 알파, 베타 또는 제타 사슬, CD28, CD3 엡실론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137(4-1BB), CD154에서 유래된 것을 포함한다(즉, 적어도 상기의 막관통 영역(들)을 포함한다). 대안적으로 일부 구현예에서, 막관통 도메인이 합성이다. 일부 측면에서, 합성 막관통 도메인은 루신 및 발린과 같은 소수성 잔기를 우세하게 포함한다. 일부 측면에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛(triplet)이 합성 막관통 도메인의 각 말단에서 발견될 것이다. 일부 구현예에서, 연결은 링커, 스페이서 및/또는 막관통 도메인(들)에 의한 것이다. 일부 측면에서, 막관통 도메인은 CD28 또는 이의 변이체의 막관통 부분을 함유한다. 세포 외 영역 및 막관통이 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 외 영역 및 막관통이 여기에 기재된 어느 하나와 같은 스페이서에 의해 연결된다.

[0826] 일부 구현예에서, 수용체, 예를 들어 CAR의 막관통 도메인이, 인간 CD28 또는 이의 변이체의 막관통 도메인, 예를 들어, 인간 CD28의 27-아미노산 막관통 도메인(수탁 번호: P10747.1)이거나 또는 서열 번호: 8에 제시된 아

미노산 서열 또는 서열 번호: 8에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 막관통 도메인이며; 일부 구현예에서, 재조합 수용체의 일부를 함유하는 막관통 도메인이, 서열 번호: 9에 제시된 아미노산 서열 또는 이에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0827] c. 세포 내 영역

[0828] 일부 측면에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 암호화된 재조합 수용체, 예를 들어, CAR이, 신호 전달 영역 또는 도메인을 포함하는 세포 내 영역(세포질 영역으로도 명명)을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 영역이 세포 내 신호 전달 영역 또는 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 신호 전달 영역 또는 도메인은, 1차 신호 전달 영역, T 세포에서 1차 활성화 신호를 자극할 수 있고/거나 유도할 수 있는 신호 전달 도메인, T 세포 수용체(TCR) 구성 요소의 신호 전달 도메인(예를 들어, CD3-제타(CD3ζ) 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 영역 또는 이의 기능성 변이체 또는 신호 전달 부분) 및/또는 면역수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 신호 전달 도메인이거나 이를 포함한다.

[0829] 일부 구현예에서, 재조합 수용체, 예를 들어 CAR은, 하나 이상의 세포 내 신호 전달 구성 요소 또는 구성 요소들, 예컨대 세포 내 신호 전달 영역 또는 도메인을 포함한다. 세포 내 신호 전달 영역 중에 천연 항원 수용체를 통한 신호, 공자극 수용체와 조합으로 상기 수용체를 통한 신호 및/또는 공자극 수용체 단독을 통한 신호를 모방하거나 이와 유사한 것이 있다. 일부 구현예에서, 짧은 올리고- 또는 폴리펩티드 링커, 예를 들어 글리신 및 세린, 예를 들어 글리신-세린 더블릿을 함유하는 것과 같은 2 내지 10 개 아미노산 길이의 링커가, CAR의 막관통 도메인과 세포질 신호 전달 도메인 사이에 존재하고 연결을 형성한다.

[0830] 일부 구현예에서, CAR의 결합시, CAR의 세포질(또는 세포 내) 도메인 또는 영역, 예를 들어 세포 내 신호 전달 영역이, 면역 세포, 예를 들어 CAR을 발현하도록 조작된 T 세포의 정상 이펙터 기능 또는 반응 중 하나 이상을 자극 및/또는 활성화시킨다. 예를 들어, 일부 상황에서, CAR이 T 세포의 기능, 예컨대 세포 용해 활성 또는 T-헬퍼 활성, 예컨대 사이토카인 또는 다른 인자의 분비를 유도한다. 일부 구현예에서, 항원 수용체 구성 요소 또는 공자극 분자의 세포 내 신호 전달 영역 또는 도메인의 절단 부분이, 예를 들어 그것이 이펙터 기능 신호를 전달하는 경우 온전한 면역 자극 사슬 대신에 사용된다. 일부 구현예에서, 예를 들어 세포 내 도메인 또는 도메인들을 포함하는 세포 내 신호 전달 영역이, T 세포 수용체(TCR)의 세포질 서열 및 일부 측면에서, 자연적인 상황에서 항원 수용체 결합 후에 신호 전달을 개시하기 위해 상기 수용체와 협력하여 작용하는 공-수용체 및/또는 상기 분자의 임의의 유도체 또는 변이체 및/또는 동일한 기능적 능력을 갖는 임의의 합성 서열의 세포질 서열을 또한 포함한다. 일부 구현예에서, 예를 들어 세포 내 도메인 또는 도메인들을 포함하는 세포 내 신호 전달 영역이, 공자극 신호 제공에 관여하는 영역 또는 도메인의 세포질 서열을 포함한다.

[0831] (i) 공자극 신호 전달 도메인

[0832] 일부 구현예에서, 완전한 자극 및/또는 활성화를 촉진하기 위해, 2차 또는 공자극 신호를 생성하기 위한 하나 이상의 구성 요소가 암호화된 CAR에 포함된다. 다른 구현예에서, 암호화된 CAR이 공자극 신호를 생성하기 위한 구성 요소를 포함하지 않는다. 일부 측면에서, 추가 수용체 폴리펩티드 또는 이의 일부가 동일한 세포에서 발현되고, 2차 또는 공자극 신호를 생성하기 위한 구성 요소를 제공한다.

[0833] 일부 구현예에서, 암호화된 CAR이 공자극 수용체, 예컨대 CD28, 4-1BB, OX40(CD134), CD27, DAP10, DAP12, ICOS 및/또는 다른 공자극 수용체의 신호 전달 영역 및/또는 막관통 부분을 포함한다. 일부 측면에서, 동일한 CAR이 1차 세포질 신호 전달 영역 및 공자극 신호 전달 구성 요소 둘 다를 포함한다.

[0834] 일부 구현예에서, 하나 이상의 상이한 재조합 수용체가 하나 이상의 상이한 세포 내 신호 전달 영역(들) 또는 도메인(들)을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 1차 세포질 신호 전달 영역이 하나의 암호화된 CAR 내에 포함되는 반면, 공자극 구성 요소는 또 다른 수용체, 예를 들어 또 다른 항원을 인식하는 또 다른 CAR에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, 암호화된 CAR이, 활성화 또는 자극 CAR 및 공자극 CAR을 포함하며, 둘 다 동일한 세포 상에서 발현된다(국제 출원 W02014/055668 참조).

[0835] 특정 구현예에서, 세포 내 신호 전달 영역이 CD3(예를 들어, CD3ζ) 세포 내 영역 또는 도메인에 연결된 CD28 막관통 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 영역이 CD3ζ 세포 내 영역 또는 도메인에 연결된 키메라 CD28 및 CD137(4-1BB, TNFRSF9) 공자극 도메인을 포함한다.

[0836] 일부 구현예에서, 암호화된 CAR이 세포질 부분에 하나 이상, 예를 들어 2 개 이상의 공자극 도메인 및 1차 세포

질 신호 전달 영역을 포함한다. 예시적인 CAR은 CD3-제타, CD28, CD137(4-1BB), OX40(CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D 및/또는 ICOS의 세포 내 구성 요소, 예컨대 세포 내 신호 전달 영역(들) 또는 도메인(들)을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체가, 일부 경우에 막관통 도메인과 세포 내 신호 전달 영역 또는 도메인 사이에, 예를 들어 CD28, CD137(4-1BB), OX40(CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D 및/또는 ICOS 유래 T 세포 공자극 분자의 세포 내 신호 전달 영역 또는 도메인을 함유한다. 일부 측면에서, T 세포 공자극 분자는 CD28, CD137(4-1BB), OX40(CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D 및/또는 ICOS 중 하나 이상이다. 일부 구현예에서, 공자극 분자는 인간 공자극 분자이다.

[0837] 일부 구현예에서, 세포 내 신호 전달 영역 또는 도메인이, 인간 CD28의 세포 내 공자극 신호 전달 도메인 또는 이의 기능성 변이체 또는 이의 일부, 예컨대 이의 41 개 아미노산 도메인 및/또는 천연 CD28 단백질의 186-187번 위치에서 LL의 GG로의 치환을 갖는 상기 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 신호 전달 도메인이, 서열 번호: 10 또는 11에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 10 또는 11에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 내 영역은, CD137(4-1BB)의 세포 내 공자극 신호 전달 도메인 또는 영역 또는 이의 기능성 변이체 또는 이의 일부, 예컨대 인간 4-1BB의 42-아미노산 세포질 도메인(수탁 번호: Q07011.1) 또는 이의 기능성 변이체 또는 이의 일부, 예컨대 서열 번호: 12에 제시된 아미노산 서열 또는 서열 번호: 12에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0838] 일부 경우에, 암호화된 CAR은 제1, 제2, 제3 또는 제4 세대 CAR로 지칭된다. 일부 측면에서, 제1 세대 CAR은, 항원 결합 시, 예를 들어 CD3-사슬 유도 신호를 통해 1차 자극 또는 활성화 신호만을 제공하는 것이고; 일부 측면에서, 제2 세대 CAR은 CD28, CD137(4-1BB), OX40(CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS 및/또는 다른 공자극 수용체와 같은 하나 이상의 공자극 수용체 유래 세포 내 신호 전달 영역(들) 또는 도메인(들)을 포함하는 것과 같은 상기 신호 및 공자극 신호를 제공하는 것이고; 일부 측면에서, 제3 세대 CAR은, 예를 들어 CD28, CD137(4-1BB), OX40(CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS 및/또는 다른 공자극 수용체에서 선택된 상이한 공자극 수용체의 다중 공자극 도메인을 포함하는 것이고; 일부 측면에서, 제4 세대 CAR은, 예를 들어 CD28, CD137(4-1BB), OX40(CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS 및/또는 다른 공자극 수용체에서 선택된 상이한 공자극 수용체의 3 개 이상의 공자극 도메인을 포함하는 것이다.

[0839] (ii) 1차 신호 전달 영역, 예를 들어, CD3 $\zeta$  사슬

[0840] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체, 예를 들어 CAR이, T 세포 활성화 및 세포 독성을 매개하는 TCR CD3 사슬, 예를 들어 CD3 제타 사슬과 같은 TCR 복합체의 세포 내 구성 요소를 포함한다. 따라서, 일부 측면에서, 항원 결합 또는 항원 인식 도메인이 하나 이상의 세포 신호 전달 모듈에 연결된다. 일부 구현예에서, 세포 신호 전달 모듈은 CD3 막관통 도메인, CD3 세포 내 신호 전달 도메인 및/또는 다른 CD 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체, 예를 들어 CAR은, Fc 수용체 감마(FcR  $\gamma$ ), CD8 알파, CD8 베타, CD4, CD25 또는 CD16과 같은 하나 이상의 추가 분자를 더 포함한다. 예를 들어, 일부 측면에서, CAR은 CD3 제타(CD3  $\zeta$ )와 CD8 알파, CD8 베타, CD4, CD25 또는 CD16 중 하나 이상 사이에 키메라 분자를 포함한다.

[0841] 천연 TCR의 상황에서, 완전한 활성화는 TCR을 통한 신호 전달뿐만 아니라 공자극 신호를 일반적으로 필요로 한다. 일부 측면에서, T 세포 활성화는 2 종류의 세포질 신호 전달 서열: TCR을 통한 항원 의존적 1차 활성화를 개시하는 것(1차 세포질 신호 전달 영역(들) 또는 도메인(들)) 및 항원 비의존적 방식으로 작용하여 2차 또는 공자극 신호를 제공하는 것(2차 세포질 신호 전달 영역(들) 또는 도메인(들))에 의해 매개될 수 있다. 일부 측면에서, CAR이 상기 신호 전달 구성 요소 중 하나 또는 둘 다를 포함한다.

[0842] 일부 측면에서, 암호화된 CAR이, TCR 복합체의 1차 자극 및/또는 활성화를 조절하는 1차 세포질 신호 전달 영역을 포함하는 세포 내 영역을 포함한다. 자극 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호 전달 영역(들)이, 예를 들어 CD3 제타(CD3  $\zeta$ )에서 유래된 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 공지된 신호 전달 모티프를 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, CAR이 CD3 $\zeta$ 에서 유래된 세포질 신호 전달 도메인, 이의 단편 또는 일부 또는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, 세포 내 (또는 세포질) 신호 전달 영역이, 인간 CD3 제타 사슬 또는 이의 단편 또는 부분을 포함하며, CD3 $\zeta$ 의 세포 내 또는 세포질 자극 신호 전달 도메인 또는 이의 기능성 변이체, 예컨대 인간 CD3 $\zeta$ 의 동형 단백질 3의 112 AA 세포질 도메인(수탁 번호: P20963.2) 또는 문헌[미국 특허 번호 7,446,190 또는 미국 특허 번호 8,911,993]에 기재된 바와 같은 CD3 $\zeta$  신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체의 세포 내 영역이, 서열 번호: 13, 14 또는 15에 제시된 아미노산 서열 또는

서열 번호: 13, 14 또는 15 또는 이의 부분 서열에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화된 예시적인 CD3  $\zeta$  사슬 또는 이의 단편이, CD3  $\zeta$  사슬의 ITAM 도메인, 예를 들어 서열 번호: 188에 제시된 인간 CD3  $\zeta$  사슬 전구체 서열 중 61-89, 100-128 또는 131-159 아미노산 잔기 또는 서열 번호: 188에 대해 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내고 CD3  $\zeta$  사슬 유래 하나 이상의 ITAM 도메인을 함유하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0843] 일부 구현예에서, 세포가 조작되어 암호화된 CAR의 기능 및/또는 활성을 조절, 제어 또는 변경하는 데 사용되는 하나 이상의 추가 분자(예를 들어, 폴리펩티드, 예컨대 추가 재조합 수용체 폴리펩티드 또는 이의 일부)를 발현한다. 예시적인 다중 사슬 재조합 수용체, 예컨대 다중 사슬 CAR이 여기, 예를 들어 섹션 III.B.2에 기재되어 있다.

[0844] 일부 구현예에서, 암호화된 CAR이, 항체, 예를 들어, 항체 단편, CD28의 막관통 부분 또는 이의 기능성 변이체이거나 이를 함유하는 막관통 도메인 및 CD28의 신호 전달 부분 또는 이의 기능성 변이체 및 CD3 제타의 신호 전달 부분 또는 이의 기능성 변이체를 함유하는 세포 내 신호 전달 영역을 함유한다. 일부 구현예에서, CAR이 항체, 예를 들어, 항체 단편, CD28의 막관통 부분 또는 이의 기능성 변이체이거나 이를 함유하는 막관통 도메인 및 4-1BB의 신호 전달 부분 또는 이의 기능성 변이체 및 CD3 제타의 신호 전달 부분 또는 이의 기능성 변이체를 함유하는 세포 내 신호 전달 도메인을 함유한다. 상기 일부 구현예에서, 수용체가 Ig 분자, 예컨대 인간 Ig 분자의 일부, 예컨대 Ig 힌지, 예를 들어 IgG4 힌지, 예컨대 힌지 단독 스페이서를 함유하는 스페이서를 더 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체가 수용체의 C-말단에서 CD3 제타(CD3  $\zeta$ )를 포함한다.

[0845] **2. 다중 사슬 CAR**

[0846] 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌의 핵산 서열에 의해 암호화된 재조합 수용체가 다중 사슬 CAR일 수 있다. 일부 구현예에서, 2 개 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 다중 사슬 CAR이 세포에서 발현될 경우, 하나 이상의 폴리펩티드 사슬이 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화된다. 일부 측면에서, 다중 사슬 CAR의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 핵산 서열을 도입하는 데 사용된 폴리뉴클레오티드가 여기 섹션 I.B.에 기재된 어느 하나를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드가, 다중 사슬 CAR의 하나 이상의 사슬 또는 이의 일부, 예컨대 다중 사슬 CAR의 하나 이상의 폴리펩티드의 적어도 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 함유한다. 일부 측면에서, 전이 유전자 서열이, 상이하거나 추가의 폴리펩티드, 예를 들어 다중 사슬 CAR의 다른 또는 추가 사슬 또는 추가 분자, 예컨대 여기 섹션 I.B.2.(iv)에 기재된 것을 암호화하는 서열을 또한 포함한다. 일부 측면에서, 다중 사슬 CAR의 추가 구성요소를 암호화하는 추가 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 추가 주형 폴리뉴클레오티드가 도입될 수 있다. 일부 측면에서, 추가 폴리뉴클레오티드가 여기, 예를 들어 섹션 I.B.2에 기재된 임의의 폴리뉴클레오티드 또는 이의 변형된 형태, 예컨대 별개의 게놈 유전자 좌에서 통합을 위해 핵산을 표적화하기 위한 상이한 상동성 암을 포함하는 것일 수 있다.

[0847] 일부 구현예에서, 제공된 조작된 세포가 다중 사슬 수용체, 예컨대 다중 사슬 CAR을 발현하는 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 다중 사슬 CAR이, 기능성 재조합 수용체를 함께 포함할 수 있는 2 개 이상의 유전자 조작된 수용체를 세포 상에 함유할 수 있다. 일부 측면에서, 다양한 폴리펩티드 사슬이 CAR의 기능 또는 활성을 조합으로 수행할 수 있고/거나 CAR의 기능 및/또는 활성을 조절, 제어 또는 조정할 수 있다. 일부 측면에서, 다중 사슬 CAR이 2 개 이상의 폴리펩티드 사슬을 함유할 수 있고, 각각이 상이한 항원의 동일한 곳을 인식하고, 각각이 상이한 영역 또는 도메인, 예컨대 상이한 세포 내 신호 전달 구성요소를 전형적으로 포함한다. 일부 측면에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌가, 다중 사슬 수용체, 예컨대 다중 사슬 CAR의 하나 이상의 사슬을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다.

[0848] 일부 구현예에서, 재조합 수용체가, 2 개 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함하는 다중 사슬 CAR 또는 이중 사슬 CAR이다. 일부 구현예에서, 다중 사슬 수용체는 조절 가능한 CAR, 조건적 활성 CAR 또는 유도 가능 CAR이다. 일부 측면에서, 재조합 수용체, 예컨대 이중 사슬 CAR의 2 개 이상의 폴리펩티드가, 재조합 수용체의 특이성, 활성, 항원(또는 리간드) 결합, 기능 및/또는 발현의 공간 또는 시간적 조절 또는 제어를 가능하게 한다. 상기 구현예 중 일부에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌의 핵산 서열에 의해 암호화된 재조합 수용체가 이중 사슬 또는 다중 사슬 수용체의 하나 이상의 사슬을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 이중 사슬 CAR 중 하나만이 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화되는 경우, 나머지 다른 하나의 사슬이 상이한 게놈 위치에서 통합되거나 에피솜의 별도 핵산 분자에 의해 암호화될 수 있다.

- [0849] 일부 구현예에서, 다중 사슬 CAR이 활성화 및 공자극 CAR의 조합물을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 다중 사슬 CAR이, 비-표적 세포, 예를 들어 정상 세포 상에 개별적으로 존재하나 치료될 질병 또는 병태의 세포 상에만 함께 존재하는 2 개의 상이한 항원을 표적화하는 CAR을 암호화하는 2 개의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 다중 사슬 CAR이 활성화 및 억제 CAR, 예컨대 활성화 CAR은 정상 또는 비질병 세포 및 치료될 질병 또는 병태의 세포 둘 다에서 발현되는 하나의 항원에 결합하고, 억제 CAR은 정상 세포 또는 치료가 바람직하지 않은 세포에서만 발현되는 또 다른 항원에 결합하는 것을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 다중 사슬 CAR이 조절, 조정 또는 제어될 수 있는 CAR을 암호화하는 1 개 이상의 폴리펩티드를 포함할 수 있다.
- [0850] 일부 구현예에서, 다중 사슬 CAR이, CAR의 하나 이상의 도메인 또는 영역을 암호화하는 하나 이상의 폴리펩티드 사슬을 포함한다. 일부 측면에서, 다양한 폴리펩티드 사슬이 조합으로 CAR을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 도메인 또는 영역이 CAR에 존재한다. 일부 구현예에서, 다중 사슬 CAR의 하나 이상의 폴리펩티드 사슬에 존재하는 다양한 도메인 또는 영역이 이용되어 CAR의 기능 및/또는 활성을 조절, 제어 또는 조정한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포가 상이한 구성 요소, 도메인 또는 영역을 함유하는 2 개 이상의 폴리펩티드 사슬을 발현한다. 일부 측면에서, 2 개 이상의 폴리펩티드 사슬이, 재조합 수용체의 특이성, 활성화, 항원(또는 리간드) 결합, 기능 및/또는 발현의 공간 또는 시간적 조절 또는 제어를 가능하게 한다. 일부 구현예에서, 다중 사슬 CAR이 하나 이상의 폴리펩티드, 예를 들어 2 개 이상의 폴리펩티드를 포함하고, 하나 이상의 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열이 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 통합을 위해 표적화된다. 일부 구현예에서, 추가 분자 또는 폴리펩티드, 예를 들어 다중 사슬 CAR의 추가 폴리펩티드 사슬 또는 추가 분자를 암호화하는 핵산 서열이, 예를 들어 표적화를 위해 사용되는 동일한 폴리뉴클레오티드 상에 배치에 의해 동일한 유전자 좌에서 표적화될 수 있다. 추가 분자 또는 폴리펩티드를 암호화하는 일부 핵산 서열이 상이한 유전자 좌에서 표적화되거나 상이한 방법에 의해 전달된다.
- [0851] 일부 측면에서, CAR의 도메인 또는 영역을 암호화하는 하나 이상의 폴리펩티드 사슬이 하나 이상의 항원 또는 분자를 표적화할 수 있다. 예시적인 다중 사슬 CAR 또는 기타 다중 표적화 전략이, 예를 들어 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO 2014055668 또는 Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, Sci Transl Med. (2013) 5(215):215ra172; Sadelain, Curr Opin Immunol. (2016) 41: 68-76; Wang et al. (2017) Front. Immunol. 8:1934; Mirzaei et al. (2017) Front. Immunol. 8:1850; Marin-Acevedo et al. (2018) Journal of Hematology & Oncology 11:8; Fesnak et al. (2016) Nat Rev Cancer. 16(9): 566-581; 및 Abate-Daga and Davila, (2016) Molecular Therapy - Oncolytics 3, 16014]에 기재된 것을 포함한다.
- [0852] 일부 구현예에서, 조작된 세포가, 일반적으로 제1 폴리펩티드 사슬에 의해 인식되는 항원, 예를 들어 제1 항원에 특이적인 결합 시, 세포에 대한 활성화 또는 자극 신호를 유도할 수 있는 재조합 수용체, 예를 들어, CAR의 제1 폴리펩티드 사슬을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포가, 일반적으로 제2 폴리펩티드 사슬에 의해 인식되는 제2 항원에 특이적인 결합 시, 면역 세포에 대해 공자극 신호를 유도할 수 있는, 일부 경우에, 키메라 공자극 수용체로 명명되는, 재조합 수용체, 예를 들어, CAR의 제2 폴리펩티드 사슬을 더 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원은 동일하다. 일부 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원이 상이하다.
- [0853] 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 사슬은 세포에 대한 활성화 또는 자극 신호를 유도할 수 있다. 일부 구현예에서, 수용체는 ITAM 또는 ITAM 유사 모티프를 함유하는 세포 내 신호 전달 구성 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬에 의해 유도된 활성화가, 면역 반응의 개시, 예컨대 ITAM 인산화 및/또는 ITAM 매개 신호 전달 캐스케이드의 개시, 면역학적 시냅스의 형성 및/또는 결합된 수용체 근처 분자(예를 들어, D4 또는 CD8 등)의 클러스터링, 하나 이상의 전사 인자, 예컨대 NF- $\kappa$ B 및/또는 AP-1의 활성화 및/또는 사이토카인과 같은 인자의 유전자 발현, 증식 및/또는 생존의 유도를 초래하는 세포 내 신호 전달 또는 단백질 발현의 변화를 수반한다. 일부 구현예에서, 활성화 도메인은 다중 사슬 CAR, 예컨대 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화된 폴리펩티드 사슬 중 하나 이상 내에 포함되는 반면, 공자극 구성 요소는 또 다른 항원을 인식하는 또 다른 폴리펩티드에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, 조작된 세포가, 활성화 또는 자극 CAR, 공자극 CAR을 포함하는 다중 사슬 CAR을 포함할 수 있으며, 둘 다 동일한 세포 상에 발현될 수 있다(국제 출원 WO2014/055668 참조). 일부 측면에서, 세포가 하나 이상의 자극 또는 활성화 CAR(예컨대 여기, 예를 들어 섹션 III.A에 기재된 바와 같은 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화된 것) 및/또는 공자극 CAR을 발현한다.
- [0854] 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 사슬이, CD28, CD137(4-1BB), OX40(CD134), CD27, DAP10, DAP12, NKG2D, ICOS와 같은 공자극 수용체 및/또는 다른 공자극 수용체의 세포 내 신호 전달 영역 또는 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 폴리펩티드 사슬이 상이한 공자극 수용체의 세포 내 신호 전달 도메인(들)을 함유할 수 있다. 일 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬이 CD28 공자극 신호 전달 도메인을 함유하고,

제2 폴리펩티드 사슬이 4-1BB 공자극 신호 전달 영역을 함유하거나 이와 반대도 마찬가지이다.

- [0855] 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 사슬이, ITAM 또는 ITAM 유사 모티프를 함유하는 세포 내 신호 전달 도메인, 예컨대 CD3 제타(CD3 $\zeta$ ) 사슬 또는 이의 단편 또는 일부에서 유래된 것, 예컨대 CD3 $\zeta$  세포 내 신호 전달 도메인 및 공자극 수용체의 세포 내 신호 전달 도메인 둘 다를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬이 ITAM 또는 ITAM 유사 모티프를 함유하는 세포 내 신호 전달 도메인을 함유하고, 제2 폴리펩티드 사슬이 공자극 수용체의 세포 내 신호 전달 도메인을 함유한다. 동일한 세포에서 유도된 활성화 또는 자극 신호와 조합한 공자극 신호는, 면역 반응, 예컨대 강력하고 지속적인 면역 반응, 예컨대 유전자 발현의 증가, 사이토카인 및 기타 인자의 분비 및 T 세포 매개 이펙터 기능, 예컨대 세포 사멸을 초래하는 것이다.
- [0856] 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬 단독의 결찰 또는 제2 폴리펩티드 사슬 단독의 결찰 중 어느 것도 강력한 면역 반응을 유도하지 못한다. 일부 측면에서, 하나의 수용체만 결찰되는 경우, 세포는 항원에 내성화되거나 반응하지 않거나 억제되고/거나 증식 또는 인자를 분비하거나 이펙터 기능을 수행하도록 유도되지 않는다. 그러나, 일부 상기 구현예에서, 예컨대 제1 및 제2 항원을 발현하는 세포와의 조우 시 다중 폴리펩티드 사슬이 결찰된 경우, 예를 들어, 하나 이상의 사이토카인의 분비, 증식, 지속성 및/또는 표적 세포의 세포 독성 사멸과 같은 면역 이펙터 기능의 수행에 의해 나타난 바와 같이 전체 면역 활성화 또는 자극과 같은 원하는 반응이 달성된다.
- [0857] 일부 구현예에서, 다중 사슬 CAR의 하나 이상의 사슬이 억제 CAR(iCAR, 문헌[Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215) (2013)] 참조), 예컨대 질병 또는 병태와 관련 및/또는 특이적인 것이 아닌 항원을 인식하는 CAR을 포함할 수 있고 이로써 질병 표적화 CAR을 통해 전달된 활성화 신호가 이의 리간드에 대한 억제 CAR의 결합에 의해 감소 또는 억제되어, 예를 들어 표적외 효과가 감소된다. 일부 구현예에서, 억제 CAR이 자극 또는 활성화 CAR(예를 들어, CD3제타(CD3 $\zeta$ ) 사슬 또는 이의 단편 또는 이의 일부를 함유함)과 동일한 폴리뉴클레오티드에 의해 또는 상이한 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화될 수 있다.
- [0858] 일부 구현예에서, 다중 사슬 CAR의 2 개의 폴리펩티드 사슬이 세포에 대해 활성화 및 억제 신호를 각각 유도하여, 항원에 하나의 폴리펩티드 사슬의 결찰은 세포를 활성화하거나 반응을 유도하나, 항원에 제2 폴리펩티드 사슬, 예를 들어 억제 수용체의 결찰은 반응을 억제하거나 약화시키는 신호를 유도한다. 활성화 CAR 및 억제 CAR(iCAR)의 조합물의 예가 있다. 상기 전략이 사용되어, 예를 들어, 활성화 CAR이 질병 또는 병태에서 발현되거나 정상 세포에서도 발현되는 항원에 결합하고, 억제 수용체가 정상 세포에서 발현되거나 질병 또는 병태의 세포에서 발현되지 않는 별도의 항원에 결합하는 상황에서 표적외 효과의 가능성을 감소시킬 수 있다.
- [0859] 일부 측면에서, 세포에서 발현된 추가 수용체 폴리펩티드가 억제 CAR(예를 들어 iCAR)을 더 포함하고, 세포에서 면역 반응, 예컨대 ITAM- 및/또는 공자극-촉진 반응을 약화 또는 억제하는 세포 내 구성 요소를 포함한다. 상기 세포 내 신호 전달 구성 요소의 예는 면역 체크포인트 분자 상에서 발견되는 것이고, 이는 PD-1, CTLA4, LAG3, BTLA, OX2R, TIM-3, TIGIT, LAIR-1, PGE2 수용체, EP2/4 아데노신 수용체를 포함하며, A2AR을 포함한다. 일부 측면에서, 조작된 세포는 상기 억제 분자 또는 이로부터 유래된 신호 전달 도메인을 포함하는 억제 CAR를 포함하여, 이것이 예를 들어, 활성화 및/또는 공자극 CAR에 의해 유도된 세포의 반응을 약화시키는 역할을 한다.
- [0860] 일부 구현예에서, 다중 사슬 CAR이 이용될 수 있고, 여기서 특정 질병 또는 병태와 관련된 항원이 비질병 세포 상에서 발현되고/거나 조작된 세포 자체에서 (예를 들어, 유전자 조작과 관련된 자극 시) 일시적으로 또는 영구적으로 발현된다. 상기 경우에, 2 개의 별도 및 개별적으로 특이적인 폴리펩티드의 결찰을 요구함으로써, 특이성, 선택성 및/또는 효능이 향상될 수 있다.
- [0861] 일부 구현예에서, 복수의 항원, 예를 들어, 제1 및 제2 항원이 암세포 상과 같은 표적화될 세포, 조직 또는 질병 또는 병태 상에서 발현된다. 일부 측면에서, 세포, 조직, 질병 또는 병태가 다발성 골수종 또는 다발성 골수종 세포이다. 일부 구현예에서, 복수의 항원 중 하나 이상이 일반적으로 정상 또는 비질병 세포 또는 조직 및/또는 조작된 세포 자체와 같은 세포 요법으로 표적화하는 것이 바람직하지 않은 세포 상에서도 발현된다. 상기 구현예에서, 세포의 반응을 달성하기 위해 다중 수용체의 결찰을 요구함으로써, 특이성 및/또는 효능이 달성된다.
- [0862] 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 폴리펩티드 사슬 중 하나가 나머지 다른 폴리펩티드 사슬의 발현, 항원 결합 및/또는 활성을 조절할 수 있다.
- [0863] 일부 측면에서, 2 개의 폴리펩티드 사슬 시스템이 사용되어 폴리펩티드 사슬 중 하나 이상의 발현을 조절할 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 폴리펩티드 사슬이 조절 가능한 절단 요소를 통해 연결된 조절 분자, 예컨대 전사

인자에 연결된 제1 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인을 함유한다. 일부 측면에서, 조절 가능한 절단 요소는 제1 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인의 결합 시 세포 내 도메인을 절단 및 방출할 수 있는 변형된 노치(Notch) 수용체(예를 들어, synNotch)에서 유래된다. 일부 측면에서, 제2 폴리펩티드 사슬이 세포에 대해 활성화 또는 자극 신호를 유도할 수 있는 세포 내 신호 전달 구성 요소, 예컨대 ITAM-함유 세포 내 신호 전달 도메인에 연결된 제2 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인을 함유한다. 일부 측면에서, 제2 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 핵산 서열이, 특정 전사 인자, 예를 들어 제1 폴리펩티드 사슬에 의해 암호화된 전사 인자에 의해 조절될 수 있는 전사 조절 요소, 예를 들어 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 측면에서, 제1 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인에 대한 리간드 또는 항원의 결합이 전사 인자의 단백질 분해 방출로 이어지고, 이는 차례로 제2 폴리펩티드 사슬의 발현을 유도할 수 있다(문헌[Roybal et al. (2016) Cell1164:770-779; Morsut et al. (2016) Cell 164:780-791] 참조). 일부 구현예에서, 제1 항원 및 제2 항원이 상이하다.

[0864] 일부 경우에, 재조합 수용체, 예를 들어, CAR이 조절, 제어, 유도 또는 억제되어 재조합 수용체를 이용한 요법의 안정성 및 효능을 최적화할 수 있거나 최적화하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, 다중 사슬 CAR은 조절 가능한 CAR이다. 일부 측면에서, 조절될 수 있는 CAR을 포함하는 조작된 세포가 여기에 제공된다. "조절 가능한 재조합 수용체(regulatable recombinant receptor)" 또는 "조절 가능한 CAR(regulatable CAR)"로도 여기서 지칭되는 조절될 수 있는 재조합 수용체는 2 개 이상의 폴리펩티드 사슬 세트와 같은 다중 폴리펩티드를 지칭하고, 이는 조작된 세포(예를 들어, 조작된 T 세포)에서 발현될 경우, 유도제의 제어 하에 세포 내 신호를 생성하는 능력을 가진 조작된 세포를 제공한다.

[0865] 일부 구현예에서, 조절 가능한 CAR의 폴리펩티드가, 또 다른 다량체화 도메인과 다량체화할 수 있는 다량체화 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인은 유도제에 결합 시 다량체화할 수 있다. 예를 들어, 다량체화 도메인이 다량체화 도메인의 다량체화에 의하여 조절 가능한 CAR의 폴리펩티드의 다량체화를 초래하는 화학 유도제와 같은 유도제에 결합함으로써 조절 가능한 CAR을 생성할 수 있다.

[0866] 일부 구현예에서, 조절 가능한 CAR 중 하나의 폴리펩티드가 리간드-(예를 들어, 항원) 결합 도메인을 포함하고, 조절 가능한 CAR 중 상이한 폴리펩티드가 세포 내 신호 전달 영역을 포함하며, 여기서 다량체화 도메인의 다량체화에 의한 2 개의 폴리펩티드의 다량체화가 리간드 결합 도메인 및 세포 내 신호 전달 영역을 포함하는 조절 가능한 CAR을 생성한다. 일부 구현예에서, 다량체화가 조절 가능한 CAR을 함유하는 조작된 세포에서 신호를 유도, 조절, 활성화, 매개 및/또는 촉진할 수 있다. 일부 구현예에서, 유도제가 조절 가능한 CAR의 하나 이상의 폴리펩티드의 다량체화 도메인에 결합하고, 조절 가능한 CAR의 구조적 변화를 유도하며, 여기서 상기 구조적 변화가 신호 전달을 활성화한다. 일부 구현예에서, 상기 키메라 수용체에 대한 리간드의 결합이, 수용체를 세포 내 신호 전달에 적합하게 만들 수 있는 일부 경우, 폴리펩티드 사슬 올리고머화를 포함한, 폴리펩티드 사슬의 구조적 변화를 유도한다.

[0867] 일부 구현예에서, 유도제가 작용하여, 예컨대 표적 항원과 조절 가능한 CAR의 상호 작용 중 조절 가능한 CAR이 바람직한 세포 내 신호를 생성하기 위해 조작된 세포에서 발현된 조절 가능한 CAR의 2 개 이상의 폴리펩티드 사슬 세트를 결합 또는 다량체화(예를 들어, 2량체화)한다. 유도제에 의한 조절 가능한 CAR의 2 개 이상의 폴리펩티드의 결합 또는 다량체화가 다량체화 도메인에 유도제의 결합 시 달성된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 조작된 세포 내 제1 폴리펩티드 및 제2 폴리펩티드가 유도제에 결합할 수 있는 다량체화 도메인을 각각 포함할 수 있다. 유도제에 의한 다량체화 도메인의 결합 시, 제1 폴리펩티드와 제2 폴리펩티드가 함께 결합하여 원하는 세포 내 신호를 생성한다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인은 폴리펩티드의 세포 내 부분에 위치한다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인은 폴리펩티드의 세포 외 부분에 위치한다.

[0868] 일부 구현예에서, 조절 가능한 CAR의 2 개 이상의 폴리펩티드 세트가 2, 3, 4 또는 5 개 이상의 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 2 개 이상의 폴리펩티드 세트는, 세포 내 신호 전달 영역 및 다량체화 도메인을 포함하는 동일한 폴리펩티드, 예를 들어 2, 3 개 이상의 동일한 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 2 개 이상의 폴리펩티드 세트는 상이한 폴리펩티드, 예를 들어, 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인 및 다량체화 도메인을 포함하는 제1 폴리펩티드 및 세포 내 신호 전달 영역 및 다량체화 도메인을 포함하는 제2 폴리펩티드이다. 일부 구현예에서, 세포 간 신호는 유도제의 존재 하에 생성된다. 일부 구현예에서, 세포 내 신호가 유도제의 부재 하에 발생하며, 예를 들어, 유도제가 조절 가능한 CAR의 2 개 이상의 폴리펩티드의 다량체화를 방해함으로써 조절 가능한 CAR에 의한 세포 내 신호 전달을 방지한다.

[0869] 일부 구현예에서, 다중 사슬 CAR, 하나 이상의 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 핵산 서열이, 예를 들어 HDR에 의해 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내로 통합된다. 일부 구현예에서, 2 개 이상의 별개의 폴리펩티드 사슬 중 다른 것

을 암호화하는 핵산 서열이 동일한 유전자 좌(예를 들어, 동일한 전이 유전자 서열 내이며 다른 폴리펩티드 사슬을 암호화하는 핵산 서열의 5' 또는 3'에 배치될 수 있음) 또는 상이한 유전자 좌 내에 통합될 수 있다. 일부 측면에서, 2 개 이상의 별개의 폴리펩티드 사슬 중 다른 것을 암호화하는 핵산 서열의 도입이 상이한 전달 방법, 예를 들어 일시적인 전달 방법 또는 에피솜 핵산 분자에 의할 수 있다.

[0870] 일부 구현예에서, 다중 사슬 CAR의 하나 이상의 폴리펩티드 사슬이 다량체화 도메인을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인이 유도제의 결합 시 다량체화(예를 들어, 2량체화)할 수 있다. 여기에서 고려된 유도제는 화학적 유도제 또는 단백질(예를 들어, 카스파제)을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 일부 구현예에서 유도제가 에스트로겐, 글루코코르티코이드, 비타민 D, 스테로이드, 테트라사이클린, 사이클로스포린, 라파마이신, 쿠머마이신, 기베렐린, FK1012, FK506, FKCsA, 리미두시드 또는 HaXS 또는 이의 유사물 또는 이의 유도체에서 선택된다. 일부 구현예에서 유도제는 AP20187 또는 AP20187 유사물, 예컨대, AP1510이다.

[0871] 일부 구현예에서, 다량체화 도메인이, 여기에 제공된 유도제와 같은 유도제의 결합 시 다량체화(예를 들어, 2량체화)할 수 있다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인은 FKBP, 시클로필린 수용체, 스테로이드 수용체, 테트라사이클린 수용체, 에스트로겐 수용체, 글루코코르티코이드 수용체, 비타민 D 수용체, 칼시뉴린 A, CyP-Fas, mTOR의 FRB 도메인, GyrB, GAI, GID1, Snap-태그 및/또는 HaloTag 또는 이의 일부 또는 이의 유도체 유래일 수 있다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인은 FK506 결합 단백질(FKBP) 또는 이의 유도체 또는 이의 단편 및/또는 이의 다량체, 예컨대 FKBP12v36이다. 일부 구현예에서, FKBP는 GVQVETISPGDGRTPFKRQGTVCVVHYTGMLEDGKMKDSSRDRNPKFKFLMGKQEVIRGWEEGVAQMSVGRQAKLTISPDYAYGATGHPGI IPPHATLVFDVE LLKLE(서열 번호: 82)의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, FKBP12v36은 GVQVETISPGDGRTPFKRQGTVCVVHYTGMLEDGKMKDSSRDRNPKFKFLMGKQEVIRGWEEGVAQMSVGRQAKLTISPDYAYGATGHPGI IPPHATLVFDVE LLKLE(서열 번호: 83)의 아미노산 서열을 포함한다.

[0872] 예시적인 유도제 및 대응하는 다량체화 도메인이, 예를 들어 문헌[미국 특허 출원 공개 번호 2016/0046700, Clackson *et al.* (1998) Proc Natl Acad Sci U S A. 95(18):10437-42; Spencer *et al.* (1993) Science 262(5136):1019-24; Farrar *et al.* (1996) Nature 383 (6596):178-81; Miyamoto *et al.* (2012) Nature Chemical Biology 8(5): 465-70; Erhart *et al.* (2013) Chemistry and Biology 20(4): 549-57]에 기재된 바와 같이 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 유도제는 리미두시드(AP1903으로도 공지; CAS 색인 명칭: 2-피페리딘카르복실산, 1-[(2S)-1-옥소-2-(3,4,5-트리메톡시페닐)부틸]-, 1,2-에탄디일비스 [이미노 (2-옥소-2, 1-에탄디일)옥시-3,1-페닐렌[(1R)-3-(3,4- 디메톡시페닐)프로필리덴]]에스테르, [2S-[1(R\*),2R \*[S\*[S\*[1(R\*),2R]]]]]- (9C1); CAS 등록 번호: 195514-63- 7; 분자식: C<sub>78</sub>H<sub>98</sub>N<sub>4</sub>O<sub>20</sub>; 분자량: 1411.65)이고, 다량체화 도메인은 FK506 결합 단백질(FKBP)이다.

[0873] 일부 구현예에서, 조작된 세포의 세포 막은 유도제가 관통할 수 없다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 세포 막은 유도제가 관통할 수 있다.

[0874] 일부 구현예에서, 조절 가능한 CAR은 유도제의 부재 하에 다량체 또는 2량체의 일부가 아니다. 유도제의 결합 시, 다량체화 도메인이 다량체화, 예를 들어 2량체화할 수 있다. 일부 측면에서, 다량체화 도메인의 다량체화가, 조절 가능한 CAR의 또 다른 폴리펩티드와 조절 가능한 CAR의 폴리펩티드의 다량체화, 예를 들어, 조절 가능한 CAR의 2 개 이상의 폴리펩티드의 다량체 복합체를 초래한다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인의 다량체화가, 신호 전달 구성 요소의 물리적 근접 또는 다량체 또는 2량체 형성을 유도함으로써 신호 전달을 유도, 조절, 활성화, 매개 및/또는 촉진할 수 있다. 일부 구현예에서, 유도제의 결합 시, 다량체화 도메인의 다량체화가, 다량체화 도메인에 직접 또는 간접적으로 연결된 신호 전달 도메인의 다량체화를 또한 유도한다. 일부 구현예에서, 다량체화가 신호 전달 도메인 또는 영역을 통해 신호 전달을 유도, 조절, 활성화, 매개 및/또는 촉진한다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인에 연결된 신호 전달 도메인 또는 영역이 세포 내 신호 전달 영역이다.

[0875] 일부 구현예에서, 다량체화 도메인이 세포 내에 있거나 또는 조작된 세포(예를 들어, 조작된 T 세포)의 세포 내 또는 세포질 측면 상의 세포 막과 결합한다. 일부 측면에서, 세포 내 다량체화 도메인이 막결합 도메인(예를 들어, 지질 연결 도메인), 예컨대 미리스토일화 도메인, 팔미토일화 도메인, 프레닐화 도메인 또는 막관통 도메인에 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인은 세포 내에 있고, 막관통 도메인을 통해 세포 외 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인에 연결된다. 일부 구현예에서, 세포 내 다량체화 도메인이 세포 내 신호 전달 영역에 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 측면에서, 다량체화 도메인의 유도된 다량체화가 또한 세포 내 신호 전달 영역을 서로 근접하게 가져와서 다량체화, 예를 들어 2량체화를 가능하게 하고 세포

내 신호 전달을 자극한다. 일부 구현예에서, 조절 가능한 CAR의 폴리펩티드가 막관통 도메인, 하나 이상의 세포 내 신호 전달 영역(들) 및 하나 이상의 다량체화 도메인(들)을 포함하며, 이들 각각이 직접 또는 간접적으로 연결된다.

[0876] 일부 구현예에서, 다량체화 도메인이 세포 외에 있거나 또는 조작된 세포(예를 들어, 조작된 T 세포)의 세포 외 측면 상의 세포 막과 결합한다. 일부 측면에서, 세포 외 다량체화 도메인이 막 결합 도메인(예를 들어, 지질 연결 도메인), 예컨대 미리스토일화 도메인, 팔미토일화 도메인, 프레닐화 도메인 또는 막관통 도메인에 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 세포 외 다량체화 도메인이 예컨대, 질병과 관련된 항원에 결합하기 위해 리간드 결합 도메인, 예를 들어, 항원 결합 도메인에 직접 또는 간접적으로 연결된다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인이 세포 외에 있고, 막관통 도메인을 통해 세포 내 신호 전달 영역에 연결된다.

[0877] 일부 측면에서, 막결합 도메인이 기존의 막관통 단백질의 막관통 도메인이다. 일부 예에서, 막결합 도메인은 여기 기재된 임의의 막관통 도메인이다. 일부 측면에서, 막결합 도메인은 단백질-단백질 상호 작용 모티프 또는 막관통 서열을 함유한다.

[0878] 일부 측면에서, 막결합 도메인은 아실화 도메인, 예컨대 미리스토일화 도메인, 팔미토일화 도메인, 프레닐화 도메인(즉, 파르네실화, 제라닐-제라닐화, CAAX 박스)이다. 예를 들어, 막결합 도메인은 단백질의 N-말단 또는 C-말단에 존재하는 아실화 서열 모티프일 수 있다. 상기 도메인은, 도메인을 함유하는 폴리펩티드에 아실 모이어티를 전달하는 아실전달효소에 의해 인식될 수 있는 특정 서열 모티프를 함유한다. 예를 들어, 아실화 모티프가 단일 아실 모이어티로 변형될 수 있다(일부 경우에, 몇몇 양으로 하전된 잔기(예를 들어, 인간 c-Src: MGSNKSQPKDASQRRR(서열 번호: 84))가 이어져서 음이온 지질 두부와의 결합이 개선된다). 다른 측면에서, 아세틸화 모티프가 다중 아실 모이어티로 변형될 수 있다. 예를 들어, 이중 아실화 영역이, Src 패널리 멤버의 하위 세트(예를 들어, Yes, Fyn, Lck)와 같은 특정 단백질 키나아제의 N-말단 영역 및 G-단백질 알파 서브유닛 내에 위치한다. 예시적인 이중 아실화 영역이 Met-Gly-Cys-Xaa-Cys(서열 번호: 85)의 서열 모티프를 함유하고, 여기서 Met은 절단되고, Gly은 N-아세틸화되며 Cys 잔기 중 하나가 S-아세틸화된다. Gly은 종종 미리스토일화되고, Cys은 팔미토일화될 수 있다.

[0879] 다른 예시적인 아실화 영역은 C15 또는 O10 이소프레닐 모이어티로 변형될 수 있는 Cys-Ala-Ala-Xaa(소위 “CAAX 박스”; 서열 번호: 86) 서열 모티프를 포함하고, 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Gauthier-Campbell et al. (2004) Molecular Biology of the Cell 15:2205-2217; Glabati et al. (1994) Biochem. J. 303: 697-700 및 Zlakine et al. (1997) J. Cell Science 110:673-679; ten Klooster et al. (2007) Biology of the Cell 99:1-12; Vincent et al. (2003) Nature Biotechnology 21:936-40] 참조). 일부 구현예에서, 아실 모이어티는 C1-C20 알킬, C2-C20 알케닐, C2-C20 알키닐, C3-C6 시클로알킬, C1-C4 할로알킬, C4-C12 시클로알킬알킬, 아릴, 치환된 아릴 또는 아릴 (C1-C4) 알킬이다. 일부 구현예에서, 아실 함유 모이어티는 지방산이고, 지방산 모이어티의 예는 프로필(C3), 부틸(C4), 펜틸(C5), 헥실(C6), 헵틸(C7), 옥틸(C8), 노닐(C9), 데실(C10), 운데실(C11), 라우릴(C12), 미리스틸(C14), 팔미틸(C16), 스테아릴(C18), 아라키딜(C20), 베헤닐(C22) 및 리그노세틸 모이어티(C24)이며, 각각의 모이어티는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8 개의 불포화 결합(즉, 이중 결합)을 함유할 수 있다. 일부 예에서, 아실 모이어티는 지질 분자, 예컨대 포스파디딜 지질(예를 들어, 포스파디딜 세린, 포스파디딜 이노시톨, 포스파디딜 에탄올아민, 포스파디딜 콜린), 스펅고지질(예를 들어, 신고미엘린, 스펅고신, 세라마이드, 강글리오사이드, 세레브로사이드) 또는 이의 변형된 버전이다. 특정 구현예에서, 1, 2, 3, 4 또는 5 개 이상의 아실 모이어티가 막결합 도메인에 연결된다.

[0880] 일부 측면에서, 막결합 도메인은 당지질(글리코실 포스파티딜이노시톨 또는 GPI로도 공지)의 추가를 촉진하는 도메인이다. 일부 측면에서, GPI 분자는, 카르복시 말단 GPI 신호 서열의 절단(예를 들어, 문헌[White et al. (2000) J. Cell Sci. 113:721] 참조) 및 새롭게 형성된 카르복시 말단 아미노산으로 이미 합성된 GPI 앵커 분자의 동시 전달(예를 들어, 문헌[Varki A, et al., editors. Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1999. Chapter 10, Glycophospholipid Anchors. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK20711/>] 참조)을 초래하는 아미드기 전달 반응에 의해 단백질 표적에 번역 후 부착된다. 특정 구현예에서, 막결합 도메인은 GPI 신호 서열이다.

[0881] 일부 구현예에서, 여기에 제공된 바와 같은 다량체화 도메인이 세포 내 신호 전달 영역, 예를 들어, 1차 신호 전달 영역 및/또는 공자극 신호 전달 도메인에 연결된다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인이 세포 외에 있고, 막관통 도메인을 통해 세포 내 신호 전달 영역에 연결된다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인이 세포 내에 있고, 막관통 도메인을 통해 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인에 연결된다. 리간드 결합 도메인과 막관통

도메인은 직접 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 리간드 결합 도메인과 막관통이 여기에 기재된 임의의 것과 같은 스페이스에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 다량체화 도메인이 FK506 결합 단백질(FKBP) 또는 이의 유도체 또는 이의 단편, 예컨대 FKBP12v36이다. 일부 예에서, 리미두디드와 같은 유도체의 도입 시, 조절 가능한 CAR의 폴리펩티드가 다량체화, 예를 들어 2량체화함으로써 다량체화 도메인과 결합된 신호 전달 도메인을 자극하고 다량체 복합체를 형성한다. 다량체 복합체의 형성이 세포 내 신호 전달 영역을 통해 신호의 유도, 조절, 자극, 활성화, 매개 및/또는 촉진을 초래한다.

[0882] 일부 구현예에서, 조절 가능한 CAR을 통한 신호 전달이 조건부 다량체화를 통한 조건부 방식으로 조절될 수 있다. 예를 들어, 조절 가능한 CAR 폴리펩티드의 다량체화 도메인이 유도체에 결합하여 다량체화될 수 있고, 상기 유도체는 외인성으로 제공될 수 있다. 일부 측면에서, 유도체의 결합 시, 다량체화 도메인이 다량체화되고, 신호 전달 도메인을 통해 신호 전달을 유도, 조절, 활성화, 매개 및/또는 촉진한다. 예를 들어, 유도체가 외인성으로 투여됨으로써 조절 가능한 CAR을 함유하는 조작된 세포에 제공된 신호의 위치 및 지속 기간을 제어할 수 있다. 일부 구현예에서, 조절 가능한 CAR 폴리펩티드의 다량체화 도메인이 유도체에 결합하여 다량체화될 수 있고, 상기 유도체는 외인성으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 유도체가 재조합 발현 벡터로부터 또는 유도 가능한 또는 조건부 프로모터의 제어 하에 조작된 세포의 게놈으로부터 조작된 세포(예를 들어, 조작된 T 세포)에 의해 내인성으로 생성될 수 있음으로써 조절 가능한 CAR을 함유하는 조작된 세포에 제공된 신호의 위치 및 지속 기간을 제어할 수 있다.

[0883] 일부 구현예에서, 조절 가능한 CAR이 자살 스위치를 사용하여 제어된다. 예시적인 키메라 수용체가 유도성 카스파제-9(iCasp9) 시스템을 이용하고, 이는 인간 카스파제-9와 변형된 FKBP 2량체화 도메인의 융합을 포함하며, 유도체, 예를 들어 AP1903과 결합 시 조건부 2량체화를 허용한다. 유도체의 결합에 의한 2량체화 시, 카스파제-9가 활성화되고, 키메라 수용체를 발현하는 세포의 세포 자멸사 및 세포의 사멸을 초래한다(예를 들어, 문헌[Di Stasi et al. (2011) N. Engl. J. Med. 365:1673-683] 참조).

[0884] 일부 구현예에서, 예시적인 조절 가능한 CAR이: (1) (i) 세포 내 신호 전달 영역; 및 (ii) 유도체에 결합할 수 있는 하나 이상의 다량체화 도메인;을 포함하는 조절 가능한 CAR의 제1 폴리펩티드; 및 (2) (i) 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 유도체에 결합할 수 있는 하나 이상의 다량체화 도메인;을 포함하는 조절 가능한 CAR의 제2 폴리펩티드;를 포함한다. 일부 구현예에서, 예시적인 조절 가능한 CAR이: (1) (i) 막관통 도메인 또는 아실화 도메인; (ii) 세포 내 신호 전달 영역; 및 (iii) 유도체에 결합할 수 있는 하나 이상의 다량체화 도메인;을 포함하는 조절 가능한 CAR의 제1 폴리펩티드; 및 (2) (i) 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 유도체에 결합할 수 있는 하나 이상의 다량체화 도메인;을 포함하는 조절 가능한 CAR의 제2 폴리펩티드;를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 신호 전달 영역이 공자극 신호 전달 도메인을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드가 공자극 신호 전달 도메인을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드 둘 다에 있는 하나 이상의 다량체화 도메인(들)이 세포 내에 있다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드 둘 다에 있는 하나 이상의 다량체화 도메인(들)이 세포 외에 있다.

[0885] 일부 구현예에서, 예시적인 조절 가능한 CAR이: (1) (i) 유도체에 결합할 수 있는 하나 이상의 세포 외 다량체화 도메인; (ii) 막관통 도메인; 및 (iii) 세포 내 신호 전달 영역;을 포함하는 조절 가능한 CAR의 제1 폴리펩티드; 및 (2) (i) 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인; (ii) 유도체에 결합할 수 있는 하나 이상의 세포 외 다량체화 도메인; 및 (iii) 막관통 도메인, 아실화 도메인 또는 GPI 신호 서열;을 포함하는 조절 가능한 CAR의 제2 폴리펩티드;를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 신호 전달 영역이 공자극 신호 전달 도메인을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 제2 폴리펩티드가 공자극 신호 전달 도메인을 더 포함한다.

[0886] 일부 구현예에서, 예시적인 조절 가능한 CAR이: (1) (i) 막관통 도메인 또는 아실화 도메인; (ii) 하나 이상의 공자극 도메인; (iii) 유도체에 결합할 수 있는 다량체화 도메인; 및 (iv) 세포 내 신호 전달 영역; 및 (iii) 하나 이상의 공자극 도메인;을 포함하는 조절 가능한 CAR의 제1 폴리펩티드; 및 (2) (i) 리간드-(예를 들어, 항원-) 결합 도메인; (ii) 막관통 도메인; (iii) 하나 이상의 공자극 도메인; 및 (iv) 유도체에 결합할 수 있는 하나 이상의 세포 외 다량체화 도메인;을 포함하는 조절 가능한 CAR의 제2 폴리펩티드;를 포함한다.

[0887] 일부 측면에서, 예시적인 조절 가능한 CAR에 기재된 임의의 영역 및/또는 도메인이 다양한 상이한 순서로 배열될 수 있다. 일부 측면에서, 조절 가능한 CAR(들)의 다양한 폴리펩티드가 세포 막의 동일한 측면에 다량체화 도메인을 함유하며, 예를 들어, 2 개 이상의 폴리펩티드 내 다량체화 도메인이 모두 세포 내 또는 모든 세포 외에 있다.

[0888] 조절 가능한 CAR의 변이가 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[미국 특허 출원 공개 번호 2014/0286987, 미국 특허

출원 공개 번호 2015/0266973, 국제 특허 출원 공개 번호 W02014/127261 및 국제 특허 출원 공개 번호 W02015/142675]에 기재되어 있다.

[0889] **3. 키메라 자가 항체 수용체(Chimeric Auto-Antibody Receptor, CAAR)**

[0890] 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화된 재조합 수용체가 키메라 자가 항체 수용체(CAAR)이다. 일부 구현예에서, CAAR은 자가 항체에 결합, 예를 들어, 특이적으로 결합하거나 이를 인식한다. 일부 구현예에서, CAAR을 발현하도록 조작된 T 세포와 같은 CAAR을 발현하는 세포가 정상적인 항체 발현 세포가 아닌 자가 항체 발현 세포에 결합하고 이를 사멸하는데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, CAAR 발현 세포를 사용하여 자가 면역 질병과 같은 자가 항원 발현과 관련된 자가 면역 질병을 치료할 수 있다. 일부 구현예에서, CAAR 발현 세포가 궁극적으로 자가 항체를 생성하는 B 세포를 표적화하고 이의 세포 표면 상에 자가 항체를 제시하며, 치료적 개입을 위한 질병 특이적 표적으로 상기 B 세포를 표시할 수 있다. 일부 구현예에서, CAAR 발현 세포가 사용되어 항원 특이적 키메라 자가 항체 수용체를 이용하여 질병을 유발하는 B 세포를 표적화함으로써 자가 면역 질병에서 병원성 B 세포를 효율적으로 표적화하고 사멸시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체가 문헌[미국 특허 출원 공개 번호 US 2017/0051035]에 기재된 어느 하나와 같은 CAAR이다.

[0891] 일부 구현예에서, CAAR은 자가 항체 결합 도메인, 막관통 도메인 및 하나 이상의 세포 내 신호 전달 영역 또는 도메인(상호 교환적으로 세포질 신호 전달 도메인 또는 영역으로도 명명)을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 신호 전달 영역은 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 신호 전달 도메인은, 1차 신호 전달 영역, T 세포에서 1차 활성화 신호를 자극할 수 있고/거나 유도할 수 있는 신호 전달 도메인, T 세포 수용체(TCR) 구성 요소의 신호 전달 도메인(예를 들어, CD3-제타(CD3ζ) 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 영역 또는 이의 기능성 변이체 또는 신호 전달 부분) 및/또는 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프(ITAM)를 포함하는 신호 전달 도메인이거나 이를 포함한다.

[0892] 일부 구현예에서, 자가 항체 결합 도메인은 자가 항원 또는 이의 단편을 포함한다. 자가 항원의 선택은 표적화될 자가 항체의 유형에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 자가 항원은 특정 질병 상태, 예를 들어 자가 면역 질병, 예컨대 자가 항체 매개 자가 면역 질병과 관련된 B 세포와 같은 표적 세포 상의 자가 항체를 인식하기 때문에 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 자가 면역 질병은 심상성 천포창(pemphigus vulgaris, PV)을 포함한다. 예시적인 자가 항원은 데스모글레인 1(desmoglein 1, Dsg1) 및 Dsg3을 포함한다.

[0893] **4. T 세포 수용체(TCR)**

[0894] 일부 구현예에서, 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화된 재조합 수용체는, 종양 항원, 바이러스 또는 자가 면역 단백질과 같은 표적 폴리펩티드의 세포 내 및/또는 펩티드 에피토프 또는 T 세포 에피토프를 인식하는 T 세포 수용체(TCR) 또는 이의 일부, 예컨대 재조합 TCR 또는 이의 항원 결합 부분이다. 일부 측면에서, 암호화된 수용체는 재조합 TCR이거나 이를 포함한다. 일부 측면에서, 재조합 TCR은 단일 사슬 TCR 또는 다중 사슬 TCR, 예컨대 이중 사슬 TCR이다.

[0895] 일부 구현예에서, "T 세포 수용체(T cell receptor)" 또는 "TCR"은 가변 α 및 β 사슬(각각 TCRα 및 TCRβ로도 공지) 또는 가변 γ 및 δ 사슬(각각 TCRγ 및 TCRδ로도 공지) 또는 이의 항원 결합 부분을 함유하는 분자이고, 이는 MHC 분자에 결합된 펩티드에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 αβ 형태이다. 일부 구현예에서, αβ 및 γδ 형태로 존재하는 TCR은 일반적으로 구조적으로 유사하나, 이를 발현하는 T 세포는 별개의 해부학적 위치 또는 기능을 가질 수 있다. TCR은 세포의 표면 상에서 또는 가용성 형태로 발견될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은, TCRα 및 TCRβ; 또는 TCRγ 및 TCRδ 사슬을 포함하는 이중 사슬 TCR이다. 일부 측면에서, TCR은 T 세포(또는 T 림프구)의 표면 상에서 발견되며, 여기서 상기는 주요 조직 적합성 복합체(MHC) 분자에 결합된 항원의 인식을 일반적으로 담당한다.

[0896] 일부 구현예에서, TCR은 전장 TCR 또는 이의 항원 결합 부분 또는 항원 결합 단편을 포괄한다. 일부 구현예에서, TCR은 αβ 형태 또는 γδ 형태의 TCR을 포함한 온전한 또는 전장 TCR이다. 일부 구현예에서, TCR은 전장 미만의 TCR이나 MHC 펩티드 복합체에 결합하는 것과 같이 MHC 분자에 결합된 특정 펩티드에 결합하는 항원 결합 부분이다. 일부 경우에, TCR의 항원 결합 부분 또는 단편은 전장 또는 온전한 TCR의 구조 도메인의 일부만을 함유할 수 있으나, 그럼에도 전체 TCR이 결합하는 MHC 펩티드 복합체와 같은 펩티드 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 경우에, 항원 결합 부분은 특정 MHC 펩티드 복합체에 결합하기 위한 결합 부위를 형성하기에 충분한 TCR의 가변 도메인, 예컨대 TCR의 가변 α(Vα) 사슬 및 가변 β(Vβ) 사슬 또는 이의 항원 결합 단편을 함유한다.

- [0897] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR의 가변 도메인은 초 가변 루프 또는 상보성 결정 영역(CDR)을 함유하며, 이는 일반적으로 항원 인식 및 결합 능력 및 특이성에 대한 1차 기여자이다. 일부 구현예에서, TCR의 CDR 또는 이의 조합물이 주어진 TCR 분자의 항원 결합 부위의 전부 또는 실질적으로 전부를 형성한다. TCR 사슬의 가변 영역 내의 다양한 CDR이, CDR에 비해 TCR 분자 중에서 일반적으로 가변성을 덜 나타내는 프레임워크 영역(FR)에 의해 분리된다(예를 들어, 문헌[Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990; Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988] 참조; 또한 문헌[Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003] 참조). 일부 구현예에서, CDR3이 항원 결합 또는 특이성을 담당하는 주요 CDR이거나, 항원 인식 및/또는 펩티드 MHC 복합체의 프로세싱된 펩티드 부분과의 상호 작용을 위한 주어진 TCR 가변 영역 상에서 3 개의 CDR 중 가장 중요하다. 일부 상황에서, 알파 사슬의 CDR1이 특정 항원 펩티드의 N-말단 부분과 상호 작용할 수 있다. 일부 상황에서, 베타 사슬의 CDR1이 펩티드의 C-말단 부분과 상호 작용할 수 있다. 일부 상황에서, CDR2가 MHC 펩티드 복합체의 MHC 부분과의 상호 작용 또는 인식에 가장 강력하게 기여하거나 이를 담당하는 주요 CDR이다. 일부 구현예에서,  $\beta$  사슬의 가변 영역이 추가 초 가변 영역(CDR4 또는 HVR4)을 함유할 수 있으며, 이는 일반적으로 항원 인식이 아닌 초 항원 결합에 관여한다(Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).
- [0898] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR이, 불변 도메인, 막관통 도메인 및/또는 짧은 세포질 꼬리를 또한 함유할 수 있다(예를 들어, 문헌[Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997] 참조). 일부 측면에서, TCR 각 사슬이 1 개의 N 말단 면역 글로불린 가변 도메인, 1 개의 면역 글로불린 불변 도메인, 막관통 영역 및 C 말단 끝에 짧은 세포질 꼬리를 소유할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR이 신호 전달 매개에 관여하는 CD3 복합체의 불변 단백질과 결합한다.
- [0899] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR 사슬은 하나 이상의 불변 도메인을 함유한다. 예를 들어, 주어진 TCR 사슬(예를 들어,  $\alpha$ -사슬 또는  $\beta$ -사슬)의 세포 외 부분이, 세포막에 인접한 2 개의 면역 글로불린 유사 도메인, 예컨대 가변 도메인(예를 들어  $V\alpha$  또는  $V\beta$ ; Kabat 넘버링(Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.)에 근거한 전형적으로 1 내지 116 아미노산) 및 불변 도메인(예를 들어,  $\alpha$  사슬 불변 도메인, 또는  $C\alpha$ , Kabat 넘버링에 근거한 전형적으로 사슬의 117 내지 259번 위치 또는  $\beta$  사슬 불변 도메인, 또는  $C\beta$ , Kabat에 근거한 전형적으로 사슬의 117 내지 295번 위치)을 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 2 개의 사슬에 의해 형성된 TCR의 세포 외 부분은 2 개의 막 근위 불변 도메인과 2 개의 막 원위 가변 도메인을 함유하고, 상기 가변 도메인 각각이 CDR을 함유한다. TCR의 불변 도메인은 시스테인 잔기가 이황화물 결합을 형성하는 짧은 연결 서열을 함유함으로써 2 개의 TCR 사슬을 연결할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은  $\alpha$  및  $\beta$  사슬 각각에 추가 시스테인 잔기를 가질 수 있어서, TCR은 불변 도메인에 2 개의 이황화물 결합을 함유한다.
- [0900] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR 사슬은 막관통 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 양으로 하전된다. 일부 경우에, TCR 사슬은 세포질 꼬리를 함유한다. 일부 경우에, 구조가 TCR이 CD3 및 이의 하위 단위와 같은 다른 분자와 결합하게 한다. 예를 들어, 막관통 영역을 가진 불변 도메인을 함유하는 TCR은 세포막에 단백질을 고정하고 CD3 신호 전달 장치 또는 복합체의 불변 하위 단위와 결합할 수 있다. CD3 신호 전달 하위 단위(예를 들어,  $CD3\gamma$ ,  $CD3\delta$ ,  $CD3\epsilon$  및  $CD3\zeta$  사슬)의 세포 내 꼬리는 TCR 복합체의 신호 전달 용량에 관여하는 하나 이상의 면역 수용체 티로신 기반 활성화 모티프, 즉 ITAM을 함유한다.
- [0901] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR은 다양한 도메인 또는 영역을 함유한다. 일부 경우에, 정확한 도메인 또는 영역은 특정 도메인을 설명하는 데 사용된 특정 구조 또는 상동성 모델링 또는 다른 특성에 따라 달라질 수 있다. 재조합 수용체, 예를 들어, TCR의 도메인 구조를 기재하는 데 사용된 서열 번호로 제시된 특정 서열을 포함한 아미노산에 대한 언급은 예시 목적을 위한 것이며 제공된 구현예의 범위를 제한하는 것을 의미하지 않는다는 것이 이해된다. 일부 경우에, 특정 도메인(예를 들어, 가변 또는 불변)은 몇 개의 아미노산(예컨대 1, 2, 3 또는 4)이 더 길거나 더 짧을 수 있다. 일부 측면에서, TCR의 잔기가 공지되거나 IMGT(International Immunogenetics Information System) 넘버링 시스템에 따라 확인될 수 있다(예를 들어, www.imgt.org 참조; 또한 문헌[Lefranc et al. (2003) Developmental and Comparative Immunology, 27:55-77; 및 The T Cell Factsbook 2nd Edition, Lefranc and LeFranc Academic Press 2001] 참조). 상기 시스템을 사용하여, TCR  $V\alpha$  사슬 및/또는  $V\beta$  사슬 내의 CDR1 서열은 잔기 번호 27-38(수치 포함) 사이에 존재하는 아미노산에 대응하고, TCR  $V\alpha$  사슬 및/또는  $V\beta$  사슬 내의 CDR2 서열은 잔기 번호 56-65(수치 포함) 사이에 존재하는 아미노산에 대응하며, TCR  $V\alpha$  사슬 및/또는  $V\beta$  사슬 내의 CDR3 서열은 잔기 번호 105-117(수치 포함) 사이에 존재하는 아미노산에 대응한다.

- [0902] 일부 구현예에서, TCR의  $\alpha$  사슬 및  $\beta$  사슬은 각각 불변 도메인을 더 함유한다. 일부 구현예에서,  $\alpha$  사슬 불변 도메인( $C\alpha$ ) 및  $\beta$  사슬 불변 도메인( $C\beta$ )은 개별적으로 인간 또는 무린 불변 도메인과 같은 포유류이다. 일부 구현예에서, 불변 도메인이 세포막에 인접해 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 2 개의 사슬에 의해 형성된 암호화된 TCR의 세포 외 부분은 2 개의 막 근위 불변 도메인과 2 개의 막 원위 가변 도메인을 함유하고, 상기 가변 도메인 각각이 CDR을 함유한다.
- [0903] 일부 구현예에서,  $C\alpha$  및  $C\beta$  도메인 각각이 인간이다. 일부 구현예에서,  $C\alpha$ 는 *TRAC* 유전자(IMG T 명명법)에 의해 암호화되거나 이의 변이체이다. 일부 구현예에서,  $C\beta$ 는 *TRBC1* 또는 *TRBC2* 유전자(IMG T 명명법)에 의해 암호화되거나 이의 변이체이다. 일부 구현예에서, 임의의 제공된 TCR 또는 이의 항원 결합 단편이 인간/마우스 키메라 TCR일 수 있다. 일부 경우에, 암호화된 TCR 또는 이의 항원 결합 단편이 마우스 불변 영역을 포함하는  $\alpha$  사슬 및/또는  $\beta$  사슬을 갖는다. 일부 측면에서,  $C\alpha$  및/또는  $C\beta$  영역은 마우스 불변 영역이다. 상기 임의의 구현예 중 일부에서, 암호화된 TCR 또는 이의 항원 결합 단편이 코돈 최적화된 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된다.
- [0904] 상기 임의의 구현예 중 일부에서, 결합 분자 또는 TCR 또는 이의 항원 결합 단편은 단리 또는 정제되거나 또는 재조합이다. 상기 임의의 구현예 중 일부에서, 결합 분자 또는 TCR 또는 이의 항원 결합 단편은 인간이다.
- [0905] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR은, 예컨대 이황화물 결합 또는 이황화물 결합들에 의해 연결된 2 개의 사슬  $\alpha$  및  $\beta$ 의 이중 2량체일 수 있다. 일부 구현예에서, 암호화된 TCR의 불변 도메인은 시스테인 잔기가 이황화물 결합을 형성하는 짧은 연결 서열을 함유함으로써 2 개의 암호화된 TCR 사슬을 연결할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은  $\alpha$  및  $\beta$  사슬 각각에 추가 시스테인 잔기를 가질 수 있어서, 암호화된 TCR은 불변 도메인에 2 개의 이황화물 결합을 함유한다. 일부 구현예에서, 불변 및 가변 도메인 각각이 시스테인 잔기에 의해 형성된 이황화물 결합을 함유한다.
- [0906] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR은 2 개의 사슬  $\alpha$  및  $\beta$  또는  $\gamma$  및  $\delta$ 의 이중 2량체, 예컨대 이중 사슬 TCR이거나 또는 단일 사슬 TCR 작제물일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 예컨대 이황화물 결합 또는 이황화물 결합들에 의해 연결된 2 개의 별개의 사슬(이중 사슬 TCR,  $\alpha$  및  $\beta$  사슬 또는  $\gamma$  및  $\delta$  사슬)을 함유하는 이중 2량체이다.
- [0907] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR은, 실질적으로 전장 코딩 서열이 용이하게 이용 가능한  $V\alpha$ ,  $\beta$  사슬의 서열과 같은 공지된 TCR 서열(들)로부터 생성될 수 있다.  $V$  사슬 서열을 포함한 전장 TCR 서열을 세포 출처에서 수득하는 방법이 잘 알려져 있다. 일부 구현예에서, TCR을 암호화하는 핵산이, 예컨대 주어진 세포 또는 세포들 내 또는 상기에서 단리된 TCR 암호화 핵산의 증합 효소 연쇄 반응(PCR) 증폭에 의해 또는 공개적으로 이용 가능한 TCR DNA 서열의 합성에 의해 다양한 출처에서 수득될 수 있다.
- [0908] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 수용체는 재조합 TCR 및/또는 자연 발생 T 세포에서 클로닝된 TCR을 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 항원(예를 들어, 암 항원)에 대한 높은 친화도의 T 세포 클론이 환자에서 확인, 단리되고, 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 표적 항원에 대한 TCR 클론이 인간 면역 시스템 유전자(예를 들어, 인간 백혈구 항원 시스템, 즉 HLA)로 조작된 전이 유전자 마우스에서 생성되었다. 예를 들어, 종양 항원(예를 들어, 문헌[Parkhurst et al. (2009) Clin Cancer Res. 15:169-180 및 Cohen et al. (2005) J Immunol. 175:5799-5808] 참조)을 참조한다. 일부 구현예에서, 파지 디스플레이를 이용하여 표적 항원에 대한 TCR을 단리한다(예를 들어, 문헌[Varela-Rohena et al. (2008) Nat Med. 14:1390-1395 및 Li (2005) Nat Biotechnol. 23:349-354] 참조).
- [0909] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR이 생물학적 출처, 예컨대 세포, 예컨대 T 세포(예를 들어, 세포 독성 T 세포), T 세포 하이브리도마 또는 기타 공개적으로 이용 가능한 출처에서 수득된다. 일부 구현예에서, T 세포가 *생체 내에서* 단리된 세포에서 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 흉선에서 선택된 TCR이다. 일부 구현예에서, TCR은 네오에피토프 제한 TCR이다. 일부 구현예에서, T 세포는 배양된 T 세포 하이브리도마 또는 클론일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR 또는 이의 항원 결합 부분 또는 이의 항원 결합 단편이 TCR의 서열에 대한 지식으로부터 합성으로 생성될 수 있다.
- [0910] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR이, 표적 폴리펩티드 항원 또는 이의 표적 T 세포 에피토프에 대한 후보 TCR의 라이브러리를 스크리닝하여 확인되거나 이로부터 선택된 TCR에서 생성된다. TCR 라이브러리가 PBMC, 비장 또는 기타 림프구 기관에 존재하는 세포를 포함하여 대상체에서 단리된 T 세포의  $V\alpha$  및  $V\beta$  레퍼토리를 증폭하여 생성될 수 있다. 일부 경우에, T 세포가 종양 침윤성 림프구(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL)에서 증폭될

수 있다. 일부 구현예에서, TCR 라이브러리가 CD4+ 또는 CD8+ 세포에서 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR이 정상적인 건강한 대상체의 T 세포 출처, 즉 정상 TCR 라이브러리로부터 증폭될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR이 유병 대상체의 T 세포 출처, 즉 유병 TCR 라이브러리로부터 증폭될 수 있다. 일부 구현예에서, 퇴화(degenerate) 프라이머가 사용되어 인간에서 수득된 T 세포와 같은 샘플에서 예컨대, RT-PCR에 의해 V $\alpha$  및 V $\beta$ 의 유전자 레퍼토리가 증폭된다. 일부 구현예에서, 단일 사슬 TCR(scTv) 라이브러리와 같은 라이브러리가, 증폭된 생성물이 클로닝되거나 조립되어 링커에 의해 분리될 나이트 V $\alpha$  및 V $\beta$  라이브러리에서 조립될 수 있다. 대상체 및 세포의 출처에 따라, 라이브러리는 HLA 대립유전자 특이적일 수 있다. 대안적으로, 일부 구현예에서, TCR 라이브러리가 부모 또는 스캐폴드 TCR 분자의 돌연변이 발생 또는 다양화에 의해 생성될 수 있다.

[0911] 일부 측면에서, 암호화된 TCR이, 예를 들어  $\alpha$  또는  $\beta$  사슬의 예컨대, 돌연변이 발생에 의해 유도 진화의 대상이 된다. 일부 측면에서, TCR의 CDR 내 특정 잔기가 변경된다. 일부 구현예에서, 선택된 TCR이 친화도 성숙에 의해 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 항원 특이적 T 세포가 예컨대, 스크리닝에 의해 선택되어 펩티드에 대한 CTL 활성을 분석할 수 있다. 일부 측면에서, 예를 들어, 항원 특이적 T 세포 상에 존재하는 암호화된 TCR은, 예컨대 결합 활성, 예를 들어 항원에 대한 특정 친화도 또는 친화력에 의해 선택될 수 있다.

[0912] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR 또는 이의 항원 결합 부분은 변형되었거나 조작된 것이다. 일부 구현예에서, 유도 진화 방법이 사용되어 예컨대, 특정 MHC 펩티드 복합체에 대한 보다 높은 친화도를 갖는 변경된 특성을 가진 TCR이 생성된다. 일부 구현예에서, 유도 진화가, 효모 디스플레이(Holler et al. (2003) Nat Immunol, 4, 55-62; Holler et al. (2000) Proc Natl Acad Sci U S A, 97, 5387-92), 파지 디스플레이(Li et al. (2005) Nat Biotechnol, 23, 349-54) 또는 T 세포 디스플레이(Chervin et al. (2008) J Immunol Methods, 339, 175-84)를 포함하나 이에 국한되지 않는 디스플레이 방법에 의해 달성된다. 일부 구현예에서, 디스플레이 접근법은 공지된, 부모 또는 기준 TCR을 조작 또는 변형하는 것을 수반한다. 예를 들어, 일부 경우에, 야생형 TCR이 CDR의 하나 이상의 잔기에서 돌연변이된 돌연변이를 일으킨 TCR을 생성하기 위한 주형으로 이용될 수 있고, 원하는 변경된 특성, 예컨대 원하는 표적 항원에 대한 보다 높은 친화도를 갖는 돌연변이가 선택된다.

[0913] 일부 구현예에서, 항원은, 신경 교종 관련 항원,  $\beta$ -인간 융모막 성선 자극 호르몬, 알파페토프로테인(alphafetoprotein, AFP), B 세포 성숙 항원(B-cell maturation antigen, BCMA, BCM), B 세포 활성화 인자 수용체(BAFFR, BR3) 및/또는 막관통 활성화제 및 CAML 상호작용자(TACI), Fc 수용체 유사 5(FCRL5, FcRH5), 렉틴 반응성 AFP, 티로글로불린, RAGE-1, MN-CA IX, 인간 텔로머라제 역전사 효소, RU1, RU2(AS), 장 카르복실 에스터라제, mut hsp70-2, M-CSF, 멜라닌-A/MART-1, WT-1, S-100, MBP, CD63, MUC1(예를 들어, MUC1-8), p53, Ras, 사이클린 B1, HER-2/neu, 암배아 항원(carcinoembryonic antigen, CEA), gp100, MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, MAGE-A11, MAGE-A11, MAGE-B1, MAGE-B2, MAGE-B3, MAGE-B4, MAGE-C1, BAGE, GAGE-1, GAGE-2, p15, 티로시나제, 티로시나제 관련 단백질 1(tyrosinase-related protein 1, TRP-1), 티로시나제 관련 단백질 2(TRP-2),  $\beta$ -카테닌, NY-ESO-1, LAGE-1a, PP1, MDM2, MDM4, EGVFvIII, Tax, SSX2, 텔로머라제, TARP, pp65, CDK4, 비멘틴, S100, eIF-4A1, IFN 유도성 p78 및 멜라노트랜스페린(p97), 우로플라킨 II, 전립선 특이적 항원(prostate specific antigen, PSA), 인간 칼리크레인(huK2), 전립선 특이적 막 항원(prostate specific membrane antigen, PSM) 및 전립선산 포스파타아제(prostatic acid phosphatase, PAP), 호중구 엘라스타제, 에프린 B2, BA-46, 베타-카테닌, Bcr-abl, E2A-PRL, H4-RET, IGH-IGK, MYL-RAR, 카스파제 8 또는 B-Raf 항원일 수 있는 종양 항원이다. 기타 종양 항원은, FRa, CD24, CD44, CD133, CD 166, epCAM, CA-125, HE4, 오발(Oval), 에스트로겐 수용체, 프로게스트론 수용체, uPA, PAI-1, CD19, CD20, CD22, ROR1, 메소텔린, CD33/IL3Ra, c-Met, PSMA, 당지질 F77, GD-2, 인슐린 성장 인자(insulin growth factor, IGF)-I, IGF-II 및 IGF-I 수용체에서 유래된 무엇이든지 포함할 수 있다. 특정 종양 관련 항원 또는 T 세포 에피토프가 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[van der Bruggen et al. (2013) Cancer Immun, www.cancerimmunity.org/peptide/에서 이용 가능; Cheever et al. (2009) Clin Cancer Res, 15, 5323-37] 참조).

[0914] 일부 구현예에서, 항원은 바이러스 항원이다. 많은 바이러스 항원 표적이 확인되었으며 공지되어 있고, HIV, HTLV 및 기타 바이러스의 바이러스 게놈에서 유래된 펩티드를 포함한다(예를 들어, 문헌[Addo et al. (2007) PLoS ONE, 2, e321 ; Tsomides et al. (1994) J Exp Med, 180, 1283-93; Utz et al. (1996) J Virol, 70, 843-51] 참조). 예시적인 바이러스 항원은, A형 간염, B형 간염(예를 들어, HBV 코어 및 표면 항원(HBvC, HBVs)), C형 간염(HCV), 엡스타인-바 바이러스(예를 들어, EBVA), 인간 유두종 바이러스(HPV; 예를 들어 E6 및 E7), 인간 면역 결핍 유형-1 바이러스(HIV1), 카포시의 육종 헤르페스 바이러스(KSHV), 인간 유두종 바이러스(HPV), 인플루엔자 바이러스, 라사 바이러스, HTLN-1, HIN-1, HIN-II, CMN, EBN 또는 HPN 유래 항원을 포함하

나 이에 국한되지 않는다. 일부 구현예에서, 표적 단백질은 세균 항원 또는 기타 병원체 항원, 예컨대 결핵균 (*Mycobacterium tuberculosis*, MT) 항원, 트리파노소마, 예를 들어, 트리파노소마 크루지(*Tiypansoma cruzi*, T. cruzi) 항원 예컨대 표면 항원(TSA), 또는 말라리아 항원이다. 특정 바이러스 항원 또는 에피토프 또는 기타 병원체 항원 또는 T 세포 에피토프가 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Addo *et al.* (2007) PLoS ONE, 2:e321 ; Anikeeva *et al.* (2009) Clin Immunol, 130:98-109] 참조).

- [0915] 일부 구현예에서, 항원은 종양 형성 바이러스와 같은 암과 관련된 바이러스에서 유래된 항원이다. 예를 들어, 종양 형성 바이러스는 특정 바이러스 감염이 상이한 유형의 암의 발달로 이어지는 것으로 공지된 바이러스, 예를 들어 A형 간염, B형 간염(예를 들어, HBV 코어 및 표면 항원(HBvc, HBVs)), C형 간염(HCV), 인간 유두종 바이러스(HPV), 간염 바이러스의 감염, 엡스타인-바 바이러스(EBV), 인간 헤르페스 바이러스 8(HHV-8), 인간 T 세포 백혈병 바이러스-1(HTLV-1), 인간 T 세포 백혈병 바이러스-2(HTLV-2) 또는 사이토메갈로바이러스(CMV) 항원이다.
- [0916] 일부 구현예에서, 바이러스 항원은, 일부 경우에 이는 자궁 경부암 발병의 보다 큰 위험으로 이어질 수 있는 HPV 항원이다. 일부 구현예에서, 항원은 HPV-16 항원 및 HPV-18 항원 및 HPV-31 항원, HPV-33 항원 또는 HPV-35 항원일 수 있다. 일부 구현예에서, 바이러스 항원은 HPV-16 항원(예를 들어, HPV-16E1의 E1, E2, E6 및/또는 E7 단백질의 혈청 반응성 영역, 예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 제6,531,127호] 참조) 또는 HPV-18 항원(예를 들어, 문헌[미국 특허 번호 제5,840,306호]에 기재된 바와 같은 HPV-18의 L1 및/또는 L2 단백질의 혈청 반응성 영역)이다. 일부 구현예에서, 바이러스 항원은 HPV-16의 E6 및/또는 E7 단백질에서 유래된 HPV-16 항원이다. 일부 구현예에서, TCR은 HPV-16 E6 또는 HPV-16 E7에 대하여 유도된 TCR이다. 일부 구현예에서, TCR은 예를 들어, 문헌[국제 출원 WO 2015/184228, WO 2015/009604 및 WO 2015/009606]에 기재된 TCR이다.
- [0917] 일부 구현예에서, 바이러스 항원은, 일부 경우에 HBV 또는 HCV 음성 대상체보다 간암 발병의 보다 큰 위험으로 이어질 수 있는 HBV 또는 HCV 항원이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이종 항원은 B형 간염 코어 항원 또는 B형 간염 외피 항원과 같은 HBV 항원이다(US2012/0308580).
- [0918] 일부 구현예에서, 바이러스 항원은, 일부 경우에 EBV 음성 대상체보다 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 비인두 암종 및 호지킨 질병의 발병에 대한 보다 큰 위험으로 이어질 수 있는 EBV 항원이다. 예를 들어, EBV는, 일부 경우에, 다양한 조직 기원의 수많은 인간 종양과 관련되어 발견되는 인간 헤르페스 바이러스이다. 주로 무증상 감염으로 발견되나, EBV 양성 종양은 EBNA-1, LMP-1 및 LMP-2A와 같은 바이러스 유전자 생성물의 활성 발현으로 특성화될 수 있다. 일부 구현예에서, 이종 항원은 엡스타인-바 핵 항원(EBNA)-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA 리더 단백질(EBNA-LP), 잠재성 막 단백질(latent membrane protein), LMP-1, LMP-2A 및 LMP-2B, EBV-EA, EBV-MA 또는 EBV-VCA를 포함할 수 있는 EBV 항원이다.
- [0919] 일부 구현예에서, 바이러스 항원은, 일부 경우에 HTLV-1 또는 HTLV-2 음성 대상체보다 T 세포 백혈병 발병의 보다 큰 위험으로 이어질 수 있는 HTLV-1 또는 HTLV-2 항원이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 이종 항원은 TAX와 같은 HTLV 항원이다.
- [0920] 일부 구현예에서, 바이러스 항원은, 일부 경우에 HHV-8 음성 대상체보다 카포시 육종(Kaposi's sarcoma) 발병의 보다 큰 위험으로 이어질 수 있는 HHV-8 항원이다. 일부 구현예에서, 이종 항원은 pp65 또는 pp64와 같은 CMV 항원이다(문헌[미국 특허 번호 제8,361,473호] 참조).
- [0921] 일부 구현예에서, 항원은 자가 면역 질병 또는 장애와 관련된 폴리펩티드 항원과 같은 자가 항원이다. 일부 구현예에서, 자가 면역 질병 또는 장애는, 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis, RA), 쇼그렌 증후군(Sjogren syndrome), 피부 경화증, 다발성 근육염(polymyositis), 피부근염(dermatomyositis), 전신 루푸스 홍반성, 청소년 류마티스 관절염, 강직성 척추염, 중증 근무력증(myasthenia gravis, MG), 수포성류천포창(진피-표피 교차점에서 기저막에 대한 항체), 천포창(뮤코 다당류 단백질 복합체 또는 세포 내 시멘트 물질에 대한 항체), 사구체 신염(사구체 기저막에 대한 항체), 굿파스처(Goodpasture) 증후군, 자가 면역 용혈성 빈혈(적혈구에 대한 항체), 하시모토병(갑상선에 대한 항체), 악성 빈혈(내인성 인자에 대한 항체), 특발성 혈소판 감소성 자반병(혈소판에 대한 항체), 그레이브병 또는 애디슨병(티로글로불린에 대한 항체)일 수 있다. 일부 구현예에서, 자가 항원, 예컨대 상기 자가 면역 질병 중 하나와 관련된 자가 항원은, II 형 콜라겐과 같은 콜라겐, 미코박테리아 열충격 단백질, 티로글로불린, 아세틸 콜린 수용체(AChR), 미엘린 염기성 단백질(myelin basic protein, MBP) 또는 단백질질 단백질(proteolipid protein, PLP)일 수 있다. 특정 자가 면역 관련 에피토프 또는 항원이 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Bulek *et al.* (2012) Nat Immunol, 13:283-9; Harkiolaki *et al.* (2009) Immunity, 30:348-57; Skowera *et al.* (2008) J

Clin Invest, 1(18): 3390-402] 참조).

- [0922] 일부 구현예에서, 관심 TCR의 제조 또는 생성에 사용하기 위한 표적 폴리펩티드의 펩티드가 공지되어 있거나 용이하게 확인될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR 또는 항원 결합 부분을 생성하는 데 사용하기에 적합한 펩티드가 하기 기재된 표적 폴리펩티드와 같은 관심 표적 폴리펩티드에서 HLA 제한 모티프의 존재에 근거하여 결정될 수 있다. 일부 구현예에서, 펩티드가 이용 가능한 컴퓨터 예측 모델을 사용하여 확인된다. 일부 예에서, 컴퓨터 예측 모델을 사용한 프로테아좀 및 면역 프로테아좀에 대한 HLA-A0201 결합 모티프 및 절단 부위가 공지되어 있다. 일부 구현예에서, MHC 클래스 I 결합 부위를 예측하기 위해, 상기 모델은 ProPred1(Singh and Raghava (2001) *Bioinformatics* 17(12):1236-1237) 및 SYFPEITHI(Schuler et al. (2007) *Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 409(1): 75-93 2007 참조)를 포함하나 이에 국한되지 않는다. 일부 구현예에서, MHC 제한 에피토프는 HLA-A0201이며, 이는 모든 백인의 약 39-46%에서 발현되고 따라서, TCR 또는 다른 MHC 펩티드 결합 분자의 제조에 사용하기 위한 MHC 항원의 적합한 선택을 나타낸다.
- [0923] 일부 구현예에서, TCR 또는 이의 항원 결합 부분은, 결합 특성과 같은 하나 이상의 특질이 변경된 재조합으로 생성된 천연 단백질 또는 이의 돌연변이 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 인간, 마우스, 래트 또는 다른 포유동물과 같은 다양한 동물 종 중 하나에서 유래될 수 있다. TCR은 세포 결합 또는 가용성 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 방법의 목적을 위해, TCR이 세포의 표면 상에 발현된 세포 결합 형태이다.
- [0924] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 TCR은 전장 TCR이다. 일부 구현예에서, 재조합 TCR은 항원 결합 부분이다. 일부 구현예에서, TCR은 2량체 TCR(dimeric TCR, dTCR)이다. 일부 구현예에서, TCR은 단일 사슬 TCR(scTCR)이다. 일부 구현예에서, dTCR 또는 scTCR은, 예를 들어 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO 03/020763, WO 04/033685, 및 WO2011/044186]에 기재된 바와 같은 구조를 갖는다.
- [0925] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 TCR은 막관통 서열에 대응하는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, TCR은 세포질 서열에 대응하는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, TCR은 CD3과 TCR 복합체를 형성할 수 있다. 일부 구현예에서, dTCR 또는 scTCR을 포함하는 임의의 재조합 TCR은, T 세포 표면 상에서 활성 TCR을 생성하는 신호 전달 도메인에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 TCR이 세포의 표면 상에 발현된다. 일부 구현예에서, dTCR 또는 scTCR이 도입되거나 조작된 사슬 간 이황화물 결합을 함유하고, 천연 이황화물 결합이 존재하지 않는다.
- [0926] 특정 구현예에서, 암호화된 TCR이 하나 이상의 변형(들)을 함유하여 TCR $\alpha$  사슬과 TCR $\beta$  사슬 사이에서 하나 이상의 비천연 이황화물 가교를 형성할 수 있는 하나 이상의 시스테인 잔기를 도입한다. 일부 구현예에서, 암호화된 TCR은, TCR $\beta$  사슬과 비천연 이황화물 결합을 형성할 수 있는 하나 이상의 시스테인 잔기를 함유하는 TCR $\alpha$  불변 도메인을 함유하는 TCR $\alpha$  사슬 또는 이의 일부를 함유한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자가, TCR $\alpha$  사슬과 비천연 이황화물 결합을 형성할 수 있는 하나 이상의 시스테인 잔기를 함유하는 TCR $\beta$  불변 도메인을 함유하는 TCR $\beta$  사슬 또는 이의 일부를 암호화한다. 일부 구현예에서, 암호화된 TCR이 하나 이상의 변형을 함유하는 TCR $\alpha$  및/또는 TCR $\beta$  사슬 및/또는 TCR $\alpha$  및/또는 TCR $\beta$  사슬 불변 도메인을 포함하여 하나 이상의 이황화물 결합을 도입한다. 일부 구현예에서, 전이 유전자가 TCR $\alpha$  및/또는 TCR $\beta$  사슬 및/또는 하나 이상의 변형을 갖는 TCR $\alpha$  및/또는 TCR $\beta$ 를 암호화하여 예를 들어, 전이 유전자에 의해 암호화된 TCR $\alpha$ 와 내인성 TCR $\beta$  사슬 사이 또는 전이 유전자에 의해 암호화된 TCR $\beta$ 와 내인성 TCR $\alpha$  사슬 사이에서 천연 이황화물 결합을 제거 또는 방지한다. 일부 구현예에서, 천연 사슬 간 이황화물 결합을 형성하고/거나 형성할 수 있는 하나 이상의 천연 시스테인이 또 다른 잔기, 예를 들어, 세린 또는 알라닌으로 치환된다. 일부 구현예에서, 시스테인이, TCR $\alpha$  불변 도메인의 넘버링을 참조하여 Thr48, Thr45, Tyr10, Thr45 및 Ser15 잔기 중 하나 이상에 도입된다. 특정 구현예에서, 시스테인이, TCR $\beta$  사슬 불변 도메인의 Ser57, Ser77, Ser17, Asp59 또는 Glu15 잔기에 도입될 수 있다. TCR의 예시적인 비천연 이황화물 결합이 문헌[국제 출원 PCT 공개 번호 WO2006/000830, WO 2006/037960 및 Kuball et al. (2007) *Blood*, 109:2331-2338]에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 시스테인이, C $\alpha$  사슬의 Thr48 및 C $\beta$  사슬의 Ser57, C $\alpha$  사슬의 Thr45 및 C $\beta$  사슬의 Ser77 잔기, C $\alpha$  사슬의 Tyr10 및 C $\beta$  사슬의 Ser17 잔기, C $\alpha$  사슬의 Thr45 및 C $\beta$  사슬의 Asp59 잔기 및/또는 C $\alpha$  사슬의 Ser15 및 C $\beta$  사슬의 Glu15 잔기에 대응하는 잔기에 도입 또는 치환될 수 있다. 일부 구현예에서, 임의의 시스테인 돌연변이가 또 다른 서열, 예를 들어, 상기 기재된 인간 또는 마우스 C $\alpha$  및 C $\beta$  서열 내 대응하는 위치에서 이루어질 수 있다. 단백질의 위치와 관련하여 “대응하는(corresponding)”이라는 용어, 예컨대 아미노산 위치가 예시적인 C $\alpha$  및 C $\beta$  내 아미노산 위치에 “대응한다(correspond to)”는 인용은, 구조적 서열 정렬에 근거하여 또는 GAP 알고리즘과 같은 표준 정렬 알고리즘을 사용하여 개시된 서열과 정렬 시 확인된 아미노산의 위치를 지칭한다.

- [0927] 일부 구현예에서, 천연 사슬 간 이황화물 결합을 형성하는 하나 이상의 천연 시스테인이 또 다른 잔기, 예컨대 세린 또는 알라닌으로 치환된다. 일부 구현예에서, 도입되거나 조작된 이황화물 결합이 제1 및 제2 세그먼트 상의 비시스테인 잔기를 시스테인으로 돌연변이시키므로써 형성될 수 있다. TCR의 예시적인 비천연 이황화물 결합이 문헌[국제 PCT 출원 공개 번호 WO2006/000830]에 기재되어 있다.
- [0928] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 TCR은 2량체 TCR(dTCR)이다. 일부 구현예에서, dTCR은 TCR  $\alpha$  사슬 가변 영역 서열에 대응하는 서열이 TCR  $\alpha$  사슬 불변 영역 세포 외 서열에 대응하는 서열의 N 말단에 융합된 제1 폴리펩티드 및 TCR  $\beta$  사슬 가변 영역 서열에 대응하는 서열이 TCR  $\beta$  사슬 불변 영역 세포 외 서열에 대응하는 N 말단 서열에 융합된 제2 폴리펩티드를 함유하고, 제1 및 제2 폴리펩티드는 이황화물 결합에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 결합이 천연 2량체  $\alpha\beta$  TCR에 존재하는 천연 사슬 간 이황화물 결합에 대응할 수 있다. 일부 구현예에서, 사슬 간 이황화물 결합은 천연 TCR에 존재하지 않는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 하나 이상의 시스테인이 dTCR 폴리펩티드 쌍의 불변 영역 세포 외 서열 내로 편입될 수 있다. 일부 경우에, 천연 및 비천연 이황화물 결합 둘 다가 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR이 막관통 서열을 함유하여 막에 고정된다.
- [0929] 일부 구현예에서, dTCR은 가변  $\alpha$  도메인, 불변  $\alpha$  도메인 및 불변  $\alpha$  도메인의 C-말단에 부착된 제1 2량체화 모티프를 함유하는 TCR  $\alpha$  사슬 및 가변  $\beta$  도메인, 불변  $\beta$  도메인 및 불변  $\beta$  도메인의 C-말단에 부착된 제2 2량체화 모티프를 포함하는 TCR  $\beta$  사슬을 함유하고, 여기서 제1 및 제2 2량체화 모티프가 상호 작용하여 TCR  $\alpha$  사슬과 TCR  $\beta$  사슬을 서로 연결하는 제1 2량체화 모티프 내 아미노산과 제2 2량체화 모티프 내 아미노산 사이에서 공유 결합을 형성한다.
- [0930] 일부 구현예에서, 암호화된 재조합 TCR은 단일 사슬 TCR(scTCR 또는 scTv)이다. 전형적으로, scTCR은 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다(예를 들어, 문헌[Soo Hoo, W. F. et al. PNAS (USA) 89, 4759 (1992); Wufing, C. and Plückthun, A., J. Mol. Biol. 242, 655 (1994); Kurucz, I. et al. PNAS (USA) 90 3830 (1993); 국제 특허 출원 공개 번호 WO 96/13593, WO 96/18105, WO 99/60120, WO 99/18129, WO 03/020763, WO 2011/044186; 및 Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996)]을 참조한다). 일부 구현예에서, scTCR이 도입된 비천연 사슬 간 이황화물 결합을 함유하여 TCR 사슬의 결합을 촉진한다(예를 들어, 문헌[국제 출원 공개 번호 WO 03/020763] 참조). 일부 구현예에서, scTCR은, 이의 C-말단에 융합된 이종 루신 지퍼(heterologous leucine zipper)가 사슬 결합을 촉진하는 비이황화물 연결 절단형 TCR이다(예를 들어, 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO99/60120] 참조). 일부 구현예에서, scTCR은 펩티드 링커를 통해 TCR $\hat{\alpha}$  가변 도메인에 공유 결합된 TCR  $\alpha$  가변 도메인을 함유한다(예를 들어, 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO 99/18129] 참조).
- [0931] 일부 구현예에서, scTCR은, TCR  $\alpha$  사슬 가변 영역에 대응하는 아미노산 서열로 구성된 제1 세그먼트, TCR  $\beta$  사슬 불변 도메인 세포 외 서열에 대응하는 아미노산 서열의 N 말단에 융합된 TCR  $\beta$  사슬 가변 영역 서열에 대응하는 아미노산 서열로 구성된 제2 세그먼트 및 제1 세그먼트의 C 말단을 제2 세그먼트의 N 말단에 연결하는 링커 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, scTCR은,  $\alpha$  사슬 세포 외 불변 도메인 서열의 N 말단에 융합된  $\alpha$  사슬 가변 영역 서열로 구성된 제1 세그먼트 및  $\beta$  사슬 세포 외 불변 서열의 N 말단에 융합된  $\beta$  사슬 가변 영역 서열로 구성된 제2 세그먼트 및 막관통 서열 및 선택적으로 제1 세그먼트의 C 말단을 제2 세그먼트의 N 말단에 연결하는 링커 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, scTCR은,  $\beta$  사슬 세포 외 불변 도메인 서열의 N 말단에 융합된 TCR  $\beta$  사슬 가변 영역 서열로 구성된 제1 세그먼트 및  $\alpha$  사슬 세포 외 불변 서열의 N 말단에 융합된  $\alpha$  사슬 가변 영역 서열로 구성된 제2 세그먼트 및 막관통 서열 및 선택적으로 제1 세그먼트의 C 말단을 제2 세그먼트의 N 말단에 연결하는 링커 서열을 함유한다.
- [0932] 일부 구현예에서, 제1 및 제2 TCR 세그먼트를 연결하는 scTCR의 링커는, TCR 결합 특이성을 유지하면서 단일 폴리펩티드 가닥을 형성할 수 있는 임의의 링커일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커 서열은 예를 들어, 화학식 -P-AA-P-를 가질 수 있고, 여기서 P는 프롤린이고 AA는 아미노산 서열을 나타내며 여기서 아미노산은 글리신과 세린이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 세그먼트가 쌍을 이루어 이의 가변 영역 서열이 상기 결합을 위해 배향된다. 따라서, 일부 경우에, 링커는 제1 세그먼트의 C 말단과 제2 세그먼트의 N 말단 사이(또는 그 반대로 마찬가지로)의 거리를 포괄하기에 충분한 길이를 가지나, 표적 리간드에 대한 scTCR의 결합을 차단하거나 감소시킬 정도로 너무 길지 않다. 일부 구현예에서, 링커는 (약) 10 내지 45 개의 아미노산, 예컨대 10 내지 30 개의 아미노산 또는 26 내지 41 개의 아미노산 잔기, 예를 들어 29, 30, 31 또는 32 개의 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 링커는 화학식 -PGGG-(SGGG)<sub>5</sub>-P-을 갖고, 여기서 P는 프롤린이고, G는 글리신이며, S는 세린이다 (서열 번호: 22). 일부 구현예에서, 링커는 서열 GSADDAKKDAAKKDGKS(서열 번호: 23)을 갖는다.

- [0933] 일부 구현예에서, scTCR은  $\alpha$  사슬의 불변 도메인의 면역글로불린 영역의 잔기를  $\beta$  사슬의 불변 도메인의 면역글로불린 영역의 잔기에 연결하는 공유 이황화물 결합을 함유한다. 일부 구현예에서, 천연 TCR 내 사슬 간 이황화물 결합은 존재하지 않는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 하나 이상의 시스테인이 scTCR 폴리펩티드의 제1 및 제2 세그먼트의 불변 영역 세포 외 서열 내로 편입될 수 있다. 일부 경우에, 천연 및 비천연 이황화물 결합 둘 다 바람직할 수 있다.
- [0934] 일부 구현예에서, 암호화된 TCR 또는 이의 항원 결합 단편은, 표적 항원에 대해 (약)  $10^{-5}$  내지  $10^{-12}$  M 및 그 안의 모든 개별 수치 및 범위의 평형 해리 상수( $K_D$ )를 갖는 친화도를 나타낸다. 일부 구현예에서, 표적 항원은 MHC 펩티드 복합체 또는 리간드이다.
- [0935] **C. 유전자 조작을 위한 세포 및 세포의 제조**
- [0936] 일부 구현예에서, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 포함하는 유전자 조작된 세포를 포함하는 조작된 세포, 예를 들어, 유전자 조작되거나 변형된 세포 및 세포를 조작하는 방법이 제공된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 주형 폴리뉴클레오티드, 예컨대 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 여기, 예컨대 섹션 I.B.2에 기재된 임의의 주형 폴리뉴클레오티드 및/또는 추가 분자(들)가, 예를 들어 여기 기재된 조작 방법에 따라 조작을 위해 하나의 세포 내로 도입된다. 일부 측면에서, 조작된 세포의 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 여기 섹션 III.A에 기재된 것을 포함한다.
- [0937] 일부 측면에서, 폴리뉴클레오티드 내 전이 유전자 서열(외인성 또는 이중 핵산 서열) 및/또는 이의 일부가 이중이다, 즉 예를 들어, 조작된 세포 및/또는 상기 세포가 유래된 유기체에서 보통 발견되지 않는, 또 다른 유기체 또는 세포에서 수득된 것과 같이 세포 또는 세포에서 수득된 샘플에는 정상적으로 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열이 자연에서 발견되지 않는 핵산 서열과 같이 자연 발생이 아니거나 자연에서 발견되는 핵산 서열에서 변형되며, 복수의 상이한 세포 유형으로부터 다양한 도메인을 암호화하는 핵산의 키메라 조합을 포함하는 것을 포함한다.
- [0938] 일부 측면에서, 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 방법이 제공되고, 상기 방법은 *TGFBR2* 유전자 좌에서 유전자 파괴를 포함하는 T 세포 내로 예를 들어, 여기 섹션 I.B.2에 기재된 제공된 임의의 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것을 수반한다. 일부 측면에서, 유전자 파괴가, 여기 예컨대 섹션 I.A에 기재된 임의의 것을 포함한 표적화된 유전자 파괴를 도입하기 위한 임의의 제제 또는 방법에 의해 도입된다. 일부 측면에서, 방법은 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 생성하고, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 측면에서, T 세포의 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)를 T 세포 내로 도입하는 것; 및 *TGFBR2* 유전자 좌에서 유전자 파괴를 포함하는 T 세포 내로 예를 들어, 여기 섹션 I.B.2에 기재된 제공된 임의의 폴리뉴클레오티드를 도입하는 것을 수반하는 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 방법이 제공되고, 여기서 상기 방법은 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 생성하며, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체, 예컨대 CAR 또는 TCR을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 서열이 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함하고, 상기 전이 유전자 서열이 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내에서 통합을 위해 표적화된다.
- [0939] 일부 구현예에서, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 T 세포 내로 도입하는 것을 수반하는 유전자 조작된 T 세포를 생성하는 방법이 제공되고, 상기 T 세포는 T 세포의 *TGFBR2* 유전자 좌 내에 유전자 파괴를 가지며, 여기서 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열이 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내에 통합을 위해 표적화된다. 일부 구현예에서, 방법은 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 생성하고, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산 서열이 재조합 수용체 또는 이의 일부, 예컨대 여기 예를 들어, 섹션 I.B.2에 기재된 임의의 것을 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법 수행 시, 내인성 TGFBR2의 발현이 감소 또는 제거되거나, TGFBR2의 비기능성 및/또는 부분 서열이 발현된다. 일부 구현예에서, 방법 수행 시, TGFBR2의 우성 음성(DN) 형태가 발현된다.
- [0940] 세포는 일반적으로 포유류 세포와 같은 진핵 세포이며, 전형적으로 인간 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 혈액, 골수, 림프 또는 림프 기관에서 유래되며, 선천적 또는 적응성 면역 세포와 같은 면역 계통의 세포, 예를 들어 림프구, 전형적으로 T 세포 및/또는 NK 세포를 포함한 골수 또는 림프 세포이다. 다른 예시적인 세포는 유도된 다능성 줄기 세포(induced pluripotent stem cell, iPSC)를 포함한, 다분화능 및 다능성 줄기 세포와 같

은 줄기 세포를 포함한다. 세포는 전형적으로 대상체에서 직접 단리되고/거나 대상체에서 단리되고 동결된 세포와 같은 1차 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포 또는 다른 세포 유형 중 하나 이상의 하위 세트, 예컨대 전체 T 세포 집단, CD4+ 세포, CD8+ 세포 및 이의 하위 집단, 예컨대 기능, 활성화 상태, 성숙도, 분화 가능성, 증폭, 재순환, 국소화 및/또는 지속 용량, 항원 특이성, 항원 수용체의 유형, 특정 기관 또는 구획에의 존재, 마커 또는 사이토카인 분비 프로필 및/또는 분화 정도에 의해 정의되는 것을 포함한다. 치료될 대상체와 관련하여, 세포는 동종 이계 및/또는 자가 조직일 수 있다. 방법 중 기성품 방법이 포함된다. 일부 측면에서, 예컨대 기성품 기술의 경우, 세포는 다능성 및/또는 다분화능, 예컨대 줄기 세포, 예컨대 iPSC이다. 일부 구현예에서, 방법은 대상체에서 세포를 단리하고, 세포를 제조, 프로세싱, 배양 및/또는 조작하고, 동결 보존 전 또는 후에 동일한 대상체 내로 세포를 재도입하는 것을 포함한다.

[0941] T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 하위 유형 및 하위 집단 중에는 나이브 T( $T_N$ ) 세포, 이펙터 T 세포 ( $T_{EFF}$ ), 기억 T 세포 및 이의 하위 유형, 예컨대 줄기 세포 기억 T( $T_{SCM}$ ), 중앙 기억 T( $T_{CM}$ ), 이펙터 기억 T( $T_{EM}$ ) 또는 말단 분화된 이펙터 기억 T 세포, 종양 침윤성 림프구(tumor-infiltrating lymphocyte, TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포 독성 T 세포, 점막 관련 불변 T(mucosa-associated invariant T, MAIT) 세포, 천연 발생 및 적응성 조절 T(Treg) 세포, 헬퍼 T 세포, 예컨대 TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 여포성 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포 및 델타/감마 T 세포가 있다.

[0942] 일부 구현예에서, 세포는 자연 살해(NK) 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 단핵구 또는 과립구, 예를 들어 골수 세포, 대식 세포, 호중구, 수지상 세포, 비만 세포, 호산구 및/또는 호염기구이다. 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작을 통해 도입된 하나 이상의 핵산을 포함함으로써 상기 핵산의 재조합 또는 유전자 조작된 생성물을 발현한다. 일부 구현예에서, 핵산은 이중 기원이다, 즉 예를 들어, 조작될 세포 및/또는 상기 세포가 유래된 유기체에서 보통 발견되지 않는 또 다른 유기체 또는 세포에서 수득된 것과 같이 세포 또는 세포에서 수득된 샘플에는 정상적으로 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 핵산은 자연에서 발견되지 않는 핵산과 같이 천연 발생이 아니고, 복수의 상이한 세포 유형으로부터 다양한 도메인을 암호화하는 핵산의 키메라 조합을 포함하는 것을 포함한다.

[0943] 일부 구현예에서, 조작된 세포의 제조는 하나 이상의 배양 및/또는 제조 단계를 포함한다. CAR과 같은 전이 유전자 수용체를 암호화하는 핵산의 도입을 위한 세포는, 생물학적 샘플, 예를 들어 대상체에서 수득되거나 유래된 것과 같은 샘플에서 단리될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포가 단리되는 대상체는 질병 또는 병태를 갖거나 세포 요법이 필요하거나 또는 세포 요법이 투여될 대상체이다. 일부 구현예에서, 대상체는, 세포가 단리, 프로세싱 및/또는 조작되는 입양 세포 요법과 같은 특정 치료적 개입이 필요한 인간이다.

[0944] 따라서, 일부 구현예에서 세포는 1차 세포, 예를 들어 1차 인간 세포이다. 샘플은 대상체에서 직접 채취된 조직, 유체 및 기타 샘플뿐만 아니라 분리, 원심분리, 유전적 조작(예를 들어, 바이러스 벡터로 형질 도입), 세척 및/또는 인큐베이션과 같은 하나 이상의 프로세싱 단계에서 생성된 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플은, 생물학적 출처에서 직접 수득된 샘플 또는 프로세싱된 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 체액, 예컨대 혈액, 혈장, 혈청, 뇌척수액, 활액, 소변 및 땀, 조직 및 기관 샘플을 포함하며, 이로부터 유래된 프로세싱된 샘플을 포함하나, 이에 국한되지 않는다.

[0945] 일부 측면에서, 세포가 유래되거나 단리된 샘플은 혈액 또는 혈액 유래 샘플이거나, 성분 채집술 또는 백혈구 성분 채집술 생성물이거나 이로부터 유래된다. 예시적인 샘플은, 전혈, 말초 혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장 관련 림프 조직, 점막 관련 림프 조직, 비장, 기타 림프 조직, 간, 폐, 위, 내장, 결장, 신장, 췌장, 유방, 뼈, 전립선, 자궁 경부, 고환, 난소, 편도선 또는 기타 기관 및/또는 이로부터 유래된 세포를 포함한다. 샘플은, 세포 요법, 예를 들어, 입양 세포 요법의 상황에서 자가 및 동종이계 출처의 샘플을 포함한다.

[0946] 일부 구현예에서, 세포는 세포주, 예를 들어 T 세포주에서 유래된다. 일부 구현예에서, 세포가 이중 발생 출처, 예를 들어 마우스, 랫트, 비인간 영장류 및 돼지에서 수득된다.

[0947] 일부 구현예에서, 세포의 단리는 하나 이상의 제조 및/또는 비친화도 기반 세포 분리 단계를 포함한다. 일부 예에서, 세포가 세척, 원심 분리 및/또는 하나 이상의 시약의 존재 하에 인큐베이션되어, 예를 들어 원치 않는 성분의 제거, 원하는 성분의 농축, 특정 시약에 민감한 세포를 용해시키거나 제거한다. 일부 예에서, 세포는 하나 이상의 특성, 예컨대 밀도, 부착 특성, 크기, 특정 성분에 대한 민감성 및/또는 내성에 근거하여 분리된다.

[0948] 일부 예에서, 대상체의 순환 혈액 유래 세포가, 예를 들어, 성분 채집술 또는 백혈구 성분 채집술에 의해 수득

된다. 일부 측면에서, 샘플은 림프구를 함유하고, T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 핵 형성 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판을 포함하며, 일부 측면에서 적혈구 및 혈소판이 아닌 세포를 함유한다.

- [0949] 일부 구현예에서, 대상체에서 수집된 혈액 세포가 세척되어, 예를 들어 혈장 분획을 제거하고, 후속 프로세스 단계를 위한 적절한 완충제 또는 배지에 세포를 배치한다. 일부 구현예에서, 세포가 인산 완충 식염수(PBS)로 세척된다. 일부 구현예에서, 세척 용액은 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 많은 또는 모든 2가 양이온이 결여되어 있다. 일부 측면에서, 세척 단계가 제조업체의 지침에 따라 반자동 "플로우-쓰루(flow-through)" 원심 분리기(예를 들어, Cobe 2991 세포 프로세서, Baxter)로 달성된다. 일부 측면에서, 세척 단계가 제조업체의 지침에 따라 접선 흐름 여과(tangential flow filtration, TFF)에 의해 달성된다. 일부 구현예에서, 세포가 세척 후, 예를 들어  $Ca^{++}/Mg^{++}$  이 없는 PBS와 같은 다양한 생체 적합성 완충제에 재현탁된다. 특정 구현예에서, 혈액 세포 샘플의 성분이 제거되고, 세포가 배양 배지에 직접 재현탁된다.
- [0950] 일부 구현예에서, 방법은 적혈구를 용해시키고 Percoll 또는 Ficoll 구배를 통한 원심 분리에 의해 말초 혈액에서 백혈구를 준비하는 것과 같은 밀도 기반 세포 분리 방법을 포함한다.
- [0951] 일부 구현예에서, 단리 방법은 표면 마커, 예를 들어, 표면 단백질, 세포 내 마커 또는 핵산과 같은 하나 이상의 특정 분자의 세포 내 발현 또는 존재에 근거한 상이한 세포 유형의 분리를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 마커에 근거한 분리를 위한 임의의 공지된 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 분리는 친화도- 또는 면역 친화도-기반 분리이다. 예를 들어, 일부 측면에서 단리는 하나 이상의 마커, 전형적으로 세포 표면 마커의 세포 발현 또는 발현 수준에 근거하여, 예를 들어 상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와 인큐베이션 후 일반적으로 세척 단계 및 항체 또는 결합 파트너에 결합하지 않은 세포로부터 항체 또는 결합 파트너에 결합한 세포의 분리에 의한 세포 및 세포 집단의 분리를 포함한다.
- [0952] 상기 분리 단계는 시약에 결합한 세포가 추가 사용을 위해 보유되는 양성 선택 및/또는 항체 또는 결합 파트너에 결합하지 않은 세포가 보유되는 음성 선택에 근거할 수 있다. 일부 예에서, 두 분획 모두 추가 사용을 위해 보유된다. 일부 측면에서, 음성 선택은 이질적인 집단에서 세포 유형을 특이적으로 식별하는 항체가 이용 가능하지 않은 경우에 특히 유용할 수 있어서, 분리가 원하는 집단이 아닌 세포에 의해 발현된 마커에 근거하여 가장 잘 수행된다.
- [0953] 분리는 특정 마커를 발현하는 특정 세포 집단 또는 세포의 100% 농축 또는 제거를 초래할 필요가 없다. 예를 들어, 마커를 발현하는 것과 같은 특정 유형의 세포에 대한 양성 선택 또는 이의 농축은 상기 세포의 수 또는 백분율을 증가시키는 것을 지칭하나, 마커를 발현하지 않는 세포의 완전한 부재를 초래할 필요는 없다. 마찬가지로, 마커를 발현하는 것과 같은 특정 유형의 세포의 음성 선택, 제거 또는 고갈은 상기 세포의 수 또는 백분율을 감소시키는 것을 지칭하나, 모든 상기 세포의 완전한 제거를 초래할 필요는 없다.
- [0954] 일부 예에서, 다중 라운드의 분리 단계가 수행되고, 여기서 한 단계에서 양성 또는 음성 선택된 분획이 후속적인 양성 또는 음성 선택과 같은 또 다른 분리 단계의 대상이 된다. 일부 예에서, 단일 분리 단계가, 예컨대 음성 선택을 위해 표적화된 마커에 대해 각각 특이적인 복수의 항체 또는 결합 파트너와 세포를 인큐베이션함으로써 동시에 다중 마커를 발현하는 세포를 고갈시킬 수 있다. 마찬가지로, 다중 세포 유형이 다양한 세포 유형에서 발현되는 복수의 항체 또는 결합 파트너와 세포를 인큐베이션함으로써 동시에 양성으로 선택될 수 있다.
- [0955] 예를 들어, 일부 측면에서, T 세포의 특정 하위 집단, 예컨대 하나 이상의 표면 마커, 예를 들어  $CD28^{+}$ ,  $CD62L^{+}$ ,  $CCR7^{+}$ ,  $CD27^{+}$ ,  $CD127^{+}$ ,  $CD4^{+}$ ,  $CD8^{+}$ ,  $CD45RA^{+}$  및/또는  $CD45RO^{+}$  T 세포를 높은 수준으로 발현하거나 이에 대해 양성인 세포가, 양성 또는 음성 선택 기술에 의해 단리된다.
- [0956] 예를 들어,  $CD3^{+}$ ,  $CD28^{+}$  T 세포가 항-CD3/항-CD28 접합 자성 비드(예를 들어, DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T Cell Expander)를 사용하여 양성 선택될 수 있다.
- [0957] 일부 구현예에서, 단리가, 양성 선택에 의한 특정 세포 집단에 대한 농축 또는 음성 선택에 의한 특정 세포 집단의 고갈에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 양성 또는 음성 선택이, 각각 양성 또는 음성으로 선택된 세포 상에서 발현(마커<sup>+</sup>)되거나 또는 상대적으로 보다 높은 수준으로 발현(마커<sup>hi</sup>)된 하나 이상의 표면 마커에 특이적으로 결합하는 하나 이상의 항체 또는 다른 결합체와 세포를 인큐베이션함으로써 달성된다.
- [0958] 일부 구현예에서, T 세포가 비-T 세포 상에 발현된 마커의 음성 선택에 의해 PBMC 샘플, 예컨대 B 세포, 단핵구

또는 다른 백혈구, 예컨대 CD14에서 분리된다. 일부 측면에서, CD4<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup> 선택 단계가 사용되어 CD4<sup>+</sup> 헬퍼 및 CD8<sup>+</sup> 세포 독성 T 세포가 분리된다. 상기 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> 집단이, 하나 이상의 나이브(naive), 기억 및/또는 이펙터 T 세포 하위 집단 상에 발현된 또는 상대적으로 보다 높은 정도로 발현된 마커에 대해 양성 또는 음성 선택에 의해 하위 집단으로 더 분류될 수 있다.

[0959] 일부 구현예에서, CD8<sup>+</sup> 세포가, 예컨대 각각의 하위 집단과 관련된 표면 항원에 근거한 양성 또는 음성 선택에 의해 나이브, 중앙 기억, 이펙터 기억 및/또는 중앙 기억 줄기 세포로 더 농축되거나 고갈된다. 일부 구현예에서, 중앙 기억 T(T<sub>CM</sub>) 세포로 농축이 수행되어 투여 후의 장기간 생존, 증폭 및/또는 생착이 개선되는 것과 같이 효능이 증가되고, 상기는 일부 측면에서 상기 하위 집단에서 특히 강력하다. 문헌[*Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701*]을 참조한다. 일부 구현예에서, T<sub>CM</sub>-농축 CD8<sup>+</sup> T 세포 및 CD4<sup>+</sup> T 세포의 조합이 효능을 더 향상시킨다.

[0960] 일부 구현예에서, 기억 T 세포가 CD8<sup>+</sup> 말초 혈액 림프구의 CD62L<sup>+</sup> 및 CD62L<sup>-</sup> 하위 세트 둘 다에 존재한다. PBMC가, 예컨대 항-CD8 및 항-CD62L 항체를 사용하여 CD62L<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> 및/또는 CD62L<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> 분획으로 농축되거나 고갈될 수 있다.

[0961] 일부 구현예에서, 중앙 기억 T(T<sub>CM</sub>) 세포로 농축이 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및/또는 CD127의 표면 발현 양성 또는 상기의 높은 표면 발현에 근거하고; 일부 측면에서, 이는 CD45RA 및/또는 그랜자임 B를 발현하거나 고도로 발현하는 세포에 대한 음성 선택에 근거한다. 일부 측면에서, T<sub>CM</sub> 세포로 농축된 CD8<sup>+</sup> 집단의 단리가, CD4, CD14, CD45RA를 발현하는 세포의 고갈 및 CD62L을 발현하는 세포에 대한 양성 선택 또는 농축에 의해 수행된다. 일 측면에서, 중앙 기억 T(T<sub>CM</sub>) 세포에 대한 농축이 CD4 발현에 근거하여 선택된 세포의 음성 분획으로 시작하여 수행되며, 이는 CD14 및 CD45RA의 발현에 근거한 음성 선택 및 CD62L에 근거한 양성 선택의 대상이 된다. 일부 측면에서, 상기 선택이 동시에 수행되며, 다른 측면에서 순차적으로, 어떠한 순서로든 수행된다. 일부 측면에서, CD8<sup>+</sup> 세포 집단 또는 하위 집단을 제조하는 데 사용된 동일한 CD4 발현 기반 선택 단계가 또한 사용되어 CD4<sup>+</sup> 세포 집단 또는 하위 집단을 생성하여, CD4 기반 분리 유래 양성 및 음성 분획 둘 다가 보유하고, 선택적으로 하나 이상의 추가 양성 또는 음성 선택 단계 후, 후속 단계의 방법에 사용된다.

[0962] 특정 예에서, PBMC 샘플 또는 다른 백혈구 샘플이 CD4<sup>+</sup> 세포의 선택의 대상이 되고, 여기서 음성 및 양성 분획 둘 다가 보유된다. 이어서 음성 분획이 CD14 및 CD45RA 또는 CD19의 발현에 근거한 음성 선택 및 CD62L 또는 CCR7과 같은 중앙 기억 T 세포에 특징적인 마커에 근거한 양성 선택의 대상이 되고, 여기서 양성 및 음성 선택은 어느 순서로든 수행된다.

[0963] CD4<sup>+</sup> T 헬퍼 세포가 세포 표면 항원을 갖는 세포 집단을 확인함으로써 나이브, 중앙 기억 및 이펙터 세포로 분류된다. CD4<sup>+</sup> 림프구가 표준 방법으로 획득될 수 있다. 일부 구현예에서, 나이브 CD4<sup>+</sup> T 림프구는 CD45RO<sup>-</sup>, CD45RA<sup>+</sup>, CD62L<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T 세포이다. 일부 구현예에서, 중앙 기억 CD4<sup>+</sup> 세포는 CD62L<sup>+</sup> 및 CD45RO<sup>+</sup>이다. 일부 구현예에서, 이펙터 CD4<sup>+</sup> 세포는 CD62L<sup>-</sup> 및 CD45RO<sup>-</sup>이다.

[0964] 일 예에서, 음성 선택에 의해 CD4<sup>+</sup> 세포를 농축하기 위해, 단클론 항체 콕테일은 전형적으로 CD14, CD20, CD11b, CD16, HLA-DR 및 CD8에 대한 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 결합 파트너가 자성 비드 또는 상자성 비드와 같은 고체 지지체 또는 매트릭스에 결합되어 양성 및/또는 음성 선택에 대한 세포 분리를 가능하게 한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 세포 및 세포 집단이 면역자성(또는 자성친화도) 분리 기술을 사용하여 분리되거나 단리된다(문헌[*Methods in Molecular Medicine, vol. 58: Metastasis Research Protocols, Vol. 2: Cell Behavior In vitro and In vivo, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher ©Humana Press Inc., Totowa, NJ*]에서 검토됨).

[0965] 일부 측면에서, 분리될 세포 샘플 또는 세포 조성물이, 작고, 자화 가능 또는 자성 반응 물질, 예컨대 자성 반응 입자 또는 미세입자, 예컨대 상자성 비드(예를 들어, Dynalbeads 또는 MACS 비드)와 함께 인큐베이션된다. 자성 반응 물질, 예를 들어 입자가, 분리가 바람직한, 예를 들어 음성 또는 양성 선택이 바람직한 세포, 세포들

또는 세포 집단 상에 존재하는 분자, 예를 들어 표면 마커에 특이적으로 결합하는 결합 파트너, 예를 들어 항체에 일반적으로 직접 또는 간접적으로 부착된다.

- [0966] 일부 구현예에서, 자성 입자 또는 비드가, 항체 또는 다른 결합 파트너와 같은 특정 결합 멤버에 결합된 자성 반응 물질을 포함한다. 자성 분리 방법에 사용되는 잘 알려진 많은 자성 반응 물질이 있다. 적합한 자성 입자는 문헌[여기에 참조로 통합된 MolDay, 미국 특허 번호 4,452,773 및 유럽 특허 명세서 EP 452342 B]에 기재된 것을 포함한다. 콜로이드 크기의 입자, 예컨대 문헌[Owen 미국 특허 번호 4,795,698 및 Liberti et al., 미국 특허 번호 5,200,084]에 기재된 것이 다른 예이다.
- [0967] 항체 또는 결합 파트너 또는 분자, 예컨대 자성 입자 또는 비드에 부착된, 상기 항체 또는 결합 파트너에 특이적으로 결합하는 2차 항체 또는 다른 시약이 샘플 내의 세포 상에 존재하는 경우 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하는 조건 하에서, 인큐베이션이 일반적으로 수행된다.
- [0968] 일부 측면에서, 샘플이 자기장에 배치되고, 이에 부착된 자성 반응 입자 또는 자화 가능 입자를 갖는 상기 세포가 자석에 끌리고 비표지 세포로부터 분리될 것이다. 양성 선택의 경우, 자석에 끌린 세포가 보유되고; 음성 선택의 경우, 끌리지 않은 세포(비표지 세포)가 보유된다. 일부 측면에서, 양성 및 음성 선택의 조합이 동일한 선택 단계 중 수행되며, 여기서 양성 및 음성 분획이 보유되고, 추가 분리 단계로 더 프로세싱되거나 이의 대상이 된다.
- [0969] 특정 구현예에서, 자성 반응 입자가, 1차 항체 또는 다른 결합 파트너, 2차 항체, 렉틴, 효소 또는 스트렙타비딘으로 코팅된다. 특정 구현예에서, 자성 입자가 하나 이상의 마커에 특이적인 1차 항체의 코팅을 통해 세포에 부착된다. 특정 구현예에서, 비드보다는 세포가 1차 항체 또는 결합 파트너로 표지되고, 이어서 세포 유형 특이적 2차 항체- 또는 다른 결합 파트너(예를 들어, 스트렙타비딘)-코팅된 자성 입자가 첨가된다. 특정 구현예에서, 스트렙타비딘 코팅된 자성 입자가 비오틴화된 1차 또는 2차 항체와 함께 사용된다.
- [0970] 일부 구현예에서, 자성 반응 입자가 후속적으로 인큐베이션, 배양 및/또는 조작될 세포에 부착되어 남아있고; 일부 측면에서, 입자가 환자에게 투여하기 위한 세포에 부착되어 남아있다. 일부 구현예에서, 자화 가능 또는 자성 반응 입자가 세포에서 제거된다. 세포로부터 자화 가능 입자를 제거하는 방법이 공지되어 있고, 예를 들어 경쟁 비-표지 항체 및 절단 가능한 링커에 접합된 자화 가능 입자 또는 항체의 사용을 포함한다. 일부 구현예에서, 자화 가능 입자는 생분해성이다.
- [0971] 일부 구현예에서, 친화도 기반 선택은 자성 활성화 세포 분류(magnetic-activated cell sorting, MACS)(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)를 통한 것이다. 자성 활성화 세포 분류(MACS) 시스템은 이에 부착된 자화된 입자를 갖는 세포를 고순도로 선택할 수 있다. 특정 구현예에서, MACS가 모드에서 작동하며, 여기서 외부 자기장의 적용 후에 비표적 및 표적 종이 순차적으로 용리된다. 즉, 자화된 입자에 부착된 세포가 부착되지 않은 종이 용리되는 동안 제자리에 유지된다. 이어서, 상기 제1 용리 단계가 완료된 후, 자기장에 포획되고 용리가 방지된 종이 상당한 방식으로 해제되어 용리 및 회수될 수 있다. 특정 구현예에서, 비표적 세포가 표지되고, 이 중 세포 집단으로부터 고갈된다.
- [0972] 특정 구현예에서, 단리 또는 분리가, 방법 중 단리, 세포 제조, 분리, 프로세싱, 인큐베이션, 배양 및/또는 제형화 단계 중 하나 이상을 수행하는 시스템, 장치 또는 기구를 사용하여 수행된다. 일부 측면에서, 시스템이 폐쇄 또는 멸균 환경에서 상기 단계 각각을 수행하는 데 사용되어 예를 들어, 오류, 사용자 취급 및/또는 오염이 최소화된다. 일 예에서, 시스템은 문헌[국제 특허 출원 공개 번호 WO2009/072003 또는 미국 출원 US 20110003380]에 기재된 바와 같은 시스템이다.
- [0973] 일부 구현예에서, 시스템 또는 기구가 통합되거나 독립적인 시스템 및/또는 자동화되거나 프로그램 가능한 방식으로 단리, 프로세싱, 조작 및 제형화 단계 중 하나 이상, 예를 들어 모두를 수행한다. 일부 측면에서, 시스템 또는 기구가, 사용자가 프로세싱, 단리, 조작 및 제형화 단계의 결과를 프로그램, 제어, 평가 및/또는 프로세싱, 단리, 조작 및 제형화 단계의 다양한 측면의 조정을 가능하게 하는 시스템 또는 기구와 통신하는 컴퓨터 및/또는 컴퓨터 프로그램을 포함한다.
- [0974] 일부 측면에서, 분리 및/또는 다른 단계가, 예를 들어 폐쇄 및 멸균 시스템에서 임상 규모 수준으로 세포의 자동 분리를 위해 CliniMACS 시스템(Miltenyi Biotec)을 사용하여 수행된다. 구성 요소는 통합 마이크로 컴퓨터, 자기 분리 유닛, 연동 펌프 및 다양한 핀치 밸브를 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 통합된 컴퓨터가 기기의 모든 구성 요소를 제어하고 시스템이 표준화된 순서로 반복된 절차를 수행하도록 지시한다. 일부 측면에서, 자기 분리 유닛은 이동 가능한 영구 자석 및 선택 칼럼을 위한 홀더를 포함한다. 연동 펌프가 튜브 세트 전체의 유량

을 제어하고, 핀치 밸브와 함께 시스템을 통한 완충제의 흐름 제어와 세포의 지속적인 현탁을 보장한다.

[0975] 일부 측면에서, CliniMACS 시스템은 멸균, 비발열성 용액으로 공급되는 항체 결합 자화 가능 입자를 사용한다. 일부 구현예에서, 자성 입자로 세포를 표지한 후, 세포를 세척하여 과량의 입자를 제거한다. 이어서, 세포 제조 백이 튜브 세트에 연결되고, 이는 차례로 완충제를 함유하는 백 및 세포 수집 백에 연결된다. 튜브 세트는 사전 컬럼 및 분리 컬럼을 포함한 사전 조립된 멸균 튜브로 구성되며, 일회용이다. 분리 프로그램이 시작된 후, 시스템이 세포 샘플을 분리 컬럼 상에 자동으로 적용한다. 표지된 세포는 컬럼 내에 보유되나, 비표지 세포는 일련의 세척 단계에 의해 제거된다. 일부 구현예에서, 여기에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 표지되지 않고 칼럼에 보유되지 않는다. 일부 구현예에서, 여기에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단은 표지되고 칼럼에 보유된다. 일부 구현예에서, 여기에 기재된 방법과 함께 사용하기 위한 세포 집단이 자기장을 제거한 후 칼럼에서 용리되고, 세포 수집 백 내에 수집된다.

[0976] 특정 구현예에서, 분리 및/또는 다른 단계가 CliniMACS Prodigy 시스템(Miltenyi Biotec)을 사용하여 수행된다. 일부 측면에서, CliniMACS Prodigy 시스템에는 원심 분리에 의한 세포의 자동 세척 및 세포의 분획화를 가능하게 하는 세포 프로세싱 단일체가 구비되어 있다. CliniMACS Prodigy 시스템은, 출처 세포 생성물의 거시 층을 식별함으로써 최적의 세포 분획화 중점을 결정하는 온보드 카메라 및 이미지 인식 소프트웨어를 또한 포함할 수 있다. 예를 들어, 말초 혈액이 적혈구, 백혈구 및 혈장 층으로 자동 분리된다. CliniMACS Prodigy 시스템은, 예를 들어, 세포 분화 및 증폭, 항원 로딩 및 장기 세포 배양과 같은 세포 배양 프로토콜을 완수하는 통합된 세포 배양 챔버를 또한 포함할 수 있다. 입력 포트가 배지의 멸균 제거 및 보충을 가능하게 할 수 있고, 통합된 현미경을 사용하여 세포를 모니터링할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Klebanoff et al. (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood*.1:72-82, 및 Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701]을 참조한다.

[0977] 일부 구현예에서, 여기에 기재된 세포 집단이 유세포 분석을 통해 수집 및 농축(또는 고갈)되고, 여기서 다중 세포 표면 마커에 대해 염색된 세포가 유체 스트림으로 운반된다. 일부 구현예에서, 여기에 기재된 세포 집단이 분취 규모(FACS) 분류를 통해 수집 및 농축(또는 고갈)된다. 특정 구현예에서, 여기에 기재된 세포 집단이, FACS 기반 검출 시스템과 조합된 미세전자기계 시스템(microelectromechanical system, MEMS) 칩을 사용함으로써 수집 및 농축(또는 고갈)된다(예를 들어, 문헌[국제 출원 WO 2010/033140), Cho et al. (2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; 및 Godin et al. (2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376] 참조). 두 경우 모두, 세포가 고순도로 잘 정의된 T 세포 하위 세트의 단리를 가능하게 하는 다중 마커로 표지될 수 있다.

[0978] 일부 구현예에서, 항체 또는 결합 파트너가 하나 이상의 검출 가능한 마커로 표지되어, 양성 및/또는 음성 선택을 위한 분리가 촉진된다. 예를 들어, 분리가 형광 표지된 항체에 대한 결합에 근거할 수 있다. 일부 예에서, 하나 이상의 세포 표면 마커에 특이적인 항체 또는 다른 결합 파트너의 결합에 근거한 세포의 분리가, 예를 들어 유세포 분석 검출 시스템과 조합으로 예컨대, 분취 규모(FACS) 및/또는 미세전자기계 시스템(MEMS) 칩을 포함한 형광 활성화 세포 분류(fluorescence-activated cell sorting, FACS)에 의해 유체 스트림에서 수행된다. 상기 방법은 다중 마커에 근거한 양성 및 음성 선택을 동시에 가능하게 한다.

[0979] 일부 구현예에서, 제조 방법은 단리, 인큐베이션 및/또는 조작 전이든 후이든 세포를 동결, 예를 들어, 동결 보존하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 동결 및 후속적인 해동 단계가 세포 집단에서 과립구 및 어느 정도 단핵구를 제거한다. 일부 구현예에서, 세포가 예를 들어, 혈장 및 혈소판을 제거하기 위한 세척 단계 후에 동결 용액에 현탁된다. 일부 측면에서, 공지된 다양한 임의의 동결 용액 및 파라미터가 사용될 수 있다. 일 예는 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민(human serum albumin, HSA)을 함유하는 PBS 또는 다른 적합한 세포 동결 배지를 사용하는 것을 수반한다. 이어서, 상기가 배지를 이용하여 1:1로 희석되어 DMSO 및 HSA의 최종 농도가 각각 10% 및 4%가 된다. 이어서 세포를 일반적으로 분당 1°의 속도로 -80 °C까지 동결시키고, 액체 질소 저장 탱크의 기상에서 저장한다.

[0980] 일부 구현예에서, 세포가 유전자 조작과 관련하여 또는 그 전에 인큐베이션 및/또는 배양된다. 인큐베이션 단계는 배양, 양성, 자극, 활성화 및/또는 번식을 포함할 수 있다. 인큐베이션 및/또는 조작이, 배양 용기, 예컨대 유닛, 챔버, 웰, 컬럼, 튜브, 튜브 세트, 밸브, 바이알, 배양 접시, 백 또는 세포 배양 또는 세포 양성을 위한 다른 컨테이너에서 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물 또는 세포가 자극 조건 또는 자극제의 존재 하에 인큐베이션된다. 상기 조건은, 집단 내 세포의 증식, 증폭, 활성화 및/또는 생존을 유도하고, 항원 노출을 모방하고/거나 재조합 항원 수용체의 도입과 같은 유전자 조작을 위해 세포를 프라임하도록 설계된 것을 포함한다.

- [0981] 조건은, 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 제제, 예를 들어 영양소, 아미노산, 항생제, 이온 및/또는 자극 인자, 예컨대 사이토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체 및 세포를 활성화하도록 설계된 임의의 기타 제제 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0982] 일부 구현예에서, 자극 조건 또는 제제는, TCR 복합체의 세포 내 신호 전달 도메인을 자극 또는 활성화할 수 있는 하나 이상의 제제, 예를 들어 리간드를 포함한다. 일부 측면에서, 제제는 T 세포에서 TCR/CD3 세포 내 신호 전달 캐스케이드를 켜거나 개시한다. 상기 제제는 항체, 예컨대 TCR에 특이적인 것, 예를 들어 항-CD3을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 자극 조건은 공자극 수용체, 예를 들어 항-CD28을 자극할 수 있는 하나 이상의 제제, 예를 들어 리간드를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 제제 및/또는 리간드는 고체 지지체, 예컨대 비드 및/또는 하나 이상의 사이토카인에 결합될 수 있다. 선택적으로, 증폭 방법은 배양 배지에 (예를 들어, 약 0.5 ng/mL 이상의 농도로) 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체를 첨가하는 단계를 더 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 자극제는 IL-2, IL-15 및/또는 IL-7을 포함한다. 일부 측면에서, IL-2 농도는 약 10 유닛/mL 이상이다.
- [0983] 일부 측면에서, 인큐베이션은, 예컨대 문헌[미국 특허 번호 6,040,177, Klebanoff et al. (2012) J Immunother. 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82, 및/또는 Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701]에 기재된 기술에 따라 수행된다.
- [0984] 일부 구현예에서, T 세포가, (예를 들어, 생성된 세포 집단이 증폭될 초기 집단 내 각각의 T 림프구에 대해 적어도 약 5, 10, 20 또는 40 개 이상의 PBMC 배양보조 세포를 함유하도록) 배양 개시 조성물 배양보조 세포, 예컨대 비분열 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)에 첨가하고; 상기 배양물을 (예를 들어, T 세포 수를 증폭하기에 충분한 시간 동안) 인큐베이션함으로써; 증폭된다. 일부 측면에서, 비분열 배양보조 세포는 감마 조사된 PBMC 배양보조 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PBMC가 약 3000 내지 3600 라드(rad) 범위의 감마선으로 조사되어 세포 분열이 방지된다. 일부 측면에서, 배양보조 세포가 T 세포 집단에 첨가하기 전에 배양 배지에 첨가된다.
- [0985] 일부 구현예에서, 자극 조건은 인간 T 림프구의 성장에 적합한 온도, 예를 들어, 약 25 °C 이상, 일반적으로 약 30 °C 이상 및 일반적으로 (약) 37 °C를 포함한다. 선택적으로, 인큐베이션은 배양보조 세포로서 비분열 EBV 형질 전환된 림프모구 세포(LCL)를 첨가하는 것을 더 포함할 수 있다. LCL은 약 6000 내지 10,000 라드 범위의 감마선으로 조사될 수 있다. 일부 측면에서, LCL 배양보조 세포가 임의의 적합한 양, 예컨대 약 10:1 이상의 LCL 배양보조 세포 대 초기 T 림프구의 비율로 제공된다.
- [0986] 구현예에서, 항원 특이적 T 세포, 예컨대 항원 특이적 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포가 항원으로 나이브 또는 항원 특이적 T 림프구를 자극함으로써 획득된다. 예를 들어, 항원 특이적 T 세포주 또는 클론이, 감염된 대상체에서 T 세포를 단리하고 동일한 항원으로 시험관 내에서 세포를 자극함으로써 사이토메갈로바이러스 항원에 대해 생성될 수 있다.
- [0987] 유전자 조작 구성 요소, 예를 들어, 유전자 파괴를 유도하는 제제 및/또는 재조합 수용체, 예를 들어, CAR 또는 TCR을 암호화하는 핵산의 도입을 위한 다양한 방법이 공지되어 있고 제공된 방법 및 조성물과 함께 사용될 수 있다. 예시적인 방법은, 바이러스 벡터, 예를 들어 레트로바이러스 또는 렌티바이러스, 비-바이러스 벡터 또는 트랜스포존, 예를 들어 슬리핑 뷰티(*Sleeping Beauty*) 트랜스포존 시스템을 통한 것을 포함하여 폴리펩티드 또는 수용체를 암호화하는 핵산 전달을 위한 방법을 포함한다. 유전자 전달 방법은 형질 도입, 전기 천공 또는 세포 내로 유전자 전달을 초래하는 다른 방법 또는 여기 섹션 I.A에 기재된 임의의 전달 방법을 포함할 수 있다. 재조합 생성물을 암호화하는 핵산 전달을 위한 다른 접근법 및 벡터에는, 예를 들어, 문헌[국제 출원 WO2014055668 및 미국 특허 번호 제7,446,190호]에 기재된 것이 있다.
- [0988] 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 전기 천공을 통해 T 세포 내로 전달된다(예를 들어, 문헌[Chicaybam et al. (2013) *PLoS ONE* 8(3): e60298 및 Van Tedeloo et al. (2000) *Gene Therapy* 7(16): 1431-1437] 참조). 일부 구현예에서, 재조합 핵산이 전위를 통해 T 세포 내로 전달된다(예를 들어, 문헌[Manuri et al. (2010) *Hum Gene Ther* 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) *Molec Ther Nucl Acids* 2, e74; 및 Huang et al. (2009) *Methods Mol Biol* 506: 115-126] 참조). 면역 세포에서 유전 물질을 도입하고 발현시키는 다른 방법은, 인산칼슘 형질 감염(예컨대, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.]에 기재됨), 원형질체 융합, 양이온 리포좀 매개 형질 감염; 텅스텐 입자 촉진 미세 입자 충격(Johnston, *Nature*, 346: 776-777 (1990)); 및 인산 스트론티 DNA 공침전(Brash et al., *Mol. Cell Biol.*, 7: 2031-2034 (1987))을 포함한다.

- [0989] 일부 구현예에서, 유전자 전달이, 예를 들어 사이토카인 또는 활성화 마커의 발현에 의해 측정된 바와 같이, 예컨대 증식, 생존 및/또는 활성화와 같은 반응을 유도하는 자극과 이를 조합함으로써 세포를 먼저 자극한 뒤 활성화된 세포의 형질 도입 및 임상 적용에 충분한 수로 배양에서 증폭함으로써 달성된다.
- [0990] 일부 상황에서, 자극 인자(예를 들어, 림포카인 또는 사이토카인)의 과발현이 대상체에서 독성과 관련된 인자와 같은 대상체에서 원하지 않는 결과 또는 보다 낮은 효능을 잠재적으로 초래할 수 있는 가능성으로부터 보호하는 것이 바람직할 수 있다. 따라서, 일부 상황에서, 조작된 세포는, 예컨대 입양 면역 요법으로 투여 시 *생체 내*에서 세포를 음성 선택에 취약하게 하는 유전자 세그먼트를 포함한다. 예를 들어, 일부 측면에서, 세포가 조작되어 이들이 투여되는 환자의 *생체 내* 조건의 변화의 결과로 제거될 수 있다. 음성 선택 가능한 표현형이, 투여된 제제, 예를 들어 화합물에 대한 민감성을 부여하는 유전자의 삽입으로부터 초래될 수 있다. 음성 선택 가능한 유전자는, 간시클로비르(ganciclovir) 민감성을 부여하는 헤르페스 심플렉스 바이러스 유형 I 티미딘 키나제(HSV-I TK) 유전자(Wigler et al., Cell 11:223, 1977); 세포의 하이포잔틴 포스포리보실트랜스퍼라제(hypoxanthine phosphoribosyltransferase, HPRT) 유전자, 세포의 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제(adenine phosphoribosyltransferase, APRT) 유전자, 세균의 시토신 디아미나제(Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992))를 포함한다.
- [0991] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어, T 세포가 증폭 중 또는 후에 조작될 수 있다. 원하는 폴리펩티드 또는 수용체의 유전자 도입을 위한 상기 조작이, 예를 들어 임의의 적합한 레트로바이러스 벡터로 수행될 수 있다. 이어서 유전자 변형된 세포 집단이 초기 자극(예를 들어, CD3/CD28 자극)에서 벗어날 수 있으며, 후속적으로 (예를 들어, 새로이 도입된 수용체를 통해) 제2 유형의 자극으로 자극될 수 있다. 상기 제2 유형의 자극은, 펩티드/MHC 분자, 유전자 도입된 수용체의 같은 기원 (교차 결합) 리간드(예를 들어, CAR의 천연 리간드) 또는 (예를 들어 수용체 내의 불변 영역을 인지함으로써) 새로운 수용체의 프레임워크 내에서 직접 결합하는 임의의 리간드(예컨대 항체) 형태의 항원 자극을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Cheadle et al., “Chimeric antigen receptors for T-cell based therapy” Methods Mol Biol. 2012; 907:645-66 또는 Barrett et al., Chimeric Antigen Receptor Therapy for Cancer Annual Review of Medicine Vol. 65: 333-347 (2014)]을 참조한다.
- [0992] 추가 핵산, 예를 들어 도입을 위한 유전자 중에, 예컨대 전달된 세포의 생존 능력 및/또는 기능을 촉진함으로써 요법의 효능을 개선하는 유전자; 세포의 선택 및/또는 평가, 예컨대 *생체 내*에서 생존 또는 국소화를 평가하기 위한 유전자 마커를 제공하는 유전자; 문헌[Lupton S. D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991); 및 Riddell et al., Human Gene Therapy 3:319-338 (1992)]에 기재된 바와 같이 예를 들어, *생체 내*에서 음성 선택에 세포를 취약하게 함으로써 안정성을 개선하는 유전자;가 있고; 우성 양성 선택 가능한 마커의 음성 선택 가능한 마커와의 융합에서 유래된 이중 기능의 선택 가능한 융합 유전자의 용도를 기재한 문헌[국제 출원 공보 PCT/US91/08442 및 PCT/US94/05601 by Lupton et al.]을 또한 참조한다. 예를 들어, 문헌[Riddell et al., 미국 특허 번호 6,040,177의 14-17 열]을 참조한다.
- [0993] 일부 구현예에서, 여기에 기재된 바와 같이, 세포가 유전자 조작과 관련하여 또는 그 전에 인큐베이션 및/또는 배양된다. 인큐베이션 단계는 배양, 양성, 자극, 활성화, 번식 및/또는 보존을 위한 동결, 예를 들어, 동결 보존을 포함할 수 있다.
- [0994] **D. 재조합 수용체를 발현하는 세포 조성물**
- [0995] 복수의 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단, 상기 세포를 함유하고/거나 상기 세포로 농축된 조성물이 또한 제공된다. 일부 측면에서, 제공된 조작된 세포 및/또는 조작된 세포 조성물이, 예를 들어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함하는 변형된 *TGFB2* 유전자 좌를 포함하는 여기 기재된 임의의 것을 포함하고/거나 여기 기재된 방법에 의해 생성된다. 일부 측면에서, 복수의 조작된 세포 또는 조작된 세포 집단이 여기, 예를 들어 여기 섹션 III.C에 기재된 임의의 조작된 세포를 함유한다. 일부 측면에서, 제공된 세포 및 세포 조성물이 여기 기재된 임의의 방법을 사용하여, 예를 들어 여기 섹션 I.A에 기재된 바와 같이 예를 들어, 유전자 파괴를 도입하기 위한 제제(들) 또는 방법을 사용하여 및/또는 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 여기, 예를 들어 섹션 I.B.2에 기재된 폴리뉴클레오티드, 예컨대 주형 폴리뉴클레오티드를 사용하여 조작될 수 있다. 일부 측면에서, 여기 제공된 상기 세포 집단 및/또는 조성물은, 예를 들어 여기 섹션 V에 기재된 바와 같은 약학 조성물 또는 치료적 용도 또는 방법을 위한 조성물이거나 이에 포함된다.
- [0996] 일부 구현예에서, 조작된 세포를 함유하는 제공된 세포 집단 및/또는 조성물은, 다른 방법을 사용하여 생성된 세포 집단 및/또는 조성물의 발현 및/또는 항원 결합과 비교하여, 재조합 수용체에 의한 보다 개선된, 일정한, 균질한 및/또는 안정적인 발현 및/또는 항원 결합을 나타내는, 예를 들어 변이 계수의 감소를 나타내는 세포 집

단을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집단 및/또는 조성물은, 다른 방법, 예를 들어 재조합 수용체를 암호화하는 서열의 무작위 통합을 사용하여 생성된 각 집단에 비해, 재조합 수용체의 발현 및/또는 재조합 수용체에 의한 항원 결합이 적어도 100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20% 또는 10% 더 작은 변이 계수를 나타낸다. 변이 계수는, 각각의 세포 집단 내 각각의 관심 핵산 발현의 평균으로 나누어진, 세포, 예를 들어 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포 집단 내의 관심 핵산(예를 들어, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열) 발현의 표준 편차로 정의된다. 일부 구현예에서, 세포 집단 및/또는 조성물이, 여기 제공된 방법을 사용하여 조작된 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포 집단 중에서 측정될 때 0.70, 0.65, 0.60, 0.55, 0.50, 0.45, 0.40, 0.35 또는 0.30 이하보다 더 작은 변이 계수를 나타낸다.

[0997] 일부 구현예에서, 조작된 세포를 함유하는 제공된 세포 집단 및/또는 조성물이, 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자의 최소 또는 감소된 무작위 통합을 나타내는 세포 집단을 포함한다. 일부 측면에서, 세포의 계층 내로 전이 유전자의 무작위 통합이, 계층 내 원하지 않는 위치 내로 전이 유전자의 통합, 예를 들어 필수 유전자 또는 세포의 활성 조절에 중요한 유전자 내로 전이 유전자의 통합으로 인해 부작용 또는 세포 사멸 및/또는 수용체의 조절되지 않거나 제어되지 않은 발현을 초래할 수 있다. 일부 측면에서, 전이 유전자의 무작위 통합이, 다른 방법을 사용하여 생성된 세포 집단에 비해 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 또는 이를 초과하여 감소된다.

[0998] 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 발현하는 복수의 조작된 면역 세포를 포함하는 세포 집단 및/또는 조성물이 제공되고, 여기서 재조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열이, 상동성 지시 수선(HDR)을 통해, 예를 들어 *TGFBR2* 유전자 좌에 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자의 통합에 의해 *TGFBR2* 유전자 좌에 존재한다. 일부 구현예에서, *TGFBR2* 유전자 좌에 유전자 파괴를 함유하는 조성물 내 세포 및/또는 조성물 내 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 90% 이상 또는 이를 초과하는 세포가, *TGFBR2* 유전자 좌에 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자의 통합을 포함한다.

[0999] 일부 구현예에서, 예컨대 재조합 수용체를 발현하는 세포가, 조성물 내 총 세포 또는 특정 유형의 세포, 예컨대 T 세포 또는 CD8+ 또는 CD4+ 세포 중 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상을 구성하는 세포를 함유하는 조성물이 제공된다. 일부 구현예에서, 예컨대 재조합 수용체를 발현하는 세포가, *TGFBR2* 유전자 좌에 유전자 파괴를 함유하는 조성물 내 총 세포 중 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상을 구성하는 세포를 함유하는 조성물이 제공된다.

[1000] **IV. 치료 방법**

[1001] 예를 들어, 임의의 조작된 세포 또는 여기 기재된 조작된 세포, 예를 들어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자를 포함하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 포함하는 조작된 세포를 함유하는 조성물을 투여하는 것을 포함하는 치료 방법이 여기에 제공된다. 일부 측면에서, 임의의 조작된 세포 또는 여기 기재된 조작된 세포를 함유하는 조성물을 대상체, 예컨대 질병 또는 장애가 있는 대상체에 투여하는 방법이 또한 제공된다. 여기 기재된 재조합 수용체, 예컨대 키메라 항원 수용체(CAR) 또는 T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 조작된 세포 또는 동일한 것을 포함하는 조성물이 다양한 치료, 진단 및 예방적 징후에 유용하다. 예를 들어, 조작된 세포 또는 조작된 세포를 포함하는 조성물이 대상체의 다양한 질병 및 장애를 치료하는 데 유용하다. 상기 방법 및 용도는, 예를 들어, 조작된 세포 또는 동일한 것을 함유하는 조성물을 중앙 또는 암과 같은 질병, 병태 또는 장애를 앓는 대상체에 투여하는 것을 수반한 치료 방법 및 용도를 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포 또는 동일한 것을 포함하는 조성물이 질병 또는 장애의 치료를 초래하도록 유효량으로 투여한다. 용도는 상기 방법 및 치료에서 및 상기 치료 방법을 수행하기 위한 약제의 제조에서 조작된 세포 또는 조성물의 용도를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 조작된 세포 또는 동일한 것을 포함하는 조성물을 질병 또는 병태를 앓거나 앓는 것으로 의심되는 대상체에 투여함으로써 수행된다. 일부 구현예에서, 방법이 이로써 대상체의 질병 또는 병태 또는 장애를 치료한다. 대상체, 예를 들어 환자에게 세포 및 조성물을 투여하기 위한 치료 방법이 또한 제공된다.

[1002] 입양 세포 요법을 위한 세포를 투여하는 방법이 공지되어 있으며, 제공된 방법 및 조성물과 관련하여 이용될 수 있다. 예를 들어, 입양 T 세포 요법 방법이, 예를 들어 문헌[미국 특허 출원 공개 번호 2003/0170238(Gruenberg et al); 미국 특허 번호 4,690,915(Rosenberg); Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)]에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌[Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338]을 참조한다.

- [1003] 치료되는 질병 또는 병태는, 항원의 발현이 질병, 병태 또는 장애와 관련되고/거나 이의 병인과 관련되는 예를 들어, 이를 야기, 악화 또는 그렇지 않으면 상기 질병, 병태 또는 장애에 수반되는 임의의 것일 수 있다. 예시적인 질병 및 병태는 악성 종양 또는 세포의 형질 전환(예를 들어, 암)과 관련된 질병 또는 병태, 자가 면역 또는 염증성 질병 또는 예를 들어, 세균, 바이러스 또는 기타 병원체로 인한 감염성 질병을 포함할 수 있다. 치료될 수 있는 다양한 질병 및 병태와 관련된 항원을 포함하는 예시적인 항원이 여기에 기재된다. 특정 구현예에서, 키메라 항원 수용체 또는 전이 유전자 TCR이 질병 또는 병태와 관련된 항원에 특이적으로 결합한다.
- [1004] 질병, 병태 및 장애 중에 고형 종양, 혈액암 및 흑색종을 포함한 종양이 있고, 국소화 및 전이성 종양, 감염성 질병, 예컨대 바이러스 또는 기타 병원체, 예를 들어 HIV, HCV, HBV, CMV, HPV로의 감염 및 기생충 질병 및 자가 면역 질병 및 염증성 질병을 포함한다. 일부 구현예에서, 질병, 장애 또는 병태는 종양, 암, 악성 종양, 신 생물 또는 기타 증식성 질병 또는 장애이다. 상기 질병은, 백혈병, 림프종, 예를 들어, 급성 골수성(또는 골수형성) 백혈병(acute myeloid (or myelogenous) leukemia, AML), 만성 골수성(또는 골수형성) 백혈병(chronic myeloid (or myelogenous) leukemia, CML), 급성 림프구성(또는 림프아구성) 백혈병(acute lymphocytic (or lymphoblastic) leukemia, ALL), 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 털세포 백혈병(hairy cell leukemia, HCL), 작은 림프구성 림프종(small lymphocytic lymphoma, SLL), 맨틀 세포 림프종(Mantle cell lymphoma, MCL), 변연부 림프종, 버키트 림프종, 호지킨 림프종(Hodgkin lymphoma, HL), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin lymphoma, NHL), 역형성 거대 세포 림프종(Anaplastic large cell lymphoma, ALCL), 여포성 림프종, 난치성 여포성 림프종, 미만성 거대 B 세포 림프종(diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL) 및 다발성 골수종(multiple myeloma, MM)을 포함하나 이에 국한되지 않는다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는, 급성 림프아구성 백혈병(ALL), 성인 ALL, 만성 림프아구성 백혈병(CLL), 비호지킨 림프종(NHL) 및 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL) 중에서 선택된 B 세포 악성 종양이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 NHL이고 NHL은, 공격적인 NHL, 미만성 거대 B 세포 림프종(DLBCL), NOS(새로 및 비활동성으로부터 형질 전환), 1차 종격동 거대 B 세포 림프종(primary mediastinal large B cell lymphoma, PMBCL), T 세포/조직세포 풍부 거대 B 세포 림프종(T cell/histocyte-rich large B cell lymphoma, TCHRBCL), 버키트 림프종, 맨틀 세포 림프종(MCL) 및/또는 여포성 림프종(FL), 선택적으로, 여포성 림프종 3B 등급(follicular lymphoma Grade 3B, FL3B)으로 구성된 군에서 선택된다.
- [1005] 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는 다발성 골수종(MM)이다. 일부 구현예에서, 제공된 세포, 예를 들어 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 갖는 조작된 세포의 투여가 대상체의 MM과 같은 질병 또는 병태의 치료 및/또는 개선을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 B 세포 성숙 항원(BCMA)과 같은 종양 관련 항원의 발현과 관련된 MM을 앓거나 앓을 것으로 의심된다.
- [1006] 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는 만성 림프구성 백혈병(CLL)이다. 일부 구현예에서, 제공된 세포, 예를 들어 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 갖는 조작된 세포의 투여가 대상체의 CLL과 같은 질병 또는 병태의 치료 및/또는 개선을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1)과 같은 종양 관련 항원의 발현과 관련된 CLL을 앓거나 앓을 것으로 의심된다.
- [1007] 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는 고형 종양 또는 비혈액학적 종양과 관련된 암이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는 고형 종양 또는 고형 종양과 관련된 암이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는, 췌장암, 방광암, 대장암, 유방암, 전립선암, 신장암, 간세포 암, 폐암, 난소암, 자궁 경부암, 췌장암, 직장암, 갑상선암, 자궁암, 위암, 식도암, 두경부암, 흑색종, 신경 내분비 암, CNS 암, 뇌 종양, 뼈암 또는 연조직 육종이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는, 방광, 폐, 뇌, 흑색종(예를 들어, 소-세포 폐, 흑색종), 유방, 자궁 경부, 난소, 대장, 췌장, 자궁 내막, 식도, 신장, 간, 전립선, 피부, 갑상선 또는 자궁암이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는, 췌장암, 방광암, 대장암, 유방암, 전립선암, 신장암, 간세포 암, 폐암, 난소암, 자궁 경부암, 췌장암, 직장암, 갑상선암, 자궁암, 위암, 식도암, 두경부암, 흑색종, 신경 내분비 암, CNS 암, 뇌 종양, 뼈암 또는 연조직 육종이다.
- [1008] 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는 비-소세포 폐암(NSCLC)이다. 일부 구현예에서, 제공된 세포, 예를 들어 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 갖는 조작된 세포의 투여가 대상체의 NSCLC와 같은 질병 또는 병태의 치료 및/또는 개선을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1)과 같은 종양 관련 항원의 발현과 관련된 NSCLC를 앓거나 앓을 것으로 의심된다.
- [1009] 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는 두경부 편평상피 세포 암종(HNSCC)이다. 일부 구현예에서, 제공된 세포, 예

를 들어 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 갖는 조작된 세포의 투여가 대상체의 HNSCC와 같은 질병 또는 병태의 치료 및/또는 개선을 초래할 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 인간 유두종 바이러스(HPV) 16 E6 또는 E7과 같은 종양 관련 항원의 발현과 관련된 HNSCC를 앓거나 앓을 것으로 의심된다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는, 예컨대 바이러스, 레트로바이러스, 세균 및 원생 동물 감염, 면역 결핍, 사이토메갈로바이러스(CMV), 엡스타인-바 바이러스(EBV), 아데노바이러스, BK 폴리오마바이러스로 국한되지 않는 감염성 질병 또는 병태이다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는, 자가 면역 또는 염증성 질병 또는 병태, 예컨대 관절염, 예를 들어 류머티스성 관절염(rheumatoid arthritis, RA), I 형 당뇨병, 전신 홍반성 루푸스(systemic lupus erythematosus, SLE), 염증성 장 질환, 건선, 피부 경화증, 자가 면역 갑상선 질환, 그레이브병(Grave's disease), 크론병(Crohn's disease), 다발성 경화증, 천식 및/또는 이식과 관련된 질병 또는 병태이다.

[1010] 일부 구현예에서, 질병 또는 장애와 관련된 항원은,  $\alpha\text{v}\beta 6$  인테그린, B 세포 성숙 항원(BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 탈수 효소 9(CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로 공지), 암 고환 항원, 암/고환 항원 1B(CTAG, 또한 NY-ESO-1 및 LAGE-2로 공지), 암배아 항원(CEA), 사이클린, 사이클린 A2, C-C 모티프 케모카인 리간드 1(CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸 4(CSPG4), 표피 성장 인자 단백질(EGFR), 유형 III 표피 성장 인자 수용체 돌연변이(EGFR vIII), 표피 당단백질 2(EPG-2), 표피 당단백질 40(EPG-40), 에프린B2, 에프린 수용체 A2(EpHa2), 에스트로겐 수용체, Fc 수용체 유사 5(FCRL5; Fc 수용체 상동물 5 또는 FCRH5로도 공지), 태아 아세틸콜린 수용체(태아 AchR), 엽산 결합 단백질(FBP), 엽산 수용체 알파, 강글리오사이드 GD2, 0-아세틸화 GD2(OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백질 100(gp100), 글리피칸-3(GPC3), G 단백질 결합 수용체 C 클래스 5 그룹 D 멤버(GPRC5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나제 erb-B2), Her3(erb-B3), Her4(erb-B4), erbB 2량체, 인간 고분자량 흑색종 관련 항원(HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1(HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22R  $\alpha$ ), IL-13 수용체 알파 2(IL-13R  $\alpha 2$ ), 키나제 삽입 도메인 수용체(kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자(L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 패밀리 8 A 멤버를 함유하는 루신 리치 반복(LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종 관련 항원(MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, 메소텔린(MSLN), c-Met, 뮤린 시토메갈로 바이러스(CMV), 뮤신 1(MUC1), MUC16, 천연 킬러 2 그룹 D 멤버(NKG2D) 리간드, 멜란 A (MART-1), 신경 세포 부착 분자(NCAM), 종양태아성 항원, 흑색종 우선 발현 항원(PRAME), 프로게스트론 수용체, 전립선 특이적 항원, 전립선 줄기 세포 항원(PSCA), 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1), 서바이빈(survivin), 영양막 당단백질(TPBG, 또한 5T4로 공지), 종양 관련 당단백질 72(TAG72), 티로시나제 관련 단백질 1(TRP1, 또한 TYRP1 또는 gp75로 공지), 티로시나제 관련 단백질 2(TRP2, 또한 도파크롬 타우도메라제, 도파크롬 델타 이성화 효소 또는 DCT로 공지), 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 빌름스 종양 1(WT-1), 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원 또는 범용 태그 관련 항원 및/또는 비오티닐화 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체에 의해 발현된 분자이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화된 항원은 다수의 공지된 임의의 B 세포 마커와 같은 B 세포 악성 종양과 관련된 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig카파, Ig람다, CD79a, CD79b 또는 CD30이거나 이를 포함한다.

[1011] 일부 구현예에서, 항원은 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원이거나 이를 포함한다. 일부 구현예에서, 항원은 바이러스 항원(예컨대 HIV, HCV, HBV 등 유래 바이러스 항원), 세균 항원 및/또는 기생충 항원이다.

[1012] 일부 측면에서, CAR과 같은 재조합 수용체는, B 세포 악성 종양과 관련된 병변 환경의 세포에서 발현되거나 질병 또는 병태와 관련된 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화된 항원은 다수의 공지된 임의의 B 세포 마커와 같은 B 세포 악성 종양과 관련된 항원을 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화된 항원은 CD20, CD19, CD22, ROR1, CD45, CD21, CD5, CD33, Ig카파, Ig람다, CD79a, CD79b 또는 CD30 또는 이의 조합물이다.

[1013] 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 다발성 골수종과 같은 골수종이다. 일부 측면에서, CAR과 같은 재조합 수용체는, 다발성 골수종과 관련된 병변 환경의 세포에서 발현되거나 질병 또는 병태와 관련된 항원에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화된 항원은 다발성 골수종과 관련된 항원을 포함한다. 일부 측면에서, 항원, 예를 들어 질병 특이적 항원 및/또는 관련 항원과 같은 제2 또는 추가 항원이, 다발성 골수종, 예컨대 B 세포 성숙 항원(BCMA), G 단백질 결합 수용체 C 클래스 5 그룹 D 멤버(GPRC5D), CD38(환형 ADP 리보오스 가수 분해 효소), CD138(신데칸-1, 신데칸, SYN-1), CS-1(CS1, CD2 하위 세트 1, CRACC, SLAMF7, CD319 및 19A24), BAFF-R, TACI 및/또는 FcRH5 상에 발현된다. 다른 예시적인 다발성 골수종 항원은 CD56, TIM-3, CD33, CD123, CD44, CD20, CD40, CD74, CD200, EGFR,  $\beta 2$ -마이크로글로불린, HM1.24, IGF-1R, IL-6R, TRAIL-

R1 및 액티빈(activin) 수용체 IIA형(ActRIIA)을 포함한다. 문헌[Benson and Byrd, J. Clin. Oncol. (2012) 30(16): 2013-15; Tao and Anderson, Bone Marrow Research (2011):924058; Chu et al., Leukemia (2013) 28(4):917-27; Garfall et al., Discov Med. (2014) 17(91):37-46]을 참조한다. 일부 구현예에서, 항원은 림프성 종양, 골수종, AIDS 관련 림프종 및/또는 이식 후 림프구 증식, 예컨대 CD38 상에 존재하는 것을 포함한다. 상기 항원에 대해 지시된 항체 또는 항원 결합 단편이 공지되어 있고, 예를 들어 문헌[미국 특허 번호 8,153,765; 8,603,477, 8,008,450; 미국 특허 공개 번호 US20120189622 또는 US20100260748; 및/또는 국제 PCT 공개 번호 W02006099875, W02009080829 또는 W02012092612 또는 W02014210064]에 기재된 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예를 들어 scFv)이, 다중 특이적 항체, 다중 특이적 키메라 수용체, 예컨대 다중 특이적 CAR 및/또는 다중 특이적 세포에 함유되어 있다.

[1014] 일부 구현예에서, 질병 또는 장애가, G 단백질 결합 수용체 C 클래스 5 그룹 D 멤버(GPRC5D)의 발현 및/또는 B 세포 성숙 항원(BCMA)의 발현과 관련된다.

[1015] 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는 B 세포 관련 장애이다. 제공된 방법의 임의의 제공된 구현예 중 일부에서, BCMA와 관련된 질병 또는 장애는 자가 면역 질병 또는 장애이다. 제공된 방법의 임의의 제공된 구현예 중 일부에서, 자가 면역 질병 또는 장애는, 전신성 홍반성 루푸스(SLE), 루푸스 신염, 염증성 장 질환, 류마티스 관절염, ANCA 관련 혈관염, 특발성 혈소판 감소증 자반병(idiopathic thrombocytopenia purpura, ITP), 혈전성 혈소판 감소증 자반병(thrombotic thrombocytopenia purpura, TTP), 자가 면역성 혈소판 감소증, 차가스 병(Chagas' disease) 그레이브스 병(Grave's disease), 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis), 결절성 다발 동맥염, 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 심상성 천포창, 피부 경화증, 다발성 경화증, 건선, IgA 신증, IgM 다발성 신경병, 혈관염, 진성 당뇨병, 레이노 증후군(Reynaud's syndrome), 항인지질 증후군, 굿파스처 병(Goodpasture's disease), 가와사키 병(Kawasaki disease), 자가 면역 용혈성 빈혈, 중증 근무력증 또는 진행성 사구체 신염이다.

[1016] 일부 구현예에서, 질병 또는 장애는 암이다. 일부 구현예에서, 암은 GPRC5D 발현 암이다. 일부 구현예에서, 암은 혈장 세포 악성 종양이고, 혈장 세포 악성 종양은 다발성 골수종(MM) 또는 형질 세포종이다. 일부 구현예에서, 암은 다발성 골수종(MM)이다. 일부 구현예에서, 암은 재발성/난치성 다발성 골수종이다.

[1017] 일부 구현예에서, 항원은 바이러스, 예컨대 인간 유두종 바이러스(HPV)와 연관되고, 질병 또는 장애는 암, 예컨대 HNSCC이다. 일부 구현예에서, 항원은 ROR1이고, 질병 또는 장애는 CLL이다. 일부 구현예에서, 항원은 ROR1이고, 질병 또는 장애는 NSCLC이다.

[1018] 일부 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편(예를 들어, scFv 또는 V<sub>H</sub> 도메인)이 CD19, BCMA, GPRC5D 또는 ROR1와 같은 항원을 특이적으로 인식한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 항원 결합 단편이 CD19, BCMA, GPRC5D 또는 ROR1에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항원 결합 단편에서 유래하거나 이의 변이체이다.

[1019] 일부 구현예에서, 세포 요법, 예를 들어, 입양 T 세포 요법은 자가 조직 전달에 의해 수행되며, 여기서 상기 세포는 세포 요법을 받을 대상체 또는 상기 대상체에서 유래된 샘플로부터 단리되고/거나 그렇지 않으면 제조된다. 따라서, 일부 측면에서, 세포는 치료가 필요한 대상체, 예를 들어 환자에서 유래되고, 단리 및 프로세싱 후에 세포가 동일한 대상체에 투여된다.

[1020] 일부 구현예에서, 세포 요법, 예를 들어, 입양 T 세포 요법은 동종 이계 전달에 의해 수행되며, 여기서 상기 세포는 세포 요법을 받을 예정이거나 최종적으로 받은 대상체, 예를 들어 제1 대상체가 아닌 대상체로부터 단리되고/거나 그렇지 않으면 제조된다. 상기 구현예에서, 이어서 세포가 동일한 종의 상이한 대상체, 예를 들어, 제2 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 대상체가 유전적으로 동일하다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 대상체가 유전적으로 유사하다. 일부 구현예에서, 제2 대상체가 제1 대상체와 동일한 HLA 클래스 또는 수퍼타입(supertype)을 발현한다.

[1021] 세포가, 임의의 적합한 수단, 예를 들어 볼루스 주입, 주사, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사, 안구내 주사, 안구주위 주사, 망막하 주사, 유리체내 주사, 중격경유성 주사, 공막하 주사, 맥락막내 주사, 전방내 주사, 결막하 주사(subconjunctival injection, subconjunctival injection), 서브 테논(sub-Tenon) 주사, 안구뒤 주사, 안구주위 주사 또는 후부 점막 주사 전달에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기는 비경구, 폐내 및 비강내 및 국소 치료가 바람직한 경우 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 주어진 용량은 세포의 단일 볼루스 투여에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 상기는 예를 들어, 3 일 이내의 기간에 걸쳐 세포의 다중 볼루스 투여에 의해, 또는 세포의

지속적인 주입 투여에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 세포 용량 또는 임의의 추가 요법, 예를 들어 림프구 고갈 요법, 중재 요법 및/또는 병용 요법의 투여가 외래 환자 전달을 통해 수행된다.

- [1022] 질병의 예방 또는 치료를 위해, 적절한 투여량이, 치료될 질병의 유형, 세포 또는 재조합 수용체의 유형, 질병의 중증도 및 진행 과정, 세포가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 이전 요법, 대상체의 임상 이력 및 세포에 대한 반응 및 주치의의 판단에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물 및 세포가 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 대상체에 적합하게 투여된다.
- [1023] 일부 구현예에서, 세포가 또 다른 치료적 개입, 예컨대 항체 또는 조작된 세포 또는 수용체 또는 제제, 예컨대 세포 독성제 또는 치료제와 예컨대 동시에 또는 순차적으로, 어떠한 순서로든 조합 치료의 일부로 투여된다. 일부 구현예에서, 세포가 하나 이상의 추가 치료제와 함께 공투여되거나 또는 또 다른 치료적 개입과 관련하여 동시 또는 순차적으로 어떠한 순서로든 공투여된다. 일부 상황에서, 세포가 시간에 있어 충분히 가깝게 또 다른 요법과 공투여되어 세포 집단이 하나 이상의 추가 치료제의 효과를 향상시키거나 반대로 마찬가지로이다. 일부 구현예에서, 세포가 하나 이상의 추가 치료제보다 앞서 투여된다. 일부 구현예에서, 세포가 하나 이상의 추가 치료제 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 제제가 IL-2와 같은 사이토카인을 포함하여 예를 들어, 지속성을 향상시킨다. 일부 구현예에서, 방법은 화학요법제의 투여를 포함한다.
- [1024] 일부 구현예에서, 방법은 예를 들어, 화학요법제를 조절하는 화학요법제의 투여를 포함하여 예를 들어, 투여 전에 종양 부담을 감소시킨다.
- [1025] 일부 측면에서, 면역 고갈(예를 들어, 림프구 고갈) 요법으로 대상체를 사전 조절하는 것은 입양 세포 요법(adoptive cell therapy, ACT)의 효과를 개선할 수 있다.
- [1026] 따라서, 일부 구현예에서, 방법은 세포 요법의 개시 전에 대상체에 사이클로포스파미드, 플루다라빈, 또는 이의 조합물과 같은 림프구 고갈 또는 화학요법제와 같은 사전 조절제를 투여하는 것을 포함한다. 예를 들어, 세포 요법의 개시 2 일 이상 전, 예컨대 3, 4, 5, 6 또는 7 일 이상 전에 사전 조절제가 대상체에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 요법의 개시 7 일 이내 전, 예컨대 6, 5, 4, 3 또는 2 일 이내 전에 사전 조절제가 대상체에 투여된다.
- [1027] 일부 구현예에서, 대상체가, (약) 20 mg/kg 내지 100 mg/kg, 예컨대 (약) 40 mg/kg 내지 80 mg/kg의 용량의 사이클로포스파미드로 사전 조절된다. 일부 측면에서, 대상체가 (약) 60 mg/kg의 사이클로포스파미드로 사전 조절된다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파미드가 단일 용량으로 투여될 수 있거나, 예컨대 매일, 격일 또는 3 일마다 주어진 복수의 용량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파미드가 1 일 또는 2 일 동안 매일 1회 투여된다. 일부 구현예에서, 림프구 고갈제가 사이클로포스파미드를 포함하는 경우, (약) 100 mg/m<sup>2</sup> 내지 500 mg/m<sup>2</sup>, 예컨대 (약) 200 mg/m<sup>2</sup> 내지 400 mg/m<sup>2</sup> 또는 250 mg/m<sup>2</sup> 내지 350 mg/m<sup>2</sup>(수치 포함)의 용량으로 사이클로포스파미드가 대상체에 투여된다. 일부 경우에, 약 300 mg/m<sup>2</sup>의 사이클로포스파미드가 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파미드가 단일 용량으로 투여될 수 있거나, 예컨대 매일, 격일 또는 3 일마다 주어진 복수의 용량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 사이클로포스파미드가 예컨대 1-5 일 동안, 예를 들어 3 내지 5 일 동안 매일 투여된다. 일부 경우에, 세포 요법의 개시 전 3 일 동안 매일 약 300 mg/m<sup>2</sup>의 사이클로포스파미드가 대상체에 투여된다.
- [1028] 일부 구현예에서, 림프구 고갈제가 플루다라빈을 포함하는 경우, (약) 1 mg/m<sup>2</sup> 내지 100 mg/m<sup>2</sup>, 예컨대 (약) 10 mg/m<sup>2</sup> 내지 75 mg/m<sup>2</sup>, 15 mg/m<sup>2</sup> 내지 50 mg/m<sup>2</sup>, 20 mg/m<sup>2</sup> 내지 40 mg/m<sup>2</sup> 또는 24 mg/m<sup>2</sup> 내지 35 mg/m<sup>2</sup>(수치 포함)의 용량으로 플루다라빈이 대상체에 투여된다. 일부 경우에, 약 30 mg/m<sup>2</sup>의 플루다라빈이 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 플루다라빈이 단일 용량으로 투여될 수 있거나, 예컨대 매일, 격일 또는 3 일마다 주어진 복수의 용량으로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 플루다라빈이 예컨대 1-5 일 동안, 예를 들어 3 내지 5 일 동안 매일 투여된다. 일부 경우에, 세포 요법의 개시 전 3 일 동안 매일 약 30 mg/m<sup>2</sup>의 플루다라빈이 대상체에 투여된다.
- [1029] 일부 구현예에서, 림프구 고갈제는 사이클로포스파미드 및 플루다라빈의 조합물과 같은 제제의 조합물을 포함한다. 따라서, 제제의 조합물이 여기 기재된 것과 같은 임의의 용량 또는 투여 스케줄로 사이클로포스파미드 및 여기 기재된 것과 같은 임의의 용량 또는 투여 스케줄로 플루다라빈을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 측면에

서, 제1 또는 후속 용량 전에 60 mg/kg( $\sim 2 \text{ g/m}^2$ )의 사이클로포스파미드 및 3 내지 5 용량의 25 mg/m<sup>2</sup> 플루다라빈이 대상체에 투여된다.

- [1030] 일부 구현예에서, 세포의 투여 후에, 조작된 세포 집단의 생물학적 활성이 예를 들어, 공지된 다수의 임의의 방법에 의해 측정된다. 평가 파라미터는 생체 내에서, 예를 들어 영상화에 의해 또는 생체 외에서, 예를 들어 ELISA 또는 유세포 분석에 의해 항원에 대한 조작된 또는 천연 T 세포 또는 다른 면역 세포의 특이적 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 조작된 세포가 표적 세포를 파괴하는 능력이, 예를 들어 문헌[Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009), 및 Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)]에 기재된 세포 독성 분석과 같은 공지된 임의의 적합한 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 특정 구현예에서, 세포의 생물학적 활성이, 하나 이상의 사이토카인, 예컨대 CD107a, IFN $\gamma$ , IL-2 및 TNF의 발현 및/또는 분비를 분석함으로써 측정된다. 일부 측면에서, 생물학적 활성이 중앙 부담 또는 부하 감소와 같은 임상 결과를 분석함으로써 측정된다.
- [1031] 특정 구현예에서, 조작된 세포가 여러 가지 방법으로 더 변형되어 이들의 치료 또는 예방적 효능이 증가된다. 예를 들어, 집단에 의해 발현된 조작된 CAR이 표적화 모이어티에 링커를 통해 직접적으로든 간접적으로든 접합될 수 있다. 화합물, 예를 들어 CAR을 표적화 모이어티에 접합시키는 실시가 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995) 및 미국 특허 5,087,616]을 참조한다.
- [1032] 일부 구현예에서, 세포가 또 다른 치료적 개입, 예컨대 항체 또는 조작된 세포 또는 수용체 또는 제제, 예컨대 세포 독성제 또는 치료제와 예컨대 동시에 또는 순차적으로, 어떠한 순서로든 조합 치료의 일부로 투여된다. 일부 구현예에서, 세포가 하나 이상의 추가 치료제와 함께 공투여되거나 또는 또 다른 치료적 개입과 관련하여 동시 또는 순차적으로 어떠한 순서로든 공투여된다. 일부 상황에서, 세포가 시간에 있어 충분히 가깝게 또 다른 요법과 공투여되어 세포 집단이 하나 이상의 추가 치료제의 효과를 향상시키거나 반대도 마찬가지이다. 일부 구현예에서, 세포가 하나 이상의 추가 치료제보다 앞서 투여된다. 일부 구현예에서, 세포가 하나 이상의 추가 치료제 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 제제가 IL-2와 같은 사이토카인을 포함하여 예를 들어, 지속성이 향상된다.
- [1033] 일부 구현예에서, 세포의 용량이 제공된 방법 및/또는 제공된 제조 물품 또는 조성물과 부합되게 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 용량의 크기 또는 시기가 대상체의 특정 질병 또는 병태의 함수로 결정된다. 일부 경우에, 제공된 기체의 관점에서 특정 질병에 대한 용량의 크기 또는 시기가 경험적으로 결정될 수 있다.
- [1034] 일부 구현예에서, 세포의 용량이, (약)  $2 \times 10^5$ 의 세포/kg 내지 (약)  $2 \times 10^6$ 의 세포/kg, 예컨대 (약)  $4 \times 10^5$ 의 세포/kg 내지 (약)  $1 \times 10^6$ 의 세포/kg 또는 (약)  $6 \times 10^5$ 의 세포/kg 내지 (약)  $8 \times 10^5$ 의 세포/kg를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 용량이, 대상체의 체중 킬로그램 당  $2 \times 10^5$  개 이내의 세포(세포/kg)(예를 들어, 항원 발현, 예컨대 CAR 발현 세포), 예컨대 (약)  $3 \times 10^5$  개 이내의 세포/kg, (약)  $4 \times 10^5$  개 이내의 세포/kg, (약)  $5 \times 10^5$  개 이내의 세포/kg, (약)  $6 \times 10^5$  개 이내의 세포/kg, (약)  $7 \times 10^5$  개 이내의 세포/kg, (약)  $8 \times 10^5$  개 이내의 세포/kg, (약)  $9 \times 10^5$  개 이내의 세포/kg, (약)  $1 \times 10^6$  개 이내의 세포/kg 또는 (약)  $2 \times 10^6$  개 이내의 세포/kg를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 용량이, 대상체의 체중 킬로그램 당 (약)  $2 \times 10^5$  개 (이상)의 세포(세포/kg)(예를 들어, 항원 발현, 예컨대 CAR 발현 세포), 예컨대 (약)  $3 \times 10^5$  개 (이상)의 세포/kg, (약)  $4 \times 10^5$  개 (이상)의 세포/kg, (약)  $5 \times 10^5$  개 (이상)의 세포/kg, (약)  $6 \times 10^5$  개 (이상)의 세포/kg, (약)  $7 \times 10^5$  개 (이상)의 세포/kg, (약)  $8 \times 10^5$  개 (이상)의 세포/kg, (약)  $9 \times 10^5$  개 (이상)의 세포/kg, (약)  $1 \times 10^6$  개 (이상)의 세포/kg 또는 (약)  $2 \times 10^6$  개 (이상)의 세포/kg를 포함한다.
- [1035] 특정 구현예에서, 세포 또는 세포의 하위 유형의 개별 집단이, (약) 10 만 내지 (약) 1000 억 개의 세포의 범위로 및/또는 대상체의 체중 1kg 당 예를 들어, (약) 10 만 내지 (약) 500 억 개의 세포(예를 들어, (약) 5 백만 개의 세포, (약) 2 천 5 백만 개의 세포, (약) 5 억 개의 세포, (약) 10 억 개의 세포, (약) 50 억 개의 세포, (약) 200 억 개의 세포, (약) 300 억 개의 세포, (약) 400 억 개의 세포 또는 전술한 수치 중 임의의 2 개에 의해 정의된 범위), (약) 1 백만 내지 (약) 500 억 개의 세포(예를 들어, (약) 5 백만 개의 세포, (약) 2 천 5 백만 개의 세포, (약) 5 억 개의 세포, (약) 10 억 개의 세포, (약) 50 억 개의 세포, (약) 200 억 개의 세포, (약) 300 억 개의 세포, (약) 400 억 개의 세포 또는 전술한 수치 중 임의의 2 개에 의해 정의된 범위), 예컨대

(약) 1 천만 내지 (약) 1000 억 개의 세포(예를 들어, (약) 2 천만 개의 세포, (약) 3 천만 개의 세포, (약) 4 천만 개의 세포, (약) 6 천만 개의 세포, (약) 7 천만 개의 세포, (약) 8 천만 개의 세포, (약) 9 천만 개의 세포, (약) 100 억 개의 세포, (약) 250 억 개의 세포, (약) 500 억 개의 세포, (약) 750 억 개의 세포, (약) 900 억 개의 세포 또는 전술한 수치 중 임의의 2 개에 의해 정의된 범위) 및 일부 경우에 (약) 1 억 개의 세포 내지 (약) 500 억 개의 세포(예를 들어, (약) 1 억 2 천만 개의 세포, (약) 2 억 5 천만 개의 세포, (약) 3 억 5 천만 개의 세포, (약) 6 억 5 천만 개의 세포, (약) 8 억 개의 세포, (약) 9 억 개의 세포, (약) 30 억 개의 세포, (약) 300 억 개의 세포, (약) 450 억 개의 세포) 또는 상기 범위 사이의 임의의 수치와 같은 세포의 양으로 및/또는 대상체의 체중 1kg 당 세포의 양으로 대상체에 투여된다. 투여량이 질병 또는 장애 및/또는 환자 및/또는 다른 치료에 대한 개별적인 특성에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 수치는 재조합 수용체 발현 세포의 수를 지칭하고; 다른 구현예에서, 이는 투여된 T 세포 또는 PBMC 또는 총 세포의 수를 지칭한다.

[1036] 일부 구현예에서, 예를 들어, 대상체가 인간인 경우, 용량이, 약  $5 \times 10^8$  개 미만의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR) 발현 세포, T 세포 또는 말초 혈액 단핵세포(PBMC)를, 예를 들어, (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 상기 세포, 예컨대 (약)  $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1.5 \times 10^8$  또는  $5 \times 10^8$  개의 총 상기 세포의 범위 또는 전술한 수치 중 임의의 2 개 사이 범위로 포함한다. 일부 구현예에서, 예를 들어 대상체가 인간인 경우, 용량이, (약)  $1 \times 10^6$  개 이상의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR) 발현 세포, T 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 (약)  $2 \times 10^9$  개 미만의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR) 발현 세포, T 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)를, 예를 들어, (약)  $2.5 \times 10^7$  내지 (약)  $1.2 \times 10^9$  개의 상기 세포, 예컨대 (약)  $2.5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1.5 \times 10^8$ ,  $8 \times 10^8$  또는  $1.2 \times 10^9$  개의 총 상기 세포의 범위 또는 전술한 수치 중 임의의 2 개 사이의 범위로 포함한다.

[1037] 일부 구현예에서, 유전자 조작된 세포의 용량이, (약)  $1 \times 10^5$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 총 CAR 발현(CAR<sup>+</sup>) T 세포, (약)  $1 \times 10^5$  내지 (약)  $2.5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^5$  내지 (약)  $1 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^5$  내지 (약)  $5 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^5$  내지 (약)  $2.5 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^5$  내지 (약)  $1 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^5$  내지 (약)  $5 \times 10^6$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^5$  내지 (약)  $2.5 \times 10^6$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^5$  내지 (약)  $1 \times 10^6$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $2.5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $1 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $5 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $2.5 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $1 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $5 \times 10^6$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $2.5 \times 10^6$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $2.5 \times 10^6$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $2.5 \times 10^6$  내지 (약)  $2.5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $2.5 \times 10^6$  내지 (약)  $1 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $2.5 \times 10^6$  내지 (약)  $5 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $2.5 \times 10^6$  내지 (약)  $2.5 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $2.5 \times 10^6$  내지 (약)  $1 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $2.5 \times 10^6$  내지 (약)  $5 \times 10^6$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $5 \times 10^6$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $5 \times 10^6$  내지 (약)  $2.5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $5 \times 10^6$  내지 (약)  $1 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $5 \times 10^6$  내지 (약)  $5 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $5 \times 10^6$  내지 (약)  $2.5 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $5 \times 10^6$  내지 (약)  $1 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^7$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^7$  내지 (약)  $2.5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^7$  내지 (약)  $1 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^7$  내지 (약)  $5 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^7$  내지 (약)  $2.5 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $2.5 \times 10^7$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $2.5 \times 10^7$  내지 (약)  $2.5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $2.5 \times 10^7$  내지 (약)  $1 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $2.5 \times 10^7$  내지 (약)  $5 \times 10^7$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $5 \times 10^7$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $5 \times 10^7$  내지 (약)  $2.5$

$x 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $5 \times 10^7$  내지 (약)  $1 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^8$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^8$  내지 (약)  $2.5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, (약) 또는  $2.5 \times 10^8$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 조작된 세포의 용량이 (약)  $2.5 \times 10^7$  내지 (약)  $1.5 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포, 예컨대 (약)  $5 \times 10^7$  내지 (약)  $1 \times 10^8$  개의 총 CAR<sup>+</sup> T 세포를 포함한다.

[1038] 일부 구현예에서, 유전자 조작된 세포의 단위 용량이, (약)  $1 \times 10^5$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포, (약)  $2.5 \times 10^5$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포, (약)  $5 \times 10^5$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포, (약)  $1 \times 10^6$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포, (약)  $2.5 \times 10^6$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포, (약)  $5 \times 10^6$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포, (약)  $1 \times 10^7$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포, (약)  $2.5 \times 10^7$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포, (약)  $5 \times 10^7$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포, (약)  $1 \times 10^8$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포, (약)  $1.5 \times 10^8$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포, (약)  $2.5 \times 10^8$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포, 또는 (약)  $5 \times 10^8$  개 이상의 CAR<sup>+</sup> 세포를 포함한다.

[1039] 일부 구현예에서, 세포 요법이, (약)  $1 \times 10^5$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 총 재조합 수용체 발현 세포, 총 T 세포 또는 총 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), (약)  $5 \times 10^5$  내지 (약)  $1 \times 10^7$  개의 총 재조합 수용체 발현 세포, 총 T 세포 또는 총 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 또는 (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $1 \times 10^7$  개의 총 재조합 수용체 발현 세포, 총 T 세포 또는 총 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)(각각의 수치 포함)의 세포 수를 포함하는 용량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 요법이, (약)  $1 \times 10^5$  개 이상의 총 재조합 수용체 발현 세포, 총 T 세포, 또는 총 말초 혈액 단핵 세포(PBMC), 예컨대 (약)  $1 \times 10^6$  개 이상, (약)  $1 \times 10^7$  개 이상, (약)  $1 \times 10^8$  개 이상의 상기 세포의 세포 수를 포함하는 세포 용량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 숫자는 CD3<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup>, 일부 경우에 또한 재조합 수용체 발현(예를 들어, CAR<sup>+</sup>) 세포의 총 수에 관한 것이다. 일부 구현예에서, 세포 요법이, (약)  $1 \times 10^5$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 CD3<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup> 총 T 세포 또는 CD3<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup> 재조합 수용체 발현 세포, (약)  $5 \times 10^5$  내지 (약)  $1 \times 10^7$  개의 CD3<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup> 총 T 세포 또는 CD3<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup> 재조합 수용체 발현 세포 또는 (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $1 \times 10^7$  개의 CD3<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup> 총 T 세포 또는 CD3<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup> 재조합 수용체 발현 세포(각각의 수치 포함)의 세포 수를 포함하는 용량의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 요법이, (약)  $1 \times 10^5$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 총 CD3<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup> 세포, (약)  $5 \times 10^5$  내지 (약)  $1 \times 10^7$  개의 총 CD3<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup> 세포 또는 (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $1 \times 10^7$  개의 총 CD3<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup> 또는 CD8<sup>+</sup>/CAR<sup>+</sup> 세포(각각의 수치 포함)의 세포 수를 포함하는 용량의 투여를 포함한다.

[1040] 일부 구현예에서, T 세포의 용량이 CD4<sup>+</sup> T 세포, CD8<sup>+</sup> T 세포 또는 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포를 포함한다.

[1041] 일부 구현예에서, 예를 들어 대상체가 인간인 경우, CD8<sup>+</sup> T 세포의 용량이 CD4<sup>+</sup> 및 CD8<sup>+</sup> T 세포를 포함하는 용량으로 포함하고, (약)  $1 \times 10^6$  내지 (약)  $5 \times 10^8$  개의 총 재조합 수용체(예를 들어, CAR) 발현 CD8<sup>+</sup> 세포를, 예를 들어, (약)  $5 \times 10^6$  내지 (약)  $1 \times 10^8$  개의 상기 세포, 예컨대  $1 \times 10^7$ ,  $2.5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7.5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1.5 \times 10^8$ , 또는  $5 \times 10^8$  개의 총 상기 세포의 범위 또는 전술한 수치 중 임의의 2 개 사이의 범위로 포함한다. 일부 구현예에서, 환자는 다중 용량으로 투여되고, 각각의 용량 또는 총 용량이 전술한 임의의 수치 내에 있을 수 있다. 일부 구현예에서, 세포의 용량이, (약)  $1 \times 10^7$  내지 (약)  $0.75 \times 10^8$  개의 총 재조합 수용체 발현 CD8<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^7$  내지 (약)  $5 \times 10^7$  개의 총 재조합 수용체 발현 CD8<sup>+</sup> T 세포, (약)  $1 \times 10^7$  내지 (약)  $0.25 \times 10^8$  개의 총 재조합 수용체 발현 CD8<sup>+</sup> T 세포(각각의 수치 포함)의 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포의 용량이 (약)  $1 \times 10^7$ ,  $2.5 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $7.5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1.5 \times 10^8$ ,  $2.5 \times 10^8$ , 또는  $5 \times 10^8$  개의 총 재조합 수용체 발현 CD8<sup>+</sup> T 세포의 투여를 포함한다.

[1042] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 재조합 수용체 발현 T 세포의 용량이 단일 단위 용량으로 대상체에 투여되거나

나 2 주, 1 개월, 3 개월, 6 개월, 1 년 이상의 기간 내에 1회만 투여된다.

- [1043] 

입양 세포 요법의 상황에서, 주어진 "용량(dose)"의 투여는 단일 조성물 및/또는 단일 비중단 투여, 예를 들어 단일 주사 또는 연속 주입으로 주어진 세포의 양 또는 수의 투여를 포괄하며, 다중 개별 조성물 또는 주입으로 제공된 경우 특정 기간에 걸쳐, 예컨대 3 일 이내에 걸쳐 분할 용량 또는 복수의 조성물로 주어진 세포의 양 또는 수의 투여를 또한 포괄한다. 따라서, 일부 상황에서, 용량은 단일 시점에 주어지거나 개시된, 특정 세포 수의 단일 또는 연속 투여이다. 그러나, 일부 상황에서, 용량이 3 일 동안 또는 2 일 동안 하루에 한 번 또는 하루의 기간에 걸쳐 다중 주입과 같이 3 일 이내의 기간에 걸쳐 다중 주사 또는 주입으로 투여된다.
- [1044] 

따라서, 일부 측면에서, 세포 용량이 단일 약학 조성물로 투여된다. 일부 구현예에서, 세포 용량이 세포 용량을 집합적으로 함유하는 복수의 조성물로 투여된다.
- [1045] 

일부 구현예에서, 용어 "분할 용량(split dose)"은 1 일 이상에 걸쳐 투여되도록 분할된 용량을 지칭한다. 상기 유형의 투약이 본 방법에 포괄되고 단일 용량으로 간주된다.
- [1046] 

따라서, 세포 용량이 분할 용량, 예를 들어, 시간의 흐름에 따라 투여되는 분할 용량으로 투여될 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 용량이 2 일 또는 3 일에 걸쳐 대상체에 투여될 수 있다. 분할 투약에 대한 예시적인 방법은 제1 일에 용량의 25%를 투여하고, 제2 일에 용량의 나머지 75%를 투여하는 것을 포함한다. 다른 구현예에서, 용량의 33%가 제1 일에 투여되고, 나머지 67%가 제2 일에 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 용량의 10%가 제1 일에 투여되고, 용량의 30%가 제2 일에 투여되며, 용량의 60%가 제3 일에 투여된다. 일부 구현예에서, 분할 용량이 3 일 이상에 걸쳐 확대되지 않는다.
- [1047] 

일부 구현예에서, 세포 용량이 복수의 조성물 또는 용액, 예컨대 제1 및 제2, 선택적으로 그 이상의 투여로 투여될 수 있고, 각각이 세포 용량을 일부 함유한다. 일부 측면에서, 각각이 상이한 세포 집단 및/또는 하위 유형의 세포를 함유하는 복수의 조성물이 선택적으로 특정 기간 내에 개별적으로 또는 독립적으로 투여된다. 예를 들어, 세포 집단 및/또는 하위 유형의 세포가, 각각 CD8<sup>+</sup> 및 CD4<sup>+</sup> T 세포 및/또는 각각 CD8<sup>+</sup>-농축 및 CD4<sup>+</sup>-농축 집단, 예를 들어 CD4<sup>+</sup> 및/또는 CD8<sup>+</sup> T 세포를 포함할 수 있고, 각각이 재조합 수용체를 발현하도록 유전자 조작된 세포를 개별적으로 포함한다. 일부 구현예에서, 투여 용량이, CD8<sup>+</sup> T 세포의 용량 또는 CD4<sup>+</sup> T 세포의 용량을 포함하는 제1 조성물의 투여 및 CD4<sup>+</sup> T 세포 및 CD8<sup>+</sup> T 세포의 다른 용량을 포함하는 제2 조성물의 투여를 포함한다.
- [1048] 

일부 구현예에서, 조성물 또는 용량의 투여, 예를 들어, 복수의 세포 조성물의 투여는 별도로 세포 조성물의 투여를 수반한다. 일부 측면에서, 별도의 투여는 동시 또는 순차적으로 어떠한 순서로든 수행된다. 일부 구현예에서, 용량은 제1 조성물 및 제2 조성물을 포함하고, 제1 조성물 및 제2 조성물은 (약) 0 내지 (약) 12시간 간격, (약) 0 내지 (약) 6시간 간격 또는 (약) 0 내지 (약) 2시간 간격으로 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 조성물의 투여 개시 및 제2 조성물의 투여 개시는 (약) 2 시간 이내, (약) 1 시간 이내 또는 (약) 30 분 이내의 간격, (약) 15 분 이내, (약) 10 분 이내 또는 (약) 5 분 이내의 간격으로 수행된다. 일부 구현예에서, 제1 조성물의 투여 개시 및/또는 완료 및 제2 조성물의 투여 완료 및/또는 개시가, (약) 2 시간 이내, (약) 1 시간 이내 또는 (약) 30 분 이내의 간격, (약) 15 분 이내, (약) 10 분 이내 또는 (약) 5 분 이내의 간격으로 수행된다.
- [1049] 

일부 조성물에서, 제1 조성물, 예를 들어, 제1 조성물의 용량은 CD4<sup>+</sup> T 세포를 포함한다. 일부 조성물에서, 제1 조성물, 예를 들어, 제1 조성물의 용량은 CD8<sup>+</sup> T 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 조성물이 제2 조성물 전에 투여된다.
- [1050] 

일부 구현예에서, 세포의 용량 또는 조성물은, 재조합 수용체를 발현하는 CD4<sup>+</sup> 세포 대 재조합 수용체를 발현하는 CD8<sup>+</sup> 세포 및/또는 CD4<sup>+</sup> 세포 대 CD8<sup>+</sup> 세포의 정의된 또는 표적 비율을 포함하고, 상기 비율은 선택적으로 대략 1:1이거나 대략 1:3 내지 대략 3:1, 예컨대 대략 1:1이다. 일부 측면에서, 상이한 세포 집단의 표적 또는 원하는 비율(예컨대 CD4<sup>+</sup>:CD8<sup>+</sup> 비율 또는 CAR+CD4<sup>+</sup>:CAR+CD8<sup>+</sup> 비율, 예를 들어, 1:1)을 갖는 조성물 또는 용량의 투여는, 집단 중 하나를 함유하는 세포 조성물의 투여 후 나머지 다른 하나의 집단을 포함하는 별도의 세포 조성물의 투여를 수반하고, 여기서 상기 투여는 (약) 표적 또는 원하는 비율로 수행된다. 일부 측면에서, 정의된 비율로 세포 용량 또는 세포 조성물의 투여가 T 세포 요법의 증폭, 지속성 및/또는 항종양 활성의 개선으로 이어진다.
- [1051] 

일부 구현예에서, 대상체는 세포의 다중 용량, 예를 들어 2 이상의 용량 또는 다중 연속 용량을 받는다. 일부 구현예에서, 2 용량이 대상체에 투여된다. 일부 구현예에서, 대상체는 연속적인 용량, 예를 들어 제2 용량을 받

고, 제1 용량 후 약 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21 일에 투여된다. 일부 구현예에서, 다중 연속 용량이 제1 용량 후에 투여되어 추가 용량 또는 용량들이 연속 용량의 투여 후에 투여된다. 일부 측면에서, 추가 용량으로 대상체에 투여되는 세포의 수가, 제1 용량 및/또는 연속 용량과 동일하거나 유사하다. 일부 구현예에서, 추가 용량 또는 용량들은 선행 용량보다 더 많다.

- [1052] 일부 측면에서, 제1 및/또는 연속 용량의 크기가, 하나 이상의 기준, 예컨대 선행 치료, 예를 들어 화학요법에 대한 대상체의 반응, 대상체의 질병 부담, 예컨대 종양 부하, 부피, 크기 또는 전이의 등급, 정도 또는 유형, 단계 및/또는 대상체가 독성 결과, 예를 들어 CRS, 대식세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 신경 독성을 발달시킬 가능성 또는 발생률 및/또는 투여될 세포 및/또는 재조합 수용체에 대한 숙주 면역 반응에 근거하여 결정된다.
- [1053] 일부 측면에서, 제1 용량의 투여와 연속 용량의 투여 사이의 시간이, 약 9 내지 약 35 일, 약 14 내지 약 28 일 또는 15 내지 27 일이다. 일부 구현예에서, 연속 용량의 투여는, 제1 용량의 투여 후 약 14 일 이상 및 약 28 일 미만의 시점이다. 일부 측면에서, 제1 용량 및 연속 용량 사이 시간이 약 21 일이다. 일부 구현예에서, 추가 용량 또는 용량들, 예를 들어, 연속 용량이 연속 용량 투여 후에 투여된다. 일부 측면에서, 추가 연속 용량 또는 용량들이, 선행 용량의 투여 후 약 14 일 이상 및 약 28 일 미만에 투여된다. 일부 구현예에서, 추가 용량이, 선행 용량 후 약 14 일 미만, 예를 들어, 선행 용량 후 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13 일에 투여된다. 일부 구현예에서, 선행 용량 후 약 14 일 미만 및/또는 선행 용량 후 약 28 일 이상에 어떤 용량도 투여되지 않는다.
- [1054] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어 재조합 수용체 발현 세포의 용량이 T 세포의 제1 용량 및 T 세포의 연속 용량을 포함하는 2 용량(예를 들어, 2배 용량)을 포함하며, 여기서 제1 용량 및 제2 용량 중 하나 또는 둘 다가 T 세포의 분할 용량의 투여를 포함한다.
- [1055] 일부 구현예에서, 세포의 용량은 일반적으로 질병 부담을 감소시키는 데 효과적인 만큼 충분히 많다.
- [1056] 일부 구현예에서, 세포는 원하는 투여량으로 투여되며, 이는 일부 측면에서 원하는 용량 또는 세포 수 또는 세포 유형(들) 및/또는 원하는 비율의 세포 유형을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 세포의 투여량은 세포의 총 수(또는 체중 kg 당 수) 및 원하는 비율의 개별 집단 또는 하위 유형, 예컨대 CD4+ 대 CD8+ 비율에 근거한다. 일부 구현예에서, 세포의 투여량은, 개별 집단 내 세포 또는 개별 세포 유형의 원하는 총 수(또는 체중 kg당 수)에 근거한다. 일부 구현예에서, 투여량은 상기 특성, 예컨대 개별 집단 내 총 세포의 원하는 수, 원하는 비율 및 원하는 총 세포의 수의 조합에 근거한다.
- [1057] 일부 구현예에서, 세포 집단 또는 하위 유형의 세포, 예컨대 CD8<sup>+</sup> 및 CD4<sup>+</sup> T 세포가, T 세포의 원하는 용량과 같은 총 세포의 원하는 용량의 허용된 차이 또는 내로 투여된다. 일부 측면에서, 원하는 용량은 원하는 세포 수 또는 세포가 투여되는 대상체의 체중 단위 당 원하는 세포 수, 예를 들어 세포/kg이다. 일부 측면에서, 원하는 용량은 최소 세포 수 또는 최소 세포 수 이상 또는 체중 단위 당 최소 세포 수이다. 일부 측면에서, 원하는 용량으로 투여된 총 세포 중, 개별 집단 또는 하위 유형이, 원하는 산출 비율(예컨대 CD4+ 대 CD8+ 비율) 또는 근처로 예를 들어, 상기 비율의 특정 허용된 차이 또는 오류 내에서 존재한다.
- [1058] 일부 구현예에서, 세포가, 하나 이상의 개별 세포 집단 또는 하위 유형의 세포의 원하는 용량, 예컨대 CD4+ 세포의 원하는 용량 및/또는 CD8+ 세포의 원하는 용량의 허용된 차이 또는 내로 투여된다. 일부 측면에서, 원하는 용량은, 하위 유형 또는 집단의 원하는 세포 수 또는 세포가 투여되는 대상체의 체중 단위 당 원하는 상기 세포 수, 예를 들어 세포/kg이다. 일부 측면에서, 원하는 용량이 집단 또는 하위 유형의 최소 세포 수 또는 그 이상 또는 체중 단위 당 집단 또는 하위 유형의 최소 세포 수이다.
- [1059] 따라서, 일부 구현예에서, 투여량은, 개별 하위 유형 또는 하위 집단의 총 세포의 원하는 고정 용량 및 원하는 비율에 근거하고/거나 하나 이상, 예를 들어 각각의 원하는 고정 용량에 근거한다. 따라서, 일부 구현예에서, 투여량은 T 세포의 원하는 고정 또는 최소 용량 및 CD4<sup>+</sup> 대 CD8<sup>+</sup> 세포의 원하는 비율에 근거하고/거나 CD4<sup>+</sup> 및/또는 CD8<sup>+</sup> 세포의 원하는 고정 또는 최소 용량에 근거한다.
- [1060] 일부 구현예에서, 세포가, 다중 세포 집단 또는 하위 유형, 예컨대 CD4+ 및 CD8+ 세포 또는 하위 유형의 원하는 산출 비율의 허용 범위 또는 내로 투여된다. 일부 측면에서, 원하는 비율이 특정 비율일 수 있거나 비율의 범위 일 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 원하는 비율(예를 들어, CD4<sup>+</sup> 대 CD8<sup>+</sup> 세포의 비율)은, (약) 5:1 내지 (약) 5:1(또는 약 1:5 초과 및 약 5:1 미만) 또는 (약) 1:3 내지 (약) 3:1(또는 약 1:3 초과 및 약 3:1 미

만), 예컨대 (약) 2:1 내지 (약) 1:5(또는 약 1:5 초과 및 약 2:1 미만), 예컨대 (약) 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9: 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5 또는 1:5이다. 일부 측면에서, 허용된 차이는, 원하는 비율의 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4% 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50% 내이고, 상기 범위 사이의 임의의 수치를 포함한다.

[1061] 특정 구현예에서, 세포의 수 및/또는 농도는 재조합 수용체(예를 들어, CAR) 발현 세포의 수를 지칭한다. 다른 구현예에서, 세포의 수 및/또는 농도는 투여된 모든 세포, T 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)의 수 또는 농도를 지칭한다.

[1062] 일부 측면에서, 용량의 크기가, 하나 이상의 기준, 예컨대 선행 치료, 예를 들어 화학요법에 대한 대상체의 반응, 대상체의 질병 부담, 예컨대 종양 부하, 부피, 크기 또는 전이의 등급, 정도 또는 유형, 단계 및/또는 대상체가 독성 결과, 예를 들어 CRS, 대식세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 신경 독성을 발달시킬 가능성 또는 발생률 및/또는 투여될 세포 및/또는 재조합 수용체에 대한 숙주 면역 반응에 근거하여 결정된다.

[1063] 일부 구현예에서, 방법은 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 세포의 하나 이상의 추가 용량의 투여 및/또는 림프구 고갈 요법을 또한 포함하고/거나 방법 중 하나 이상의 단계가 반복된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 용량이 초기 용량과 동일하다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 용량이, 초기 용량과 상이하며, 예를 들어, 초기 용량보다 2 배, 3 배, 4 배, 5 배, 6 배, 7 배, 8 배, 9 배 또는 10 배 이상 더 많은 것과 같이 더 많거나, 예를 들어, 초기 용량보다 2 배, 3 배, 4 배, 5 배, 6 배, 7 배, 8 배, 9 배 또는 10 배 이상 더 적은 것과 같이 더 적다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 용량의 투여가, 초기 치료 또는 임의의 선행 치료에 대한 대상체의 반응, 대상체의 질병 부담, 예컨대 종양 부하, 부피, 크기 또는 전이의 등급, 정도 또는 유형, 단계 및/또는 대상체가 독성 결과, 예를 들어 CRS, 대식세포 활성화 증후군, 종양 용해 증후군, 신경 독성을 발달시킬 가능성 또는 발생률 및/또는 투여될 세포에 대한 숙주 면역 반응에 근거하여 결정된다.

[1064] **V. 약학 조성물 및 제형**

[1065] 예컨대 입양 세포 요법을 위한 투여용 조성물, 예컨대 약학 조성물 및 제형이 또한 제공된다. 일부 측면에서, 약학 조성물이, 예를 들어, 재조합 또는 키메라 수용체를 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 포함하는 여기 기재된 조작된 세포를 함유하는 임의의 조작된 세포 또는 조성물을 함유한다. 일부 구현예에서, 예를 들어 재조합 항원 수용체 또는 이의 일부, 예를 들어, CAR을 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 포함하는 제공된 조작된 세포를 포함하는 세포 용량이 조성물 또는 제형, 예컨대 약학 조성물 또는 제형으로 제공된다. 상기 조성물은, 예컨대 질병, 병태 및 장애의 예방 또는 치료에 또는 검출, 진단 및 예후 방법에 제공된 방법 및/또는 제공된 제조 물품 또는 조성물과 부합되게 사용될 수 있다.

[1066] 용어 "약학 제형(pharmaceutical formulation)"은 그 안에 함유된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과적이게 하는 그런 형태의 제제이고, 제형이 투여될 대상체에 허용 가능하지 않게 독성이 있는 추가 성분을 함유하지 않는 제제를 지칭한다.

[1067] "약학적으로 허용 가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)"는, 대상체에 무독성인 활성 성분이 아닌 약학 제형 내 성분을 지칭한다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 완충제, 부형제, 안정제 또는 방부제를 포함하나 이에 국한되지 않는다.

[1068] 일부 측면에서, 담체의 선택은 특정 세포 또는 제제 및/또는 투여 방법에 의해 부분적으로 결정된다. 따라서, 다양한 적합한 제형이 존재한다. 예를 들어, 약학 조성물은 방부제를 함유할 수 있다. 적합한 방부제는 예를 들어, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 벤조산 나트륨 및 염화벤잘코늄을 포함할 수 있다. 일부 측면에서, 2 개 이상의 방부제의 혼합물이 사용된다. 방부제 또는 이의 혼합물이 전형적으로 전체 조성물의 약 0.0001 중량% 내지 약 2 중량%의 양으로 존재한다. 담체는 예를 들어, 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)]에 기재되어 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 사용된 투여량 및 농도에서 수용체에 일반적으로 무독성이며, 인산염, 구연산염 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 방부제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤잘코늄 클로라이드; 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 메틸 또는 프로필 파라벤과 같은 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10 잔기 미만) 폴리펩티드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역 글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히

스티딘, 아르기닌 또는 리신과 같은 아미노산; 글루코오스, 만노오스 또는 텍스트린을 포함하는 단당류, 이당류 및 기타 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이팅제; 수크로오스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨과 같은 자당; 나트륨과 같은 염 형성 카운터 이온; 금속 착물(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 및/또는 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 비이온 계면활성제를 포함하나 이에 국한되지 않는다.

- [1069] 일부 측면에서, 완충제가 조성물에 포함된다. 적합한 완충제는 예를 들어, 구연산, 구연산 나트륨, 인산, 인산 칼륨 및 다양한 기타 산 및 염을 포함한다. 일부 측면에서, 2 개 이상의 완충제 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 이의 혼합물이, 전형적으로 전체 조성물의 약 0.001 중량% 내지 약 4 중량%의 양으로 존재한다. 투여 가능한 약학 조성물의 제조 방법이 공지되어 있다. 예시적인 방법이 예를 들어, 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)]에 보다 상세하게 기재되어 있다.
- [1070] 제형 또는 조성물이, 세포 또는 제제로 예방 또는 치료될 특정 징후, 질병 또는 병태에 유용한 하나 이상의 활성 성분을 또한 함유할 수 있으며, 여기서 각각의 활성이 서로 악영향을 미치지 않는다. 상기 활성 성분이 의도된 목적에 유효한 양으로 조합하여 적합하게 존재한다. 따라서, 일부 구현예에서, 약학 조성물이 다른 약학적 활성제 또는 약물, 예컨대 화학 요법제, 예를 들어 아스파라기나제, 부술판, 카르보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 젠시타빈, 히드록시우레아, 메토틱렉세이트, 파클리탁셀, 리톡시맙, 빈블라스틴 등을 더 포함한다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포가 염, 예를 들어 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 투여된다. 약학적으로 적합하고 허용 가능한 산성 부가 염은 염산, 브롬화수소산, 인산, 메타인산, 질산 및 황산과 같은 무기산 및 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 말산, 락트산, 푸마르산, 벤조산, 글리콜산, 글루콘산, 숙신산 및 아릴술폰산, 예를 들어 p-톨루엔술폰산과 같은 유기산에서 유래된 것을 포함한다.
- [1071] 일부 구현예에서, 약학 조성물이, 질병 또는 병태를 치료 또는 예방하는 유효량, 예컨대 치료적 유효량 또는 예방적 유효량으로 제제 또는 세포를 함유한다. 일부 구현예에서, 치료적 또는 예방적 효능이 치료 대상체의 주기적 평가에 의해 모니터링된다. 병태에 따라 며칠 또는 그 이상에 걸쳐 반복 투여되는 경우, 질병 증상의 원하는 억제가 발생할 때까지 치료가 반복된다. 그러나, 다른 투약 요법이 유용할 수 있고 결정될 수 있다. 바람직한 투여량이, 조성물의 단일 볼루스 투여, 조성물의 다중 볼루스 투여 또는 조성물의 지속적인 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.
- [1072] 제제 또는 세포가 임의의 적합한 수단, 예를 들어 볼루스 주입, 주사, 예를 들어 정맥내 또는 피하 주사, 안구내 주사, 안구주위(periorcular) 주사, 망막하 주사, 유리체내 주사, 중격경유성 주사, 공막하 주사, 맥락막내 주사, 전방내 주사, 결막 하 주사(subconjunctival injection, subconjunctival injection), 서브 테논(sub-Tenon) 주사, 안구뒤 주사, 안구주위(peribulbar) 주사 또는 후부 점막 주사 전달에 의해 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기는 비경구, 폐내 및 비강내 및 국소 치료가 바람직한 경우 병변내 투여에 의해 투여된다. 비경구 주입은 근육내, 정맥내, 동맥내, 복강내 또는 피하 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 주어진 용량이 세포 또는 제제의 단일 볼루스 투여에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 상기가 예를 들어, 3 일 이내의 기간에 걸쳐 세포 또는 제제의 다중 볼루스 투여에 의해, 또는 세포 또는 제제의 지속적인 주입 투여에 의해 투여된다.
- [1073] 질병의 예방 또는 치료를 위해, 적절한 투여량이, 치료될 질병의 유형, 제제 또는 제제들의 유형, 세포 또는 재조합 수용체의 유형, 질병의 중증도 및 진행 과정, 제제 또는 세포가 예방 또는 치료 목적으로 투여되는지 여부, 이전 요법, 대상체의 임상 이력 및 제제 또는 세포에 대한 반응 및 주치의의 판단에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물이 한 번에 또는 일련의 치료에 걸쳐 대상체에 적합하게 투여된다.
- [1074] 세포 또는 제제가, 표준 투여 기술, 제형 및/또는 디바이스를 사용하여 투여될 수 있다. 조성물의 보관 및 투여를 위해 주사기 및 바이알과 같은 제형 및 장치가 제공된다. 세포에 관하여, 투여는 자가 조직 또는 이종 기원일 수 있다. 일부 측면에서, 세포가 대상체에서 단리되고, 조작되고, 동일한 대상체에 투여된다. 다른 측면에서, 세포가 한 대상체에서 단리되고, 조작되고, 또 다른 대상체에 투여된다. 예를 들어, 면역 반응성 세포 또는 전구체는 하나의 대상체에서 수득될 수 있고, 동일한 대상체 또는 상이하고, 양립 가능한 대상체에 투여될 수 있다. 말초 혈액 유래 면역 반응성 세포 또는 이의 자손(예를 들어, 생체 내, 생체 외 또는 시험관 내 유래)이, 카테터 투여, 전신 주사, 국소 주사, 정맥 주사 또는 비경구 투여를 포함하는 국소 주사를 통해 투여될 수 있다. 치료 조성물(예를 들어, 신경 독성 증상을 치료 또는 개선하는 유전자 변형된 면역 반응 세포 또는 제제를 함유하는 약학 조성물)을 투여할 경우, 이는 일반적으로 주사 가능한 단위 투여량 형태(용액, 현탁액, 에멀전)로 제형화될 것이다.
- [1075] 제형은 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 폐, 경피, 근육내, 비강내, 불, 설하 또는 좌약 투여를 위한 것을 포함한

다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포 집단이 비경구적으로 투여된다. 여기에 사용된 바와 같은 용어 "비경구 (parenteral)"는 정맥내, 근육내, 피하, 직장, 질 및 복강내 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 제제 또는 세포 집단이, 정맥내, 복강내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 사용하여 대상체에 투여된다.

[1076] 일부 구현예에서, 조성물은 멸균 액체 제제로서, 예를 들어, 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액 또는 점성 조성물로 제공되며, 이는 일부 측면에서 선택된 pH로 완충될 수 있다. 액체 제제는 일반적으로 겔, 다른 점성 조성물 및 고체 조성물보다 제조가 더 용이하다. 또한, 액체 조성물은 특히 주사에 의해 투여하기가 다소 더 편리하다. 다른 한편으로, 점성 조성물이 적절한 점도 범위 내로 제형화되어 특정 조직과 보다 긴 접촉 기간을 제공할 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은 예를 들어, 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액상 폴리에틸렌 글리콜) 및 이의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 배지일 수 있는 담체를 포함할 수 있다.

[1077] 멸균 주사용 용액이, 예컨대 적합한 담체, 희석제 또는 멸균수, 생리식염수, 포도당, 텍스트로스 등과 같은 부형제와의 혼합물로 용매 내 제제 또는 세포를 통합함으로써 제조될 수 있다.

[1078] 생체 내 투여에 사용될 제형은 일반적으로 멸균된다. 멸균은, 예를 들어 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.

[1079] **VI. 키트 및 제조 물품**

[1080] 제공된 구현예를 수행하는 데 유용한 제조 물품, 시스템, 기구 및 키트가 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 제공된 제조 물품 또는 키트는, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들) 및/또는 주형 폴리뉴클레오티드(들), 예를 들어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 함유하는 주형 폴리뉴클레오티드 중 하나 이상의 구성 요소를 함유한다. 일부 구현예에서, 제조 물품 또는 키트가 재조합 수용체 및/또는 여기 기재된 바와 같은 다른 분자를 발현하도록 T 세포를 조작하기 위한 방법에 사용되어 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자를 포함하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 포함하는 조작된 세포가 생성될 수 있다.

[1081] 일부 구현예에서, 제조 물품 또는 키트가, 제공된 방법을 수행하는 데 유용한 폴리펩티드, 핵산, 벡터 및/또는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 제조 물품 또는 키트가, 예를 들어 *TGFBR2* 유전자 좌에서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)(예컨대 여기 섹션 I.A에 기재된 것)를 포함한다. 일부 구현예에서, 제조 물품 또는 키트가, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)의 하나 이상의 구성 요소를 암호화하는 하나 이상의 핵산 분자, 예를 들어 플라스미드 또는 DNA 단편을 포함하고/거나 여기 섹션 I.B.2에 기재된 것과 같이 예를 들어, HDR을 통해 세포 내로 전이 유전자 서열을 표적화하는 데 사용하기 위한 주형 폴리뉴클레오티드(들)을 포함한다. 일부 구현예에서, 여기 제공된 제조 물품 또는 키트가 대조군 벡터를 함유한다.

[1082] 일부 구현예에서, 여기에 제공된 제조 물품 또는 키트가, 하나 이상의 제제(들) - 여기서 하나 이상의 제제 각각이 *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위의 유전자 파괴를 독립적으로 유도할 수 있음 - ; 및 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자를 포함하는 주형 폴리뉴클레오티드 - 여기서 전이 유전자가 상동성 지시수선(HDR)을 통해 표적 부위 또는 근처에서 통합을 위해 표적화됨 - ;를 함유한다. 일부 측면에서, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)가 여기에 기재된 임의의 것이다. 일부 측면에서, 하나 이상의 제제(들)가 Cas9/gRNA 복합체를 포함하는 리보핵산단백질(RNP) 복합체이다. 일부 측면에서, RNP 내에 포함된 gRNA가, 여기 기재된 임의의 표적 부위와 같은 *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위를 표적화한다. 일부 측면에서, 주형 폴리뉴클레오티드는 여기 기재된 임의의 주형 폴리뉴클레오티드이다.

[1083] 일부 구현예에서, 제조 물품 또는 키트가 하나 이상의 컨테이너, 전형적으로 복수의 컨테이너, 패키징 물질 및 컨테이너 또는 컨테이너들 및/또는 패키징 상에 또는 이와 관련된 라벨 또는 포장 삽입물을 포함하며, 일반적으로 사용 지침, 예를 들어, 조작을 위해 세포 내로 구성 요소를 도입하기 위한 지침을 포함한다.

[1084] 여기 제공된 제조 물품은 패키징 물질을 함유한다. 제공된 물질을 패키징하는 데 사용하기 위한 패키징 물질이 잘 알려져 있다. 예를 들어, 이의 각각의 전문이 여기에 편입된 문헌[미국 특허 번호 5,323,907, 5,052,558 및 5,033,252]을 참조한다. 패키징 물질의 예는, 블리스터 팩, 병, 튜브, 흡입기, 펌프, 백, 바이알, 컨테이너, 주사기, 일회용 실험실 용품, 예를 들어, 피펫 팁 및/또는 플라스틱 플레이트 또는 병이 포함되나 이에 국한되지 않는다. 제조 물품 또는 키트는 물질의 분배를 용이하게 하거나 고처리량 또는 대규모 방식으로 사용을 용이하게 하기 위한, 예를 들어, 로봇 장비에서의 사용을 용이하게 하기 위한 장치를 포함할 수 있다. 전형적으로, 패키징은 그 안에 함유된 조성물과 반응하지 않는다.

- [1085] 일부 구현예에서, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들) 및/또는 주형 폴리뉴클레오티드(들)가 별도로 포장된다. 일부 구현예에서, 각 컨테이너가 단일 구획을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, 제조 물품 또는 키트의 다른 구성 요소가 별도로 포장되거나 또는 단일 구획에 함께 포장된다.
- [1086] 예를 들어, 요법 또는 치료에 사용하기 위한 제공된 세포 및/또는 세포 조성물을 투여하는 데 유용한 제조 물품, 시스템, 기구 및 키트가 또한 제공된다. 일부 구현예에서, 여기에 제공된 제조 물품 또는 키트가, 여기에 기재된 임의의 T 세포 및/또는 T 세포 조성물과 같은 T 세포 및/또는 T 세포 조성물을 함유한다. 일부 측면에서, 여기에 제공된 제조 물품 또는 키트가 T 세포 또는 T 세포 조성물의 투여를 위해 사용될 수 있고, 사용을 위한 지침을 포함할 수 있다.
- [1087] 일부 구현예에서, 여기에 제공된 제조 물품 또는 키트가, 여기에 기재된 임의의 T 세포 및/또는 T 세포 조성물과 같은 T 세포 및/또는 T 세포 조성물을 함유한다. 일부 구현예에서, T 세포 및/또는 T 세포 조성물 임의의 변형된 T 세포가 여기에 기재된 스크리닝 방법에 사용되었다. 일부 구현예에서, 여기에 제공된 제조 물품 또는 키트가 대조군 또는 비변형 T 세포 및/또는 T 세포 조성물을 함유한다. 일부 구현예에서, 제조 물품 또는 키트가 요법을 위한 조작된 세포 및/또는 세포 조성물의 투여를 위한 하나 이상의 지침을 포함한다.
- [1088] 요법을 위한 세포 또는 세포 조성물을 함유하는 제조 물품 및/또는 키트가, 컨테이너 및 컨테이너 상에 또는 컨테이너와 관련된 라벨 또는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 컨테이너는, 예를 들어 병, 바이알, 주사기, IV 용액 백 등을 포함한다. 컨테이너는 유리 또는 플라스틱과 같은 다양한 물질로 형성될 수 있다. 일부 구현예에서, 컨테이너는 병태를 치료, 예방 및/또는 진단하는 데 효과적인 그 자체 또는 또 다른 조성물과 조합된 조성물을 보유한다. 일부 구현예에서, 컨테이너는 멸균 접근 포트를 갖는다. 예시적인 컨테이너는 정맥내 용액 백, 바이알을 포함하고, 주사용 바늘에 의해 천공될 수 있는 마개가 있는 것 또는 경구 투여 제제를 위한 병 또는 바이알을 포함한다. 라벨 또는 패키지 삽입물은 조성물이 질병 또는 병태를 치료하는 데 사용되는 것을 나타낼 수 있다. 제조 물품은, (a) 그안에 함유된 조성물을 갖는 제1 컨테이너 - 여기서 상기 조성물은 재조합 수용체를 발현하는 조작된 세포를 포함함 - ; 및 (b) 그안에 함유된 조성물을 갖는 제2 컨테이너 - 여기서 상기 조성물은 제2 제제를 포함함 - ;를 포함한다. 일부 구현예에서, 제조 물품은, (a) 그안에 함유된 제1 조성물을 갖는 제1 컨테이너 - 여기서 상기 조성물은 재조합 수용체를 발현하는 조작된 세포의 하위 유형을 포함함 - ; 및 (b) 그안에 함유된 조성물을 갖는 제2 컨테이너 - 여기서 상기 조성물은 재조합 수용체를 발현하는 조작된 세포의 상이한 하위 유형을 포함함 - ; 를 포함할 수 있다. 제조 물품은, 조성물이 특정 병태를 치료하는 데 사용될 수 있음을 나타내는 포장 삽입물을 더 포함할 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 제조 물품은 약학적으로 허용 가능한 완충제를 포함하는 또 다른 또는 동일한 컨테이너를 더 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석액, 필터, 바늘 및/또는 주사기와 같은 다른 물질을 더 포함할 수 있다.

[1089] **VII. 정의**

- [1090] 달리 정의되지 않는 한, 여기에 사용된 모든 기술 용어, 표기법 및 다른 기술 및 과학 용어 또는 전문 용어는 청구된 주제가 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는 것으로 의도된다. 일부 경우에, 통상적으로 이해되는 의미를 갖는 용어가 명확성 및/또는 용이한 참조를 위해 여기에 정의되며, 여기에 상기 정의의 포함이 당업계에서 일반적으로 이해되는 것에 비해 실질적인 차이를 나타내는 것으로 반드시 이해되어서는 안된다.
- [1091] 여기에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥상 명백하게 다르게 지시하지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 예를 들어, "a" 또는 "an"은 "적어도 하나(at least one)" 또는 "하나 이상(one or more)"을 의미한다. 여기에 기재된 측면 및 변형이 측면 및 변형을 "구성하는(consisting)" 및/또는 "본질적으로 구성하는(consisting essentially of)"을 포함하는 것으로 이해된다.
- [1092] 본 개시 전체에, 청구된 주제의 다양한 측면이 범위 형식으로 제시된다. 범위 형식의 기재는 단지 편의 및 간결성을 위한 것으로 이해되어야 하며, 청구된 주제의 범위에 대한 융통성 없는 제한으로 이해되어서는 안된다. 따라서, 범위의 기재는 모든 가능한 하위 범위뿐만 아니라 상기 범위 내의 개별 수치들 구체적으로 개시한 것으로 간주되어야 한다. 예를 들어, 수치의 범위가 제공된 경우, 상기 범위의 상한 내지 하한 사이 각각의 사이에 오는 수치와 상기 언급된 범위 내 임의의 다른 언급되거나 사이에 오는 수치가 청구된 주제 내에 포함되는 것으로 이해된다. 상기 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 보다 더 작은 범위에 포함될 수 있고, 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 배제된 한도를 조건으로 청구된 주제 내에 또한 포함된다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우, 상기 포함된 한계 중 하나 또는 둘 다를 제외한 범위도 청구된 주제에 포함된다.

이는 범위의 폭에 관계없이 적용된다.

- [1093] 여기에 사용된 바와 같은 용어 "약(about)"은 용이하게 알려진 각각의 수치에 대한 일반적인 오차 범위를 지칭한다. 여기서 "약(about)"의 수치 또는 파라미터에 대한 언급은 상기 수치 또는 파라미터 자체에 관한 구현예를 포함(설명)한다. 예를 들어, "약 X(about X)" 를 지칭하는 기재는 "X"의 기재를 포함한다. 일부 구현예에서, "약(about)"은  $\pm 25\%$ ,  $\pm 20\%$ ,  $\pm 15\%$ ,  $\pm 10\%$ ,  $\pm 5\%$  또는  $\pm 1\%$ 를 지칭할 수 있다.
- [1094] 여기에 사용된 바와 같이, 뉴클레오티드 또는 아미노산 위치가 서열 목록에 제시된 것과 같은 개시된 서열의 뉴클레오티드 또는 아미노산 위치에 "대응(correspond to)"한다는 인용은, GAP 알고리즘과 같은 표준 정렬 알고리즘을 사용하여 동일성을 극대화하도록 개시된 서열과 정렬시 확인된 뉴클레오티드 또는 아미노산 위치를 지칭한다. 서열을 정렬함으로써, 예를 들어 보존되고 동일한 아미노산 잔기를 가이드로 사용하여 대응하는 잔기를 확인할 수 있다. 일반적으로, 대응하는 위치를 확인하기 위해, 아미노산 서열이 가장 높은 순서의 일치에 수득되도록 정렬된다(예를 들어: 문헌[Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; 및 Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; Carrillo et al. (1988) SIAM J Applied Math 48: 1073] 참조).
- [1095] 여기에 사용된 바와 같은 용어 "벡터(vector)"는 이에 연결된 또 다른 핵산을 번식시킬 수 있는 핵산 분자를 지칭한다. 용어는 자가 복제 핵산 구조로서의 벡터뿐만 아니라 상기가 도입된 숙주 세포의 계통 내로 편입된 벡터를 포함한다. 특정 벡터는 이들이 작동 가능하게 연결된 핵산의 발현을 지시할 수 있다. 상기 벡터가 여기서 "발현 벡터(expression vector)"로 지칭된다. 벡터 중에 레트로바이러스, 예를 들어 감마레트로바이러스 및 렌티바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터가 있다.
- [1096] 용어 "숙주 세포(host cell)", "숙주 세포주(host cell line)" 및 "숙주 세포 배양물(host cell culture)"이 상호 교환적으로 사용되며, 상기 세포의 자손을 포함하여 외인성 핵산이 도입된 세포를 지칭한다. 숙주 세포는 "형질 전환체(transformants)" 및 "형질 전환된 세포(transformed cells)"를 포함하고, 이는 1차 형질 전환 세포 및 계대 수에 관계없이 이로부터 유래된 자손을 포함한다. 자손은 핵산 함량에서 부모 세포와 완전히 동일하지 않을 수 있으나 돌연변이를 함유할 수 있다. 원래 형질 전환된 세포에서 선별되거나 선택된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 여기에 포함된다.
- [1097] 여기에 사용된 바와 같이, 세포 또는 세포 집단이 특정 마커에 대해 "양성(positive)"이라는 진술은 특정 마커, 전형적으로 표면 마커가 세포 상에 또는 세포 내에 검출 가능하게 존재함을 지칭한다. 표면 마커를 언급할 때, 용어는 예를 들어 마커에 특이적으로 결합하는 항체로 염색하고 상기 항체를 검출함으로써, 유세포 분석에 의해 검출된 바와 같은 표면 발현의 존재를 지칭하며, 여기서 상기 염색은 달리 동일한 조건 하에서 아이소타이프-매칭된 대조군으로 동일한 절차를 수행하여 검출된 염색보다 실질적으로 상위 수준에서 및/또는 마커에 대해 양성인 것으로 공지된 세포에 대한 것과 실질적으로 유사한 수준에서 및/또는 마커에 대해 음성인 것으로 공지된 세포에 대한 것보다 실질적으로 더 높은 수준에서 유세포 분석에 의해 검출 가능하다.
- [1098] 여기에 사용된 바와 같이, 세포 또는 세포 집단이 특정 마커에 대해 "음성(negative)"이라는 진술은 특정 마커, 전형적으로 표면 마커가 세포 상에 또는 세포 내에 실질적으로 검출 가능하게 존재하지 않음을 지칭한다. 표면 마커를 언급할 때, 용어는 예를 들어 마커에 특이적으로 결합하는 항체로 염색하고 상기 항체를 검출함으로써, 유세포 분석에 의해 검출된 바와 같은 표면 발현의 부재를 지칭하며, 여기서 상기 염색은, 달리 동일한 조건 하에서 아이소타이프-매칭된 대조군으로 동일한 절차를 수행하여 검출된 염색보다 실질적으로 상위 수준에서 및/또는 마커에 대해 양성인 것으로 공지된 세포에 대한 것보다 실질적으로 더 낮은 수준에서 및/또는 마커에 대해 음성인 것으로 공지된 세포에 대한 것과 비교하여 실질적으로 유사한 수준에서 유세포 분석에 의해 검출되지 않는다.
- [1099] 여기에 사용된 바와 같이, "아미노산 서열 동일성 백분율(percent (%) amino acid sequence identity)" 및 "동일성 백분율(percent identity)"이 아미노산 서열(기준 폴리펩티드 서열)에 대하여 사용될 때, 서열 동일성의 일부로서 임의의 보존적 치환을 고려하지 않고 최대 백분율의 서열 동일성을 달성하도록 서열 및 필요하다면 도입 갭을 정렬한 후 기준 폴리펩티드 서열의 아미노산 잔기와 동일한 후보 서열(예를 들어, 대상 항체 또는 단편) 내 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 아미노산 서열 동일성 백분율을 결정하기 위한 정렬이, 일부 구현예에서 공개적으로 이용 가능한 컴퓨터 소프트웨어, 예컨대 BLAST, BLAST-2, ALIGN 또는 Megalign(DNASTAR)

소프트웨어를 이용하여 공지된 다양한 방법으로 달성될 수 있다. 비교될 서열의 전장에 대해 최대 정렬을 달성하는 데 필요한 임의의 알고리즘을 포함하여, 서열을 정렬하기 위한 적절한 파라미터가 결정될 수 있다.

- [1100] 일부 구현예에서, "작동 가능하게 연결된(operably linked)"은 적절한 분자(예를 들어, 전사 활성제 단백질)가 조절 서열에 결합될 때 유전자 발현을 가능하게 하는 방식으로 DNA 서열과 같은 구성 요소, 예를 들어 이중 핵산 및 조절 서열(들)의 결합을 포함할 수 있다. 따라서, 이는 설명된 구성 요소가 의도된 방식으로 기능하게 하는 관계에 있음을 의미한다.
- [1101] 아미노산 치환은 폴리펩티드 내 하나의 아미노산을 또 다른 아미노산으로 교체하는 것을 포함할 수 있다. 치환은 보존적 아미노산 치환 또는 비보존적 아미노산 치환일 수 있다. 아미노산 치환이, 관심 결합 분자, 예를 들어 항체 및 원하는 활성, 예를 들어, 보유/개선된 항원 결합, 감소된 면역원성 또는 개선된 ADCC 또는 CDC에 대해 스크리닝된 생성물 내로 도입될 수 있다.
- [1102] 아미노산은 하기의 공통적인 측쇄 특성에 따라 일반적으로 그룹화될 수 있다:
- [1103] (1) 소수성: 노르루신(Norleucine), Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- [1104] (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- [1105] (3) 산성: Asp, Glu;
- [1106] (4) 염기성: His, Lys, Arg;
- [1107] (5) 사슬 배향에 영향을 미치는 잔기: Gly, Pro;
- [1108] (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.
- [1109] 일부 구현예에서, 보존적 치환은 상기 클래스 중 하나의 멤버를 동일한 클래스의 또 다른 멤버로의 교환을 수반할 수 있다. 일부 구현예에서, 비보존적 아미노산 치환은 상기 클래스 중 하나의 멤버를 또 다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 수 있다.
- [1110] 여기에 사용된 바와 같이, 조성물은 세포를 포함하여 2 개 이상의 생성물, 물질 또는 화합물의 임의의 혼합물을 지칭한다. 이는 용액, 현탁액, 액체, 분말, 페이스트, 수성, 비-수성 또는 이의 임의의 조합물일 수 있다.
- [1111] 여기에 사용된 바와 같이, "대상체(subject)"는 인간 또는 다른 동물과 같은 포유류이며, 전형적으로 인간이다.
- [1112] **VIII. 예시적인 구현예**
- [1113] 제공된 구현예 중에 하기가 있다:
- [1114] 1. 변형된 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형-2(transforming growth factor-beta receptor type-2, *TGFBR2*) 유전자 좌를 포함하는 유전자 조작된 T 세포로, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 전이 유전자 서열을 포함한다.
- [1115] 2. 구현예 1에서, 상기 전이 유전자 서열이, 선택적으로 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에 통합되었다.
- [1116] 3. 구현예 1 또는 구현예 2에서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 기능성 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화하지 않는다.
- [1117] 4. 구현예 1-3 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 TGFBRII 폴리펩티드의 발현이 제거된다.
- [1118] 5. 구현예 1-3 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 전장 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 부분적인 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화한다.
- [1119] 6. 구현예 1-3 및 5 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 우성 음성 TGFBRII 폴리펩티드를 암호화한다.
- [1120] 7. 구현예 1-3, 5 및 6 중 어느 하나에 있어서, 상기 암호화된 TGFBRII 폴리펩티드는, 서열 번호: 59의 22-191 잔기 또는 서열 번호: 60의 22-216 잔기에 대응하는 아미노산 서열 또는 서열 번호: 59의 22-191 잔기 또는 서열 번호: 60의 22-216 잔기에 대응하는 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열 또는 이의 단편을 포함한다.

- [1121] 8. 구현에 1-3 및 5-7 중 어느 하나에 있어서, 상기 전이 유전자 서열은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 엑손 또는 이의 부분 서열과 인-프레임(in-frame)이다.
- [1122] 9. 구현에 1-8 중 어느 하나에 있어서, 상기 전이 유전자 서열은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 1의 하류 및 엑손 6의 상류에 존재한다.
- [1123] 10. 구현에 1-9 중 어느 하나에 있어서, 상기 전이 유전자 서열은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 엑손 4의 하류 및 엑손 6의 상류에 존재한다.
- [1124] 11. 구현에 1-10 중 어느 하나에 있어서, 상기 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(TCR)이거나 이를 포함한다.
- [1125] 12. 구현에 1-11 중 어느 하나에 있어서, 상기 재조합 수용체는 재조합 TCR이고, 상기 전이 유전자 서열은 TCR 알파(TCR α) 사슬, TCR 베타(TCR β) 사슬 또는 둘 다를 암호화한다.
- [1126] 13. 구현에 1-10 중 어느 하나에 있어서, 상기 재조합 수용체는 기능성 비-T 세포 수용체(non-TCR) 항원 수용체이거나 이를 포함한다.
- [1127] 14. 구현에 1-10 및 13 중 어느 하나에 있어서, 상기 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(chimeric antigen receptor, CAR)이다.
- [1128] 15. 구현에 14에 있어서, 상기 CAR은 세포 외 영역, 막관통 도메인 및 세포 내 영역을 포함한다.
- [1129] 16. 구현에 15에 있어서, 상기 세포 외 영역은 결합 도메인을 포함한다.
- [1130] 17. 구현에 16에 있어서, 상기 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이거나 이를 포함한다.
- [1131] 18. 구현에 16 및 구현에 17에 있어서, 상기 결합 도메인은 질병, 장애 또는 병태의 세포 또는 조직과 연관된, 이에 특이적인 또는 이의 상에 발현된 표적 항원에 결합할 수 있다.
- [1132] 19. 구현에 18에 있어서, 상기 표적 항원은 종양 항원이다.
- [1133] 20. 구현에 18 또는 구현에 19에 있어서, 상기 표적 항원은, αvβ6 인테그린(αvβ6 integrin), B세포 성숙 항원(B cell maturation antigen, BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 탈수 효소 9(CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로 공지), 암 고환 항원, 암/고환 항원 1B(CTAG, 또한 NY-ESO-1 및 LAGE-2로 공지), 암배아 항원(carcinoembryonic antigen, CEA), 사이클린, 사이클린 A2, C-C 모티프 케모카인 리간드 1(CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸 4(chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4), 표피 성장 인자 단백질(epidermal growth factor protein, EGFR), 유형 III 표피 성장 인자 수용체 돌연변이(EGFR vIII), 표피 당단백질 2(EPG-2), 표피 당단백질 40(EPG-40), 에프린B2, 에프린 수용체 A2(EPhA2), 에스트로젠 수용체, Fc 수용체 유사 5(FCRL5; Fc 수용체 상동물 5 또는 FCRH5로도 공지), 태아 아세틸콜린 수용체(태아 AchR), 엽산 결합 단백질(folate binding protein, FBP), 엽산 수용체 알파, 강글리오사이드 GD2, 0-아세틸화 GD2(OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백질 100(gp100), 글리피칸-3(GPC3), G 단백질 결합 수용체 C 클래스 5 그룹 D 멤버(GPRC5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나제 erb-B2), Her3(erb-B3), Her4(erb-B4), erbB 2량체, 인간 고분자량 흑색종 관련 항원(Human high molecular weight-melanoma-associated antigen, HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1(Human leukocyte antigen A1, HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22R α), IL-13 수용체 알파 2(IL-13R α2), 키나제 삽입 도메인 수용체(kinase insert domain receptor, kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자(L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 8 패밀리 멤버 A를 함유하는 루신 리치 반복(Leucine Rich Repeat Containing 8 Family Member A, LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종 관련 항원(Melanoma-associated antigen, MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, 메소텔린(MSLN), c-Met, 뮤린 시토메갈로 바이러스(cytomegalovirus, CMV), 뮤신 1(MUC1), MUC16, 천연 킬러 2 그룹 D 멤버(natural killer group 2 member D, NKG2D) 리간드, 멜란 A(MART-1), 신경 세포 부착 분자(neural cell adhesion molecule, NCAM), 종양태아성 항원, 흑색종 우선 발현 항원(PRAME), 프로케스트론 수용체, 전립선 특이적 항원, 전립선 줄기 세포 항원(prostate stem cell antigen, PSCA), 전립선 특이적 막 항원(prostate specific membrane antigen, PSMA), 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1), 서바이빈(survivin), 영양막 당단백질(TPBG, 또한 5T4로 공지), 종양 관련 당단백질 72(tumor-associated glycoprotein 72, TAG72), 티로시나제 관련 단백질 1(TRP1, 또한 TYRP1 또는 gp75로 공지), 티로시나제 관련 단백질 2(TRP2, 또한 도파크롬 타우토메라제, 도파크롬 델타 이성화 효소 또는 DCT로

공지), 혈관 내피 성장 인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 빌름스 종양 1(Wilms Tumor 1, WT-1), 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원 또는 범용 태그 관련 항원 및/또는 비오틴화 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체 발현 분자 중에서 선택된다.

- [1134] 21. 구현예 15-20 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포 외 영역은 스페이서를 포함하고, 선택적으로 여기서 상기 스페이서는 결합 도메인과 막관통 도메인 사이에서 작동 가능하게 연결된다.
- [1135] 22. 구현예 21에 있어서, 상기 스페이서는 면역 글로불린 힌지 영역을 포함한다.
- [1136] 23. 구현예 21 또는 구현예 22에 있어서, 상기 스페이서는 C<sub>H</sub>2 영역 및 C<sub>H</sub>3 영역을 포함한다.
- [1137] 24. 구현예 15-23 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포 내 영역은 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다.
- [1138] 25. 구현예 24에 있어서, 상기 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3 사슬, 선택적으로 CD3-제타(CD3 $\zeta$ ) 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분이거나 이를 포함한다.
- [1139] 26. 구현예 24 또는 구현예 25에 있어서, 상기 세포 내 영역은 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들)을 포함한다.
- [1140] 27. 구현예 26에 있어서, 상기 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인은 CD28, 4-1BB 또는 ICOS의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분을 포함한다.
- [1141] 28. 구현예 26 또는 구현예 27에 있어서, 상기 공자극 신호 전달 영역은 4-1BB의 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다.
- [1142] 29. 구현예 16-28 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, N 말단에서 C 말단 순서로: 세포 외 결합 도메인, 스페이서, 막관통 도메인 및 세포 내 신호 전달 영역을 포함하는 재조합 수용체를 암호화한다.
- [1143] 30. 구현예 1-10 및 13-29 중 어느 하나에 있어서,
- [1144] 상기 전이 유전자 서열은, 세포 외 결합 도메인, 선택적으로 scFv; 선택적으로 인간 면역 글로불린 힌지, 선택적으로 IgG1, IgG2 또는 IgG4 또는 이의 변형된 버전 유래 서열을 포함하고, 선택적으로 C<sub>H</sub>2 영역 및/또는 C<sub>H</sub>3 영역을 더 포함하는, 스페이서; 및 선택적으로 인간 CD28 유래 막관통 도메인; 선택적으로 인간 4-1BB 유래 공자극 신호 전달 도메인; 및 세포 내 신호 전달 영역, 선택적으로 CD3 $\zeta$  사슬 또는 이의 일부;를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 순서로 포함하고/거나;
- [1145] 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 세포 외 결합 도메인, 선택적으로 scFv; 선택적으로 인간 면역 글로불린 힌지, 선택적으로 IgG1, IgG2 또는 IgG4 또는 이의 변형된 버전 유래 서열을 포함하고, 선택적으로 C<sub>H</sub>2 영역 및/또는 C<sub>H</sub>3 영역을 더 포함하는, 스페이서; 및 선택적으로 인간 CD28 유래 막관통 도메인; 선택적으로 인간 4-1BB 유래 공자극 신호 전달 도메인; 및 세포 내 신호 전달 영역, 선택적으로 CD3 $\zeta$  사슬 또는 이의 일부;를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 순서로 포함한다.
- [1146] 31. 구현예 14-30 중 어느 하나에 있어서, 상기 CAR은 다중 사슬 CAR이다.
- [1147] 32. 구현예 1-30 중 어느 하나에 있어서, 상기 전이 유전자 서열은 하나 이상의 추가 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [1148] 33. 구현예 1-32 중 어느 하나에 있어서, 상기 전이 유전자 서열은 하나 이상의 다중 시스템 요소(들)를 포함한다.
- [1149] 34. 구현예 33에 있어서, 상기 하나 이상의 다중 시스템 요소는, CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 하나 이상의 추가 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다.
- [1150] 35. 구현예 32-34 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 단백질은 대리 마커이고, 선택적으로 여기서 상기 대리 마커는 절단된 수용체이며, 선택적으로 여기서 상기 절단된 수용체는 세포 내 신호 전달 도메인이 결합되고/거나 리간드가 결합할 경우 세포 내 신호 전달을 매개할 수 없다.
- [1151] 36. 구현예 33에 있어서, 상기 재조합 수용체는 재조합 TCR이고, 상기 다중 시스템 요소는 TCR  $\alpha$ 를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 TCR  $\beta$ 를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다.

- [1152] 37. 구현에 33에 있어서, 상기 제조합 수용체는 다중 사슬 CAR이고, 상기 다중 시스트론 요소는 다중 사슬 CAR 중 하나의 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 다중 사슬 CAR의 또 다른 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다.
- [1153] 38. 구현에 33-37 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)는 제조합 수용체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 상류에 존재한다.
- [1154] 39. 구현에 33-38 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소는 리보솜 건너뛰기 서열이거나 이를 포함하고, 선택적으로 여기서 상기 리보솜 건너뛰기 서열은 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 요소이다.
- [1155] 40. 구현에 1-39 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 제조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열의 발현을 제어하도록 작동 가능하게 연결된 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 프로모터 및/또는 조절 또는 제어 요소를 포함한다.
- [1156] 41. 구현에 1-39 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 유전자 좌는 제조합 수용체를 암호화하는 핵산 서열의 발현을 제어하도록 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 이중 조절 또는 제어 요소(들)를 포함한다.
- [1157] 42. 구현에 41에 있어서, 상기 하나 이상의 이중 조절 또는 제어 요소는 이중 프로모터, 인핸서(enhancer), 인트론, 폴리아데닐화 신호, 코작 컨센서스 서열(Kozak consensus sequence), 스플라이스 수용체 서열 또는 스플라이스 공여체 서열을 포함한다.
- [1158] 43. 구현에 42에 있어서, 상기 이중 프로모터는 인간 신장 인자 1 알파(elongation factor 1 alpha, EF1 $\alpha$ ) 프로모터 또는 MND 프로모터 또는 이의 변이체이거나 이를 포함한다.
- [1159] 44. 구현에 1-44 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포는 대상체에서 유래된 1차 T 세포이고, 선택적으로 여기서 상기 대상체는 인간이다.
- [1160] 45. 구현에 1-44 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포는 CD8+ T 세포 또는 이의 하위 유형이다.
- [1161] 46. 구현에 1-44 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포는 CD4+ T 세포 또는 이의 하위 유형이다.
- [1162] 47. 구현에 1-46 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포는 다분화능 또는 다능성 세포에서 유래되고, 이는 선택적으로 iPSC이다.
- [1163] 48. 폴리뉴클레오티드로서,
- [1164] (a) 제조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열; 및
- [1165] (b) 상기 핵산 서열에 연결된 하나 이상의 상동성 암(들) - 여기서 상기 하나 이상의 상동성 암(들)은 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형 2(*TGFBR2*) 유전자 좌의 개방형 관독 프레임의 하나 이상의 영역(들)에 대해 상동성 서열을 포함함 - ;
- [1166] 을 포함한다.
- [1167] 49. 구현에 48에 있어서, 상기 제조합 수용체 또는 이의 일부는, 상기 제조합 수용체가 폴리뉴클레오티드로 도입된 세포에서 발현될 경우 상기 제조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌에 의해 암호화된다.
- [1168] 50. 구현에 48 또는 구현에 49에 있어서, (a)의 핵산 서열은 T 세포, 선택적으로 인간 T 세포의 내인성 계놈 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 관독 프레임에 대해 외인성 또는 이중인 서열이다.
- [1169] 51. 구현에 48-50 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 상동성 암(들)은 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 관독 프레임의 하나 이상의 인트론 또는 하나 이상의 엑손을 포함한다.
- [1170] 52. 구현에 48-51 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 폴리뉴클레오티드가 도입된 세포에서 기능성 TGFBR<sub>II</sub> 폴리펩티드를 암호화하지 않는다.
- [1171] 53. 구현에 48-52 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 폴리뉴클레오티드가 도입된 세포에서 TGFBR<sub>II</sub> 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 TGFBR<sub>II</sub> 폴리펩티드의 발현이 제거된다.
- [1172] 54. 구현에 48-52 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 폴리뉴클레오티드가 도입된 세포에서 전장 TGFBR<sub>II</sub> 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 부분적인 TGFBR<sub>II</sub> 폴리펩티드를 암호화한다.

- [1173] 55. 구현예 48-52 및 54 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 폴리뉴클레오티드가 도입된 세포에서 우성 음성 *TGFBR2* 폴리펩티드를 암호화한다.
- [1174] 56. 구현예 48-52, 54 및 55 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 세포에서 암호화된 *TGFBR2* 폴리펩티드는, 서열 번호: 59의 22-191 잔기 또는 서열 번호: 60의 22-216 잔기에 대응하는 아미노산 서열 또는 서열 번호: 59의 22-191 잔기 또는 서열 번호: 60의 22-216 잔기에 대응하는 아미노산 서열 또는 이의 단편에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열을 포함한다.
- [1175] 57. 구현예 48-52 및 54-56 중 어느 하나에 있어서, 상기 (a)의 핵산 서열은 하나 이상의 상동성 암(들)에 포함된 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 엑손과 인-프레임이다.
- [1176] 58. 구현예 48-57 중 어느 하나에 있어서, 상기 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 영역(들)은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 중 엑손 1의 하류에 있는 서열이거나 이를 포함한다.
- [1177] 59. 구현예 48-58 중 어느 하나에 있어서, 상기 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 영역(들)은 *TGFBR2* 유전자 좌의 개방형 판독 프레임 중 엑손 4의 적어도 일부 또는 엑손 4의 하류를 포함하는 서열이거나 이를 포함한다.
- [1178] 60. 구현예 48-59 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 상동성 암은 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암을 포함한다.
- [1179] 61. 구현예 60에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 [5' 상동성 암]-[(a)의 핵산 서열]-[3' 상동성 암] 구조를 포함한다.
- [1180] 62. 구현예 60 또는 구현예 61에 있어서, 상기 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로, (약) 50 내지 (약) 2000 개의 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 750 개의 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 600 개의 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 400 개의 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 300 개의 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 200 개의 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 750 개의 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 600 개의 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 400 개의 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 300 개의 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 750 개의 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 600 개의 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 400 개의 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 750 개의 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 600 개의 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 750 개의 뉴클레오티드 또는 (약) 750 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드 길이이다.
- [1181] 63. 구현예 60-62 중 어느 하나에 있어서, 상기 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 200, 300, 400, 500, 600, 700 또는 800 개의 뉴클레오티드 길이 또는 상기 중 임의의 사이의 임의의 수치이다.
- [1182] 64. 구현예 60-63 중 어느 하나에 있어서, 상기 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 300 개의 뉴클레오티드 길이를 초과하고, 선택적으로 여기서 상기 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 400, 500 또는 600 개의 뉴클레오티드 길이이거나 또는 상기 중 임의의 사이의 임의의 수치이다.
- [1183] 65. 구현예 60-64 중 어느 하나에 있어서, 상기 5' 상동성 암은, 서열 번호: 69-71에 제시된 서열 또는 서열 번호: 69-71에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열 또는 이의 부분 서열을 포함한다.
- [1184] 66. 구현예 60-65 중 어느 하나에 있어서, 상기 3' 상동성 암은, 서열 번호: 72에 제시된 서열 또는 서열 번호: 72에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열 또는 이의 부분 서열을 포함한다.
- [1185] 67. 구현예 48-66 중 어느 하나에 있어서, 상기 암호화된 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(TCR)이거나 이를 포함한다.
- [1186] 68. 구현예 48-67 중 어느 하나에 있어서, 상기 암호화된 재조합 수용체는 재조합 TCR이고, (a)의 핵산 서열은 TCR 알파(TCR  $\alpha$ ) 사슬, TCR 베타(TCR  $\beta$ ) 사슬 또는 둘 다를 암호화한다.
- [1187] 69. 구현예 48-66 중 어느 하나에 있어서, 상기 암호화된 재조합 수용체는 기능성 비-T 세포 수용체(non-TCR) 항원 수용체이거나 이를 포함한다.

- [1188] 70. 구현예 48-66 및 69 중 어느 하나에 있어서, 상기 암호화된 제조합 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다.
- [1189] 71. 구현예 70에 있어서, 상기 CAR은 세포 외 영역, 막관통 도메인 및 세포 내 영역을 포함한다.
- [1190] 72. 구현예 71에 있어서, 상기 세포 외 영역은 결합 도메인을 포함한다.
- [1191] 73. 구현예 72에 있어서, 상기 결합 도메인은 항체 또는 이의 항원 결합 단편이거나 이를 포함한다.
- [1192] 74. 구현예 72 및 구현예 73에 있어서, 상기 결합 도메인은 질병, 장애 또는 병태의 세포 또는 조직과 연관된, 이에 특이적인 또는 이의 상에 발현된 표적 항원에 결합할 수 있다.
- [1193] 75. 구현예 74에 있어서, 상기 표적 항원은 종양 항원이다.
- [1194] 76. 구현예 74 또는 구현예 75에 있어서, 상기 표적 항원은,  $\alpha\beta6$  인테그린( $\alpha\beta6$  integrin), B세포 성숙 항원(B cell maturation antigen, BCMA), B7-H3, B7-H6, 탄산 탈수 효소 9(CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로 공지), 암 고환 항원, 암/고환 항원 1B(CTAG, 또한 NY-ESO-1 및 LAGE-2로 공지), 암배아 항원(carcinoembryonic antigen, CEA), 사이클린, 사이클린 A2, C-C 모티프 케모카인 리간드 1(CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD133, CD138, CD171, 콘드로이틴 황산염 프로테오글리칸 4(chondroitin sulfate proteoglycan 4, CSPG4), 표피 성장 인자 단백질(epidermal growth factor protein, EGFR), 유형 III 표피 성장 인자 수용체 돌연변이(EGFR vIII), 표피 당단백질 2(EPG-2), 표피 당단백질 40(EPG-40), 에프린B2, 에프린 수용체 A2(EPha2), 에스트로겐 수용체, Fc 수용체 유사 5(FCRL5; Fc 수용체 상동물 5 또는 FCRH5로도 공지), 태아 아세틸콜린 수용체(태아 AchR), 엽산 결합 단백질(folate binding protein, FBP), 엽산 수용체 알파, 강글리오사이드 GD2, O-아세틸화 GD2(OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백질 100(gp100), 글리피칸-3(GPC3), G 단백질 결합 수용체 C 클래스 5 그룹 D 멤버(GPRC5D), Her2/neu(수용체 티로신 키나제 erb-B2), Her3(erb-B3), Her4(erb-B4), erbB 2량체, 인간 고분자량 흑색종 관련 항원(Human high molecular weight-melanoma-associated antigen, HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1(Human leukocyte antigen A1, HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2(HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22R $\alpha$ ), IL-13 수용체 알파 2(IL-13R $\alpha$ 2), 키나제 삽입 도메인 수용체(kinase insert domain receptor, kdr), 카파 경쇄, L1 세포 부착 분자(L1-CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 8 패밀리를 포함하는 루신 리치 반복(Leucine Rich Repeat Containing 8 Family Member A, LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종 관련 항원(Melanoma-associated antigen, MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, MAGE-A10, 메소텔린(MSLN), c-Met, 뮤린 시토메갈로 바이러스(cytomegalovirus, CMV), 뮤신 1(MUC1), MUC16, 천연 킬러 2 그룹 D 멤버(natural killer group 2 member D, NKG2D) 리간드, 멜란 A(MART-1), 신경 세포 부착 분자(neural cell adhesion molecule, NCAM), 종양태아성 항원, 흑색종 우선 발현 항원(PRAME), 프로게스트론 수용체, 전립선 특이적 항원, 전립선 줄기 세포 항원(prostate stem cell antigen, PSCA), 전립선 특이적 막 항원(prostate specific membrane antigen, PSMA), 수용체 티로신 키나제 유사 고아 수용체 1(ROR1), 서바이빈(survivin), 영양막 당단백질(TPBG, 또한 5T4로 공지), 종양 관련 당단백질 72(tumor-associated glycoprotein 72, TAG72), 티로시나제 관련 단백질 1(TRP1, 또한 TYRP1 또는 gp75로 공지), 티로시나제 관련 단백질 2(TRP2, 또한 도파크롬 타우토메라제, 도파크롬 델타 이성화 효소 또는 DCT로 공지), 혈관 내피 성장 인자 수용체(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2(VEGFR2), 빌름스 종양 1(Wilms Tumor 1, WT-1), 병원체 특이적 또는 병원체 발현 항원 또는 범용 태그 관련 항원 및/또는 비오틴화 분자 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체 발현 분자 중에서 선택된다.
- [1195] 77. 구현예 71-76 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포 외 영역은 스페이서를 포함하고, 선택적으로 여기서 상기 스페이서는 결합 도메인과 막관통 도메인 사이에서 작동 가능하게 연결된다.
- [1196] 78. 구현예 77에 있어서, 상기 스페이서는 면역 글로불린 힌지 영역을 포함한다.
- [1197] 79. 구현예 77 또는 구현예 78에 있어서, 상기 스페이서는 C $\mu$ 2 영역 및 C $\mu$ 3 영역을 포함한다.
- [1198] 80. 구현예 71-79 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포 내 영역은 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다.
- [1199] 81. 구현예 71-80 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3 사슬, 선택적으로 CD3-제타(CD3 $\zeta$ ) 사슬의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분이거나 이를 포함한다.
- [1200] 82. 구현예 71-81 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포 내 영역은 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인(들)을 포함한다.

- [1201] 83. 구현예 82에 있어서, 상기 하나 이상의 공자극 신호 전달 도메인은 CD28, 4-1BB 또는 ICOS의 세포 내 신호 전달 도메인 또는 이의 신호 전달 부분을 포함한다.
- [1202] 84. 구현예 82 또는 구현예 83에 있어서, 상기 공자극 신호 전달 영역은 4-1BB의 세포 내 신호 전달 도메인을 포함한다.
- [1203] 85. 구현예 72-84 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, N 말단에서 C 말단 순서로: 세포 외 결합 도메인, 스페이서, 막관통 도메인 및 세포 내 신호 전달 영역을 포함하는 재조합 수용체를 암호화한다.
- [1204] 86. 구현예 48-66 및 68-85 중 어느 하나에 있어서,
- [1205] 상기 전이 유전자 서열은, 세포 외 결합 도메인, 선택적으로 scFv; 선택적으로 인간 면역 글로블린 힌지, 선택적으로 IgG1, IgG2 또는 IgG4 또는 이의 변형된 버전 유래 서열을 포함하고, 선택적으로 C<sub>H</sub>2 영역 및/또는 C<sub>H</sub>3 영역을 더 포함하는, 스페이서; 및 선택적으로 인간 CD28 유래 막관통 도메인; 선택적으로 인간 4-1BB 유래 공자극 신호 전달 도메인; 및 세포 내 신호 전달 영역, 선택적으로 CD3 ζ 사슬 또는 이의 일부;를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 순서로 포함한다.
- [1206] 87. 구현예 70-86 중 어느 하나에 있어서, 상기 CAR은 다중 사슬 CAR이다.
- [1207] 88. 구현예 48-87 중 어느 하나에 있어서, (a)의 상기 핵산 서열은 하나 이상의 추가 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.
- [1208] 89. 구현예 48-88 중 어느 하나에 있어서, (a)의 상기 핵산 서열은 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)를 포함한다.
- [1209] 90. 구현예 89에 있어서, 상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소는, CAR을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 하나 이상의 추가 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다.
- [1210] 91. 구현예 88-90 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 추가 단백질은 대리 마커이고, 선택적으로 여기서 상기 대리 마커는 절단된 수용체이며, 선택적으로 여기서 상기 절단된 수용체는 세포 내 신호 전달 도메인이 결합되고/거나 리간드가 결합할 경우 세포 내 신호 전달을 매개할 수 없다.
- [1211] 92. 구현예 89에 있어서, 상기 재조합 수용체는 재조합 TCR이고, 상기 다중 시스트론 요소는 TCR α를 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 TCR β를 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다.
- [1212] 93. 구현예 89에 있어서, 상기 재조합 수용체는 다중 사슬 CAR이고, 상기 다중 시스트론 요소는 다중 사슬 CAR 중 하나의 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열과 다중 사슬 CAR의 또 다른 사슬을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다.
- [1213] 94. 구현예 89-93 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소(들)는 재조합 수용체를 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 상류에 존재한다.
- [1214] 95. 구현예 89-94 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 다중 시스트론 요소는 리보솜 건너뛰기 서열이거나 이를 포함하고, 선택적으로 여기서 상기 리보솜 건너뛰기 서열은 T2A, P2A, E2A 또는 F2A 요소이다.
- [1215] 96. 구현예 48-95 중 어느 하나에 있어서, (a)의 상기 핵산 서열은, 상기 폴리뉴클레오티드가 도입된 세포에서 발현될 경우, 재조합 수용체의 발현을 제어하도록 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 이중 또는 조절 제어 요소(들)를 포함한다.
- [1216] 97. 구현예 96에 있어서, 상기 하나 이상의 이중 조절 또는 제어 요소는 이중 프로모터, 인핸서, 인트론, 폴리 아데닐화 신호, 코작 킨센서스 서열, 스플라이스 수용체 서열 및/또는 스플라이스 공여체 서열을 포함한다.
- [1217] 98. 구현예 97에 있어서, 상기 이중 프로모터는 인간 신장 인자 1 알파(EF1α) 프로모터 또는 MND 프로모터 또는 이의 변이체이거나 이를 포함한다.
- [1218] 99. 구현예 48-98 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 바이러스 벡터에 포함된다.
- [1219] 100. 구현예 99에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 AAV 벡터이다.
- [1220] 101. 구현예 100에 있어서, 상기 AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 또는 AAV8 벡터 중에서 선택된다.

- [1221] 102. 구현예 100 또는 구현예 101에 있어서, 상기 AAV 벡터는 AAV2 또는 AAV6 벡터이다.
- [1222] 103. 구현예 99에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 선택적으로 렌티바이러스 벡터이다.
- [1223] 104. 구현예 48-98 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 선형 폴리뉴클레오티드, 선택적으로 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드이다.
- [1224] 105. 구현예 48-104 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 (약) 2500, 2750, 3000, 3250, 3500, 3750, 4000, 4250, 4500, 4760, 5000, 5250, 5500, 5750, 6000, 7000, 7500, 8000, 9000 또는 10000 개 이상의 뉴클레오티드 길이이거나 또는 상기 중 임의의 사이의 임의의 수치이다.
- [1225] 106. 구현예 48-105 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 (약) 2500 내지 (약) 5000 개의 뉴클레오티드, (약) 3500 내지 (약) 4500 개의 뉴클레오티드 또는 (약) 3750 개의 뉴클레오티드 내지 (약) 4250 개의 뉴클레오티드 길이이다.
- [1226] 107. 유전자 조작된 T 세포 생산 방법으로서, 상기 방법은 구현예 48-106 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드를 *TGFBR2* 유전자 좌에서 유전자 파괴를 포함하는 T 세포 내로 도입시키는 단계를 포함한다.
- [1227] 108. 유전자 조작된 T 세포 생산 방법으로서, 상기 방법은:
  - [1228] (a) T 세포의 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에서 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)를 T 세포 내로 도입하는 단계; 및
  - [1229] (b) *TGFBR2* 유전자 좌에서 유전자 파괴를 포함하는 T 세포 내로 구현예 48-106 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드를 도입하는 단계;
- [1230] 를 포함하고, 여기서 상기 방법은 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 생성하며, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.
- [1231] 109. 구현예 108에 있어서, 상기 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열이 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내에 통합된다.
- [1232] 110. 유전자 조작된 T 세포 생산 방법으로서, 상기 방법은 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 T 세포 내로 도입하는 단계를 포함하고, 상기 T 세포는 T 세포의 *TGFBR2* 유전자 좌 내에 유전자 파괴를 가지며, 여기서 상기 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열이 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내에 통합된다.
- [1233] 111. 구현예 107 또는 구현예 110에 있어서, 상기 유전자 파괴는, T 세포의 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들)를 T 세포 내로 도입함으로써 수행된다.
- [1234] 112. 구현예 107-111 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌를 생성하고, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.
- [1235] 113. 구현예 110-112 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 핵산 서열에 연결된 하나 이상의 상동성 암(들)을 더 포함하고, 여기서 상기 하나 이상의 상동성 암(들)은 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 유형 2(*TGFBR2*) 유전자 좌의 개방형 판독 프레임의 하나 이상의 영역(들)에 상동성인 서열을 포함한다.
- [1236] 114. 구현예 110-113 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 상기 방법에 의해 생성된 세포에서 기능성 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화하지 않는다.
- [1237] 115. 구현예 110-114 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 상기 방법에 의해 생성된 세포에서 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 TGFBR1I 폴리펩티드의 발현이 제거된다.
- [1238] 116. 구현예 110-114 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 상기 방법에 의해 생성된 세포에서 전장 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화하지 않거나 부분적인 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화한다.
- [1239] 117. 구현예 110-114 및 116 중 어느 하나에 있어서, 상기 변형된 *TGFBR2* 유전자 좌는, 상기 방법에 의해 생성된 세포에서 우성 음성 TGFBR1I 폴리펩티드를 암호화한다.
- [1240] 118. 구현예 113-117 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 상동성 암은 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암을 포함한다.

- [1241] 119. 구현예 118에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 [5' 상동성 암]-[재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열]-[3' 상동성 암] 구조를 포함한다.
- [1242] 120. 구현예 118 또는 구현예 119에 있어서, 상기 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로, (약) 50 내지 (약) 2000 개의 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 750 개의 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 600 개의 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 400 개의 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 300 개의 뉴클레오티드, (약) 100 내지 (약) 200 개의 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 750 개의 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 600 개의 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 400 개의 뉴클레오티드, (약) 200 내지 (약) 300 개의 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 750 개의 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 600 개의 뉴클레오티드, (약) 300 내지 (약) 400 개의 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 750 개의 뉴클레오티드, (약) 400 내지 (약) 600 개의 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드, (약) 600 내지 (약) 750 개의 뉴클레오티드 또는 (약) 750 내지 (약) 1000 개의 뉴클레오티드 길이이다.
- [1243] 121. 구현예 118-120 중 어느 하나에 있어서, 상기 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 200, 300, 400, 500, 600, 700 또는 800 개의 뉴클레오티드 길이 또는 상기 중 임의의 사이의 임의의 수치이다.
- [1244] 122. 구현예 118-121 중 어느 하나에 있어서, 상기 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 300 개의 뉴클레오티드 길이를 초과하고, 선택적으로 여기서 상기 5' 상동성 암 및 3' 상동성 암은 독립적으로 (약) 400, 500 또는 600 개의 뉴클레오티드 길이어거나 또는 상기 중 임의의 사이의 임의의 수치이다.
- [1245] 123. 구현예 118-122 중 어느 하나에 있어서, 상기 5' 상동성 암은, 서열 번호: 69-71에 제시된 서열 또는 서열 번호: 69-71에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열 또는 이의 부분 서열을 포함한다.
- [1246] 124. 구현예 118-123 중 어느 하나에 있어서, 상기 3' 상동성 암은, 서열 번호: 72에 제시된 서열 또는 서열 번호: 72에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 동일성을 나타내는 서열 또는 이의 부분 서열을 포함한다.
- [1247] 125. 구현예 110-124 중 어느 하나에 있어서, 상기 암호화된 재조합 수용체는 재조합 T 세포 수용체(TCR)이거나 이를 포함한다.
- [1248] 126. 구현예 110-124 중 어느 하나에 있어서, 상기 암호화된 재조합 수용체는 키메라 항원 수용체(CAR)이다.
- [1249] 127. 구현예 108 및 111-126 중 어느 하나에 있어서, 유전자 파괴를 유도할 수 있는 상기 하나 이상의 제제(들)는 표적 부위에 특이적으로 결합하거나 혼성화하는 DNA 결합 단백질 또는 DNA 결합 핵산, DNA 표적화 단백질 및 뉴클레아제를 포함하는 융합 단백질 또는 RNA 가이드 뉴클레아제를 포함하며, 선택적으로 여기서 상기 하나 이상의 제제(들)는 상기 표적 부위에 특이적으로 결합, 인식 또는 혼성화하는 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), TAL-이펙터 뉴클레아제(TALEN) 또는 및 CRISPR-Cas9 조합물을 포함한다.
- [1250] 128. 구현예 108 및 111-127 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 제제(들) 각각이 하나 이상의 표적 부위에 상보적인 표적화 도메인을 갖는 가이드 RNA(gRNA)를 포함한다.
- [1251] 129. 구현예 128에 있어서, 상기 하나 이상의 제제(들)는 gRNA 및 Cas9 단백질을 포함하는 리보핵산단백질(ribonucleoprotein, RNP) 복합체로 도입된다.
- [1252] 130. 구현예 129에 있어서, 상기 RNP는 전기 천공, 입자 총, 인산 칼슘 형질 감염, 세포 압축 또는 압착을 통해, 선택적으로 전기 천공을 통해 도입된다.
- [1253] 131. 구현예 129 또는 구현예 130에 있어서, 상기 RNP의 농도는 (약) 1 M 내지 (약) 5 M이고, 선택적으로 여기서 상기 RNP의 농도는 (약) 2 M이다.
- [1254] 132. 구현예 128-131 중 어느 하나에 있어서, 상기 gRNA는 GUGGAUGACCGGCUAACAG(서열 번호: 73)의 표적화 도메인 서열을 갖는다.
- [1255] 133. 구현예 107-132 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포는 대상체에서 유래된 1차 T 세포이고, 선택적으로 여기서 상기 대상체는 인간이다.
- [1256] 134. 구현예 107-133 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포는 CD8+ T 세포 또는 이의 하위 유형이다.

- [1257] 135. 구현예 107-133 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포는 CD4+ T 세포 또는 이의 하위 유형이다.
- [1258] 136. 구현예 107-135 중 어느 하나에 있어서, 상기 T 세포는 다분화능 또는 다능성 세포에서 유래되고, 이는 선택적으로 iPSC이다.
- [1259] 137. 구현예 110-136 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 바이러스 벡터에 포함된다.
- [1260] 138. 구현예 137에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 AAV 벡터이다.
- [1261] 139. 구현예 138에 있어서, 상기 AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7 또는 AAV8 벡터 중에서 선택된다.
- [1262] 140. 구현예 138 또는 구현예 139에 있어서, 상기 AAV 벡터는 AAV2 또는 AAV6 벡터이다.
- [1263] 141. 구현예 137에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 레트로바이러스 벡터, 선택적으로 렌티바이러스 벡터이다.
- [1264] 142. 구현예 110-136 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 선형 폴리뉴클레오티드, 선택적으로 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 또는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드이다.
- [1265] 143. 구현예 108 및 111-142 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 제제(들) 및 상기 폴리뉴클레오티드는 동시에 또는 순차적으로 어떠한 순서로든 도입된다.
- [1266] 144. 구현예 108 및 111-143 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 제제(들)의 도입 후에 도입된다.
- [1267] 145. 구현예 144에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 제제의 도입 후 즉시 또는 약 30 초, 1 분, 2 분, 3 분, 4 분, 5 분, 6 분, 6 분, 8 분, 9 분, 10 분, 15 분, 20 분, 30 분, 40 분, 50 분, 60 분, 90 분, 2 시간, 3 시간 또는 4 시간 이내에 도입된다.
- [1268] 146. 구현예 108 및 111-141 중 어느 하나에 있어서, 상기 하나 이상의 제제 도입 전에, 상기 방법은 하나 이상의 면역 세포를 자극 또는 활성화하는 조건 하에서 자극제(들)와 상기 세포를 시험관 내에서 인큐베이션하는 것을 포함한다.
- [1269] 147. 구현예 146에 있어서, 상기 자극제(들)는 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체, 선택적으로 항-CD3/항-CD28 비드를 포함하고, 선택적으로 여기서 상기 비드 대 세포의 비율은 (약) 1:1이다.
- [1270] 148. 구현예 146 또는 구현예 147에 있어서, 상기 하나 이상의 제제를 도입하기 전에 상기 하나 이상의 면역 세포에서 상기 자극제(들)를 제거하는 단계를 포함한다.
- [1271] 149. 구현예 108 및 111-148 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법은 상기 하나 이상의 제제의 도입 및/또는 상기 주형 폴리뉴클레오티드의 도입 전, 중 또는 후에 상기 세포를 하나 이상의 재조합 사이토카인과 인큐베이션하는 단계를 더 포함하고, 선택적으로 여기서 상기 하나 이상의 재조합 사이토카인은 IL-2, IL-7 및 IL-15로 이루어진 군에서 선택된다.
- [1272] 150. 구현예 149에 있어서, 상기 하나 이상의 재조합 사이토카인이, (약) 10 U/mL 내지 (약) 200 U/mL, 선택적으로 (약) 50 IU/mL 내지 (약) 100 U/mL 농도의 IL-2; 0.5 ng/mL 내지 50 ng/mL, 선택적으로 (약) 5 ng/mL 내지 (약) 10 ng/mL 농도의 IL-7; 및/또는 0.1 ng/mL 내지 20 ng/mL, 선택적으로 (약) 0.5 ng/mL 내지 (약) 5 ng/mL 농도의 IL-15;에서 선택된 농도로 첨가된다.
- [1273] 151. 구현예 149 또는 구현예 150에 있어서, 상기 인큐베이션은 상기 하나 이상의 제제의 도입 및 상기 주형 폴리뉴클레오티드의 도입 후 최대 또는 약 24 시간, 36 시간, 48 시간, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 21 일, 선택적으로 최대 또는 약 7 일 동안 수행된다.
- [1274] 152. 구현예 107-151 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법에 의해 생성된 복수의 조작된 세포 중 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 또는 90% 이상 또는 초과인 세포가, *TGFBR2* 유전자 좌위 내 하나 이상의 표적 부위의 유전자 파괴를 포함한다.
- [1275] 153. 구현예 107-152 중 어느 하나에 있어서, 상기 방법에 의해 생성된 복수의 조작된 세포 중 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80% 또는 90% 이상 또는 초과인 세포가, 재조합 수용체 또는 이의 항원 결합 단편을 발현한다.

- [1276] 154. 구현예 107-153 중 어느 하나의 방법을 사용하여 생성된 조작된 T 세포 또는 복수의 조작된 T 세포.
- [1277] 155. 구현예 1-47 및 154 중 어느 하나의 조작된 T 세포를 포함하는, 조성물.
- [1278] 156. 구현예 1-47 및 154 중 어느 하나의 복수의 조작된 T 세포를 포함하는, 조성물.
- [1279] 157. 구현예 155 또는 구현예 156에 있어서, 상기 조성물은 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포를 포함한다.
- [1280] 158. 구현예 155-157 중 어느 하나에 있어서, 상기 조성물은 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 포함하고, CD4+ 대 CD8+ T 세포의 비율은 (약) 1:3 내지 3:1, 선택적으로 1:1이다.
- [1281] 159. 구현예 155-158 중 어느 하나에 있어서, 상기 재조합 수용체를 발현하는 세포가, 조성물 내 총 세포 또는 조성물 내 총 CD4+ 또는 CD8+ 세포 중 적어도 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상을 구성한다.
- [1282] 160. 구현예 1-47 및 154-159 중 어느 하나의 조작된 세포, 복수의 조작된 세포 또는 조성물을 질병 또는 장애를 앓는 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 치료 방법.
- [1283] 161. 질병 또는 장애를 치료하기 위한 구현예 1-47 및 154-159 중 어느 하나의 조작된 세포, 복수의 조작된 세포 또는 조성물의 용도.
- [1284] 162. 질병 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조에서 구현예 1-47 및 154-159 중 어느 하나의 조작된 세포, 복수의 조작된 세포 또는 조성물의 용도.
- [1285] 163. 질병 또는 장애의 치료에 사용하기 위한 구현예 1-47 및 154-159 중 어느 하나의 조작된 세포, 복수의 조작된 세포 또는 조성물.
- [1286] 164. 구현예 160-163 중 어느 하나에 사용하기 위한 방법, 용도 또는 조작된 세포, 복수의 조작된 세포 또는 조성물로서, 여기서 상기 질병 또는 장애는 암 또는 종양이다.
- [1287] 165. 구현예 164에 있어서, 상기 암 또는 종양은 혈액암, 선택적으로 림프종, 백혈병 또는 혈장 세포 악성 종양이다.
- [1288] 166. 구현예 164 또는 구현예 165에 있어서, 상기 암은 림프종이고, 상기 림프종은 버킷 림프종(Burkitt's lymphoma), 비호지킨 림프종(non-Hodgkin's lymphoma, NHL), 호지킨 림프종, 발덴스트롬 고분자글로불린혈증(Waldenstrom macroglobulinemia), 여포성 림프종, 작은 비절단 세포 림프종, 점막-관련 림프 조직 림프종(mucosa-associated lymphatic tissue lymphoma, MALT), 변연부 림프종, 비장 림프종, 결절성 단핵구 B 세포 림프종, 면역 모세포 림프종, 거대 세포 림프종, 확산 혼합 세포 림프종, 폐 B 세포 혈관 중심 림프종, 작은 림프구성 림프종, 1 차 종격동 B 세포 림프종, 림프구 형질세포 림프종(lymphoplasmacytic lymphoma, LPL) 또는 맨틀 세포 림프종(mantle cell lymphoma, MCL)이다.
- [1289] 167. 구현예 164 또는 구현예 165에 있어서, 상기 암은 백혈병이고, 상기 백혈병은 만성 림프구성 백혈병(chronic lymphocytic leukemia, CLL), 형질 세포성 백혈병 또는 급성 림프구성 백혈병(acute lymphocytic leukemia, ALL)이다.
- [1290] 168. 구현예 164 또는 구현예 165에 있어서, 상기 암은 혈장 세포 악성 종양이고, 상기 혈장 세포 악성 종양은 다발성 골수종(multiple myeloma, MM)이다.
- [1291] 169. 구현예 164에 있어서, 상기 종양은 고형 종양이다.
- [1292] 170. 구현예 169에 있어서, 상기 고형 종양은 비-소세포 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC) 또는 두경부 편평상피 세포 암종(head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)이다.
- [1293] 171. 키트로서,
- [1294] *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제제(들); 및
- [1295] 구현예 48-106 중 어느 하나의 폴리뉴클레오티드;
- [1296] 를 포함한다.
- [1297] 172. 키트로서,

[1298] *TGFBR2* 유전자 좌 내 표적 부위에 유전자 파괴를 유도할 수 있는 하나 이상의 제체(들); 및 재조합 수용체 또는 이의 일부를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 - 여기서 상기 재조합 수용체 또는 이의 항원 결합 단편 또는 이의 사슬을 암호화하는 전이 유전자가 상동성 지시 수선(HDR)을 통해 표적 부위 또는 근처에서 통합을 위해 표적화됨 - ; 및 구현에 107-153 중 어느 하나의 방법을 수행하기 위한 지침;

[1299] 을 포함한다.

[1300] **IX. 실시예**

[1301] 하기 실시예는 예시적인 목적으로만 포함되며 본 발명의 범위를 한정하려는 의도는 아니다.

[1302] **실시예 1: 녹아웃(Knockout, KO) 또는 우성 음성(Dominant Negative, DN) 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 2(TGFBR2)를 갖는 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포의 생성 및 생체 내 분석**

[1303] 인간 T 세포가, 조작되어 종양과 연관된 항원에 특이적으로 결합하는 예시적인 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현 하였고, 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 2(*TGFBR2*)를 녹아웃(KO)시키는 유전자 파괴에 의해 또는 우성 음성 형질 전환 성장 인자 베타 수용체II(DN-TGFBR2)를 발현시킴으로써 또한 변형되었다. DN-TGFBR2의 발현이 TGF β 결합을 두고 야생형 TGFBR2와 경쟁하고 비-기능성 수용체 복합체를 형성하기 때문에, 수용체의 단백질 키나 제 도메인이 결합된 DN-TGFBR2가 대안적인 방법으로 사용되어 TGF 베타(TGF β) 신호 전달을 방해했다. 조작된 T 세포가 항원을 발현하는 종양 세포를 갖는 마우스 종양 모델에 투여되었고, 항종양 활성에 대해 모니터링되었 다.

[1304] **A. 예시적인 CAR을 발현하는 *TGFBR2* KO 및 DN T 세포의 생성**

[1305] 1차 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 건강한 도너에서 수득된 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 면역천화도 기 반 선택에 의해 단리되었다. 생성된 CD4+ 및 CD8+ 세포(1:1의 비율로)가 항-CD3/항-CD28 시약과 배양함으로써 자극되었다.

[1306] 렌티바이러스 체제가 자극된 세포의 형질 도입을 위해 제조되었다. 키메라 항원 수용체(CAR)의 형질 도입을 위 한 예시적인 렌티바이러스 벡터가, R12로 표시된 키메라 토끼/인간 IgG1 항체의 가변 중쇄 및 경쇄에서 유래된 scFv 항원 결합 도메인을 함유하는 예시적인 항-ROR1 CAR을 암호화하는 핵산 서열을 함유했다(예를 들어, 문헌 [Yang *et al.* (2011) *PLoS ONE*, 6:e21018; 미국 특허 출원 번호 US 2013/0251642] 참조). 암호화된 CAR은 면역 글로불린 유래 스페이스, 막관통 도메인, 공자극 영역 및 CD3 ζ 신호 전달 도메인을 또한 포함했다. CAR을 갖는 DN-TGFBR2의 형질 도입을 위해, 렌티바이러스 작제물이, T2A 리보솜 건너뛰기 요소를 암호화하는 서열에 의해 항-ROR1 CAR을 암호화하는 서열과 분리된, 서열 번호: 59에 제시된 *TGFBR2* 서열의 22-191 잔기에 대응하는 우성 음성 TGFBR2 서열의 성숙한 형태를 암호화하는 핵산 서열을 함유했다. CAR(LV), 또는 CAR 및 DN-TGFBR2(LV+DN)을 암호화하는 핵산 서열이 예시적인 HIV-1 유래 렌티바이러스 벡터 내에 포함되었다. 위형 (pseudotyped) 렌티바이러스 벡터 입자가, 생성된 벡터, (*gagpol* 플라스미드 및 *rev* 플라스미드를 함유하는) 헬 퍼 플라스미드 및 위형 플라스미드로 HEK-293T 세포를 일시적으로 형질 감염시킴으로써 표준 절차에 의해 생성 되었고, 세포를 형질 도입하기 위해 사용되었다.

[1307] 24 시간에, 세포가 렌티바이러스 체제로 형질 도입되었거나 대조군(모의)으로 모의 형질 도입되었다. (DN-TGFBR2를 함유하지 않는) 항-ROR1(R12) CAR 암호화 렌티바이러스 체제로 형질 도입된 세포의 경우, 세포가 또 한 조작되어 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌가 녹아웃(LV+KO)되었다. 항-CD3/항-CD28 시약이 자극 후 72 시간에 제거 되었고, 자극된 세포는 내인성 *TGFBR2* 유전자의 녹아웃(LV+KO 또는 모의 KO 대조군)을 위해 내인성 *TGFBR2* 서열 의 엑손 4(엑손 넘버링은 여기 표 1에 제시된 바와 같은 동형 단백질 1에 근거함) 내 유전자 파괴를 표적화하는 *TGFBR2* 표적화 gRNA(서열 GUGGAUGACCGGCUAACAG(서열 번호: 73)을 함유함) 및 스트렙토코커스 피오케네스 Cas9 를 함유하는 2.2 M의 리보핵산단백질(RNP) 복합체로 전기 천공되거나, 임의의 RNP 복합체없이(LV 단독 또는 LV+DN) 전기 천공되었다. 전기 천공된 세포는 동결 보존하기 전 약 7 일 동안 배양되었다. RNP없이 전기 천공된 R12 CAR 암호화 렌티바이러스로 형질 도입된 세포(LV) 및 RNP로 전기 천공된 모의 처리된 세포(모의 KO)가 대조 군으로 분석되었다.

[1308] **B. 생체 내 항종양 활성의 분석**

[1309] *TGFBR2*의 녹아웃을 갖는 예시적인 조작된 CAR을 발현하거나 DN-TGFBR2를 발현하는 1차 인간 T 세포의 항종양 효과가, 종양 보유 마우스 이중 이식 모델 내로 세포의 입양 전달 후에 종양을 모니터링함으로써 분석되었다. NOD.Cg.Prkdc<sup>scid</sup> IL2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) 마우스 각각에 약 5 x 10<sup>6</sup> 개의 H1975 비-소세포 폐암 세포가 피하로 주사

되었다. 종양 이식 후 24 일에, 종양 부피가 측정되었다. CAR 발현 T 세포 투여 전, 평균 종양 부피가 대략 190 mm<sup>3</sup>이었고, 83 내지 302 mm<sup>3</sup>의 범위였다.

[1310] 각 그룹 내 8 마리의 마우스에, (1) 렌티바이러스 전달에 의해 항-ROR1 CAR R12를 발현하는 조작된 T 세포(LV 단독), (2) 렌티바이러스 전달에 의해 항-ROR1 CAR R12를 발현하고 *TGFBR2*가 녹아웃된 조작된 T 세포(LV+KO) 또는 (3) 렌티바이러스 전달에 의해 항-ROR1 CAR R12 및 DN-TGFBRII를 발현하는 조작된 T 세포(LV+DN)와 같은, 2 명의 독립적인 인간 도너(도너 1, 도너 2) 중 한명으로부터 생성된 조작된 1차 T 세포 조성물 중 하나가 단일 정맥 내(i.v.) 주사되었다. 상이한 그룹의 조작된 T 세포가 1 x 10<sup>6</sup> 개의 세포(저용량) 또는 3 x 10<sup>6</sup> 개의 세포(고용량)의 용량으로 각각 투여되었다. 대조군으로, 마우스에 3 x 10<sup>6</sup> 개의 모의 처리된 세포(모의 KO)가 투여되거나 처리되지 않았다(종양 단독). 무종양 생존 및 종양 부피가 약 120 일에 걸쳐 분석되었다.

[1311] 입양적으로 전달된 항-ROR1 CAR+ T 세포의 항종양 활성이 투여 후 3 내지 6 일 간격으로 종양 부피를 결정함으로써 모니터링되었다. 도 1a 및 1c(그룹; 각각 도너 1 및 2) 및 도 1b 및 1d(개별 마우스; 각각 도너 1 및 2)에 도시된 바와 같이, *TGFBR2* 유전자가 녹아웃된 항-ROR1 CAR 발현 세포(KO)의 투여가, 우성 음성 형태의 TGFBRII(DN)의 발현 또는 녹아웃되지 않은 동일한 항-ROR1 CAR(LV)을 발현하는 조작된 T 세포의 투여에 비해 더 많은 종양 부피의 감소를 초래했다. TGFβ에 의해 유도된 CD103, E-카데린 결합 인테그린의 발현 수준이 분석되었고, 항-ROR1 CAR을 발현하고 *TGFBR2*가 KO되도록 조작되거나 DN-TGFBRII를 발현하는 세포에 비해 내인성 TGFBRII의 수준 및 항-ROR1 CAR을 발현하는 조작된 세포가 더 많은 것으로 관찰되었다.

[1312] 도 2a 및 2b(각각 도너 1 및 2)에 도시된 바와 같이, *TGFBR2*가 KO되거나 DN-TGFBRII를 발현하는 항-ROR1 CAR 발현 세포의 투여가, 항-ROR1 CAR만을 발현하도록 조작된 T 세포가 투여된 마우스에 비해 무종양 생존의 개선을 초래했으나 도너 대 도너의 가변성이 관찰되었다. 테스트된 저용량 및 고용량 둘 다에서 *TGFBR2*가 KO된 항-ROR1 CAR 발현 세포를 발현하는 조작된 T 세포의 투여가 상기 연구에서 가장 긴 무종양 생존을 초래했다. 항-ROR1 CAR 및 DN-TGFBRII를 발현하는 조작된 T 세포의 투여가, 항-ROR1 CAR만을 발현하는 조작된 T 세포의 투여에 비해 종양 부피의 감소 및 무종양 생존의 개선을 초래했다.

[1313] 예시적인 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 T 세포에서 *TGFBR2* 유전자의 녹아웃 또는 우성 음성(DN) TGFBRII의 발현 중 하나에 의한 TGFβ 매개 면역 억제의 억제가 항종양 활성의 개선 및 상기 세포가 투여된 마우스 생존의 개선을 초래한다는 관찰과 결과가 일치했다.

[1314] **실시예 2: KO 또는 DN *TGFBR2*를 갖는 CAR 발현 T 세포의 증폭, 종양 침윤 및 항종양 활성의 분석**

[1315] TGFβ 신호 전달이 *TGFBR2* 유전자의 녹아웃 또는 우성 음성(DN) TGFBRII의 발현 중 하나에 의해 억제된 예시적인 CAR 발현 세포의 증폭, 종양 침윤 및 항종양 활성(회전 타원체 분석에 근거)이 분석되었다.

[1316] NSG 마우스가 상기 실시예 1.B에 기재된 바와 같이 H1975 세포로 이식되었다. 종양 이식 후 24 일에, 각 그룹 내 5 마리의 마우스에, 1 x 10<sup>6</sup>개의 세포 용량으로 (1) 렌티바이러스 전달에 의해 항-ROR1 CAR R12를 발현하는 조작된 T 세포(LV), (2) 렌티바이러스 전달에 의해 항-ROR1 CAR R12를 발현하고 *TGFBR2*가 녹아웃된 조작된 T 세포(KO) 또는 (3) 렌티바이러스 전달에 의해 항-ROR1 CAR R12 및 DN-TGFBRII를 발현하는 조작된 T 세포(DN)와 같이 발현하는 조작된 1차 인간 T 세포, 1 x 10<sup>6</sup> 개의 세포를 단일 정맥 내(i.v.) 주사했고, 모든 그룹의 조작된 세포가 전기 천공되었다.

[1317] 종양 부피가 조작된 세포의 투여 후 최대 14 일까지 모니터링되었다. 조작된 세포의 투여 후 14 일에, 종양, 비장 및 혈액 샘플이 수집되어 유세포 분석에 의해 평가되었다. 종양 샘플에서 단리된 종양 침윤성 림프구(TIL)가 회전 타원체 사멸 분석의 대상이 되어 항종양 활성이 결정되었다.

[1318] **A. 종양 부피**

[1319] 도 3a(그룹) 및 3b(개별)는 종양, 비장 및 혈액 샘플을 수집하기 전, 조작된 T 세포의 투여 후 처음 14 일 동안 종양 부피의 변화를 도시한다. 도시된 바와 같이, *TGFBR2* 유전자가 녹아웃된 항-ROR1 CAR 발현 세포(KO)의 투여가, 우성 음성 형태의 TGFBRII(DN)의 발현 또는 녹아웃되지 않은 동일한 항-ROR1 CAR(LV)을 발현하는 조작된 T 세포의 투여에 비해 더 많은 종양 부피의 감소를 초래했고, 이는 실시예 1에 기재된 결과와 일치했다.

[1320] **B. CAR 발현 T 세포의 생체 내 증폭 및 종양 침윤**

[1321] 도 4a(혈액) 및 4b(비장)에 도시된 바와 같이, 혈액 또는 비장 내 CAR 발현 CD4+ 및 CD8+ T 세포의 빈도가, 다

른 그룹에 비해 *TGFBR2* KO되고 항-ROR1 CAR R12를 발현(KO)하는 조작된 T 세포가 투여되었던 마우스에서 가장 높았다. 도 4c(하단 패널)에 도시된 바와 같이, 종양에 침윤한 CD8+ CAR 발현 세포의 빈도가, 다른 그룹에 비해 *TGFBR2* KO되고 항-ROR1 CAR R12를 발현(KO)하는 조작된 T 세포가 투여된 마우스에서 더 높았다. 종양에 침윤한 CD4+ CAR 발현 세포의 평균 빈도가 *TGFBR2* KO되고 항-ROR1 CAR R12를 발현(KO)하는 세포가 투여된 마우스와 우성 음성 형태의 TGFBR2의 발현과 함께 동일한 항-ROR1 CAR을 발현(DN)하는 세포가 투여된 마우스 사이에 유사했고, 항-ROR1 CAR R12 단독(LV)이 투여된 마우스의 평균 빈도보다 더 높았다(도 4c, 상단 패널). 종양 침윤성 조작된 세포 중, CD103+ CD8+ CAR 발현 T 세포의 평균 백분율이 다른 그룹에 비해 *TGFBR2* KO된 조작된 세포에서 더 낮았던(도 4d, 하단 패널) 반면, CD103+ CD4+ 세포의 평균 백분율은 *TGFBR2* KO되고 항-ROR1 CAR R12(KO)가 투여된 마우스 및 우성 음성 형태의 TGFBR2의 발현과 함께 동일한 항-ROR1 CAR(DN)이 투여된 마우스에서 유사했다(도 4d, 상단 패널).

[1322] **C. 회전 타원체 분석에 의한 항종양 활성**

[1323] 항종양 활성이, 상기 기재된 바와 같이 조작된 T 세포가 투여된 마우스 유래 종양 샘플에서 단리된 종양 침윤성 림프구(TIL)가, 혈청 함유 배지에서 낮은 수준의 TGFβ의 존재 하에 1:5의 이펙터 대 표적 비율로 H1975 종양 회전 타원체와 함께 인큐베이션된 회전 타원체 사멸 분석에서 평가되었다. H1975 종양 회전 타원체 세포가 적색 형광 염료로 표지되어 종양 세포 용해의 모니터링(Incucyte® 살아있는 세포 분석 시스템, Essen Bioscience 사용)이 가능했고, 녹색 형광 카스파제3/7 시약의 존재 하에 인큐베이션이 수행되어 세포 자멸사가 모니터링(Incucyte® 카스파제-3/7 시약 시스템 사용)되었다. 형광이 약 9 일 동안 시간의 흐름에 따라 현미경 관찰에 의해 모니터링되었다. 조작된 T 세포가 투여된 마우스의 비장에서 회수된 T 세포가 또한 분석되었다. 대조군으로, H1975 종양 회전 타원체 세포가 조작된 세포없이(종양 단독) 인큐베이션되었다.

[1324] 도 5a에 도시된 바와 같이, 카스파제 활성이, 다른 처리된 마우스에서 회수된 세포에 비해 *TGFBR2* KO된 항-CAR 발현 T 세포가 투여된 마우스에서 회수된 종양 세포에서 가장 높았다. 마찬가지로, 도 5b에 도시된 바와 같이, (적색 형광의 감소에 의해 모니터링된 바와 같이) 회전 타원체 크기의 감소가, 다른 처리된 마우스에서 회수된 세포에 비해 *TGFBR2* KO된 항-CAR 발현(LV KO) T 세포가 투여된 마우스에서 회수된 종양 세포에서 가장 컸다. 비장에서 회수된 CAR 발현 *TGFBR2* KO 세포가 후기 분석 시점에 약간의 카스파제 활성 및 항종양 활성을 또한 나타냈다. 항-ROR1 CAR 및 DN-TGFBR2를 발현(LV DN)하는 조작된 T 세포가 *TGFBR2*의 변형없이 항-ROR1 CAR을 발현하는 세포에 비해 카스파제 활성 및 종양 회전 타원체 용해에서 약간의 개선을 나타냈다. *TGFBR2* 녹아웃된 CAR 발현(LV KO) T 세포가, *TGFBR2*가 녹아웃되지 않고 CAR을 발현하는 세포이거나 우성 음성 TGFBR2와 함께 CAR을 발현(LV DN)하는 세포에 비해, 회전 타원체 사멸 분석 및 카스파제 활성에 의해 도시된 바와 같이 회전 타원체에 대해 개선된 항종양 활성을 입증했던 관찰과 결과가 일치했다. 결과는, 예를 들어 조작된 T 세포에서 *TGFBR2*의 KO에 의해 TGFβ 매개 면역 억제를 억제하여 조작된 세포의 개선된 활성 및 기능을 달성한다는 것을 더 지지한다.

[1325] **실시예 3: *TGFBR2* 녹아웃된 완전히 인간 CAR 발현 T 세포의 항종양 활성 평가**

[1326] 예시적인 완전히 인간 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현하는 조작된 세포의 항종양 활성이 회전 타원체 분석을 이용하여 평가되었다.

[1327] CAR이 키메라 토끼/인간 항-ROR1에서 유래된 scFv 대신에 완전히 인간 항-ROR1 scFv 항원 결합 도메인을 함유한 점을 제외하고, 일반적으로 상기 실시예 1.A에 기재된 바와 같이, 1차 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 단리, 자극 및 조작되어 *TGFBR2*가 녹아웃(완전히 인간 KO) 되거나 녹아웃되지 않은(완전히 인간 WT) 예시적인 완전히 인간 항-ROR1 CAR을 발현했다. 이어서 조작된 세포가 동결 보존되었다. 상기 실시예 1.A에 기재된 *TGFBR2*가 녹아웃(R12 KO)되거나 또는 녹아웃되지 않으면서(R12 WT) R12에서 유래된 scFv 항원 결합 도메인을 갖는 항-ROR1 CAR을 발현하는 세포 및 모의 형질 도입 및 RNP없이 전기 천공(모의)되거나 또는 *TGFBR2*의 녹아웃을 위해 RNP로 모의 형질 도입(모의 KO)으로 처리된 세포가 대조군으로 또한 분석되었다.

[1328] 회전 타원체 사멸 분석을 위해, 동결 보존된 조작된 세포가 해동되었고, 1:5의 이펙터 대 표적 비율로 H1975 종양 회전 타원체와 함께 인큐베이션되었다. 카스파제 활성(녹색 염료) 및 회전 타원체 크기(적색 염료)가, 일반적으로 상기 실시예 2.A에 기재된 바와 같이, 약 7 일 동안 시간의 흐름에 따라 현미경 관찰에 의해 모니터링되었다. 분비된 사이토카인 인터페론 감마(IFN-γ)의 양이 또한 측정되었다.

[1329] 도 6a(카스파제) 및 6b(회전 타원체 크기)에 도시된 바와 같이, *TGFBR2*가 녹아웃된 완전히 인간 항-ROR1 CAR 및 항-ROR1 CAR R12 둘 다, *TGFBR2*가 녹아웃되지 않은 동일한 수용체를 발현하는 세포에 비해 카스파제 활성 및

회전 타원체 사멸 활성의 개선을 나타냈다. 결과는, IFN- $\gamma$ 의 생성이 *TGFBR2* KO되지 않은 세포에 비해 *TGFBR2* KO 세포에서 일반적으로 더 많음을 또한 나타냈다.

[1330] **실시예 4: T 세포의 내인성 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 2(*TGFBR2*) 유전자 좌에 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 전이 유전자 서열의 표적화된 녹인(Knock-in, KI)**

[1331] 인간 T 세포가 조작되어 상동성 의존 수선(HDR)을 통해 내인성 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 2(*TGFBR2*) 유전자 좌에서 CAR을 암호화하는 핵산의 표적화된 통합에 의해 예시적인 키메라 항원 수용체(CAR)를 발현했다. 전략은 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 CAR 암호화 서열의 녹인 및 내인성 *TGFBR2* 유전자좌의 녹아웃(KO/KI)을 초래했다.

[1332] **A. 표적화된 KI 또는 무작위 통합을 위한 gRNA 및 전이 유전자 작제물**

[1333] 리보핵산단백질(RNP) 복합체가 CRISPR/Cas9 매개 유전자 편집에 의해 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에 유전자 파괴를 도입하기 위해 생성되었다. RNP 복합체는, 일반적으로 상기 실시예 1.A에 기재된 바와 같이 *스트렙토코커스 피오케네스* Cas9 및 표적화 도메인 서열 GUGGAUGACCGCUAACAG(서열 번호: 73)을 갖는 가이드 RNA(gRNA)를 함유했다.

[1334] 예시적인 주형 폴리뉴클레오티드가 예시적인 키메라 항원 수용체(CAR)를 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 전이 유전자 서열의 표적화된 통합(녹인)을 위해 생성되었다. 전이 유전자 서열이, B 세포 성숙 항원(BCMA)에 특이적인 예시적인 CAR을 암호화하는 핵산 서열 및 a) 이중 프로모터의 제어 하에 CAR 암호화 서열의 발현을 구동하기 위해 인핸서(서열 번호: 119)를 갖는 인간 신장 인자 1 알파(EF1 $\alpha$ ) 프로모터(EF1 $\alpha$ -CAR); 또는 b) *TGFBR2* 개방형 판독 프레임에 인-프레임으로 HDR 매개 표적화된 통합 시 내인성 *TGFBR2* 프로모터로부터 CAR의 발현을 구동하기 위해 예시적인 CAR을 암호화하는 핵산 서열의 상류에 P2A 리보솜 건너뛰기 요소(서열 번호: 120)를 암호화하는 서열(P2A-CAR); 중 하나를 포함했다. 암호화된 CAR이, 예시적인 표적 항원 BCMA에 결합하는 scFv, 면역 글로불린 유래 스페이서, CD28에서 유래된 막관통 도메인, 4-1BB에서 유래된 공자극 영역 및 CD3 $\zeta$  신호 전달 도메인을 포함했다.

[1335] 예시적인 주형 폴리뉴클레오티드의 일반적인 구조는: [5' 상동성 암]-[전이 유전자 서열]-[3' 상동성 암]이었다. 예시적인 5' 상동성 암이, 내인성 인간 *TGFBR2* 유전자 좌의 제3 인트론 및 제4 엑손의 일부에 상동성인 약 600 bp의 서열(서열 번호: 69에 제시된 5' 상동성 암 서열; 여기 표1에 제시된 바와 같은 동형 단백질 1에 근거한 엑손 및 인트론 넘버링) 또는 제4 엑손의 일부에 상동성인 약 600 bp의 서열(서열 번호: 71에 제시된 5' 상동성 암 서열)을 함유했다. 예시적인 3' 상동성 암이 제4 인트론의 일부에 상동성인 약 600 bp의 서열(서열 번호: 72에 제시된 3' 상동성 암 서열)을 함유했다. HDR에 의한 전이 유전자 서열의 통합이 CAR 및 조절 또는 다중 시스톤 요소를 암호화하는 전이 유전자 서열에 의해 대체된 제4 엑손의 일부의 결실을 초래했다.

[1336] 대조군으로, CAR 암호화 핵산 서열이 무작위 통합에 의해 T 세포 내로 도입된 서열로부터 CAR의 발현을 위해 예시적인 HIV-1 유래 렌티바이러스 벡터 내로 통합되었다. 우성 음성(DN) 형태의 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 II(DN-TGFBRII)의 발현을 위해, 렌티바이러스 형질 도입 작제물이, 일반적으로 상기 실시예 1.A에 기재된 바와 같이 DN-TGFBRII를 암호화하는 핵산 서열을 더 함유했다.

[1337] **B. 상동성 의존적 수선(HDR)에 의해 예시적인 CAR을 발현하는 조작된 T 세포의 생성**

[1338] HDR에 의한 표적화된 통합을 위해, 상기 기재된 폴리뉴클레오티드를 함유하는 벡터 작제물을 함유하는 아데노관련 바이러스(AAV) 스톡(stock)이 세포의 형질 도입을 위해 생성되었다. 무작위 통합을 위해, 렌티바이러스 벡터 입자가 일반적으로 상기 실시예 1.A에 기재된 바와 같이 생성되었다.

[1339] 1차 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 건강한 도너에서 수득된 인간 말초 혈액 단핵 세포(PBMC)로부터 면역친화도 기반 선택에 의해 단리되었다. 생성된 CD4+ 및 CD8+ 세포(1:1의 비율로)가 항-CD3/항-CD28 시약과 배양함으로써 72 시간 동안 자극되었다. 항-CD3/항-CD28 시약이 제거되었고, 자극된 세포가 상기 기재된 바와 같이 (서열 번호: 73에 제시된 *TGFBR2* 표적화 도메인 서열을 함유하는) *TGFBR2* 표적화 gRNA 및 *스트렙토코커스 피오케네스* Cas9를 함유하는 2.2 M의 RNP 복합체로 전기 친공되었다. 전기 친공 후 0 내지 3 시간 내에, 세포가 5% 부피로 각각의 주형 폴리뉴클레오티드를 함유하는 AAV 스톡과 함께 인큐베이션되었다. *TGFBR2* 표적화 RNP로 전기 친공되나 AAV 제제와 접촉하지 않은 세포(RNP 단독), 모의 전기 친공 및 형질 도입된 세포(모의) 및 CAR 암호화 전이 유전자 서열 및 우성 음성 형태의 TGFBRII의 무작위 통합을 위한 렌티바이러스 벡터로 형질 도입된 세포(렌티 DN-TGFBRII)가 대조군으로 분석되었다. 세포가 3 일 동안 배양되었고, CAR의 발현을 검출하기 위해 CAR에 특

이적으로 결합하는 항-CD4 항체, 항-CD8 항체 및 검출 제제로 염색한 후 유세포 분석에 의해 분석되었다.

[1340] 결과가 도 7에 도시되어 있다. *TGFBR2* 유전자 좌에서 HDR에 의해 표적화된 통합을 위한 주형 폴리뉴클레오티드의 도입이 테스트된 세포 중 약 42-58%에서 세포의 표면 상에 CAR의 발현을 초래했다(도 7). 예를 들어, CAR 및 DN-TGFBRII를 발현하도록 조작된 세포에서 관찰된 바와 같이 렌티바이러스 형질 도입에 의한 CAR의 발현이 HDR 조건에서 보다 더 많았다. 항-CD4 및 항-CD8 염색의 결과는, CAR 암호화 서열의 표적화된 통합을 위한 프로세스가 조성물 내 CD4+ 또는 CD8+ 세포의 백분율을 실질적으로 바꾸지 않았음을 나타냈다.

[1341] CAR을 암호화하는 핵산 서열이 내인성 *TGFBR2* 프로모터 또는 이중 프로모터, 예컨대 EF1 $\alpha$ 의 제어 하에 CAR의 발현을 위해 *TGFBR2* 유전자 좌에 통합을 위해 표적화되어 CAR을 발현하는 조작된 T 세포를 생성할 수 있다는 발견과 결과가 일치했다.

[1342] **실시예 5: 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 상동성 의존적 수선(HDR)에 의해 CAR을 암호화하는 전이 유전자 서열의 표적화된 통합을 갖는 조작된 T 세포의 항종양 활성**

[1343] 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌의 녹아웃(KO) 또는 우성 음성 TGFBRII(DN)의 발현을 갖는 *TGFBR2* 유전자 좌에서 표적화된 통합에 의해 또는 무작위 통합에 의해 조작된 예시적인 키메라 항원 수용체(CAR) 발현 세포의 활성이 회전 타원체 분석으로 평가되었다.

[1344] **A. HDR에 의한 조작된 T 세포의 생성 및 CAR의 발현**

[1345] 3 명의 인간 도너 유래 1차 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 단리, 자극 및 조작되어 (1) 렌티바이러스 단독 전달(LV), (2) *TGFBR2*가 녹아웃된 렌티바이러스 전달(LV+KO), 또는 (3) 각각이 일반적으로 상기 실시예 1.A에 기재된 바와 같이 렌티바이러스 전달 및 우성 음성 TGFBRII의 발현(LV+DN); 또는 (4) 상이한 이중 프로모터(MND)의 제어 하에 및 항-ROR1 CAR R12를 암호화하는 핵산을 사용하는 점을 제외하고 실질적으로 상기 실시예 4에 기재된 바와 같이 HDR에 의한 *TGFBR2* 유전자 좌에서 표적화된 녹인(KO/KI)에 의해 예시적인 항-ROR1 CAR R12(실시예 1.A 참조)를 발현했다.

[1346] 표적화된 녹인을 위해, 세포가, 상기 실시예 4.A에 기재된 바와 같이 (서열 번호: 73에 제시된 *TGFBR2* 표적화 도메인 서열을 함유하는) *TGFBR2* 표적화 gRNA 및 스트렙토코커스 피오게네스 Cas9를 함유하는 RNP 복합체로 전기 천공되었다. 전기 천공 후 0 내지 3 시간 내에, 세포가, [5' 상동성 압]-[전이 유전자 서열]-[3' 상동성 압]의 구조 - 5' 상동성 압 서열은 서열 번호: 69에 제시되고, 3' 상동성 압 서열은 서열 번호: 72에 제시되며 전이 유전자 서열은 항-ROR1 CAR R12를 암호화하는 핵산 서열을 포함함 - 를 갖는 주형 폴리뉴클레오티드를 함유하는 AAV 제제와 함께 MND 프로모터, 골수 증식성 육종 바이러스 인헨서(서열 번호: 186에 제시된 서열; 문헌 [Challita et al. (1995) J. Virol. 69(2):748-755] 참조)를 갖는 변형된 MoMuLV LTR의 U3 영역을 함유하고 SV40 폴리아데닐화 신호(서열 번호: 185에 제시된 서열)에 연결된 합성 프로모터의 작동 가능한 제어 하에 인큐베이션되었다(KO/KI). 조작된 세포가 전기 천공 후 약 7 일 동안 배양되었고, 동결 보존되었다. 대조군으로, 모의 형질 도입 및 RNP없이 전기 천공(모의) 또는 *TGFBR2*의 녹아웃을 위해 RNP로 모의 형질 도입(모의 KO)으로 처리된 세포가 또한 분석되었다. 항-ROR1 CAR의 발현 수준이 각 그룹에서 분석되었다.

[1347] **B. 회전 타원체 분석에 의한 항종양 활성**

[1348] 회전 타원체 사멸 분석을 위해, 항-ROR1 CAR R12를 발현하는 조작된 세포가 해동되었고, 1:5의 이펙터 대 표적 비율로 H1975 종양 회전 타원체와 함께 인큐베이션되었다. 카스파제 활성(녹색 염료) 및 회전 타원체 크기(적색 염료)가, 일반적으로 상기 실시예 2.C에 기재된 바와 같이, 약 14 일 동안 시간의 흐름에 따라 현미경 관찰에 의해 모니터링되었다.

[1349] 도 8a에 도시된 바와 같이, 상기 실험에서 항-ROR1 CAR R12 발현(유세포 분석에 의한 기하 평균 형광)이, TGFBRII가 녹아웃된 렌티바이러스 전달(LV+KO) 또는 *TGFBR2* 유전자 좌에서 CAR의 HDR 매개 표적화된 통합(KO/KI)에 의해 CAR이 전달된 세포에 비해 렌티바이러스 전달에 의한 예시적인 CAR 단독(LV) 또는 DN-TGFBRII(LV+DN)로 조작된 세포에서 가장 많았다. 카스파제 활성의 증가(도 8b) 및 회전 타원체 크기의 감소(도 8c)에 의해 도시된 바와 같이 항종양 활성이, *TGFBR2* 유전자 좌 내로 HDR 통합에 의해 조작(KO/KI)된 CAR 발현 세포와 인큐베이션된 회전 타원체 배양물에서 가장 높았다. 개선된 항종양 활성이, 예시적인 CAR만을 발현(LV)하도록 조작된 세포에 비해 *TGFBR2* 유전자 좌의 KO(LV+KO) 또는 DN-TGFBRII(LV+DN)를 갖고 렌티바이러스 전달에 의해 조작된 CAR 발현 세포에서 또한 관찰되었다.

[1350] 항종양 활성에 대한 유사한 결과가 완전히 인간 항-ROR1 CAR을 가지나 유사하게 조작된 T 세포를 사용한 연구에

서 관찰되었다.

[1351] **C. 장기 자극 후 회전 타원체 분석**

[1352] 항-ROR1 CAR R12를 발현하는 조작된 세포의 항종양 활성이 장기 자극 후 회전 타원체 사멸 분석에 의해 평가되었다. 실시예 5.A에 기재된 바와 같이 생성된 동결 보존된 조작된 세포가 해동되었고, 세포의 만성 자극 및 활성의 감소를 초래할 수 있는 재조합 ROR1-Fc 용합 단백질로 코팅된 비드와 함께 인큐베이션함으로써 7 일 장기 자극되었다. CAR 양성 T 세포가 1:1의 비율로 ROR1-Fc 비드와 혼합되었다. 7 일에 ROR1-Fc를 함유한 비드가 제거되었고, 세포가 1:5 또는 1:10의 이펙터 대 표적 비율로 H1975 종양 회전 타원체와 함께 인큐베이션되었다. CAR을 발현하는 세포의 백분율이 장기 자극 전 및 후에 분석되었다. 카스파제 활성(녹색 염료) 및 회전 타원체 크기(적색 염료)가, 일반적으로 상기 실시예 2.C에 기재된 바와 같이, 약 14 일 동안 시간의 흐름에 따라 현미경 관찰에 의해 모니터링되었다. 분비된 사이토카인 인터페론 감마(IFN- $\gamma$ )의 양이 장기 자극 1 일 및 회전 타원체 사멸 분석 1 일에 또한 측정되었다.

[1353] 도 9a에 도시된 바와 같이, *TGFBR1* 유전자 좌에서 CAR의 HDR 매개 표적화된 통합(KO/KI)에 의해 CAR로 조작된 세포에서 장기 자극 전(pre) 또는 장기 자극 후(post) 해동시 항-ROR1 CAR R12를 발현하는 CAR+ 세포의 백분율이 농축되었다. pre- 또는 post- 장기 자극 시 CAR 발현 세포의 백분율이 3 명의 도너 각각에서 조작된 세포의 다른 그룹과 일반적으로 유사했다(하나의 도너는 렌티바이러스 전달에 의해 CAR만을 발현하도록 조작된 LV 세포에서 CAR 발현 빈도의 감소를 나타냈다). 도 9b(카스파제) 및 9c(회전 타원체 크기)에 도시된 바와 같이, *TGFBR1* 유전자 좌에서 CAR의 HDR 매개 표적화된 통합(KO/KI)에 의해 또는 *TGFBR1* 유전자 좌가 KO된 렌티바이러스 전달(LV+KO)에 의해 CAR로 조작된 세포가 상기 연구에서 테스트된 각 E:T 비율에서 가장 높은 카스파제 활성 및 회전 타원체 크기의 가장 많은 감소를 나타냈다. 개선된 항종양 활성이, 예시적인 CAR만을 발현(LV)하도록 조작된 세포에 비해 DN-*TGFBR1*를 갖는 렌티바이러스 전달(LV+DN)에 의해 조작된 CAR 발현 세포에서 또한 관찰되었다.

[1354] **D. 결론**

[1355] 회전 타원체 사멸 분석에 의해 도시된 바와 같이 (내인성 *TGFBR2* 유전자의 발현을 또한 제거하는) 내인성 *TGFBR2* 유전자 내로 예시적인 CAR 암호화 핵산 서열의 표적화된 녹인이 개선된 항종양 활성을 초래한다는 관찰과 결과가 일치한다. 개선이 상이한 예시적인 항-ROR1 CAR로 관찰되었고, *TGFBR2*의 녹아웃을 함유하고 렌티바이러스 전달에 의해 전달된 CAR 암호화 핵산 서열로 조작된 세포에 의해 달성된 것과 유사하거나 이를 초과했다. 결과가, 개선된 항종양 활성 및 기능을 나타내고, TGF $\beta$  매개 면역 억제에 덜 민감하거나 이에 내성이 있는 조작된 세포를 생성하기 위해 예를 들어, 상동성 의존적 수선(HDR)에 의해 내인성 *TGFBR2* 유전자 내로 재조합 수용체 발현 서열의 표적화된 녹인의 사용을 지지한다.

[1356] **실시예 6: *TGFBR2*의 녹인(KI) 또는 녹아웃(KO)을 갖는 재조합 T 세포 수용체(TCR)를 발현하는 조작된 T 세포의 생성 및 이의 항종양 활성의 분석**

[1357] 인간 T 세포가 조작되어 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 2(*TGFBR2*) 유전자 좌의 유전자 파괴(녹아웃) 또는 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 재조합 TCR을 암호화하는 핵산 서열의 표적화된 통합(녹인)에 의해 예시적인 재조합 T 세포 수용체(TCR)를 발현했다.

[1358] **A. 예시적인 TCR을 발현하는 *TGFBR2* KO T 세포**

[1359] 1차 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 단리, 자극 및 조작되어 *TGFBR2*가 녹아웃되거나 녹아웃되지 않은 주요 조직적 합성 복합체(MHC) 클래스 I 분자 상에 제시된 인간 유두종 바이러스 16(HPV16) E7(11-19) 펩티드에 특이적인 예시적인 재조합 TCR을 발현했다. (1) 렌티바이러스 단독 전달(TCR), (2) *TGFBR2*가 녹아웃된 렌티바이러스 전달(TCR+KO) 또는 (3) 렌티바이러스 전달 및 RNP없이 모의 전기 천공(TCR EP)에 의해 재조합 TCR을 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 렌티바이러스 벡터를 사용하는 점을 제외하고 세포를 조작하기 위한 방법이 일반적으로 상기 실시예 1.A에 기재된 바와 같았다. 대조군으로, 모의 형질 도입(모의), 모의 형질 도입 및 RNP없이 전기 천공(모의 EP) 또는 모의 형질 도입 및 *TGFBR2*의 녹아웃을 위해 RNP로 전기 천공(모의 KO)으로 처리된 세포가 또한 분석되었다.

[1360] 항-HPV16 E7 TCR 발현 세포가, 배지 내 10 ng/mL TGF $\beta$ 가 있거나 없이 1:10의 E:T 비율로 UPCI:SCC152(ATCC® CRL-3240™) 편평상피 세포 암종 세포를 포함하는 종양 회전 타원체와 함께 인큐베이션된 점을 제외하고, 예시적인 TCR을 발현하는 조작된 세포의 항종양 활성이 일반적으로 상기 실시예 2.C에 기재된 바와 같이 회전 타원체 사멸 분석에 의해 평가되었다. 분비된 사이토카인 인터페론 감마(IFN- $\gamma$ ), 인터류킨-2(IL-2) 및 종양 괴사

인자 알파(tumor necrosis factor alpha, TNF- $\alpha$ )의 양이 회전 타원체 사멸 분석 1 일에 또한 측정되었다.

[1361] 도 10a(카스파제) 및 10b(회전 타원체 크기)에 도시된 바와 같이, 카스파제 활성의 증가 및 회전 타원체 크기의 감소에 의해 각각 도시된 바와 같은 항종양 활성이, TGF $\beta$ 가 추가되거나 추가되지 않은 연구 모두에서 동일한 항-HPV TCR을 발현하나 *TGFBR2* KO되지 않은 대조군 세포에 비해 *TGFBR2* KO된 항-HPV TCR을 발현하는 세포에서 실질적으로 더 높았다. 결과는, *TGFBR2* KO된 항-HPV TCR 발현 세포에 의해 1:10의 차선의 E:T 비율에서조차 완전한 종양 회전 타원체의 제거를 나타냈다.

[1362] **B. 상동성 의존적 수선(HDR)에 의해 예시적인 CAR을 발현하는 조작된 T 세포**

[1363] 3 명의 도너(도너 1, 2 및 3) 유래 1차 인간 CD4+ 및 CD8+ T 세포가 단리, 자극 및 조작되어 HDR을 통한 표적화된 통합에 의해 인간 유두종 바이러스 16(HPV16)에 특이적인 예시적인 재조합 TCR을 발현했다. 전이 유전자 서열이, a) 인간 신장 인자 1 알파(EF1 $\alpha$ ) 프로모터(EF1 $\alpha$  KO/KI) 또는 b) MND 프로모터(MND KO/KI) 중 어느 하나의 제어 하에 예시적인 항-HPV16 TCR을 암호화하는 핵산 서열을 포함한 점을 제외하고, 세포를 조작하기 위한 방법이 일반적으로 상기 실시예 4에 기재된 바와 같았다. *TGFBR2*가 녹아웃(TCR LV *TGFBR2* KO)되거나 *TGFBR2*가 녹아웃되지 않은(TCR LV) 렌티바이러스 전달로 재조합 TCR을 발현하는 세포가 또한 분석되었다. 추가 대조군은 모의 처리된 세포(모의) 및 재조합 TCR을 발현하도록 조작되지 않은 *TGFBR2*가 녹아웃된 세포(*TGFBR2* KO)를 포함했다. 세포가 8 일 동안 배양되었고, 동결 보존되었다.

[1364] 항-HPV TCR의 발현 수준이 재조합 TCR을 인식하는 항-V베타2 항체로 염색함으로써 각 그룹에서 분석되었다. 각각의 조작된 세포에서 재조합 TCR의 발현이 도 11a 및 11b에 도시된다. 도시된 바와 같이, 재조합 TCR을 발현하는 세포의 백분율이, HDR에 의해 조작된 세포(MND KO/KI 또는 EF1 $\alpha$  KO/KI, 도 11b 참조)에 비해 렌티바이러스 전달을 이용하여 조작된 세포(TCR LV, 도 11a 참조; 또는 TCR LV *TGFBR2* KO, 도 11b 참조)에서 일반적으로 더 높았다. 약 6-9%의 내인성 T 세포가 모의 그룹에서 도시된 바와 같이, 항-V베타2 항체로 비특이적 배경 염색을 나타냈다. HDR에 의해 조작된 그룹 중, 재조합 TCR의 발현이, 재조합 TCR이 EF1 $\alpha$  프로모터의 제어 하에서와 비교하여 MND 프로모터의 제어 하에 있는 세포에서 더 많았다.

[1365] 예시적인 TCR을 발현하는 조작된 세포의 항종양 활성이, 외인성 TGF $\beta$ 가 추가되지 않고, 1:1 또는 1:5의 E:T 비율을 제외하고 상기 실시예 6.A에 일반적으로 기재된 바와 같이 회전 타원체 사멸 분석에 의해 평가되었다. 도 12a(카스파제) 및 12b(회전 타원체 크기)에 도시된 바와 같이, *TGFBRII* 유전자 좌에서 TCR의 HDR 매개 표적화된 통합(MND KO/KI)에 의해 재조합 TCR로 조작된 세포가, 상기 연구에서 테스트된 각 E:T 비율에서 가장 높은 카스파제 활성 및 회전 타원체 크기의 가장 많은 감소를 나타냈다. *TGFBRII* 유전자 좌가 KO된 렌티바이러스 전달에 의해 재조합 TCR로 조작된 세포(TCR LV *TGFBR2* KO)가 유사하게 높은 카스파제 활성을 또한 나타냈다.

[1366] **C. 결론**

[1367] 회전 타원체 사멸 분석에 의해 도시된 바와 같이, 내인성 *TGFBR2* 유전자의 녹아웃 또는 (내인성 *TGFBR2* 유전자의 녹아웃을 또한 초래하는) 내인성 *TGFBR2* 유전자 내로 예시적인 TCR 암호화 핵산 서열의 표적화된 녹인이 개선된 항종양 활성을 초래한다는 관찰과 결과가 일치했다. 결과가, 개선된 항종양 활성 및 기능을 나타내고, TGF $\beta$  매개 면역 억제에 덜 민감하거나 이에 내성이 있는 조작된 세포를 생성하기 위해 예를 들어, 상동성 의존적 수선(HDR)에 의해 재조합 수용체, 예컨대 재조합 TCR을 암호화하는 핵산 서열의 표적화된 녹인의 사용을 더욱 지지한다.

[1368] **실시예 7: 내인성 유전자 좌에서 우성 음성 *TGFBR2*의 생성 및 CAR을 암호화하는 전이 유전자 서열의 표적화된 통합을 위한 주형 폴리뉴클레오티드**

[1369] 예시적인 주형 폴리뉴클레오티드가, 내인성 *TGFBR2* 유전자 좌에서 우성 음성 *TGFBRII*(DN-*TGFBRII*)를 또한 생성 하면서 내인성 형질 전환 성장 인자 베타 수용체 2(*TGFBR2*) 유전자 좌에서 예시적인 CAR을 암호화하는 전이 유전자 서열의 표적화된 통합을 위해 생성되었다.

[1370] 상기 실시예 1.A에 기재된 바와 같이, DN-*TGFBRII*는 수용체의 단백질 키나제 도메인이 결여되고 비기능성 수용체 복합체를 형성함으로써 TGF 베타(TGF $\beta$ ) 신호 전달을 방해할 수 있다. [5' 상동성 암]-[전이 유전자 서열]-[3' 상동성 암]의 일반적인 구조를 갖는 예시적인 주형 폴리뉴클레오티드가 생성된다. 전이 유전자 서열이, i) BCMA에 결합하는 scFv, 면역 글로불린 유래 스페이스, CD28 유래 막관통 도메인 및 4-1BB 유래 공자극 영역을 포함하는 CAR을 암호화하는 서열 및 ii) 핵산 서열의 상류에 P2A 리보솜 건너뛰기 요소를 암호화하는 서열을 포함했다. 5' 상동성 암이, 내인성 인간 *TGFBR2* 유전자 좌의 제3 인트론 및 제4 엑손의 일부에 상동성인 약 600 bp의 서열을 함유하고, *TGFBR2*의 막관통 도메인을 암호화하는 서열의 일부를 포함한다(서열 번호: 70에 제시된

5' 상동성 암 서열). 3' 상동성 암이 제4 인트론의 일부에 상동성인 약 600 bp의 서열(서열 번호: 72에 제시된 3' 상동성 암 서열)을 함유한다.

[1371] HDR에 의한 전이 유전자 서열의 통합이, 번역 및 리보솜 건너뛰기 시, (P2A 서열의 절단된 N-말단 부분에 융합된) DN-TGFBRII 폴리펩티드 및 (P2A 서열의 절단된 C-말단 프롤린에 융합된) CAR을 초래하는 내인성 *TGFBRII* 프로모터의 제어 하에 DN-TGFBRII-P2A-CAR을 암호화하는 mRNA 전사물의 발현을 초래한다.

[1372] 본 발명은, 예를 들어 본 발명의 다양한 측면을 설명하기 위해 제공된 개시된 특정 구현예로 범위를 한정하려는 의도가 아니다. 기재된 조성물 및 방법에 대한 다양한 변형이 여기의 기재 및 교시에서 명백해질 것이다. 상기 변형은 공개의 진정한 범위와 정신에서 벗어나지 않고 실행될 수 있으며, 본 발명의 범위 내에 속하도록 의도된다.

[1373] 서열

#	서열	주석
1	ESKYGPPCPPCP	스페이서 (IgG4 힌지) (aa)
2	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCTTGCCT	스페이서 (IgG4 힌지) (nt)
3	ESKYGPPCPPCGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSAFLYSLRSLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLGK	힌지-C <sub>H3</sub> 스페이서
4	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTKAKAGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSAFLYSLRSLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKLSLSLGK	힌지-CH2-C <sub>H3</sub> 스페이서
5	RWPESPKAQASSVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEKKEKEKEEQEERETKTEPCPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHNSGQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPQLPQRLMALREPAAPVAPVLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH	IgD-힌지-Fc
6	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR	T2A
7	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFNKNTSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNCYANTINWKKLFGTSGQTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCAPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNTPKIPSIATGMVVALLLLVALGIGLFM	tEGFR
8	FWVLVVGGVLAQYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (Uniprot P10747 의 aa 153-179)

[1374]

9	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKP FWVLVWVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV	CD28 (Uniprot P10747 의 aa 114-179)
10	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28 (Uniprot P10747 의 aa 180-220)
11	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS	CD28(LL 이 GG 로)
12	KRGRKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFEEEEGGCEL	4-1BB (Q07011.1 의 aa 214-255)
13	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 제타
14	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 제타
15	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLRREYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD KMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR	CD3 제타
16	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSISGDLHLPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFL LIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISGDVVISGNKNLCYANTI NWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNL LEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLV WKYADAGHVCHLCPNCTYGCTGPGLEGCPNTPKIPSIATGMVGGALLLVVALGIGLFM	tEGFR
17	EGRGSLLCGDVEENPGP	T2A
18	GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
19	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	P2A
20	QCTNYALLKLAGDVESNPGP	E2A
21	VKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP	F2A
22	-PGGG-(SGGGG) <sub>5</sub> -P- (여기에서 P 는 프롤린, G 는 글리신 및 S 는 세린임)	링커

[1375]

23	GSADDAKKDAAKKDGKS	링커
24	atgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccacaccagcattcctcctgatcca	GMCSFR 알파 사슬 신호 서열
25	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP	GMCSFR 알파 사슬 신호 서열
26	MALPVTALLLPLALLHA	CD8 알파 신호 펩티드
27	EPKSCDKTHTCPPCP	хин지
28	ERKCCVECP	хин지
29	ELKTPVLDITHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	хин지
30	ESKYGPPCPSCP	хин지
31	X <sub>1</sub> PPX <sub>2</sub> P X <sub>1</sub> 은 글리신, 시스테인 또는 아르기닌 X <sub>2</sub> 는 시스테인 또는 트레오닌	хин지
32	Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	хин지
33	Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	хин지
34	Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro	хин지
35	RASQDISKYLN	CDR L1
36	SRLHSGV	CDR L2
37	GNTLPYTFG	CDR L3
38	DYGVS	CDR H1
39	VIWGSETTYNSALKS	CDR H2
40	YAMDYWG	CDR H3
41	EVKLQESGPGVLVAPSQSLVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTI IKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	VH
42	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFGSGSG TDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIT	VL

[1376]

43	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSGSG TDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEITGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVKLQESGPGLV APSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVIWGSETTYNSALKSRLTIKDNSKSQVFLK MNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVTVSS	scFv
44	KASQNVGTNVA	CDR L1
45	SATYRNS	CDR L2
46	QQYNRYPYT	CDR L3
47	SYWMN	CDR H1
48	QIYPGDGDTNYNGKFKG	CDR H2
49	KTISSVDFYFDY	CDR H3
50	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWWKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFK GQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSS	VH
51	DIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGV PDRFTGSG SGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	VL
52	GGGGSGGGSGGGGS	링커
53	EVKLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWWKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFK GQATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYFCARKTISSVDFYFDYWGQGTTVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSDIELTQSPKFMSTSVGDRVSVTKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKPLIYSATYRNSGV P RFTGSGSGTDFTLTITNVQSKDLADYFCQQYNRYPYTSGGGTKLEIKR	scFv
54	HYYYGGSYAMDY	HC-CDR3
55	HTSRLHS	LC-CDR2
56	QQGNTLPYT	LC-CDR3
57	gacatccagatgaccagaccctccagcctgagcgcagcctggcgaccgggtgaccatcagctgccgggcca ggacatcagcaagtacctgaactggtatcagcagaagcccgacggcaccgtcaagctgctgatctaccacaccagccgctg cacagcggcgtgccagccggttagcggcagcggctccggcaccgactacagcctgacctctccaactggaacaggaa gatatcgccacctctttgaccagcagggaacacactgcctacacctttggcggcgaacaagctggaatcaccggcag cacctccggcagcggcaagcctggcagcggcgaggcagcaccaggcggcagctgagctgagcggcggcctg gcctggtggccccagccagagcctgagcgtgacctgaccgtgagcggcgtgagcctgcccgactacggcgtgagctg	scFv 암호화하는 서열

[1377]

	atccggcagccccaggaaggcctggaatggctggcgtgatctggggcagcgagaccactactacaacagcgcct gaagagccgctgaccatcatcaaggacaacagcaagagccaggtgttctgaagatgaacagcctgcagaccgacgaca ccgccatctactactgcceaagcactactactacggcggcagctacgccatggactactggggccagggcaccagcgtgac cgtgagcagc	
58	GSTSGSGKPGSGEGSTKG	링커
59	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKS CMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLTVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFF MCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPDLLLIVIFQVTGISLLPPLGVAISIIIFCYRVNRQKLSSTWETGK TRKLMFSEHCAIILEDSDISSTCANNINHNTELLPIELDTLVGKGRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVA VKIFPYEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAERKTELKQYWLITAFHAKGNLQEYLTRHVISWE DLRKLGSLLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNLDTCCCLDFGLSLRLDPTLSVDDLA NSGQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEMTSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVR EHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWLHNHQIQMVCETLTECWDHDEARLTAQCVAERFSELEHLD RLSGRSCSEEKIPEDGSLNNTK	인간 TGF-베타 수용체 유형-2 (TGFR2) 동형 단백질 1 Uniprot P37173-1
60	MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIASTIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPCSNRTAHLPLRHINNDMIVTDNN GAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLTVCHDPKLPYH DFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEYNTSNPDLLLIVIFQVTGISLLPPLGVAIS VIIIFCYRVNRQKLSSTWETGKTRKLMFSEHCAIILEDSDISSTCANNINHNTELLPIELDTLVGK GRFAEVYKAKLKQNTSEQFETVAVKIFPYEYASWKTEKDIFSDINLKHENILQFLTAERKTELKQYW LITAFHAKGNLQEYLTRHVISWEDLRKLGSLLARGIAHLHSDHTPCGRPKMPIVHRDLKSSNILVKNL TCCLDFGLSLRLDPTLSVDDLANSQVGTARYMAPEVLESRMNLENVESFKQTDVYSMALVLWEM TSRCNAVGEVKDYEPFPGSKVREHPCVESMKDNVLRDRGRPEIPSWLHNHQIQMVCETLTECWDH DPEARLTAQCVAERFSELEHLDRLSGRSCSEEKIPEDGSLNNTK	인간 TGF-베타 수용체 유형-2 (TGFR2) 동형 단백질 2 Uniprot P37173-2
61	ggagagggagaaggctctcggcggagagaggtcctgccagctgtggcgaggagtctctgttcccccgagcgtg agttgaagttagtgactcctcgcgcgacggagcagcagacacccccgcgtgcacccgctcgggacagagcgggac tcctgtgagcttccccgcccgggggctccccgcctcggcctccaggccccctcctggctggcagcgggcg ccacatctggccccacatctgcgtcggccccgcgggggtccggagagggcgggcgaggcgagccaggg gtccgggaaggcggcctcggctgctgggggctcgtctatgacgagcaggggtctgcatgggtcgggggctgctc aggggctgtggcgtgcacatcgtcgtggacgctatgccagcacgatcccaccgacgttcagaagtcggttaata	인간 TGF-베타 수용체 유형-2 (TGFR2) 전사물 변이체 B NCBI 기준 서열: NM_003242.5

[1378]

<p>                     acgacatgatagtcactgacaacaacggcagtcagttccacaactgtgaaatgtgatgagatccacctgtgac                      aaccagaaatcctgcatgagcaactgcagcatcacctccatctgtgagaagccacaggaagctgtgtgctgatggagaa                      agaatgacgagaacataaactagagacagtttccatgacccaagctcccaccatgactttattctggaagatgctgctt                      tccaaagtgcattatgaaggaaaaaaagcctggtgagactttctcatgttctgtagctctgatgagtgcaatgacaac                      atcatcttctcagaagaataaacaccagcaatcctgactgttgtagtcatattcaagtgcagggcatcagcctcctgccacc                      actgggagtgtccatatctgcatcatcttctactgctaccgcttaaccggcagcagaagctgagttcaacctgggaaacc                      ggcaagacgcggaagctcatggagtgcagcagcactgtgcatcatcctggaagatgaccgctgacatcagctccactg                      gtgccaacaacatcaaccacaacagagctgctgccattgagctggacaccctgtgggaaaggctgttctgtaggt                      ctataaggccaagctgaagcagaacactcagagcagttgagacagtggcagcaagatcttccctatgaggatgct                      ctggaagacagagaaggacatcttctcagacatcaatctgaagcatgagaacatactccagttctgacggctgaggagcg                      gaagacggagtggggaacaatactggtgatcaccgcttccacgcaagggaacactcagagtagctgacgcggc                      atgtcatcagctgggaggacctgcgaagctggcagctccctgcccggggattgctcacctccacagtgatcacactcca                      tggggaggccaagatgccatctgacacgggacctcaagagctcaatctctggaagaacgacctaacctgctgct                      gtgtgacttgggcttccctgctgctgaccctactgtctgtgagatcctggttaacagtgggcaggtgggaaactgcaag                      atactggtccagaagctcagaatccagatgaattggagaatgtgagcttcaagcagaccgagtgctactccatggc                      tctggtgctctggaaatgacatctcgtgtaatgagtgaggagaagtaaaagattatgacctcattgttccaagtgcg                      ggagaccctctgtcgaagcatgaaggacaacgtgtgagagatcaggggaccagaaatcccagcttctggtcaa                      ccaccagggtccagatggtgtgtgagacgttgactgagtgctggaccacgaccagaggccgtctcagcccagtg                      tgtggacaacgctcagtgagctggacatctggacaggctctggggaggagctgctggaggagaagattctgaa                      acggctccctaaactacaaatagctcttctgggagcggctggccatgtccaagaggctgcccctcaccaaagaaca                      gaggcagcaggaagctgcccgaactgatctcctgaaaaccaaggggtcactcccctcctgtaagctgtgggata                      agcagaaacaacagcagggagtggtgacatagagcattctatgaccttgacattgtcataggataagctgtgttagcac                      ttctcaggaatgagattgattttacaatagccaataacattgcactttattaatgcctgtatataaatatgactatgttt                      atatatatatatatatctatatatgtctatagctctatatatagccataccttgaaaagagacaaggaaaacatcaatattc                      ccaggaaattggtttattggagaactccagaaccaagcagagaaggaaggaccatgacagcattgacatttgacaatca                      cacatgagtggttctgactgtaaaacagtgaaacttgcagtaggaaagaggtccatgtctcacagccagctatgaccaca                      ttgactgtctttgcaaaataatcctcctgactctctctggccatggaactaagtagtgagctgttggaggac                      cagtggtccggggtcctgtgctcctatttctctgactttcatttaagctccaagcccaaatctgggggctagtttga                      aactcctcacaactagtttagaaactcaccatcttaatacctgaaatgtttgaacccacttttacctcatgggtgcaga                 </p>
--

[1379]

	<p>aaaatcagaacagatgtcccatcctatgctgattgcccaccatctactaatgaaaaattgtctttttcatcttccctgcacttat                  gttactattctctgctcccagcttcatcttttcaaaaaggagcaaatctcactctaggctttatcggtttactttttcattacactt                  gacttgattttctagttttctatacaaacaccaatgggttccatctttctgggctcctgattgctcaagcacagttggcctgatgaa                  gaggatttcaactacacaatactatctgtcaggactatgacctcaggcacttaaacatatgtttgttggtcagcacagcgtt                  tcaaaaagtgaagccactttataaatattggagattttgagaaaatctggatcccaggttaaggatagcagatggtttcag                  ttatctccagtcacgttcacaaaatggaaggtggagacactcaaaagctgcctcacttctcactgtaaacattagcttttc                  cactgcctacctggacccagcttaggaataaatctgcacctaaccaaggtcccttgaagaatgctcattcaagcagctattc                  tctgggtataaatatgattttgactacctatctggttaagattgaagttggcctttattggactaaagggaaactcctttaa                  gggctcagttgaccaagttcttttcttatatgttaatagtttaccctctgcatggagagagggagtgctttactccaagaag                  ctttctcatggttaccgttctccatcatgcccagcttcaacctttgcagaaattactagagaggattgaaatgtggacaca                  aaggtccatttgcagttgaaaaattgtgtccacaaggacaagaacaaagtatgagctttaaactcattaggaactgtttaa                  tcaacaagaagtgtaatgctgcaagtaactctttttaaacttttgaagctactattttcagcaaataggaatattagaga                  gggactggtagtgagaatagctctgttttgaggtggaaggtctcattttatgagatttttaagatactgcaaaagtttg                  gaaatagaaccttagccacctcagtggtgggtggctgagagttaaagacagtggtgctgcagtagcatagaggcgc                  ctagaataactcagtcacgttagggcatgctgatacccaatagctgttgccttagctcagcttagtggtgatttctagaat                  actggtcattcatgagatattcaagattcaagatttctcacttctgggtatcagcataaactggaatgtagtgcagaggat                  actgtggctgtttgtttatgttttttcttatcaagaaaaagaccaaggaataacattctgtagttcctaaaaatactgactttt                  ttactactatacataaagggaagttttattctttttatggaacttgcagctgtactcatgtattaaaaatggaatgtaagtctat                  atactcttttatacaaaagtcaagcactatttttattctatgctgtttgtctttacataaaaaatgtttattagattgaataa                  agcaaaatactcaggtgagcatcctcctctgttccattcctagtagctaaa</p>	
62	<p>ggagagggagaaggtctcgggaggagagaggtctgccagctgttggcagaggatttctgtttccccgcagcgtg                  agttgaagttgagtgactcgcgcagcgagcagacacccccgcgtgacccgcctgggacaggagccggac                  tcctgtcagcttccctcggccgggggctccccgcctcggcctcagccccctcctggtgctgagcgggctg                  ccacatctgcccgcacatctgctgcccggcggcgggtccggagagggcgggcgggagggcgaccagg                  gtccgggaagcgccgtccgctgctggtgggctgctatgacgagcagcgggtctgcatgggtcggggctgctc                  aggggctgtgcccgtgcacatctgctgtgagcgtatcgcagcagatcccaccgacgttcagaagtcggatgtg                  aatggagggccagaagatgaaatcatctgcccagctgtaataggactgccatcactgagacatattaataacgacatg                  atagtactgacaacaaggtgctcagtttccaaactgtgtaattttgtgagattttccacctgtgacaaccagaa                  atcctgcatgagcaactgcagcatcacctcatctgtgagaagccacaggaagtctgtgtgctgtatggagaagaatgac</p>	<p>인간 TGF-베타                  수용체 유형-2                  (TGFR2) 전사물                  변이체 A                  NCBI 기준 서열:                  NM_001024847.2</p>

[1380]

<p>gagaacataacactagagacagtttgccatgacccaagctcccctaccatgactttattctggaagatgctgcttccaagt  gcatatgaaggaaaaaaaaaaacctggtagactttctcatgttctctgtagctctgatgagtgcaatgacaacatcatctc  tcagaagaataaacaccagcaatcctgactgttgctagtcataattcaagtacagggatcagcctcctgccaccactgggag  ttgccatatctgcatcatcttctactgctaccggttaaccggcagcagaagctgagttcaacctgggaaaccggcaagac  gcggaagctcatgaggtcagcgagcactgtgccatcatcctggaagatgaccgctctgacatcagctccacgtgtgccaaca  acatcaaccacaacacagagctgctgccattgagctggacaccctggggaaaggctgttctgtaggtctataaggc  caagctgaagcagaacactcagagcagtttgagacagtggcagcaagatcttccctatgaggatgctcttggaga  cagagaaggacatcttctcagacatcaatctgaagcatgagaacatactccagttcctgacggctgaggagcggaaacgg  agttggggaacaatactggctgacaccgcttccaccgcaagggcaacctacaggagtacctgacgcggcatgtcatcag  ctgggaggacctgcgaagctggcagctcctcgcgggggattgtcactccacagtgatcacactcattgtgggag  gcccaagatgccatctgacagggactcaagagctcaatactctgtgaagaacgacctaacctgctgctgtgtgatt  tgggcttccctgctgacccctactctgtgtgatgactctgtaacagtgaggagtggaactgcaagatacatgg  ctccagaagcttagaattcagagatgagaaatgtgagcttcaagcagaccgatgtactcctgctgtgtgct  ctgggaaatgacatctcgtgaatgagtgaggagaagtaaaagattatgacctcatttggttccaaggtcgggagcac  ccctgtgcaagcatgaaggcaacggttgagagatcagggcgaccagaaatcccagcttctggtcaaccaccagg  gatccagatggtgtgtagagctgactgagtgctggaccacgaccagagccgctctcacagccagtggtggcag  aacgtctcagtgagctggagatctggacaggctctcggggaggagctcggaggagaagattcctgaagcggctcc  ctaaactaccaatagcttctggggcaggctggccatgtcgaagaggctgcccctctcaaaagaacagaggcag  caggaagctgccccgaactgatcttctgaaaaccaaggggctcactcccctcctgtaagctgtgggataagcagaa  acaacagcagcagggagtggtgacatagacattctatgctttgacattgtataggataagctgtgttagcacttctcag  gaaatgagattgattttacaatagccaataacattgcactttattaatgctgtatataaatatgaatagctatgtttatatata  tatatatctatatatgtctatagcttatatatagccatacctgaaaagagacaaggaacaaatattcccaggaaa  ttggtttattggagaactccagaaccaagcagagaaggaaggaccatgacagcatttagcaatcacacatgacag  tggttctctgactgtaaaacagtgaaattgcatgaggaagaggctccatgtctcacagccagctatgaccacattgacttgc  tttgcaaaataatcctcctgacttctctctgccaatgaaactaagtaggctggtttgaggaccaggttccc  ggggttctgtgcccatttctcctggacttttatttaagctccaagcccaaatctgggggctagttgaaactcctcctc  aacctagtttagaaactcaccctctttaaactctgaatgtttgaaacccacttttaactctggttgagaaaaatcaga  acagatgccccatcagctgattgccccaccatcactaatgaaaaatgttctttttatcttccctgacttattgtactattc  tctgctcccagccttcttcttaaaaggagcaaatctcacttagctttatcgtgttactttttcattacactgacttgattt</p>	
---	--

[1381]

	tctagttttatacaaaccaatgggtccatctttctgggctcctgattgctcaagcacagttggcctgatgaagaggattc aactacacaatactatcattgtcaggactatgacctcaggcacttaacatattgtttgttggtcagcacagcgttcaaaaagt gaagccactttataaatatttgagattttgcaggaatctggatccccaggttaaggatagcagatggttttcagttatctcca gtccacgttcacaaaatgtgaaggtgtggagacacttacaagctcctcactctcactgtaaacattagctctttccactgct acctggacccagctctaggaattaatctgcacctaaccaaggtccctgtaagaatgtccattcaagcagctattctctgggt atataatgatatttgactacctatctgggttaagattgaaagttggcctttattggactaaaggggaactccttaagggtctc agttagcccaagttctttgcttatattgtaattgtttaccctctgattggagagaggagtgctttactccaagaagcttctca tggttaccgttctccatcatgccagccttcaacctttgcagaaattactagagaggattgaaatgtgggacacaaaaggtccc attgcagttagaaaattgtgtccacaaggacaagaacaaagatgagctttaaactccataggaactgttaatacaaaa gaaggttaatctgctcaagtaactctttttaaactttgaaagctactattttcagccaaataggaatattagagagggactg gtagtgagaatcagctctgttgatgggtggaaggtctattttattgagattttaagatacatgcaaaggttggaataga accttaggcaccctcctcagttgggtggctgagagttaagacagtggtgctgagtagcatagaggcctagaaatt ccactgcaccgtaggcctgctgataccatcccaatagctgtgcccattgacctctagtggtgagtttctagaatactgtcca ttcatgagatattcaagattcaagagtattctcactctgggttatcagcataaaactggaatgtagtgcagaggatactgtgct tgttttgtttatgtttttttctattcaagaaaaagaccaaggaataacattctgtagttcctaaaaactgactttttcactacta tacataaagggaagtttattctttatggaacactcagctgtactcatgtattaaaataggaatgtgaatgctataactctttt atatcaaaagtctcaagcacttattttattctatgattgtttgtctttacataaaaaatgtttattagattgaataaagcaaat actcaggtgagcatcctgctctgttcccattctagtagctaaa	
63	GCAGACCGAUGUCUACUCCA	TGFBR2 표적화 도메인 서열 1
64	CCCCUACCAUGACUUUUAUC	TGFBR2 표적화 도메인 서열 2
65	GACAUCUCGCUGUAAUGCAG	TGFBR2 표적화 도메인 서열 3
66	CACAUGAAGAAAGUCUCACC	TGFBR2 표적화 도메인 서열 4
67	AUGAUAGUCACUGACAACAA	TGFBR2 표적화 도메인 서열 5

[1382]

68	CUCCAUCUGUGAGAAGCCAC	TGFB2 표적화 도메인 서열 6
69	TACATGCAGATTTTTGAAGGCAGAAGCTGTGTCATTTTTTTCATGTTCCCAATGCCTGAGCTTA GATAACACTCAGTAAATGGTTGTCTTTTTATTGGCAATATTGAGGACCTGCTGTGTGCTAAGTG CAGTTTACAGTAGTGAAGAAGACATGGTACCTTCCAGCATGGAGTTCCTGTCCGTGGGGGATG GCAAGAGTAGGGAAAGACAGATGTGAAATCAAGAGGTAGAGTCATAGTTTCAATTTAGTTTAAGTT GTACTGAATTGTTACCTAGGAAAAGTATAAGGTGCTATGAAAATGTATAAAATAAGACAGTTTTTC CAAGTTTTCTAGGCCTCTCTTAAGCAGTGACATTTAAGCTGAAGTTTGAAGGAAGAGCAGGGG ATGACGAACAGATGGCCAGAGGCAGGGAAGGCTGAACGAGCATGCACTTGATCCCTGAAATA AAAATTAACAATATCGTATCTACAAAACTATGCAGATGCTAAAATCTATAGATGCTCAGGCATG AACCCTTCTGACAGTACTTACCTACCACATCCAACCTCTCTCCTGTTTTGTTTCCCATC AGAATATAACACCAGCAATCCTGAC	TGFB2 5' 상동성 암 서열 1
70	GTGCAGTTTACAGTAGTGAAGAAGACATGGTACCTTCCAGCATGGAGTTCCTGTCCGTGGGGG ATGGCAAGAGTAGGGAAAGACAGATGTGAAATCAAGAGGTAGAGTCATAGTTTCAATTTAGTTTAA GTTGTACTGAATTGTTACCTAGGAAAAGTATAAGGTGCTATGAAAATGTATAAAATAAGACAGTT TTCCAAGTTTTCTAGGCCTCTCTTAAGCAGTGACATTTAAGCTGAAGTTTGAAGGAAGAGCAGG GGATGACGAACAGATGGCCAGAGGCAGGGAAGGCTGAACGAGCATGCACTTGATCCCTGAAA TAAAAATTAACAATATCGTATCTACAAAACTATGCAGATGCTAAAATCTATAGATGCTCAGGCA TGAACCCACTTCTGACAGTACTTACCTACCACATCCAACCTCTCTCCTGTTTTGTTTCCCA TCAGAATATAACACCAGCAATCCTGACTTGTGCTAGTCATATTTCAAGTGACAGGCATCAGCCT CCTGCCCACTGGGAGTTGCCATATCTGTCATCATCTTCTACTGCTACCGGTTAACCGGC AGCAGAAGCTGAGTTCA	TGFB2 5' 상동성 암 서열 2
71	ATGGAGTTCAGCGAGCACTGTGCCATCATCCTGGAAGATGACCGCTCTGACATCAGCTCCACGT GTGCCAACACATCAACCACAACACAGAGCTGCTGCCATTGAGCTGGACACCCTGGTGGGGA AAGGTCGCTTTGCTGAGGTCTATAAGGCCAAGCTGAAGCAGAACAACCTCAGAGCAGTTTGAGAC AGTGGCAGTCAAGATCTTCCCTATGAGGAGTATGCCTCTTGAAGACAGAGAAGGACATCTTC TCAGACATCAATCTGAAGCATGAGAACAATACTCCAGTTCCTGACGGCTGAGGAGCGGAAGACG GAGTTGGGAAACAATACTGGCTGATCACCGCTTCCACGCCAAGGGCAACCTACAGGAGTAC CTGACGCGGCATGTCATCAGCTGGGAGGACCTGCGCAAGCTGGGCAGTCCCTCGCCCGGGG	TGFB2 5' 상동성 암 서열 3

[1383]

	ATTGCTCACCTCCACAGTGATCACACTCCATGTGGGAGGCCAAGATGCCCATCGTGACAGGG ACCTCAAGAGCTCCAATATCCTCGTGAAGAACGACCTAACCTGCTGCCTGTGTGACTTTGGGCTT TCCCTGCGTCTGGACCCTACTCTGTCT	
72	GTAAGTTAGAGCTAGTGCTAGATCCCCTTTACCTTGAGCCTGGCCTCACCTACCTCTTGATCCAT ATCTCCTGGCTTTATCTCAAACAGCCCTGACTCTGGACACTGGTCTAGGGAATCTAGCCAAAG TATGGAGTCTGCCTTGAGCATACTCTGCTCTGCCTGCCTGAGCATTGCTAATGGACAGCATT TCTCCTCTATCTCAAATCCTCCCAGTTCAGCACATTTTTCTCCTGGATCAATCCTCATTCTC TTCCAGCAAATGTTTTCTTTGTTCAAGCACTGTTAGTACTTTACCTCTATTTTTCCCTCTTTAT GGTTGACTCAGTCCCTTCTGCTCTATACTAGCTGTAGTTGTGTTGTTCTTTGTATTAAGCAT CGTGAAGGCAATCTCCCTGAAGTCCAAATCTACATCCACATGGTCACCCAAGATATGTAGCAC AATGCCTGAACATTGAAAGTAAAATAAGTACTGTGCGACTGAGTGAGCACTTCCACTCTTGAAG CACTCTCACAGATTAAGTAAATGTTTGGCTAAGAACTATTGGAAGGTGATTGGAATCA CCACA	TGFBR2 3' 상동성 암 서열 1
73	GUGGAUGACCUGGCUAACAG	TGFBR2 표적화 도메인 서열
74	GCAGACCGATGTCTACTCCA	TGFBR2 표적 서열 1
75	GACATCTCGCTGTAATGCAG	TGFBR2 표적 서열 2
76	ACAGTGATCACACTCCATGT	TGFBR2 표적 서열 3
77	cgtgaggctccggtgccgctcagtgaggagcgcacatgccacagtccccgagaagtgggggaggggtcgcaa ttgaaccggtcctagagaagtggtgcgctgaaactggaaagtgatgtctgtactggtccgcttttcccgagggt gggggagaaccgtatataagtgagtagtcgctgtaacgctcttttccgcaacggttccgccaacacaggaagt ccgtgtgtggtcccgctgctgctctttacgggttatggccttgcgtgcttgaattactccacgcccctgctgcagta cgtgattctgatcccagcttcgggttgaagtgggtggagagtcgaggccttgccttaaggagccccttcgctcgtg cttgagttgaggcctgctgggctggtggcgccgctgcaatctggtggcaccttcgctgctgctgtcttcgat aagtctctagcattaaaattttgatgacctgctgcgacgctttttctggcaagatagcttgaatgcgggccaagatctg cacactggtattcggttttggggccgctggcgacggggccgctgctcccagcgacatggtcgcgaggcgggg	EF1 알파 프로모터(GenBank: J04617.1)

[1384]

	cctgcgagcgcggccaccgagaatcggacggggtagtctcaagctggccgcctgcttggtgcctgcctgcgccc ggtatcggccctggcggcaaggctggccggctggcaccagttgctgagcggaaagatggcgttcccggcc ctgctcagggagctcaaatggaggacggcgctcgggagagcggcggtgagtcaccacacaaggaaggg gccttcctcctcagccgtcctcatgtgactccacggagtaccggcgccgctcaggcacctcgattagttctcagcttt ggagtacgtcgtcttaggtgggggaggggtttatcgatggagttcccacactgagtggtggagactgaagttag gccagctggcactgatgaattccttgaattgcccttttgagttggatctggtcattcctcaagcctcagacagtggtc aaagtttttctcattcaggtgctgtaa	
78	CTGACCTTCTCTCTCCACAG	인간 HBB 스플라이스 수용체 부위
79	TTTCTCTCCACAG	인간 IgG 스플라이스 수용체 부위
80	GTAGCTCTGATGAGTGAAT	TGFBR2 표적 서열 A
81	ATGAATCTTCACTCTAGG	TGFBR2 표적 서열 B
82	GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVHYTGMLEDGKKMDSSRDNRNPKFKMLGKQEVIRGWEEGVAQ MSVQRAKLTISPDYAYGATGHPIPPHATLVFDVELLKE	FKBP
83	GVQVETISPGDGRTPFKRGQTCVHYTGMLEDGKKVDSSRDNRNPKFKMLGKQEVIRGWEEGVAQ MSVQRAKLTISPDYAYGATGHPIPPHATLVFDVELLKE	FKBP12v36
84	MGSNKSQPKDASQRRR	인간 C-Src 아실화 모티프
85	MGCXC	이중 아실화 모티프
86	CAAX	CAAX 모티프
87	ACAGGAGTACCTGACGCGGC	TGFBR2 표적 서열 C

[1385]

88	CTGTTAGCCAGGTCATCCAC	TGFBR2 표적 서열 D
89	GGGTGCCAGCTCAATGGGC	TGFBR2 표적 서열 E
90	TCATAATGCACTTTGGAGAA	TGFBR2 표적 서열 F
91	TGACTTTATTCTGGAAGATG	TGFBR2 표적 서열 G
92	GGCCGCTGCACATCGTCCTG	TGFBR2 표적 서열 4
93	GCGGGGTCTGCCATGGGTCG	TGFBR2 표적 서열 5
94	AGTTGTCATGCAGGATTC	TGFBR2 표적 서열 6
95	AAGTCATGGTAGGGGAGCTT	TGFBR2 표적 서열 7
96	AGTCATGGTAGGGGAGCTTG	TGFBR2 표적 서열 8
97	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	예시적인 gRNA 상보성 도메인
98	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGAAA <b>AGCAUAGCAAGUUAAAA</b> <b>U</b> AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	예시적인 gRNA 상보성 도메인
99	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUGAAA <b>CAGCAUAGCAAGUUAA</b> <b>AAU</b> AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	예시적인 gRNA 상보성 도메인
100	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAGCUAUGCUUUUU <b>GAAACAAAACAGCAU</b> <b>AGCAAGUUAAAAU</b> AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	예시적인 gRNA 상보성 도메인
101	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGU <u>A</u> UUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAA <u>U</u> AUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	예시적인 gRNA

[1386]

102	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUU <u>A</u> AGAGCUAGAAUAGCAAGUU <u>U</u> AAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	예시적인 gRNA
103	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGU <u>U</u> UAGAGCUAUGCUGU <u>U</u> UGGAAACA <u>U</u> ACAGCAUA GCAAGUAA <u>U</u> AUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC	예시적인 gRNA
104	AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCU	예시적인 근위 및 꼬리 도메인
105	AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGGUGC	예시적인 근위 및 꼬리 도메인
106	AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCGGAUC	예시적인 근위 및 꼬리 도메인
107	AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG	예시적인 근위 및 꼬리 도메인
108	AAGGCUAGUCCGUUAUCA	예시적인 근위 및 꼬리 도메인
109	AAGGCUAGUCCG	예시적인 근위 및 꼬리 도메인
110	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUU <u>A</u> AGAGCUAGAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUU	예시적인 키메라 gRNA
111	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUU <u>A</u> GUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGG CAAAAGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUUUU	예시적인 키메라 gRNA
112	KKPYSIGLDIGTNSVGWAVTDDYKVPAKMKVLGNTDKSHIEKNLLGALLFDSGNTAEDRRLKRTA RRRYTRRRNRILYLQEIFSEEMGKVDDSFHRLSDSLVTEDKRGERHPIFGNLEEVKYHENFPTIYHLR QYLADNPEKVDLRLVYLALAHIIKFRGHFLIEGKFDTRNNDVQRLFQEFNAVYDNTFENSSLQEQNVQ VEEILTDKISAKKDRVLKLPNEKSNRFAEFLKLVGNQADFKKHFELEEKAPLQFSKDTYEEELVLL AQIGDNYAELFLSAKKLYDSILLSGILTVTDVGTAKPLSASMIQRYNEHQMDLAQLKQFIRQKLSDKYN EVFSDVSKDGYAGYIDGKTNQEAIFYKLLNKGSGYFLDKIEREDFLRKQRTFDNGSIPHQIHLQE MRAIIRRQAEFYPFLADNQDRIEKLTFRIPYVVGPLARGKSDFAWLSRKSADKITPWNFDEIVDKESSA EAFINRMTNYDLYLPNQKVLPHSLLYEKFTVYNELTKVKYKTEQGKTAFDANMKQEIFDGVFKVYR KVTKDKLMDFLEKEFEFRIVDLTGLDKENKVFNASYGYHDLCKILDKDFLDNSKNEKILEDIVLTLTLF	스트렙토코커스 류탄스(Streptococcus mutans) Cas9

[1387]

	<p>EDREMIRKLENYSDLLTKEQVKKLERRHYTGWGRLSAELIHGIRNKESRKTILDYLIDDGNSNRNFM                  QLINDDALSFKEEIAKAQVIGETDNLNQVVSADIAGSPAIKKGILQSLKIVDELVKIMGHQPENIVVEMA                  RENQFTNQGRNSQQRKGLTDSIKEFGSQILKEHPVENSQIQNDRLFYLLQNGRDMYTGEELEDID                  YLSQYDIDHIIPQAFIKDNSIDNRVLTSSKENRGKSDVPSKDVVRKMKSYWSKLLSAKLITQRKFDNL                  TKAERGGTDDDKAGFIKRLVETRQITKHVARILDERFNTETDENNKIRQVKIVTLKSNLVSFRKEF                  ELYKREINDYHHAHDAYLNAVIGKALLGVYPQLEPEFVYGDYPHFHGHKENKATAKFFYSNIMNFF                  KKDDVRTDKNGEIIWKKDEHISNIKKVLSYPQVNIIVKVEEQTGGFSKESILPKGNSDKLIPRKTCKFYW                  DTKKYGGFDSPIVAYSILVIADIEKGGKSKLKTVKALVGVTIMEKMTFERDPVAFLEKRGYRNVQEENIIK                  LPKYSLFKLENGRKRLLASARELQKGNELVPHLGLTLLYHAKNIHKVDEPKHLDYVDKHKDEFKELLD                  VVSNFSSKYTLAEGNLEKIKELYAQNNGEDLKEASSFINLLTFTAIGAPATKFFDKNIDRKRYTSTTEIL                  NATLIHQSIQGLYETRIDLNLKGGD</p>	
<p>113</p>	<p>DKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTARRR                  YTRRNKRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKL                  VDSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSVDKLFILQVQTYNQLFEENPINASGVDAKAI                  LSARLSKSRRENLIQAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVEMAREN                  QIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIF                  FDQSKNGYAGYIDGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRQRTFDNGSIPHQIHLGELH                  AILRRQEDFPFLKDNREKIKILFRIPYYVGLARGNSRFAMWTRKSEETIPWNFEEVDKGASAQS                  FIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFTNRKV                  TVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDREM                  IEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLIHD                  DSLTFKEDIQAQVSGQGDSLHEHIANLAGSPAIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVEMAREN                  QTTQKQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLS                  DYDVHIVPQSFLKDDSIDNKVLTSDKNRGSNDNVPSEEVVKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNL                  TKAERGGSELDKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVDFRKDF                  QFYKREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFY                  SNIMNFFKTEITLANGEIRKPLIETNGETGEIVWDKGRDFATVRKVLSPQVNIIVKTEVQTGGFSKE                  SILPKRNSDKLIARKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGSKLLKSVKELLGITIMERSSEFNPI                  DFLEAKGYKEVKKDLIIKPKYSLFELENGRKRMLASAGELQKGNELALPSKYVNFYLYLASHYEKLGSP</p>	<p>스트렙토코커스                  피오게네스(Streptococcus pyogenes) Cas9</p>

[1388]

	EDNEQQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLSDKVLSAYNKHRDKPIREQAENIIHFTLTNLG APAAFYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLIHQSIITGLYETRIDLSQLGGD	
114	TKPYSIGLDIGTNSVGWAVTTDNYKVPKMKMVLGNTSKYIKNLLGVLLFDSGITAEGRRLLKRTARR RYTRRRNRILYLQEIFSTEMATLDDAFFQRLDDSFVLPDDKRDSKYPIFGNLVEEKAYHDEFPTIYHLRK YLADSTKKADLRLVYLALAHMIKYRGHFLIEGFEFNSKNNDIQNFQDFLDTYNAIFESDLSLENSKQLE EIVKDKISKLEKKDRILKLPGEKNSGIFSEFLKLVGNQADFRKCFNLDEKASLHFSKESYDELDLELLGYI GDDYSDVFLKAKKLYDAILLSGFLTVDNETEAPLSSAMIKRYNEHKEDLALLKEYIRNISKTYNEVFKD DTKNGYAGYIDGKTNQEDFYVYLKLLAEFEGADYFLEKIDREDFLRKQRTFDNGSIPYQIHLQEMRAI LDKQAKFYFPLAKNERIEKILTRIPYVYVGLARGNSDFAWSIRKREKITPWNFEDVIDKESSAEAFIN RMTSFDLYLPEEKVLPKHSLLYETFNVYNELTKVRFIAESMRDYQFLDSKQKDIVRLYFKDKRKVTDK DIIEYLHAIYGYDIELGKIEKQFNSSLSTYHDLNIIINDKEFLDDSSNEAIIIEIHTLIFEDREMIKQRLSK FENIFDKSVLKKLSRRHYTGWGLSAKLINGIRDEKSGNTILDYLIIDGISNRNFMQLIHDDALSFKKI QKAQIIGDEDKNGIENKSLPGSPAIAKKGILQSIKIVDELVKVMGGRKPESIVVEMARENQYTNQGS NSQQLRKRLEKSLKELGSKILKENIPAKLSKIDNNAQNDRLYLYLQNGKDMYTGDDLDIDRLSNYDI DHIIQAFKLDNSIDNKVLSASNRGKSDDVPSLEVVKRRTFWYQLKSKLISQRKFDNLTKAERGG LSPEDKAGFIQRQLVETRQITKHVARLLDEKFNKKDENNRVAVRTVKIITLSTLVSQFRKDFELYKVEI NDFHHAHDAYLNAVVASALLKKYKLEPEFVYGDYPKYNSFRERKSATEKVYFYSNIMNIFKKSISLAD GRVIERPLIEVNEETGESVWNKESDLATVRRVLSYPQVNVVKKVEEQNHGLDRGKPKGLFNANLSSKP KPNSNENLVGAKEYLDPKYGGYAGISNSFTLVKGTIEKGAKKITNVLEFQGISILDRINYRKDKLNF LLEKGYKDIELIIEPKYSLFELSDGSRMLASILSTNNKRGEIHKGNQIFLSQKFKLLYHAKRISNTINEN HRKYVENHKKFEELFYIIEFNENYVGAKNKGLLNSAFQSWQNHSDIELCSSFIGPTGSEKGLFELT SRGSAADFEFLGVKIPRYRDYTPSSLLKDATLIHQSVTGLYETRIDLAKLGEG	스트렙토코커스 써모필러스(Streptococcus thermophilus) Cas9
115	KKPYTIGLDIGTNSVGWAVLTDQYDLVVKRKMKIAGDSEKKQIKKNFWGVRLFDEGQTAADRRMART ARRRIERRRRNRSYLQGIFAEEMSKTDANFFCRLSDSFYVDNEKRNSRHPFFATIEEEVEYHKNYPTIYH LREELVNSSEKADLRLVYLALAHIIKYRGNFLIEGALDTQNTSVDGIYKQFIQTYNQVFASGIEDGSLKKL EDNKDVAKILVEKTRKEKLERILKLYPGEKSAGMFAQFISLIVGSKGNFQKPFDLIEKSDIECAKDSYEE DLESLLALIGDEYAEFVAANKNAYSAVVLSIITVAETETNAKLSAMIERFDTHEEDLGELKAFIKLHLPK HYEEIFSNTKHYAGYIDGKTKQADFYKYMKMTLENIEGADYFIAKIEKENFLRKQRTFDNGAIPHQL HLEELEAILHQQAKYYPFLKENYDKIKSLVTRIPYVYVGLANGQSEFAWLTRKADGEIRPWNIIEKVD	리스테리아 이노쿠아(Listeria innocua) Cas9

[1389]

	<p>GKSAVDFIEKMTNKDYLPKENLVPKHS LCYQKYL VYNELTKVRYINDQ GKTSYFSGQEKEQIFNDLFK                  QKRKVKKKDLFLRNM SHVESPTIEGLEDSFNSSYSTYHDLLKVGIKQEILDNPVNTEMLENIVKILTV                  FEDKRMIKEQLQQFSDVLDGVLK LERRHYTGWGRLSAKLLMGIRDKQSHLTILDYLMNDDGLNR                  NLMQLINDSNLSFKSIIKEQVTTADKDIQSIVADLAGSPAIKKGILQSLKIVDELVSVMGYPPTIVVE                  MARENQTTGKGNNSRPRYSLEKAIKEFGSQILKEHPTDNQELRNNRLYLQNGKDMYTGQDL                  DIHNLSNYDIDHIVPQSFITDNSIDNLVLTSSAGNREKGGDVPPEIVRKRKVFWEKLYQGNLMSKRR                  FDYLTKAERGGLEADKARFIHRQLVETRQITKNVANILHQRFNYEKDDHGNTMKQVRIVTLKSALVS                  QFRKQFQLYKVRDNDYHHAHDAYLNGVVANTLLKVYPQLEPEFVYGDYHQFDWFKANKATAKK                  QFYTNIMLFFAQDRIIDENGEILWDKKYLDTVKVMYSYRQMNIWKTEIQKGEFSKATIKPKGNSSKLI                  PRKTNWDPKMYGGLDSPNMAYAVVIEYAKGKNKLVFEKKIIRVTIMERKAFEKDEKAFLEEQGYRQPK                  VLAKLPKYTYLECEEGRRRMLASANAQAQGNQQLPNHLVTLHHAANCEVSDGKSLDYIESNREMF                  AELLAHVSEFAKRYTLAEANLNKINQLFEQNKEGDIKAIQSFVLDLMAFNAMGAPASFKEFFETTIERKR                  YNNLKELNSTIYQSITGLYESRRLDD</p>	
<p>116</p>	<p>MAAFKPNISINYILGLDIGIASVGWAMVEIDEEENPIRLIDLGVRFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVR                  RLTRRRRAHRLLRTRLLKREGVLQAANFDENGLIKSLPNTPWQLRAAADRKLTPLEWSAVLLHLIKHR                  GYLSQRKNEGETADKELGALLKGVAGNAHALQTGDFRTPAELALNKFESGHIRNQSDYSHTFSR                  KDLQAEILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIELLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPAEPKAAKNYTY                  AERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLTDTERATLMDEPYRKSCLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDNA                  EASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRLKDRIQPEILEALK                  HISFDKQVQISLALRRIVPLMEQKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVLRALSQA                  RKVINGVVRRYGSPARIHIETAREVGKSFDRKEIEKRQEENRKDREKAAAFREYFPNFVGEPKSKDIL                  KLRLYEQQHGKCLYSGKEINLGRLEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLSGENQNGNQTPE                  YFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKQRILLQKDFEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRLT                  GKGGKRVFASNGQITNLLRGFWGLRQVRAENDRHHALDAVVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNAF                  DGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEVMIRVFGKPDGKPEFEEADTLEKLRLLAEKSSRPEAVH                  EYVTPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSARLDEGVSVLRVPLTQLKLDLEKMNREPERKLYEALK                  ARLEAHKDDPAKAFAPFYKYDKAGNRTQQVKA VRVEQVQKTGVVWRNHNGIADNATMVRVDVF                  EKGDKYYLVPIYSWQVAKGILPDRVQGGDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMEFYF                  ASCHRG TGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFKYQIDELGKEIRPCRLKRRPPVR</p>	<p>나이지리아                  메닌지티디스(Nei                  sseria                  meningitidis)                  Cas9</p>

[1390]

<p>117</p>	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR                  RRYTRRKNRNICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLSEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR                  KKLVDSTDKADLRLYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDA                  KAILSARLSKSRRLENLIAQLPGEKKNGLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDYDDDLNLI                  LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYK                  EIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRQRTFDNGSIPHQIHLGE                  LHAILRRQEDFPFLKDNREKIEKILTFRIPYVYVGLARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEVVDKGASA                  QSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR                  KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNLSLGYHDLLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTFEDR                  EMIEERLKYAHLFDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDQSGKTILDFLKSDFANRNFQMQLI                  HDDSLTFKEDIQAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR                  ENQTTQKGQKNSRERMKRIEIEGKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYV/DQELDINR                  LSDYDVDHIVPQSFLKDDSIDNKVLRSDKNRGKSDNVPSEEVKMKKNYWRQLLNAKLITQRKFD                  NLTKAERGGLELKDAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRK                  DFQFYKREINNYHHAHDAYLNAVVGTAIIKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEIEIGKATAKY                  FFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETGEI/WDKGRDFATVRKVLVSMQVNVIVKTEVQTGGF                  SKESILPRNSDKLIARKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVAKVEKGSKLLKSVKELLGITIMERSFFE                  KNPIDFLEAKGYKEVKKDLIILPKYSLEENGRKRLASAGELQKGNELALPSKYVNFVLYLASHYEKIK                  GSPEDNEQQLFVEQHKHYLDEIIEQISEFSKRVLADANLDKVL SAYNKHRDKPIREQAENIIHLFTLT                  NLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVL DATLIHQSI TGLYETRIDLSQLGGD</p>	<p>스트렙토코커스                  피오게네스(Streptococcus pyogenes) Cas9</p>
<p>118</p>	<p>CGTGAGGCTCCGGTCCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGG                  GGGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAACCTGGGAAAAGT                  GATGTCGTGACTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTCACTAG                  TCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTCCGCCAGAACACAGGTAAGTCCCGTGTGTGGT                  TCCCGGGGCTGGCCTCTTACGGGTTATGGCCCTTGCCTGCTTGAATTACTTCCACCTGGCT                  GCAGTACGTGATTCTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGTGGGAGAGTTCGTGGCCTTGC                  GCTTAAGGAGCCCCCTCGCTCGTGTGAGTTGTGGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCGCG                  TGCGAATCTGGTGGCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATT                  TTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTCTGGCAAGATAGTCTTGTAAATGCGGGCCAAGATCAG</p>	<p>EF1 알파                  프로모터</p>

[1391]

	CACACTGGTATTTTCGGTTTTTGGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCCAGCGCACA TGTTTCGGCGAGGCGGGGCTGCGAGCGCGCCACCGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGC TGCCCGGCCTGCTCTGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTATCGCCCCGCCCTGGGCGGCAAG GCTGGCCCCGGTCGGCACCAAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGCCGCTTCCGGCCCTGCTGCAAG GAGCACAAAATGGAGGACGCGGGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTACCCACACAAAGGA AAAGGGCCTTTCCGCTCAGCCGTCGTTTATGTGACTCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAG GCACCTCGATTAGTTCTCCAGCTTTTGGAGTACGTCGTTTAGGTTGGGGGAGGGTTTTATG CGATGGAGTTTCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTA ATTCTCTTGAATTTGCCCTTTTGGAGTTTGGATCTTGGTTCAATCTCAAGCCTCAGACAGTGGTT CAAAGTTTTTTCTCCATTCAGGTGTCGTGAAAACCTACCCCTAAAAGCCAAA	
119	GGATCTGCGATCGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTCCCCGAGA AGTTGGGGGAGGGGTCGGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGG GAAAGTGATGTCGTACTGCTCCGCTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGTG CAGTAGTCGCCGTAACGTTCTTTTTCGCAACGGGTTTCCGCCAGAACACAGCTGAAGCTTCG AGGGGTCGCATCTCTCTTACGCGCCCGCCCTACCTGAGGCCCATCCACGCCGTTG AGTCGCGTTCTGCCGCTCCCGCTGTGGTGCCTCCTGAACTGCGTCCGCCGTAGGTAAGTTT AAAGCTCAGGTCGAGACCGGCCTTTGTCCGGCGCTCCCTTGAGCCTACCTAGACTCAGCCGG CTCTCCACGCTTTGCTGACCCTGCTGCTCAACTCTACGCTTTGTTTCTGTTTCTGTTCTGCGCC GTTACAGATCCAAGCTGTGACCGGCGCTAC	HTLV1 인핸서를 갖는 Ef1 알파 프로모터
120	GGATCTGGAGCGACGAATTTAGTCTACTGAAACAAGCGGAGACGTGGAGGAAAACCTGGA CCT	P2A 뉴클레오티드 서열
121	atggataaaaagtacagcatcgggctggacatcgggtacaactcagtggggtgggcccgtgattacggacgagtacaagta ccctcaaaaaattaaagtgctgggtaacacggacagacactataaagaaaaatctattggagccttgctgtcactcag gagagacagccgaagccacaagggtgaagcggaccgagcgggtataccaggagaagaaccgatatgctacct gcaagaatctcagtaacgagatggcaagggtgacgatagcttttccatcgctggaagaatcctttgttgaggaaga caagaagcacgaagcaccatcttggcaatattgtcagcgaagtggcatatcacgaaaagtaccgactatctaccact caggaagaagctgggactaccgataaggcgacctcagactatttattggcactgcccacatgattaatttagagg acatttctgatcagggcgacctgaaccggacaacagtgacgtcgataagctgtcatccaactgtgcagacctacaatca	S. 피오게네스 Cas9 코돈 최적화된 핵산 서열

[1392]

<p>actgttcgaagaaaaccctataaatgcttcaggagtcgacgctaaagcaatcctgtccgcgcctctcaaaatctagaagact          tgagaatctgattgctcagttgccccgggaaagaaaaatggattgttggcaacctgatcgcctcagctcggactgacccc          aaattcaaaagtaacttcgacctggccgaagacgctaagctccagctgtccaaggacacatacgtacgacacctgacaatct          gctgcccagattggggatcagtagccgatctttttggcagcaaagaacctgtccgacgccatcctgttgagcgatatctt          gagagtgaacaccgaaatataaagcacccttagcgcattatgatcaagcgtacgacgacatcaggatctgaccc          tgcgaagctctgtgaggaacagctccccgaaaaatacaaggaatcttttgaccagagcaaaacggctacgctggc          tatatagatggggggcagtcaggaggaattctataaattcatcaagccattctcgagaaaatggacggcacagaggagt          gctggcaaaacttaacaggaggacctgctggaagcagcggacctttgacaacgggtctatccccaccagattcatctg          ggcgaaactgcacgcaatcctgaggagcaggaggattttatccttttaagataaccgagaaaaatagaaaagattctt          acattcaggatcccactcagtgaggacctcgcggggcaattcacggttgctggatgacaaggaagtcagaggaga          ctattacacttggaactcgaagaagtggtggacaaggggtcatctgccagctttcatcgagcggatgacaattttgaca          agaacctccctaatgagaagtgctcccaaacattctgctctacgagtactttaccgtctacaatgaactgactaaagtcaa          gtacgtcaccgaggaatgagaagccggcattcctagtggagaacagaagaaggcattgtgacactgtttgtaagac          caacaggaagtgactgtgaagcaactaaagaagactttaagaagatcgaatgtttgacagtgtgaaatttcagggg          ttgaagccctcaatgctcattggggacttaccatgatcttcaagatcataaaggacaaagacttcttgacaacgaag          aaaatgaggatattctgaagacatcgtcctcaccctgaccctgtcgaagacagggaatgatagaagcgttgaaaacc          tatgccacctctcagcagataaagtatgaagcagctgaagcgcaggagatacacaggatggggaagattgtcaaggaag          ctgatcaatggaattaggataaacagagtggaagaccatactgattcctcaaatctgatggcttcgcaataggaaactc          atgcaactgattcacgatgactccttaccctcaaggaggacattcaaaaggctcaggtgagcgggagggagactccctca          tgaacacatcgcgaattggcaggttccccgctattaaaaaggcattcctcaactgtcaaggtggatgaaattgtgtaa          ggtaatgggagacataaagcagaaaaatgtgatcgagatggcccgaaaaccagaccacacagaagggccagaaaa          atagtagagagcggatgaagaggatcagaggagcacaagagctgggatctcagattcacaagaacacccctagaa          aacacacagctgcagaacgaaaaatgtactgtactatctgcagaacggcagagacatgtacgtcgaccaagaactgatatt          aatagactgtccgactatgacgtagaccatctgtgccccagctctcgaaggacgactcattgatacaaaagtcttgaca          gaagcgaagaacaggggtaaaagtataatgtcctagcagggaggtggtaaaaaatgagaactctggcgaca          gctgcttaatgcaaaactcattacacaacggaagttcgataatctgacgaaagcagagaggggtgctgtgagttggaca          aggcagggtttataagcggcagctggtgaaactaggcagatcaaaagcagtgccgagattttggacagccgatg          aacacaaaaacgacgaaaaatgataaactgatacagaggtcaaaagttatcacgctgaaaagcaagctgggtccgatcttcg          gaaagacttcagttctcaaaagttcgcgagattaataactaccatcatgctcacgctgctacctaagcgtgtgtcgggacc</p>
---

[1393]

	<p>gccttgataaagaagtacccaagctggaatccgagttcgatatacgggattacaaagtgtacgatgtgaggaaaatgatag          ccaagtcaggagcaggagattgaaaggccacagctaagtactctttatttaacatcatgaatTTTTTAAGCGGAAATTACC          ctggccaacggagagatcagaagcggcccccttatagagacaaatgggaaacaggtgaaatcgctctgggataaggcag          ggatttcgactgtgagggaaggctgtagtatgccacaggtaaatatcgtgaaaaaaaccgaagtacagaccggaggattt          tccaaggaagcattttgcctaaaagaaactcagacaagctcatcgcccgaagaaagattgggaccctaagaaatcgggg          gatttgactaccaccctgacttattctgtgctggtgtagtaagggtgaaaaaggaagctaaagaagctgaagctcctg          aaggaaactctgggaatcactatcatggaagatcatcctttgaaagaaccctatcgatttctggaggctaagggttacaag          gaggtaagaagacctcatataaactgcaaaaactctctctcgagctgaaaaatggcaggaagagaatgttgccag          cgccggagagctgcaaaagggaacagcctgctctccccaatgttaatttctctatcgctcccactatgaaaag          ctgaaagggtctccgaagataacgagcagaagcagctgttcgcaacagcacaagcactatcggatgaaataatcgaac          aaataagcgagctcgaaggggtatctggcggatgctaatttgcaaaagtactgtctgtataacaagcaccgggat          aagcctattaggaacaagccgagaataataactcactctttactcactcagaatctcgagcccccgcccttcaatacttg          atacgactatcgaccgaaacggatataccagtagcaaaagaggtcctcgatgccaccctcatccaccagtaattactgacctg          acgaaacacggatcgacctctcaactggcggcactag</p>	
122	<p>MDKKYSIGLDIGTNSVGVAVITDEYKVPSSKFKVLGNTDRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR          RRYTRRNRCICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLLEESFLVEEDKKHERHPIFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLR          KKLVDSTDKADRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVDFLQVQTYNQLFEENPINASGVDA          KAILSARLSKSRLENLIAQLPGEKKNLFGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQSKDQYDDDLNLDL          LAQIGDQYADLFLAAKNLSDAILLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLKALVRQQLPEKYK          EIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIKPILEKMDGTEELLVKNREDLLRQRTFDNGSIPHQIHLGE          LHAILRRQEDFYFLKDNREKIEKILTRIPYYVGPLARGNSRFAMWTRKSEETITPWNFEVVDKGASA          QSFIERMTNFDKNLPNEKVLPHKSHLLYEYFTVYNELTKVKYVTEGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNR          KVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLKIKDKDFLDNEENEDILEDIVLTLTLFEDR          EMIEERLKYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKSDFANRNFMLI          HDDSLTFKEDIQKAQVSGQDLSLHEHIANLAGSPAIKKILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIEMAR          ENQTTQKGQKNSRERMKRIEIGIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINR          LSDYDVDHIVPQSLKDDSIDNKVLRSDKNRGSKNVPSSEVWKKMKNYWRQLLNAKLITQRKFD          NLTKAERGGSELKAGFIKRLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRK          DFQFYKVINNYHHAHDAYLNAVVGTAIKKYPKLESEFVYGDYKVDVRKMIKSEQEIQKATAKY</p>	S. 피오게네스 Cas9

[1394]



	<p>cgagcaagaagcagcgcacatcctgctgcagaagtcgacgaggacggctcaaggagcgcaacctgaacgacaccgcta                  cgtgaaccctcctgtccagttcgtggccgaccgcatgctgaccggcaagggaagaagcgcgtgtccagcaa                  cggccagatcaccaacctgctgctgcttctggggcctgctgcaaggtgctgctgagaaacgaccgccacgctctgg                  acgctgtgtgtgtgctgagcaccgtgcatgacgagaagatcacccgcttctgctgctacaaggagatgaacgct                  tcgacggtaaaacctgacaaggagaccggcgaggtgctgaccagaagaccactccccagccctgggagttcttcg                  ccaggagtgatgatccgctgttcgccaagcccacggcaagcccagttcgaggaggccgacacccccgagaagctg                  cgcaccctgctggcgaagctgagcagccgctgagccgtgacgagtagctgactcctctgttctgtgagcgcgccc                  ccaaccgcaagatgagcggcaggtcacatggagaccgtgaagagcgaagcgcctggacgagggcgtgagcgtgct                  gctgctgccccgaccagctgaagctgaaggacctggagaagtggtgaaccgagcgcgagcccaagctgacgag                  gccctgaaggccgctgagggcccaaggacgaccccccaaggccttccgagcccttctacaagtacgacaaggcc                  ggcaaccgaccagcaggtgaagccgtgctgctggagcaggtgagaagaccggcgtgtgtgtgctgcaaccacaac                  ggcatgctgacaacgcccacatgctgctgctggagctgttcgagaaggcacaagtactacctgtgcccatacagct                  ggaggtgccaaggccctgcccacggcggctgtgagggcaaggacgagggactggcagctgatgacg                  acagcttcaactcaagtcagctgcaacccaacgacctggtgaggtgatcaccaagaaggcccgatgttcgctacttcg                  ccagctgcccacggcaccggaacataacatccgcatccaacgacctggaccacaagatcggaagaacggcctcctgg                  agggcatcggcgtgaagaccgctgctcagaagtaccagatcgacgagctgggcaaggagatccgcccctgccc                  ctgaagaagcgcctcctgtgctaa</p>	
<p>124</p>	<p>MAAFKPNPINYILGLDIGIASVGMVEIDEDENPICLIDLGVRFERAEVPKTGDSLAMARRLARSVR                  RLTRRAHRLLRARLLKREGVLQAADFENGLIKSLPNTPWQLRAALDRKLTPLWSAVLLHLIKH                  RGYLSQRKNEGETADKELGALLKGVADNAHALQTGDFRTPAELALNKFESGHIRNQRGDYSHTF                  RKDLQAEILLFEKQKEFGNPHVSGGLKEGIETLLMTQRPALSGDAVQKMLGHCTFEPKAAKNTY                  TAERFIWLTKLNNLRILEQGSERPLDTERATLMDEPYRKSCLTYAQARKLLGLEDTAFFKGLRYGKDN                  AEASTLMEMKAYHAISRALEKEGLKDKKSPNLNLSPELQDEIGTAFSLFKTDEDITGRKLDRIQPEILEALL                  KHISFDKFVQISLALRRIVPLMEQKRYDEACAEIYGDHYGKKNTEEKIYLPPIPADEIRNPVLRALSQ                  ARKVINGVVRRYGSAPARIHETAREVGSFKDRKEIEKRQEENRKDREKAAAKFREYFPNFVGEPSKDI                  LKLRLYEQQHKGKLYSGKEINLGRLEKGYVEIDHALPFSRTWDDSFNNKVLVLGSENQKGNQTPY                  EYFNGKDNSREWQEFKARVETSRFPRSKQRILLQKFDKEDGFKERNLNDTRYVNRFLCQFVADRMRL                  TGKGGKRVFASNGQITNLLRGFWGLRKRVAENDRHHALDAVVACSTVAMQQKITRFVRYKEMNA                  FDGKTIDKETGEVLHQKTHFPQPWEFFAQEV MIRVFGKPDGKPEFEEADTPEKLRLLAEKLSSRPEAV</p>	<p>N. 매닌지티디스                  Cas9</p>

[1396]

	<p>HEYVTLPLFVSRAPNRKMSGQGHMETVKSARKLDEGVSVLRVPLTQLKLDLEKVMNRREREPKLYEAL          KARLEAHKDDPAKAFAPFYKYDKAGNRTQQVKAVRVEQVQKTGVWVRNHNHGIADNATMVRVD          VFEKGDKYLVPIYSWQVAKGILPDRVAVQKDEEDWQLIDDSFNFKFSLHPNDLVEVITKKARMEG          YFASCHRGTGNINIRIHDLDHKIGKNGILEGIGVKTALSFKYQIDELGKEIRPCRLKRPVVR</p>	
<p>125</p>	<p>atgaaaaggaaactacattctggggctggacatcgggattacaagctggggatgggattattgactatgaaacaaggac          gtgatcgacgcaggcgtcagactgttcaaggaggccaactggaacaatgaggcgagagaagcaagaggggagcc          aggcctgaaacgacgagaaggcacagatccagaggtgaaagaactgctgattacaactgctgaccgacat          tctgagctgagtgaattaatccttatgaagccagggtgaaggcctgagtcagaactgtcagaggaagagtttccgag          ctctgctgacactggctaagcgccgaggagtgataactgcaatgaggtgaaagaggacccggcaacgagctgctcaa          aggaacagatctcagcaatagcaagctctggaagagaagtatgtcgagagctgagctggaacgctgaaagaagat          ggcgaggtgagagggtcaattaataggttcaagacaagcactcgtcaagaagccaagcagctgtaagtgagaa          ggcttaccaccagctggatcagagcttcatcgatactatatacgcctgctggagactcggagaacctactatgaggaccag          gagaaggagcccttctgagaaagacatcaaggaatggtacgagatgctgagggacattgacacattttcagaag          agctgagaagcgtcaagtagcgtataacgagatctgtacaacccctgaatgacctaacaacctggtcatcaccaggat          gaaaacgagaactggaatactatgagaagttccagatcatgaaaactgtttaagcagaagaaaagcctactgaaac          agattgtaaggagatcctgtcaacgaagagcatcaagggtaccgggtgacaagcactggaacacagagttacca          atctgaaagtgtatcacgatattaaggacatcacagcaggaagaatcattgagaacccgaactgctggatcagattgct          aagatcctgactatctaccagactccgaggacatccaggaagctgactaacctgaacagcagctgaccaggaagag          atcgaacagattagtaactgaaagggatcaccggaacacacaacctgtccctgaaagctatcaatctgattctggatgagctg          tggcatacaaacgacaatcagattgcaatcttaaccggctgaaagctgtcccaaaaagggtgacactgagtcagcagaag          agatccaaccactggtggagcttctctgtcaccctggtcaagcggagcttcatccagagcatcaagtgatcaacg          ccatcatcaagaagtagcggcctcccaatgatcattatcgagctggctagggagaagaacagcaagcgcacagaaga          tgatcaatgagatgagaaacgaaaccggcagaccaatgaacgattgaagagattatccgaactaccgggaaagagaac          gcaaagtacctgattgaaaaatcaagctgcacgatatgcaggagggaagtgtctgtattctgaggccatccccctgga          ggacctgctgaaacatccattcaactcagagctgatcattatccccagaagcgtgtccttgacaattccttaacaacag          gtgctggtcaagcaggaagagaactctaaaaggcaatagactcttccagtaactgtctgattcagattccaagatcttt          acgaaactttaaaagcattctgaaatctggcacaaggaaggccgcatcagaagcaaaaaggagtaactgctgg          aagagcgggacatcaacagattctcgtccagaaggattttataaccggaatctggtgacacaagatacgtactcgggc          ctgatgaatctgctgcatcctattccgggtgaacaatctgagtgaaagtcaagtcacacgagcgggttcacatctttct</p>	<p>S. 아우레우스          Cas9 코돈          최적화된 핵산          서열</p>

[1397]

	<p>gaggcgcaaatggaagttaaaggagcgcaacaagggtacaagccatgccgaagatgctctgattatcgcaatgc                  cgactcatctttaaggagtgaaaaagctggacaaagccaagaaagtatggagaaccagatgttcgaagagaagcagg                  ccgaatctatgcccgaatcgagacagacaggagtaacaaggagatttcatcactcctcaccagatcaagcatatcaaggatt                  tcaaggactacaagtactctaccgggtgataaaaagccaacagagagctgacatgacacccctgtatagtacaagaa                  agacgataaggggaatccctgattgtgaacaactggaacggactgtacgacaaagataatgacaagctgaaaaagctgac                  acaaaaagctccgagaagctgctgattgaccacatgatcctcagacatcagaaaactgaagctgattatggagcagtagcg                  cgacgagaagaaccctgtataagtactatgaagagactgggaactacctgaccaagtagcaaaaaggataatggccc                  gtgatcaagaagatcaagtactatgggaacaagctgaatgccatctggacatcacagcagattaccctaacagtgcacaa                  ggtggtcaagctgactgaagccatacagattcgatgtctatctggacaacggcgtgataaattgtgactgtcaagaatcg                  gatgtcatcaaaaaggagaactactatgaagtgaatgcaagtgtcgaagaggctaaaaagctgaaaaagattagcaac                  caggcagagttcatgcctctttacaacaacgactgattaagatcaatggcgaactgtatagggctatcggggtgaacaat                  gatctgtgaaccgattgaagtgaatgattgacatcactaccgagatctggaacatgaatgataagcggccct                  cgaattatcaaaaactgcttaagactcagagatcaaaaagtactcaaccgacattctggaaaacctgtatgaggtgaag                  agcaaaaagcaccctcagattatcaaaaagggc</p>	
126	<p>MKRNYILGLDIGITSVGYIIDYETRVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLRRRRHRIQRVKK                  LLDYINLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQIS                  RNSKALEEKYVAELQLERLKKDGEVRSINRFKTSDYVKEAKQLLKVKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRR                  TYEGPGEPSFGWKDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLE                  YYEKFQIENVFKQKKPTLKQIAKEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEIENAEILLD                  QIAKILTIIYQSSEDIQEELTNLSELQTQEEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRL                  KLVPPKVDLSQKKEIPTTLVDDFILSPVVKRSFIQSIKVINAIKKYGLPNDIIELAREKNSKDAQMINE                  MQQRNRQTNERIEIIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQEGKCLYSLEAIPLEDLLNPNFYVDHIIIPRSVS                  FDNFNNKVLVQKEENSKGNRTPFQYLSSSDSKISYETFKKHILNLAAGKGRISKTKKEYLLEERDINR                  FSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLRRKWKFKKERNKGYKHH                  AEDALIINANADFIFKWKLDKAKKVMENQMFEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKHIKDFKDYKY                  SHRVDKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLINKSPEKLLMYHHPQTYQ                  KKLIMEQYGDENPLYKYYEETGNLYTKYSKNDNGPVIKKIKYGNKLNALDITDDYPNSRNKVVKL                  SLKPYRFDVYLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYEVNSKCYEEAKLKKISNQAEFIASFYNNDLIKINGE</p>	<p>S. 아우레우스                  Cas9</p>

[1398]

	LYRVIGVNNDLLNRIEVNMIDITYREYLENMNDKRPPRIIKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQ IIKKG	
127	ATTGCACTCATCAGAGCTAC	TGFBR2 표적 서열 9
128	CCTAGAGTGAAGAGATTCAT	TGFBR2 표적 서열 10
129	CCAATGAATCTCTCACTCT	TGFBR2 표적 서열 11
130	AAAGTCATGGTAGGGGAGCT	TGFBR2 표적 서열 12
131	GTGAGCAATCCCCGGGCGA	TGFBR2 표적 서열 13
132	GTCGTTCTTCACGAGGATAT	TGFBR2 표적 서열 14
133	GCCGCGTCAGGTACTCCTGT	TGFBR2 표적 서열 15
134	GACGCGGCATGTCATCAGCT	TGFBR2 표적 서열 16
135	GCTTCTGCTGCCGGTTAACG	TGFBR2 표적 서열 17
136	GTGGATGACCTGGCTAACAG	TGFBR2 표적 서열 18
137	GTGATCACACTCCATGTGGG	TGFBR2 표적 서열 19
138	GCCCATTGAGCTGGACACCC	TGFBR2 표적 서열 20
139	GCGGTCATCTCCAGGATGA	TGFBR2 표적 서열 21

[1399]

140	GGGAGCTGCCAGCTTGCGC	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 22
141	GTTGATGTTGTTGGCACACG	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 23
142	GGCATCTTGGGCTCCACA	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 24
143	GCGGCATGTCATCAGCTGGG	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 25
144	GCTCCTCAGCCGTCAGGAAC	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 26
145	GCTGGTGTTATATTCTGATG	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 27
146	CCGACTTCTGAACGTGCGGT	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 28
147	TGCTGGCGATACGCGTCCAC	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 29
148	CCCGACTTCTGAACGTGCGG	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 30
149	CCACCGCACGTTCAGAAGTC	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 31
150	TCACCCGACTTCTGAACGTG	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 32
151	CCCACCGCACGTTCAGAAGT	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 33
152	CGAGCAGCGGGTCTGCCAT	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 34
153	ACGAGCAGCGGGTCTGCCA	<i>TGFBR2</i>	표적 서열 35

[1400]

154	AGCGGGGTCTGCCATGGGTC	TGFBR2 표적 서열 36
155	CCTGAGCAGCCCCGACCCA	TGFBR2 표적 서열 37
156	AACGTGCGGTGGGATCGTGC	TGFBR2 표적 서열 38
157	GGACGATGTGCAGCGCCAC	TGFBR2 표적 서열 39
158	GTCCACAGGACGATGTGCAG	TGFBR2 표적 서열 40
159	CATGGGTCGGGGGCTGCTCA	TGFBR2 표적 서열 41
160	CCATGGGTCGGGGGCTGCTC	TGFBR2 표적 서열 42
161	CAGCGGGGTCTGCCATGGGT	TGFBR2 표적 서열 43
162	ATGGGTCGGGGGCTGCTCAG	TGFBR2 표적 서열 44
163	CGGGGTCTGCCATGGGTCGG	TGFBR2 target sequence 45
164	AGGAAGTCTGTGTGGCTGTA	TGFBR2 표적 서열 46
165	CTCCATCTGTGAGAAGCCAC	TGFBR2 표적 서열 47
166	ATGATAGTCACTGACAACAA	TGFBR2 표적 서열 48
167	GATGCTGCAGTTGCTCATGC	TGFBR2 표적 서열 49

[1401]

168	ACAGCCACACAGACTTCCTG	TGFBR2	표적 서열 50
169	GAAGCCACAGGAAGTCTGTG	TGFBR2	표적 서열 51
170	TTCCTGTGGCTTCTCACAGA	TGFBR2	표적 서열 52
171	CTGTGGCTTCTCACAGATGG	TGFBR2	표적 서열 53
172	TCACAAAATTTACACAGTTG	TGFBR2	표적 서열 54
173	CCCCTACCATGACTTTATTC	TGFBR2	표적 서열 55
174	CCAGAATAAAGTCATGGTAG	TGFBR2	표적 서열 56
175	GACAACATCATCTTCTCAGA	TGFBR2	표적 서열 57
176	TCCAGAATAAAGTCATGGTA	TGFBR2	표적 서열 58
177	GGTAGGGGAGCTTGGGGTCA	TGFBR2	표적 서열 59
178	TTCTCCAAAGTGCATTATGA	TGFBR2	표적 서열 60
179	CATCTTCCAGAATAAAGTCA	TGFBR2	표적 서열 61
180	CACATGAAGAAAGTCTCACC	TGFBR2	표적 서열 62
181	TTCCAGAATAAAGTCATGGT	TGFBR2	표적 서열 63

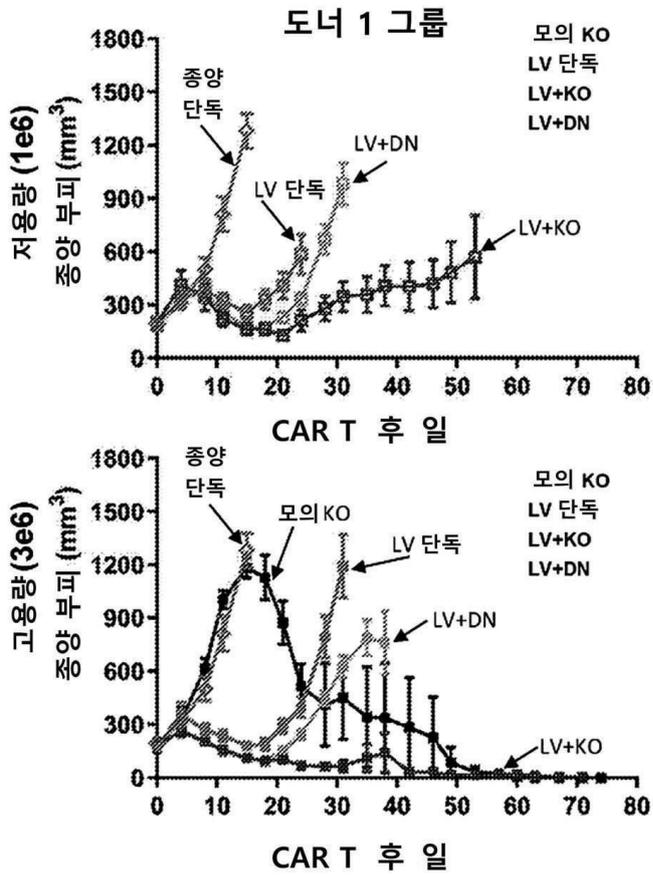
[1402]



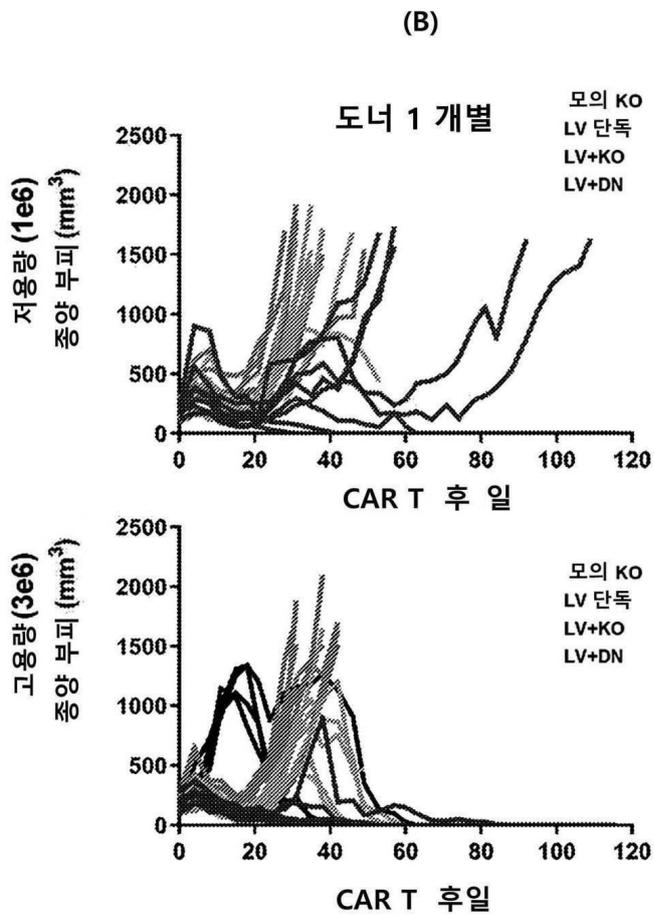
도면

도면1a

(A)

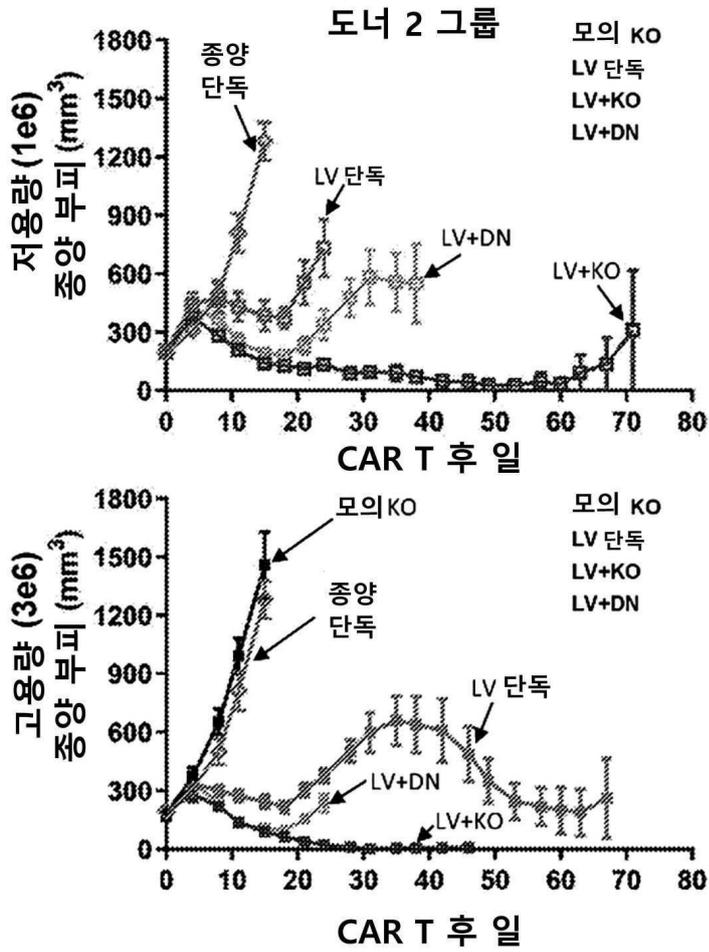


도면1b

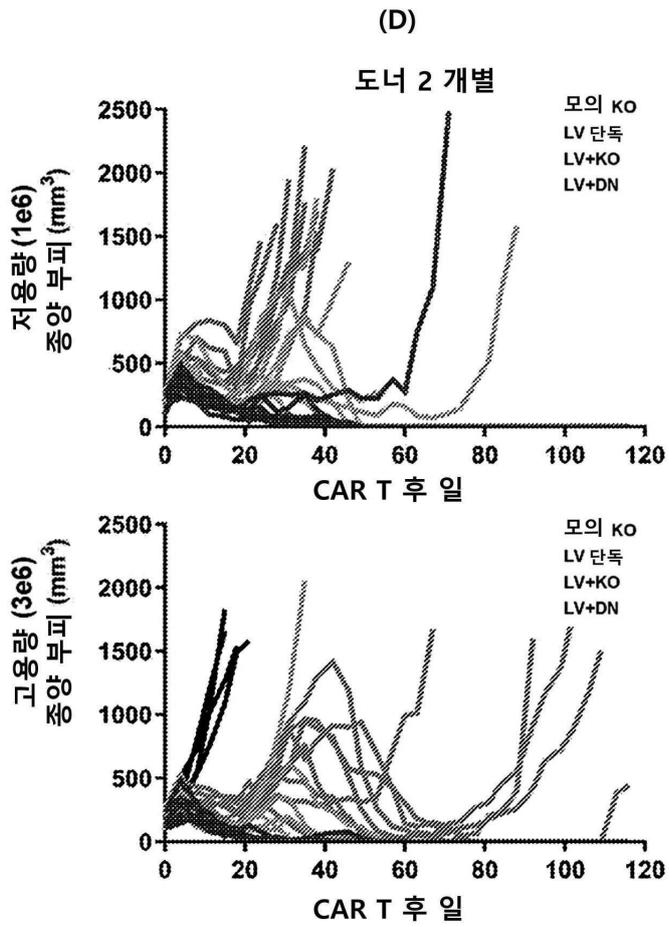


도면1c

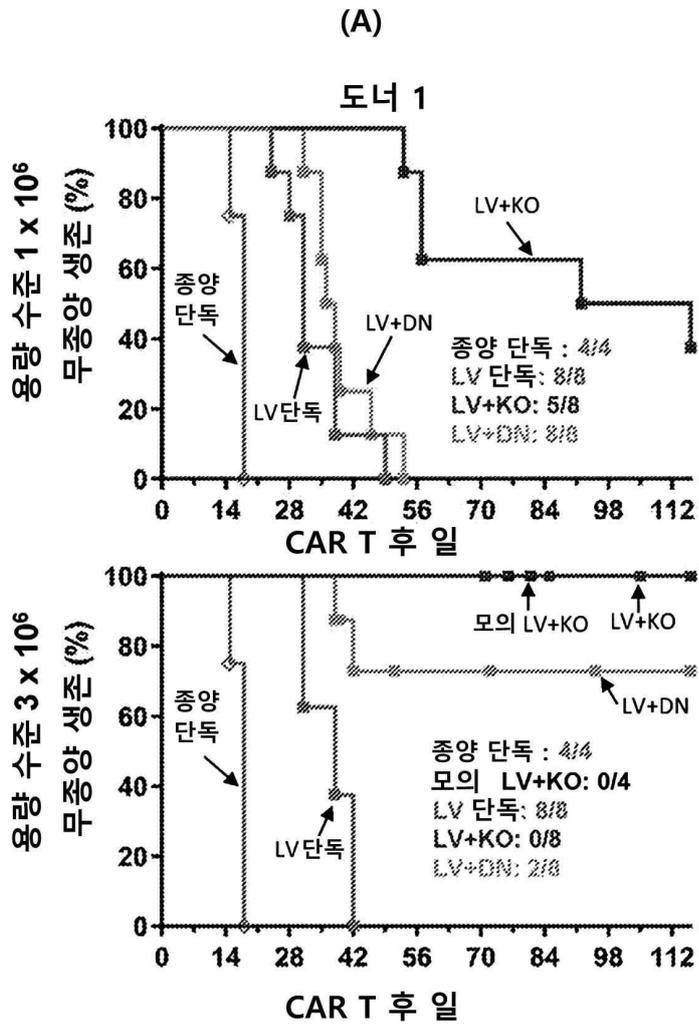
(C)



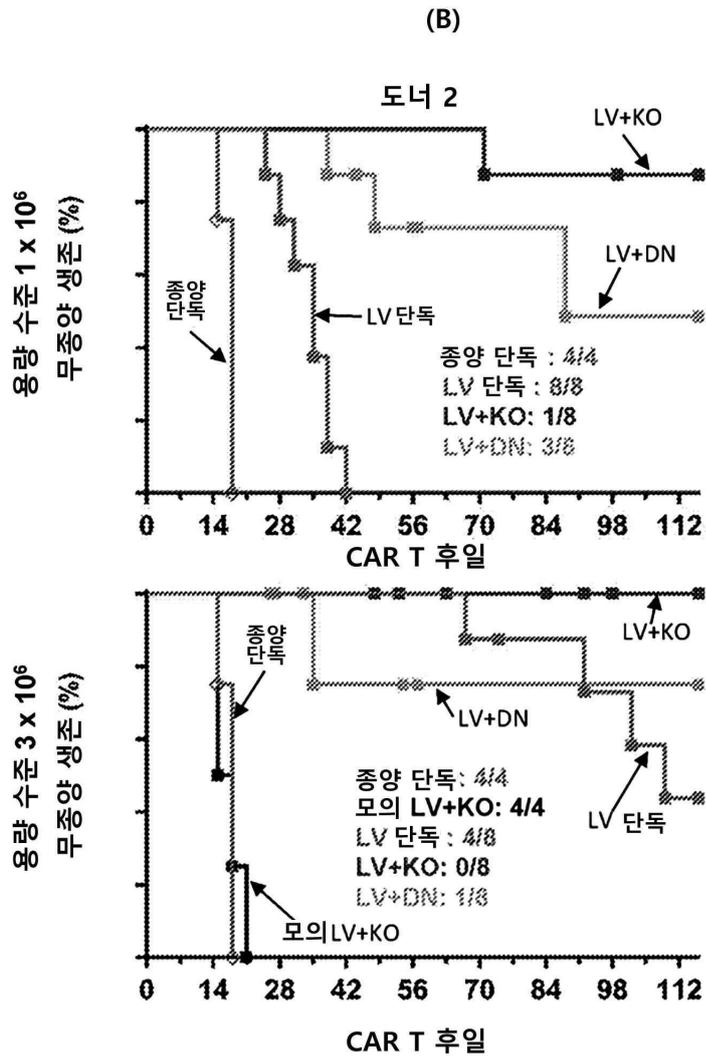
도면1d



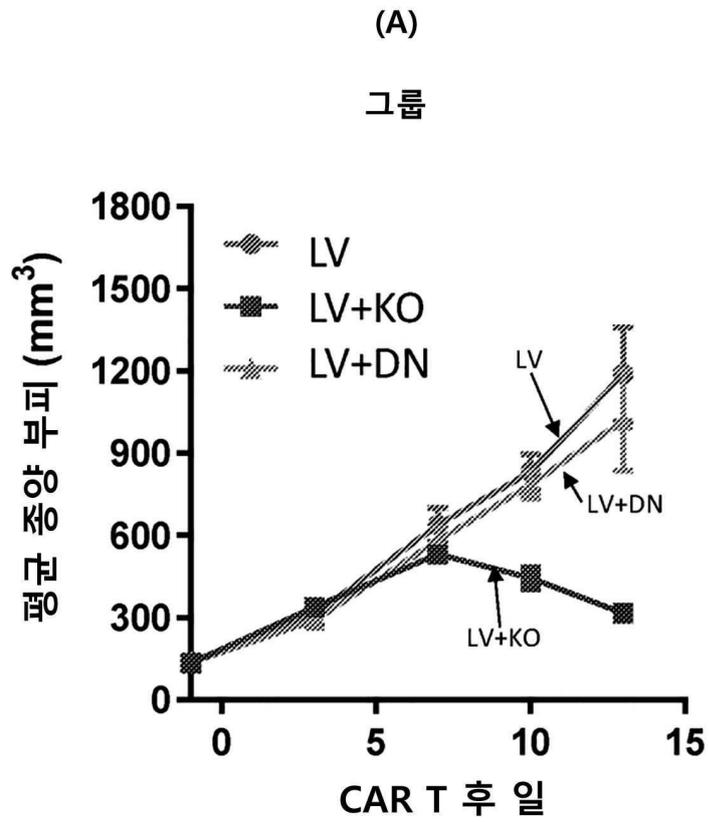
도면2a



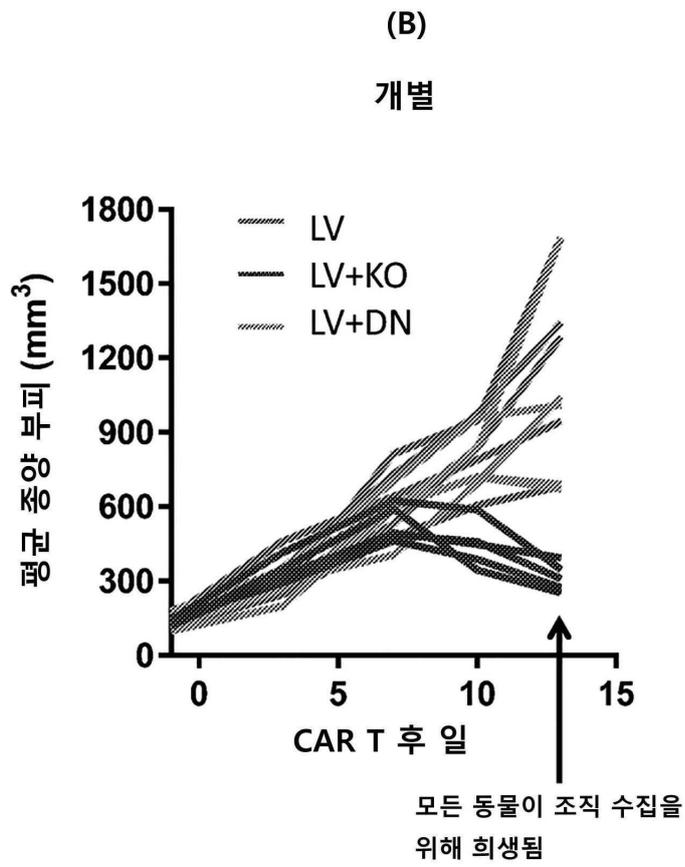
도면2b



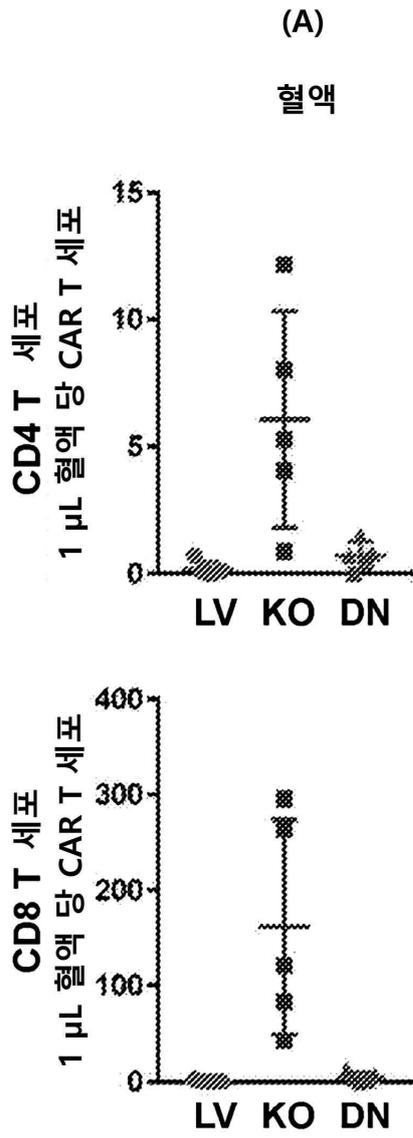
도면3a



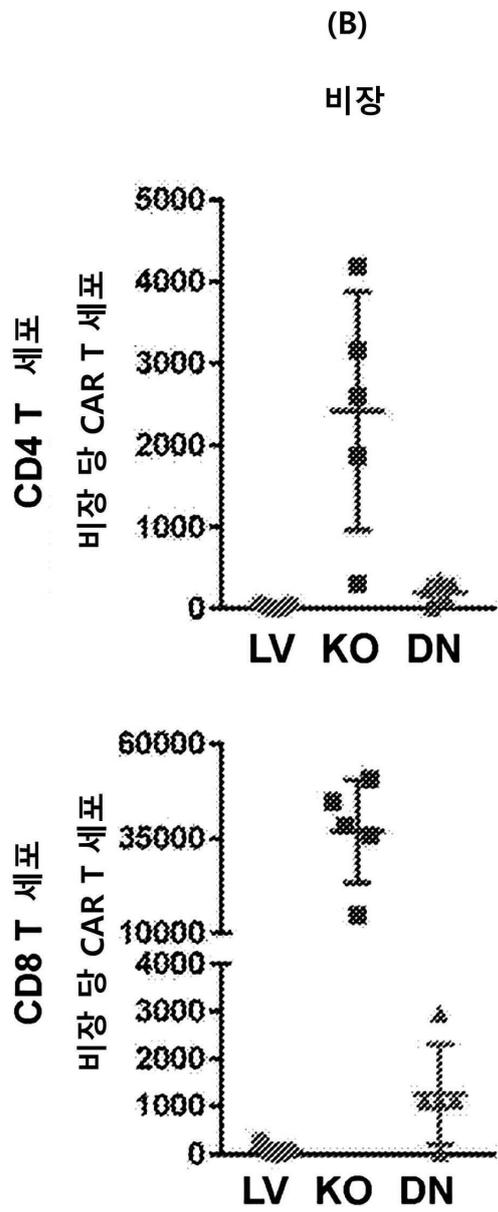
도면3b



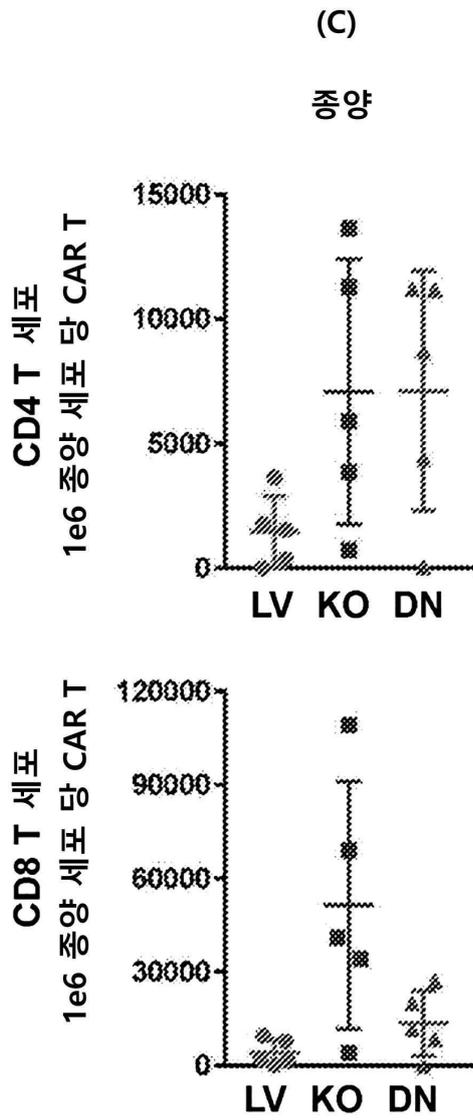
도면4a



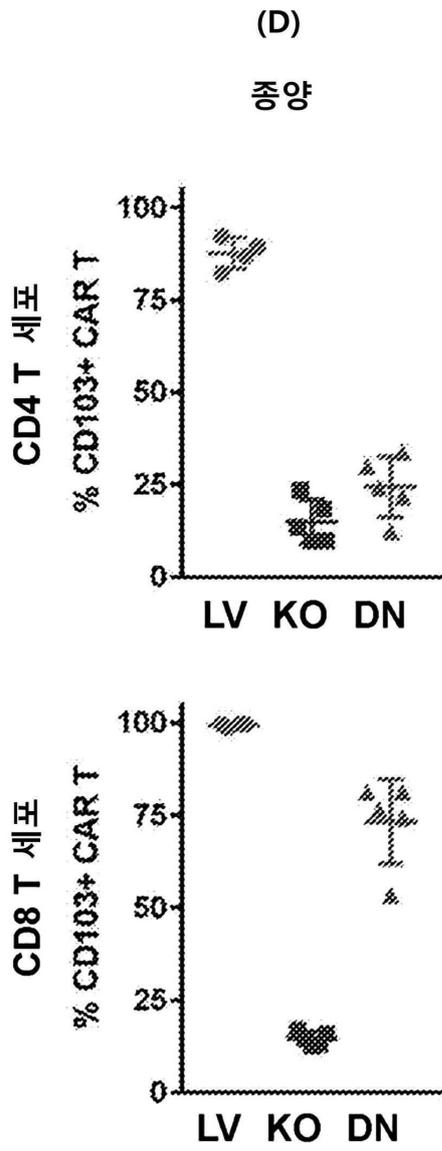
도면4b



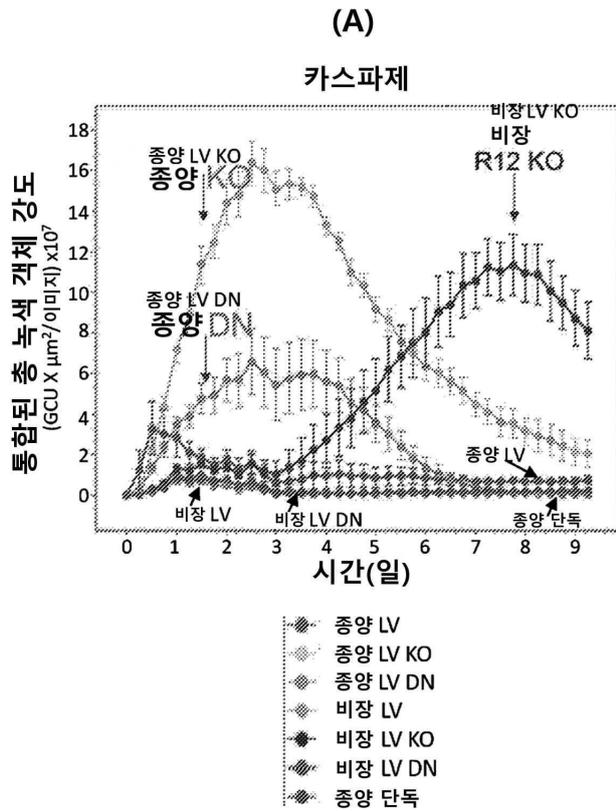
도면4c



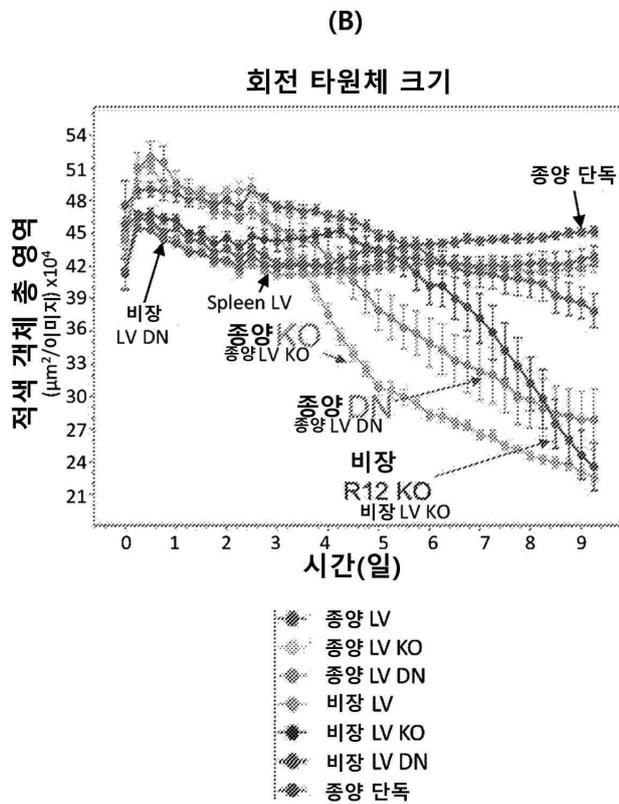
도면4d



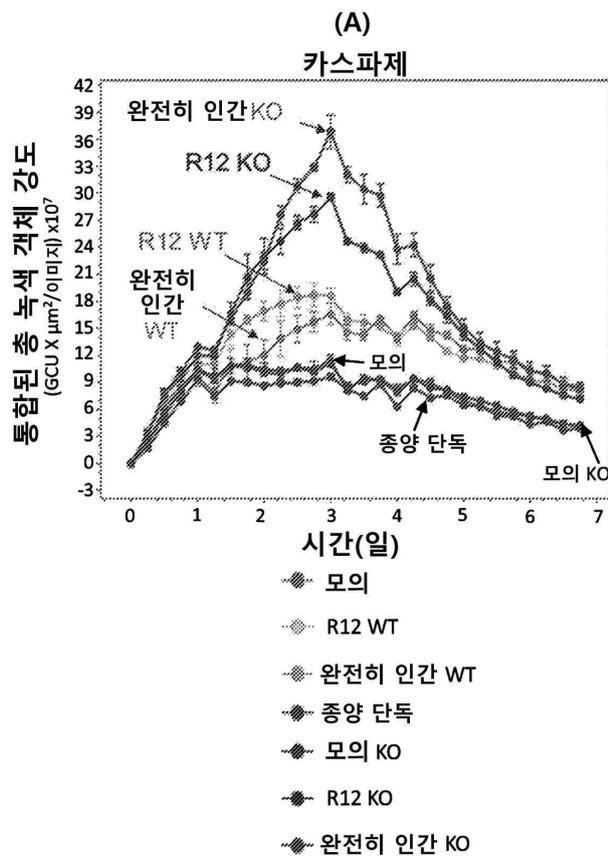
도면5a



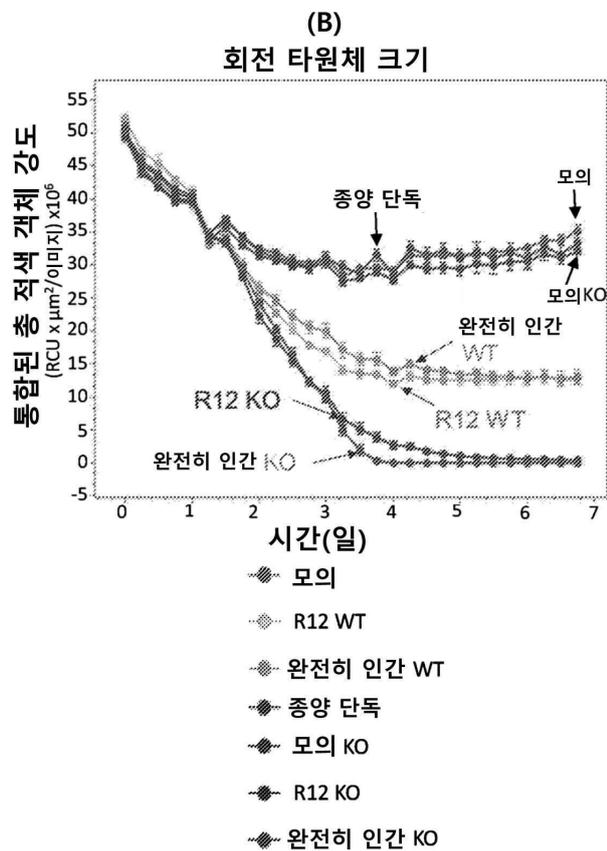
도면5b



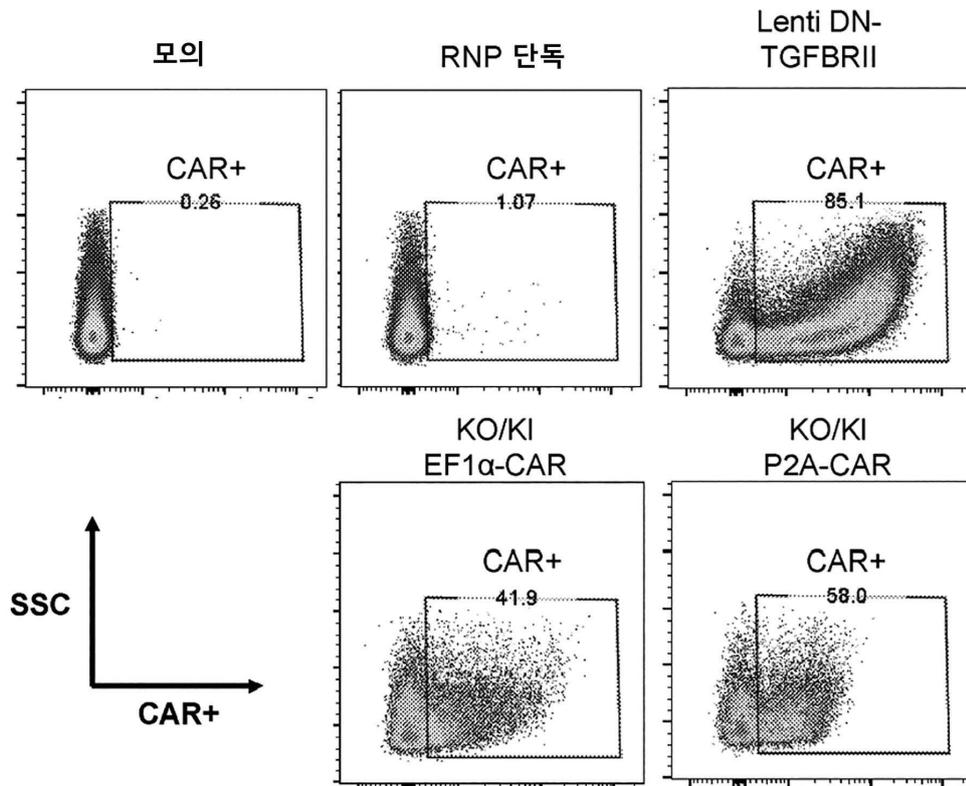
도면6a



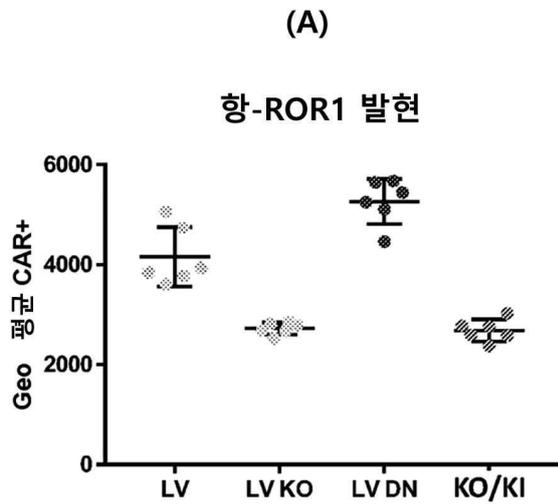
도면6b



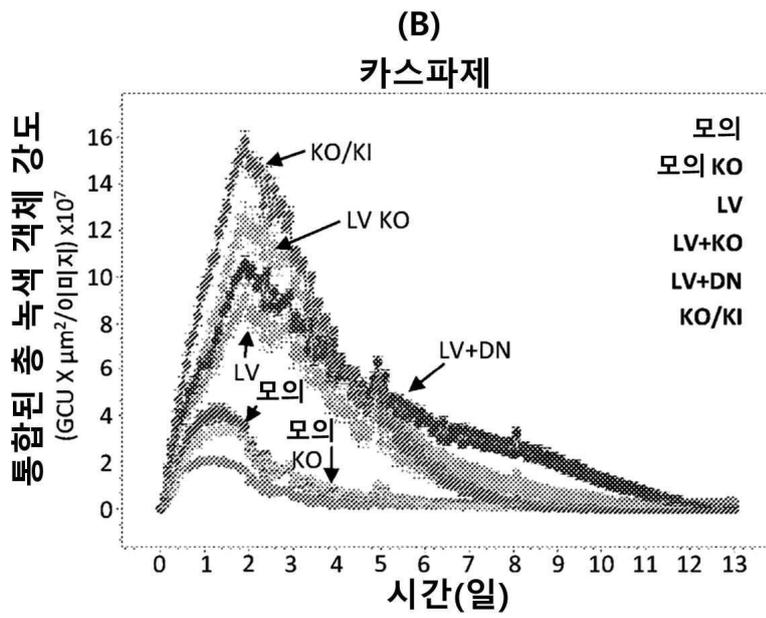
도면7



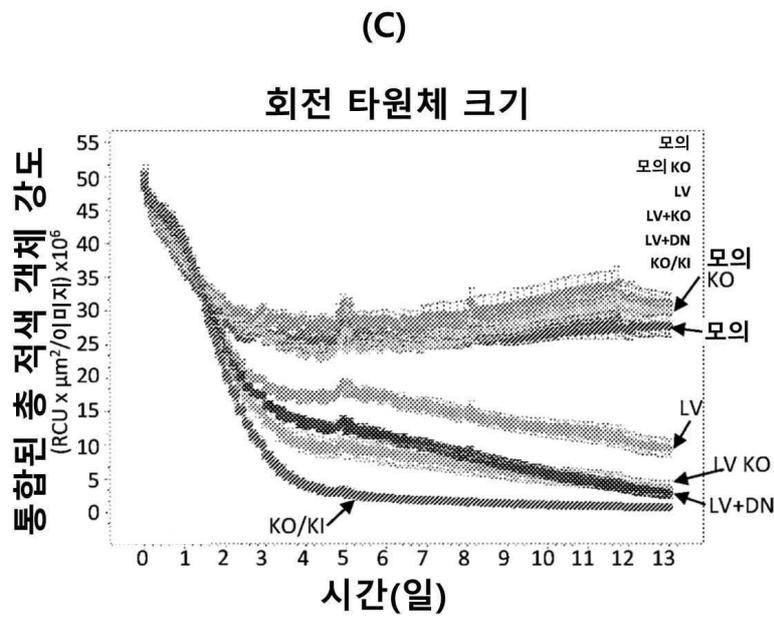
도면8a



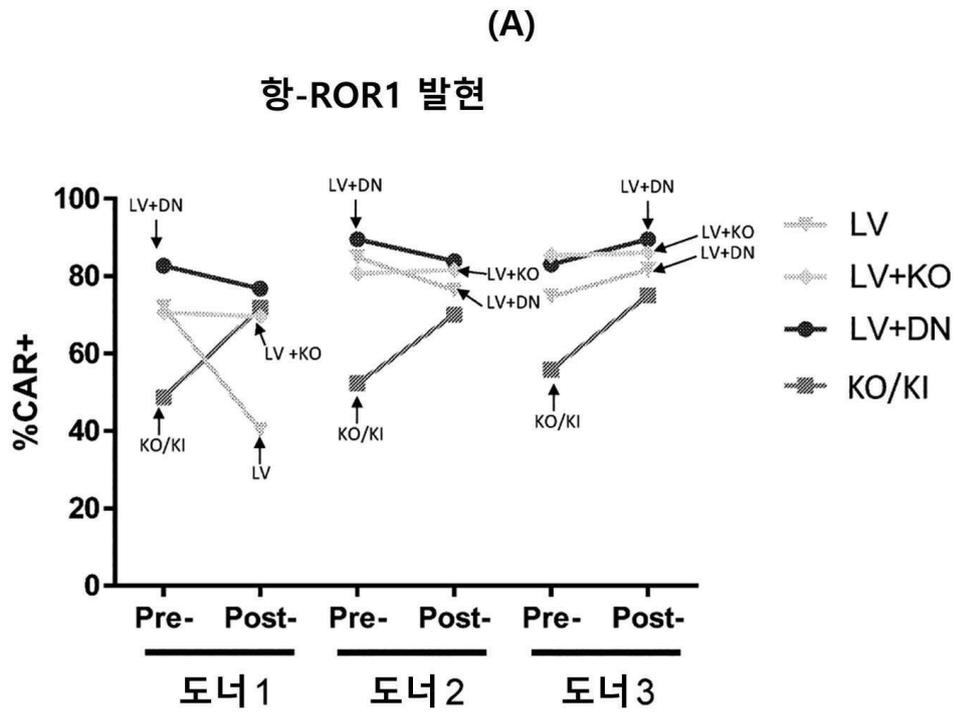
도면8b



도면8c

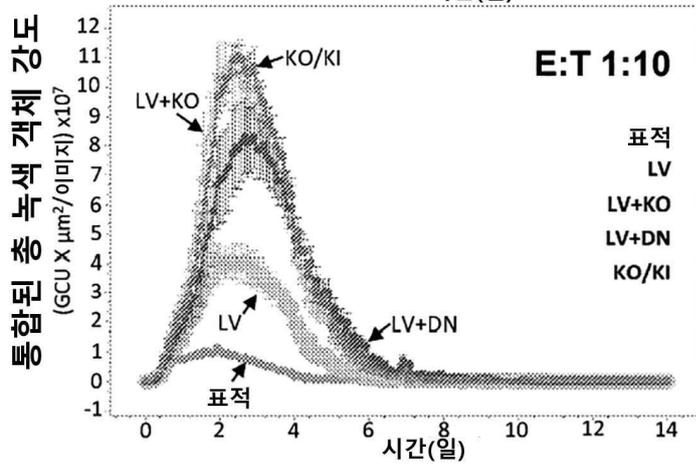
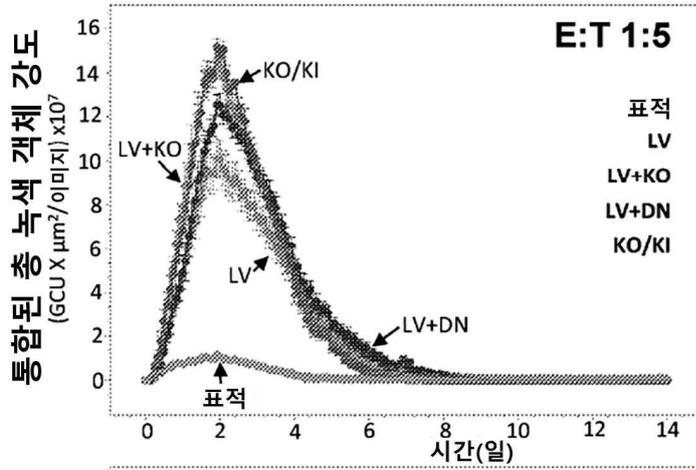


도면9a

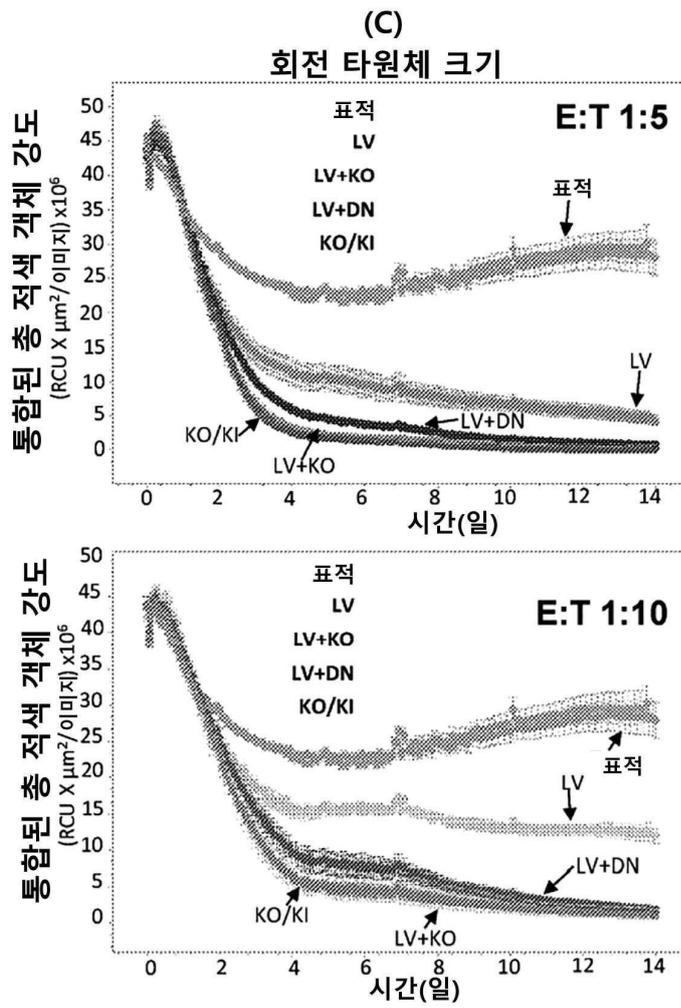


도면9b

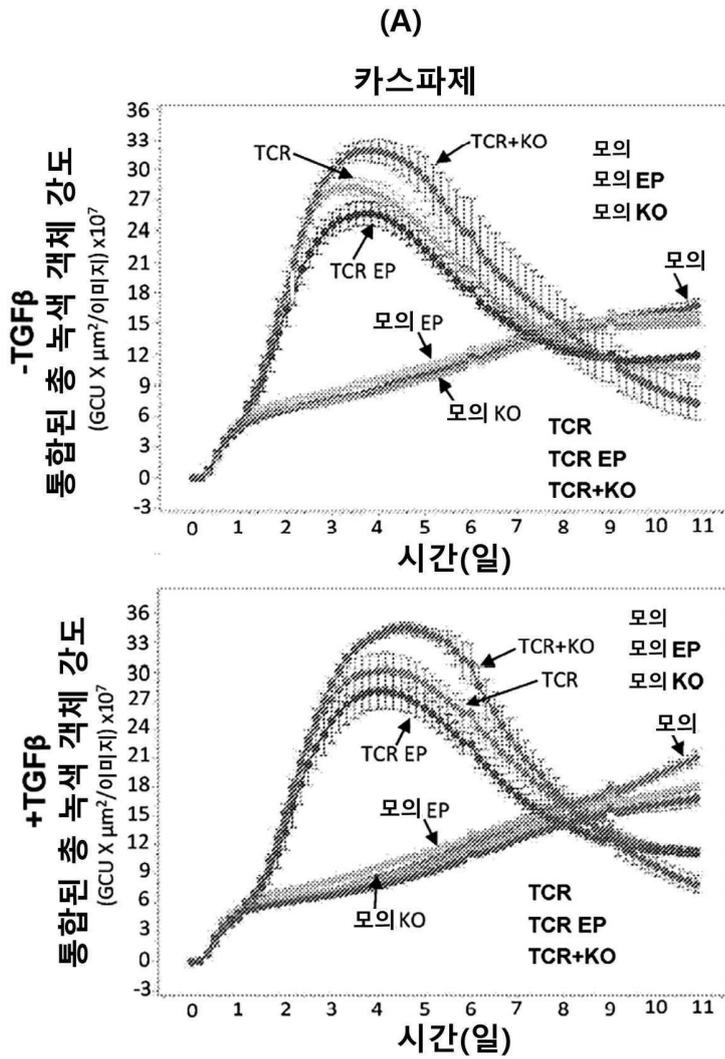
(B)  
카스파제



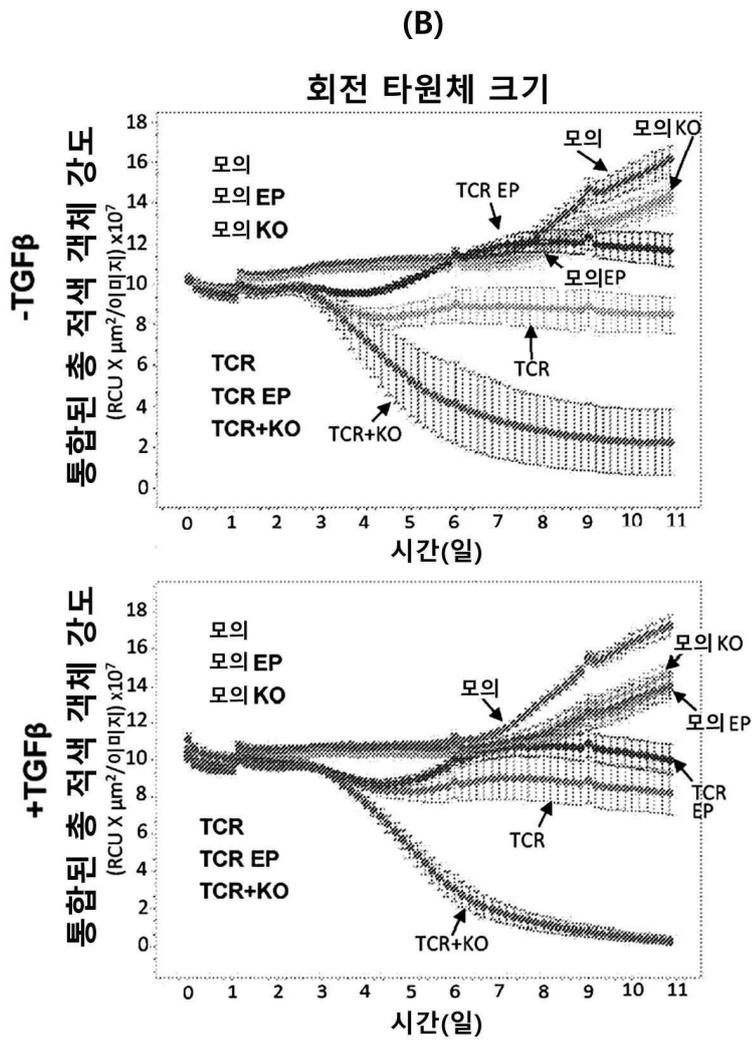
도면9c



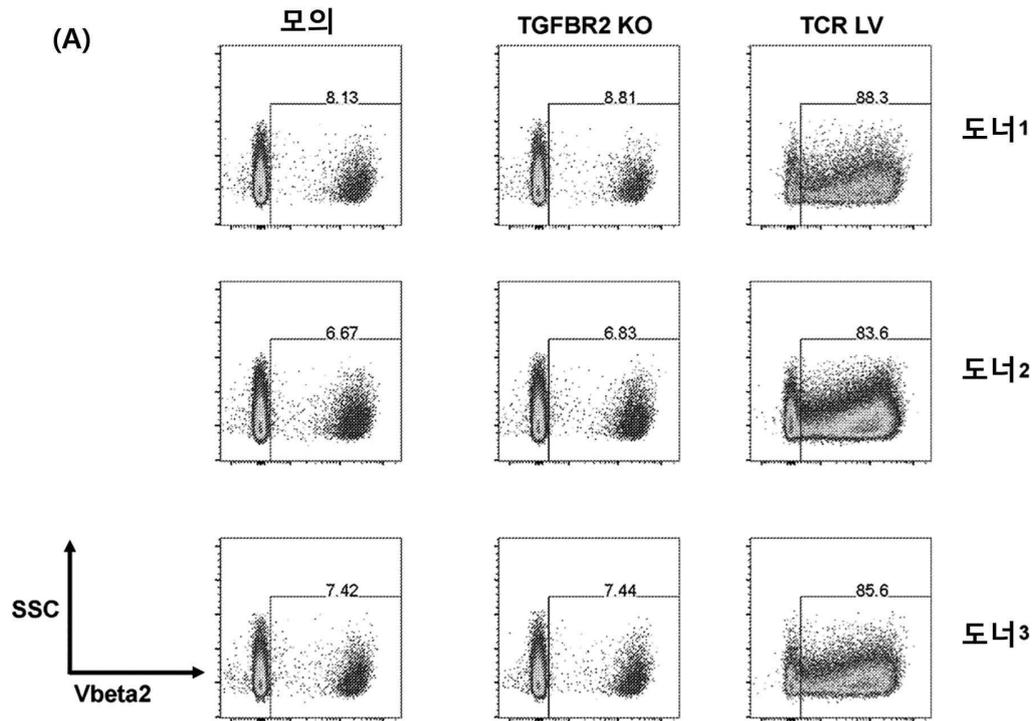
도면10a



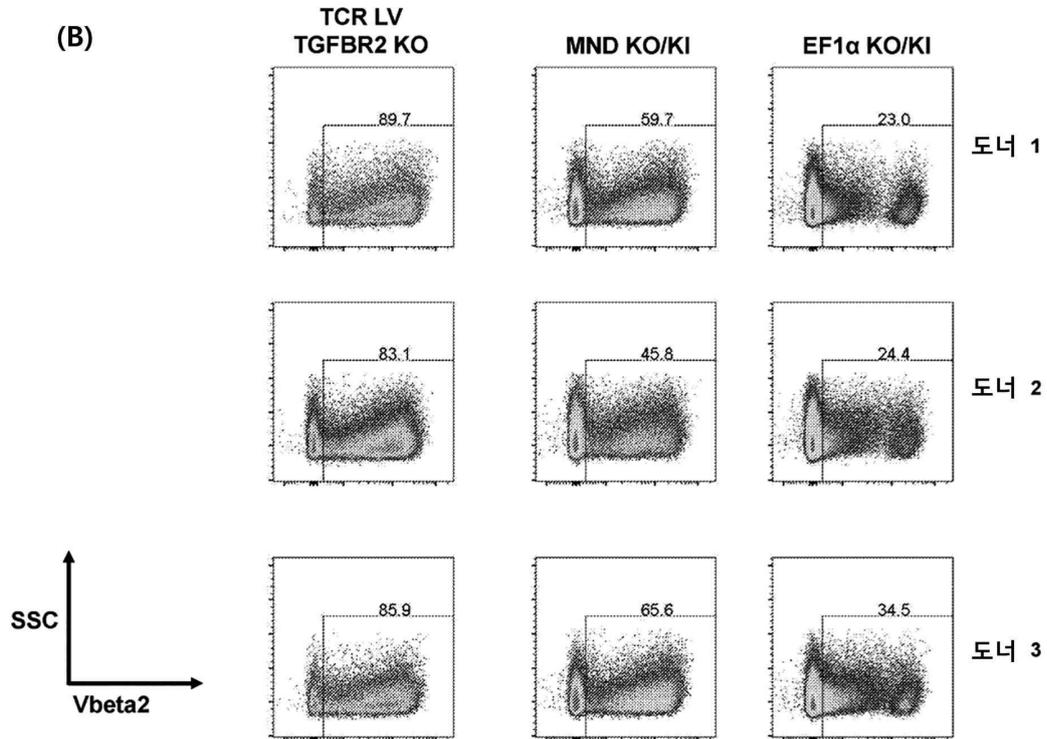
도면10b



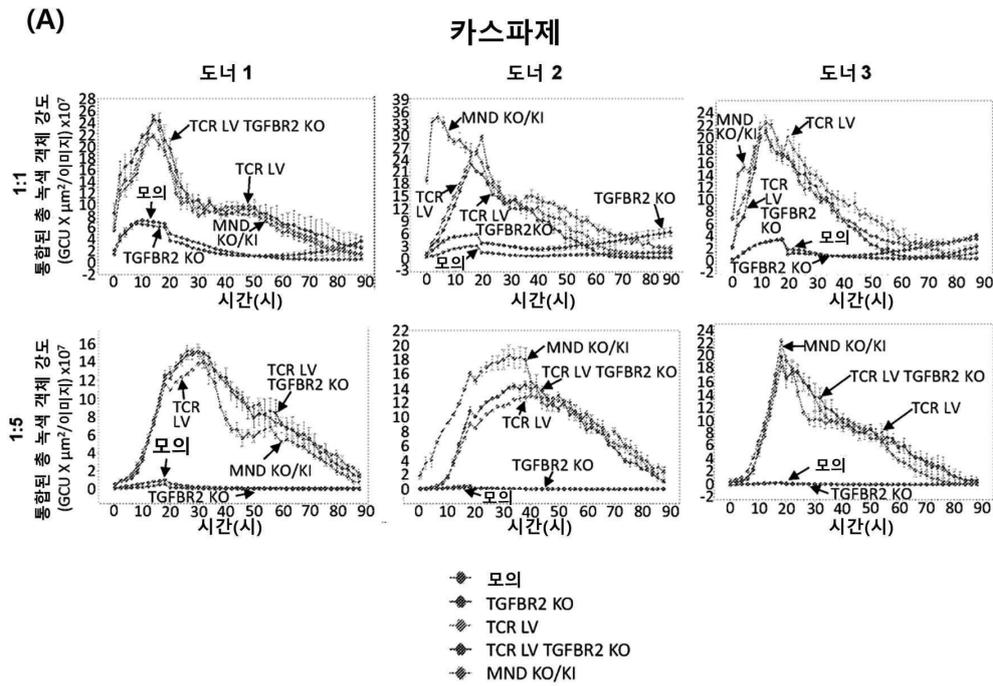
도면11a



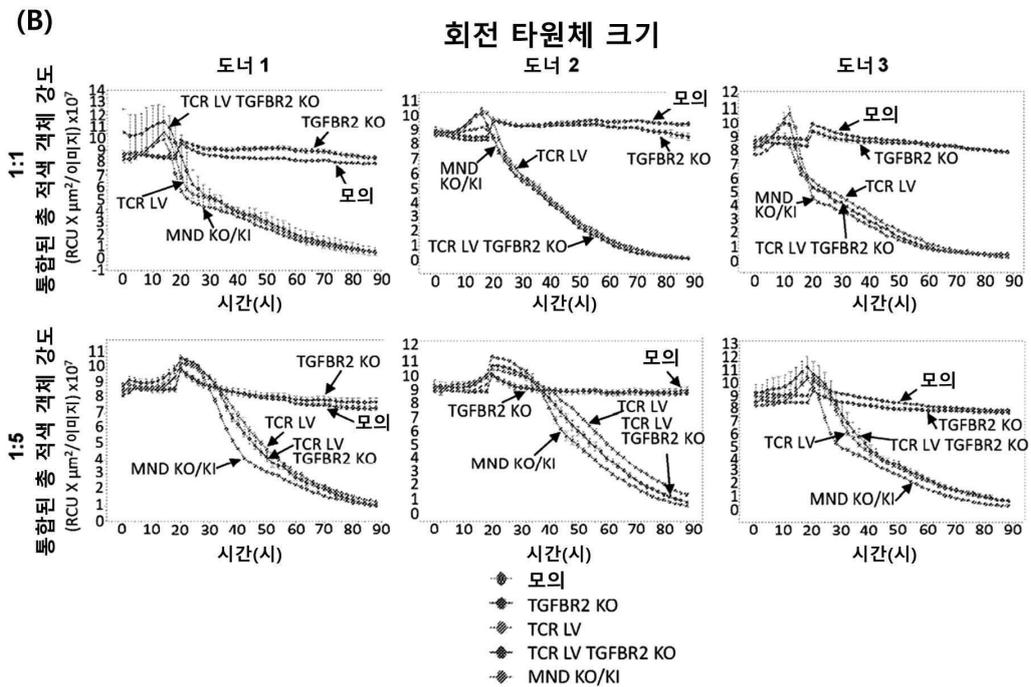
도면11b



도면12a



도면12b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Juno Therapeutics, Inc.

Editas Medicine, Inc.

<120> CELLS EXPRESSING A RECOMBINANT RECEPTOR

FROM A MODIFIED TGFBR2 LOCUS, RELATED POLYNUCLEOTIDES AND  
METHODS

<130> 735042012840

<140> PCT/US2020/030815

<141> 2020-04-30

<150> 62/841,575

<151> 2019-05-01

<160> 189

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> spacer (IgG4hinge)

<400> 1

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1                    5                    10

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<223> spacer (IgG4hinge)

<400> 2

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct                    36

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Hinge-CH3 spacer

<400> 3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg

1                    5                    10                    15

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 20 25 30  
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 35 40 45  
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 50 55 60  
 Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 65 70 75 80  
 Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser  
 85 90 95  
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
 100 105 110  
 Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys  
 115  
 <210> 4  
 <211> 229  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> Hinge-CH2-CH3 spacer  
 <400> 4  
 Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 35 40 45  
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 50 55 60  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
 65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 85 90 95  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 100 105 110  
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 115 120 125  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 130 135 140  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 165 170 175  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 180 185 190  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 195 200 205  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Leu Ser Leu Gly Lys  
 225  
 <210> 5  
 <211> 282  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> IgD-hinge-Fc  
 <400> 5  
 Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala  
 20 25 30

Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys  
 35 40 45  
 Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro  
 50 55 60  
 Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln  
 65 70 75 80  
 Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly  
 85 90 95  
 Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val  
 100 105 110  
 Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly  
 115 120 125  
 Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn  
 130 135 140  
 Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro  
 145 150 155 160  
 Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys  
 165 170 175  
 Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser  
 180 185 190  
 Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu  
 195 200 205  
 Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro  
 210 215 220  
 Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser  
 225 230 235 240  
 Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr  
 245 250 255  
 Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg  
 260 265 270  
 Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His

275 280

<210> 6

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A

<400> 6

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp

1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg

20

<210> 7

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> tEGFR

<400> 7

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

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

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu



355

<210

> 8

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28

<300>

<308> Uniprot P10747

<309> 1989-07-01

<400> 8

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu

1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val

20 25

<210> 9

<211> 66

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD28

<300>

<308> Uniprot P10747

<309> 1989-07-01

<400> 9

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

20 25 30

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

35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

50 55 60

Trp Val  
65  
<210> 10  
<211> 41  
<212>  
> PRT  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<223> CD28  
<300>  
<308> Uniprot P10757  
<309> 1989-07-01  
<400> 10  
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr  
1 5 10 15  
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
20 25 30  
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
35 40  
<210> 11  
<211> 41  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
<220>  
<223> CD28 (LL to GG)  
<400> 11  
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr  
1 5 10 15  
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
20 25 30  
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
35 40  
<210> 12  
<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> 4-1BB

<300>

<308> Uniprot Q07011.1

<309> 1995-02-01

<400> 12

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
 1                    5                    10                    15  
 Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
                   20                    25                    30  
 Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
                   35                    40

<210> 13

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta

<400> 13

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
                   20                    25                    30  
 Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
                   35                    40                    45  
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
                   50                    55                    60  
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95  
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 100 105 110

<210> 14  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> CD3 zeta  
 <400> 14

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly  
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr  
 20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys  
 35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys  
 50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg  
 65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala  
 85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg  
 100 105 110

<210> 15  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>  
 <223> CD3 zeta  
 <400> 15

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly  
 1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60

Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80

Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala

85 90 95

Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg

100 105 110

<210> 16

<211> 335

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> tEGFR

<400> 16

Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly Glu Phe Lys Asp Ser Leu

1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe Lys Asn Cys Thr Ser Ile

20 25 30

Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala Phe Arg Gly Asp Ser Phe

35 40 45

Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu Leu Asp Ile Leu Lys Thr

50 55 60

Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile Gln Ala Trp Pro Glu Asn

65 70 75 80

Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu Glu Ile Ile Arg Gly Arg

85 90 95

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

<210> 17

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> T2A

<400> 17

Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro

1 5 10 15

Gly Pro

<210> 18

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A

<400> 18

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A

<400> 19

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn

1 5 10 15

Pro Gly Pro

<210> 20

<211> 20



<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 23

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 24

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GMCSFR alpha chain signal sequence

<400> 24

atgcttctcc tggtgacaag ccttctgctc tgtgagttac cacaccaccgc attcctcctg 60

atccca 66

<210> 25

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> GMCSFR alpha chain signal sequence

<400> 25

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro

20

<210> 26

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD8 alpha signal peptide

<400> 26

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

1 5 10 15

His Ala

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 27

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10 15

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 28

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 29

<211> 61

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 29

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr His Thr Cys Pro Arg Cys Pro

1                    5                    10                    15  
 Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu

                  20                    25                    30  
 Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu Pro

                  35                    40                    45  
 Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro

                  50                    55                    60

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 30

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1                    5                    10

<210> 31

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(1)

<223> Xaa is glycine, cysteine or arginine

<220>

<221> VARIANT

<222> (4)...(4)

<223> Xaa is cysteine or threonine

<400> 31

Xaa Pro Pro Xaa Pro

1                    5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 32

Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1                    5

<210> 33

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 33

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1                    5                    10

<210> 34

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Hinge

<400> 34

Glu Val Val Val Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1                    5                    10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L1

<400> 35

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr Leu Asn

1 5 10

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L2

<400> 36

Ser Arg Leu His Ser Gly Val

1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 37

Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly

1 5

<210> 38

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H1

<400> 38

Asp Tyr Gly Val Ser

1 5

<210> 39

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2

<400> 39

Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser  
 1                    5                    10                    15

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 40

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly  
 1                    5

<210> 41

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH

<400> 41

Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln  
 1                    5                    10                    15

Ser Leu Ser Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr  
                           20                    25                    30

Gly Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu  
                           35                    40                    45

Gly Val Ile Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys  
                           50                    55                    60

Ser Arg Leu Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu  
 65                    70                    75                    80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala  
                           85                    90                    95

Lys His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 42

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 42

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr  
 100 105

<210> 43

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 43

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1                    5                    10                    15  
 Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Lys Tyr  
  
                   20                    25                    30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile  
                   35                    40                    45  
 Tyr His Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
                   50                    55                    60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln  
 65                    70                    75                    80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr  
  
                   85                    90                    95  
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Thr Gly Ser Thr Ser Gly  
                   100                    105                    110  
 Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr Lys Gly Glu Val Lys  
                   115                    120                    125  
 Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln Ser Leu Ser  
                   130                    135                    140  
 Val Thr Cys Thr Val Ser Gly Val Ser Leu Pro Asp Tyr Gly Val Ser  
  
 145                    150                    155                    160  
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Arg Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly Val Ile  
                   165                    170                    175  
 Trp Gly Ser Glu Thr Thr Tyr Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser Arg Leu  
                   180                    185                    190  
 Thr Ile Ile Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu Lys Met Asn  
                   195                    200                    205  
 Ser Leu Gln Thr Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Lys His Tyr  
  
                   210                    215                    220  
 Tyr Tyr Gly Gly Ser Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser  
 225                    230                    235                    240  
 Val Thr Val Ser Ser  
                   245

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L1

<400> 44

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala

1                    5                    10

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L2

<400> 45

Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser

1                    5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR L3

<400> 46

Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr Thr

1                    5

<210> 47

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H1

<400> 47

Ser Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H2

<400> 48

Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 49

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CDR H3

<400> 49

Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 50

<211> 122

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VH

<400> 50

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 100 105 110  
 Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 51

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> VL

<400> 51

Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Pro Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Ser Ala Thr Tyr Arg Asn Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Val Gln Ser  
 65 70 75 80

Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Arg Tyr Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Ser Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 52

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 53

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> scFv

<400> 53

Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Gln Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Arg Lys Thr Ile Ser Ser Val Val Asp Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp

100 105 110

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly



<400> 55

His Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 56

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> LC-CDR3

<400> 56

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 57

<211> 735

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Sequence encoding scFv

<400> 57

gacatccaga tgacceagac cacctccagc ctgagcgcca gcctgggcga cggggtgacc 60  
atcagctgcc gggccagcca ggacatcagc aagtacctga actggtatca gcagaagccc 120  
gacggcaccg tcaagctgct gatctaccac accagccggc tgcacagcgg cgtgccccagc 180  
cggtttagcg gcagcggctc cggcaccgac tacagcctga ccatctccaa cctggaacag 240  
gaagatatcg ccacctactt ttgccagcag ggcaacacac tgcctacac ctttggcggc 300  
ggaacaaage tggaaatcac cggcagcacc tccggcagcg gcaagcctgg cagcggcag 360  
ggcagcacca agggcgaggt gaagctgcag gaaagcggcc ctggcctggt ggccccccagc 420  
  
cagagcctga gcgtgacctg caccgtgagc ggcgtgagcc tgcccacta cggcgtgagc 480  
tggatccggc agccccccag gaagggcctg gaatggctgg gcgtgatctg gggcagcag 540  
accacctact acaacagcgc cctgaagagc cggctgacca tcatcaagga caacagcaag 600  
agccaggtgt tctgaagat gaacagcctg cagaccgacg acaccgcat ctactactgc 660  
gccaagcact actactacgg cggcagctac gccatggact actggggcca gggcaccagc 720  
gtgaccgtga gcagc 735

<210> 58

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 58

Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser Thr

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 59

<211> 567

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human TGF-beta receptor type-2 (TGFR2) isoform 1

<300>

<308> Uniprot P37173

<309> 2006-10-17

<400> 59

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu

1 5 10 15

Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val

20 25 30

Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro

35 40 45

Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln

50 55 60

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro

65 70 75 80

Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr

85 90 95

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



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human TGF-beta receptor type-2 (TGFR2) isoform 2

<300>

<308> Uniprot P37173

<309> 2006-10-17

<400> 60

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu

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

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

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

Thr Gly Ile Ser Leu Leu Pro Pro Leu Gly Val Ala Ile Ser Val Ile  
 195 200 205  
 Ile Ile Phe Tyr Cys Tyr Arg Val Asn Arg Gln Gln Lys Leu Ser Ser  
 210 215 220  
 Thr Trp Glu Thr Gly Lys Thr Arg Lys Leu Met Glu Phe Ser Glu His  
 225 230 235 240  
 Cys Ala Ile Ile Leu Glu Asp Asp Arg Ser Asp Ile Ser Ser Thr Cys  
 245 250 255  
 Ala Asn Asn Ile Asn His Asn Thr Glu Leu Leu Pro Ile Glu Leu Asp  
 260 265 270  
 Thr Leu Val Gly Lys Gly Arg Phe Ala Glu Val Tyr Lys Ala Lys Leu  
 275 280 285  
 Lys Gln Asn Thr Ser Glu Gln Phe Glu Thr Val Ala Val Lys Ile Phe  
 290 295 300  
 Pro Tyr Glu Glu Tyr Ala Ser Trp Lys Thr Glu Lys Asp Ile Phe Ser  
 305 310 315 320  
 Asp Ile Asn Leu Lys His Glu Asn Ile Leu Gln Phe Leu Thr Ala Glu  
 325 330 335  
 Glu Arg Lys Thr Glu Leu Gly Lys Gln Tyr Trp Leu Ile Thr Ala Phe  
 340 345 350  
 His Ala Lys Gly Asn Leu Gln Glu Tyr Leu Thr Arg His Val Ile Ser  
 355 360 365  
 Trp Glu Asp Leu Arg Lys Leu Gly Ser Ser Leu Ala Arg Gly Ile Ala  
 370 375 380  
 His Leu His Ser Asp His Thr Pro Cys Gly Arg Pro Lys Met Pro Ile  
 385 390 395 400  
 Val His Arg Asp Leu Lys Ser Ser Asn Ile Leu Val Lys Asn Asp Leu  
 405 410 415  
 Thr Cys Cys Leu Cys Asp Phe Gly Leu Ser Leu Arg Leu Asp Pro Thr  
 420 425 430  
 Leu Ser Val Asp Asp Leu Ala Asn Ser Gly Gln Val Gly Thr Ala Arg

435 440 445  
 Tyr Met Ala Pro Glu Val Leu Glu Ser Arg Met Asn Leu Glu Asn Val

450 455 460  
 Glu Ser Phe Lys Gln Thr Asp Val Tyr Ser Met Ala Leu Val Leu Trp  
 465 470 475 480

Glu Met Thr Ser Arg Cys Asn Ala Val Gly Glu Val Lys Asp Tyr Glu  
 485 490 495

Pro Pro Phe Gly Ser Lys Val Arg Glu His Pro Cys Val Glu Ser Met  
 500 505 510

Lys Asp Asn Val Leu Arg Asp Arg Gly Arg Pro Glu Ile Pro Ser Phe

515 520 525  
 Trp Leu Asn His Gln Gly Ile Gln Met Val Cys Glu Thr Leu Thr Glu

530 535 540  
 Cys Trp Asp His Asp Pro Glu Ala Arg Leu Thr Ala Gln Cys Val Ala

545 550 555 560  
 Glu Arg Phe Ser Glu Leu Glu His Leu Asp Arg Leu Ser Gly Arg Ser

565 570 575  
 Cys Ser Glu Glu Lys Ile Pro Glu Asp Gly Ser Leu Asn Thr Thr Lys

580 585 590

<210> 61

<211> 4629

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human TGF-beta receptor type-2 (TGFR2) transcript

variant B

<300>

<308> NCBI NM-003242.5

<309> 2019-05-28

<400> 61

ggagagggag aaggctctcg ggcggagaga gtcctgccc agctgttggc gaggagtffc 60

ctgtttcccc cgcagcgtg agttgaagt gagtgagtca ctcgctgca cggagcgacg 120

acacccccgc gcgtgcaccc gctcgggaca ggagccggac tcctgtgcag cttccctcgg 180  
 ccgccggggg cctccccgcg cctcggccgc ctccaggccc cctcctggct ggcgagcggg 240  
  
 cgccacatct ggccccaca tctgcgctgc eggccccggc cggggtccgg agagggcgcg 300  
 gcgcgagggc gcagccaggg gtccgggaag gcgccgtccg ctgcgctggg ggctcggctt 360  
 atgacgagca gcggggtctg ccatgggtcg ggggctgtc aggggcctgt ggccgctgca 420  
 catcgtcctg tggacgcgta tcgccagcac gatcccaccg cacgttcaga agtcggttaa 480  
 taacgacatg atagtactg acaacaacgg tgcagtcaag tttccacaac tgtgtaaatt 540  
 ttgtgatgtg agattttcca cctgtgacaa ccagaaatcc tgcatgagca actgcagcat 600  
 cacctccatc tigtgagaagc cacaggaagt ctgtgtggct gtatggagaa agaatgacga 660  
 gaacataaca ctagagacag tttgccatga cccaagctc ccctacatg actttattct 720  
  
 ggaagatgct gcttctcaa agtgcattat gaaggaaaa aaaaagcctg gtgagacttt 780  
 cttcatgtgt tcctgtagct ctgatgagt caatgacaac atcatcttct cagaagaata 840  
 taacaccagc aatcctgact tgttgctagt catatttcaa gtgacaggca tcagcctcct 900  
 gccaccactg ggagtggcca tatctgteat catcatette tactgctacc gcgttaaccg 960  
 gcagcagaag ctgagttcaa cctgggaaac cggcaagacg cggaagctca tggagttcag 1020  
 cgagcactgt gccatcatcc tggaaatga ccgctctgac atcagctcca cgtgtgccaa 1080  
 caacatcaac cacaacacag agctctgccc cattgagctg gacaccctgg tggggaaagg 1140  
 tcgctttgct gaggtctata aggccaagct gaagcagaac acttcagagc agtttgagac 1200  
  
 agtggcagtc aagatcttic cctatgagga gtatgcctct tggaagacag agaaggacat 1260  
 cttctcagac atcaatctga agcatgagaa catactccag ttcctgacgg ctgaggagcg 1320  
 gaagacggag ttggggaaac aatactggct gatcaccgcc ttccacgcca agggcaacct 1380  
 acaggagtac ctgacgcggc atgtcatcag ctgggaggac ctgcgcaagc tgggcagctc 1440  
 cctcggccgg gggattgtc acctccacag tgatcacact ccatgtggga ggcccaagat 1500  
 gccccctgt cacagggacc tcaagagctc caatatectc gtgaagaacg acctaacctg 1560  
 ctgcctgtgt gactttgggc ttteectgcg tctggaccct actctgtctg tggatgacct 1620  
 ggctaacagt gggcaggtag gaactgcaag atacatggct ccagaagtcc tagaatccag 1680  
  
 gatgaatttg gagaatgtg agtcttcaa gcagaccgat gtctactcca tggctctggt 1740  
 gctctgggaa atgacatctc gctglaatgc agtgggagaa gtaaaagatt atgagcctcc 1800  
 atttggttcc aagggtcggg agcaccctg tgtcgaagc atgaaggaca acgtgttgag 1860  
 agatcgaggg cgaccagaaa ttcccagctt ctggctcaac caccagggca tccagatggt 1920  
 gtgtgagacg ttgactgagt gctgggacca cgaccagag gcccttctca cagcccagtg 1980

tgtggcagaa cgcttcagtg agctggagca tctggacagg ctctcgggga ggagctgctc 2040  
 ggaggagaag attcctgaag acggctcctt aaacctacc aaatagctct tctggggcag 2100  
 gctgggccat gtccaaagag gctgccctc tcaccaaaga acagaggcag caggaagctg 2160

cccctgaact gatgcttctt ggaaaaccaa gggggtcact cccctccctg taagctgtgg 2220  
 ggataagcag aaacaacagc agcagggagt gggtgacata gagcattcta tgcctttgac 2280  
 attgtcatag gataagctgt gttagcactt cctcaggaaa tgagattgat ttttacaata 2340  
 gccataaca ttigcacttt attaatgcct gtatataaat atgaatagct atgttttata 2400  
 tatatatata tatatctata tatgtctata gctctatata tatagccata ccttgaaaag 2460  
 agacaaggaa aaacatcaaa tattcccagg aaattggttt tattggagaa ctccagaacc 2520  
 aagcagagaa ggaagggacc catgacagca ttagcatttg acaatcacac atgcagtgg 2580  
 tctctgactg taaaacagtg aactttgcat gaggaaagag gctccatgct tcacagccag 2640

ctatgaccac attgcacttg cttttgcaaa ataactattc cctgcctagc acttctcttc 2700  
 tggccatgga actaagtaca gtggcactgt ttgaggacca gtgttcccgg ggttctctgtg 2760  
 tgccttatt tctcctggac ttttcattta agctccaagc cccaaatctg gggggetagt 2820  
 ttagaaactc tcctcaacc tagtttagaa actctacccc atctttaata ccttgaatgt 2880  
 tttgaacccc actttttacc ttcatgggtt gcagaaaaat cagaacagat gtcccacatc 2940  
 atgcgattgc cccacatct actaatgaaa aattgttctt ttttcatct tcccctgca 3000  
 cttatgttac tattctctgc tccagcctt catcctttc taaaaggag caaattctca 3060  
 ctctaggctt tctcgtgtt actttttcat tacacttgac ttgattttct agttttctat 3120

acaaacacca atgggttcca tctttctggg ctctgattg ctcaagcaca gtttggcctg 3180  
 atgaagagga ttcaactac acaatactat cattgtcagg actatgacct caggcactct 3240  
 aaacatatgt ttgttttgt cagcacagcg tttcaaaaag tgaagccact ttataaata 3300  
 ttggagattt tgcagaaaa tctggatccc caggttaagga tagcagatgg ttttcagtta 3360  
 tctccagtcc acgttcacaa aatgtgaagg tgtggagaca cttacaaagc tgcctcactt 3420  
 ctcaactgta acattagctc ttccactgc ctacctggac cccagtctag gaattaaatc 3480  
 tgcacctaac caaggtccct tgaagaaat gtccattcaa gcagtcattc tctgggtata 3540  
 taatatgatt ttgactacct tatctggtgt taagatttga agttggcctt ttattggact 3600

aaaggggaac tcctttaagg gtctcagtta gcccaagttt cttttgctta tatgttaata 3660  
 gttttaccct ctgcattgga gagaggagt ctttactcca agaagctttc ctcatggta 3720  
 ccgttctctc catcatgcca gccttctcaa cctttgcaga aattactaga gaggatttga 3780  
 atgtgggaca caaaggtccc atttgcagt agaaaatttg tgtccacaag gacaagaaca 3840

aagtatgagc tttaaaactc cataggaaac ttgttaatca acaaagaagt gttaatgctg 3900  
 caagtaatct cttttttaa actttttgaa gctacttatt ttcagccaaa taggaatatt 3960  
 agagagggac tggtagtgag aatatcagct ctgtttggat ggtggaaggt ctcattttat 4020  
 tgagattttt aagatacatg caaaggtttg gaaatagaac ctctaggcac cctcctcagt 4080

gtgggtgggc tgagagttaa agacagtgtg gctgcagtag catagaggcg cctagaaatt 4140  
 ccacttgcac cgtagggcat gctgatacca tccaatage tgttgcccat tgacctctag 4200  
 tggtagtitt ctagaatact ggtccattca tgagatattc aagattcaag agtattctca 4260  
 cttctgggtt atcagcataa actggaatgt agtgcagag gatactgtgg ctgtttttgt 4320  
 ttatgttttt ttttcttatt caagaaaaa gaccaaggaa taacattctg tagttcctaa 4380  
 aaatactgac ttttttact actatacata aagggaagt tttattcttt tatggaacac 4440  
 ttcagctgta ctcatgtatt aaaataggaa tgtgaatgct atatactctt tttatatcaa 4500  
 aagtctcaag cacttatttt tattctatgc attgtttgtc ttttacataa ataaaatggt 4560

tattagattg aataaagcaa aatactcagg tgagcatcct gcctcctgtt cccattccta 4620  
 gtagctaaa 4629

<210> 62

<211> 4704

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Human TGF-beta receptor type-2 (TGFR2) transcript  
 variant A

<300>

<308> NCBI NM\_001024847.2

<309> 2020-03-01

<400> 62

ggagagggag aaggctctcg ggcggagaga ggtcctgccc agctgttggc gaggagtttc 60  
 ctgtttcccc cgcagcgtg agttgaagt gagtgagtca ctcgcgcgca cggagcgacg 120  
 acacccccgc gctgcaacc gctcgggaca ggagccggac tctgtgcag ctccctcgg 180  
  
 ccgccggggg cctccccgcg cctcggcggc ctccaggccc cctcctggct ggcgagcggg 240  
 cgccacatct ggcccgcaca tctgcgtgc cggccccggc cggggtccgg agagggcgcg 300  
 gcgcggaggc gcagccaggg gtccgggaag gcgccgtccg ctgcgtggg ggctcgtct 360  
 atgacgagca gcgggtctg ccatgggtcg ggggtgctc agggcctgt gcccgtgca 420

catcgtcctg tggacgcgta tgcaccagcac gatcccaccg cacgttcaga agtcggatgt 480  
 ggaaatggag gccagaaaag atgaaatcat ctgcccagc tgtaatagga ctgccatcc 540  
 actgagacat attaataacg acatgatagt cactgacaac aacggtgcag tcaagtttcc 600  
 acaactgtgt aaatttgtg atgtgagatt ttccacctgt gacaaccaga aatcctgcat 660  
  
 gagcaactgc agcatcacct ccatctgtga gaagccacag gaagtctgtg tggctgtatg 720  
 gagaaagaat gacgagaaca taactactaga gacagtttgc catgaccca agctcccta 780  
 ccatgacttt atcttgaag atgctgcttc tccaaagtgc attatgaagg aaaaaaaaa 840  
 gcctggtgag actttcttca tgtgttctg tagctctgat gagtgcaatg acaacatcat 900  
 cttctcagaa gaatataaca ccagcaatcc tgacttgttg ctagtcatat ttcaagtgc 960  
 aggcacagc ctctgccac cactgggagt tgccatatct gtcacatca tcttctactg 1020  
 ctaccggtt aaccggcagc agaagtgcag ttcaacctgg gaaaccggca agacgcggaa 1080  
 gctcatggag ttcagcgagc actgtgccat catcctggaa gatgaccgct ctgacatcag 1140  
  
 ctccacctgt gccacaaca tcaaccacaa cacagagctg ctgcccattg agctggacac 1200  
 cctggtgggg aaagtcgct ttgctgaggt ctataaggcc aagctgaagc agaacacttc 1260  
 agagcagttt gagacagtg gactcaagat cttccctat gaggagtatg cctcttggaa 1320  
 gacagagaag gacatcttct cagacatcaa tctgaagcat gagaacatac tccagttcct 1380  
 gacggctgag gacgcgaaga cggagttggg gaaacaatac tggtgatca cgccttcca 1440  
 cgccaagggc aacctacag agtacctgac gcggcatgtc atcagctggg aggacctgcg 1500  
 caagctgggc agctccctcg cccgggggat tgctcacctc cacagtgatc aactccatg 1560  
 tgggaggccc aagatgccca tcgtgcacag ggacctcaag agctccaata tctcgtgaa 1620  
  
 gaacgaccta acctgctgcc tgtgtgactt tgggctttcc ctgctctgg acctactct 1680  
 gtctgtggat gacctggcta acagtgggca ggtgggaact gcaagataca tggctccaga 1740  
 agtcctagaa tccaggatga atttggagaa tgttgagtcc ttcaagcaga ccgatgtcta 1800  
 ctccatggct ctggtgctct gggaaatgac atctcgctgt aatgcagtgg gagaagtaaa 1860  
 agattatgag cctccatttg gttccaaggt gcgggagcac cctgtgtcg aaagcatgaa 1920  
 ggacaacgtg ttgagagatc gagggcgacc agaaattccc agcttctggc tcaaccacca 1980  
 gggcatccag atggtgtgtg agacgttgac tgagtgtctg gaccagacc cagaggcccc 2040  
 tctcacagcc cagtgtgtgg cagaacgctt cagtgagctg gagcatctgg acaggetctc 2100  
  
 ggggaggagc tgctcggagg agaagattcc tgaagacggc tcctaaca ctaccaata 2160  
 gctcttctgg ggcagctgg gccatgcca aagagctgc ccctctcacc aaagaacaga 2220  
 gcagcagga agctgccct gaactgatgc ttctggaaa accaaggggg tcaactccct 2280

ccctgtaagc tgiiggata agcagaaaca acagcagcag ggagtgggtg acatagagca 2340  
 ttctatgcct ttgacattgt cataggataa gctgtgttag cacttcctca gaaatgaga 2400  
 ttgatTTTT caatagccaa taacatttgc actttattaa tgcctgtata taaatatgaa 2460  
 tagctatgtt ttatatatat atatatatat ctatatatgt ctatagctct atatatatag 2520  
 ccataccttg aaaagagaca aggaaaaaca tcaaatattc ccaggaaatt ggttttattg 2580

gagaactcca gaaccaagca gagaaggaag ggacccatga cagcattagc atttgacaat 2640  
 cacacatgca gtggttctct gactgtaaaa cagtgaactt tgcatgagga aagaggctcc 2700  
 atgtctcaca gccagctatg accacattgc acttgctttt gcaaaataat cattccctgc 2760  
 cttagcacttc tcttctggcc atggaactaa gtacagtggc actgtttgag gaccagtgtt 2820  
 cccgggggtc ctgtgtgcc ttatttctcc tggacttttc atttaagctc caagcccaa 2880  
 atctgggggg ctagtttaga aactctcct caacctagtt tagaaactct accccatctt 2940  
 taataccttg aatgtttga accccacttt ttacctcat gggtgcaga aaaatcagaa 3000  
 cagatgtccc catccatgcg attgccccac catctactaa tgaaaaattg ttctttttt 3060

catctttccc ctgcaattat gttactattc tctgctecca gccttcatcc ttttctaaaa 3120  
 aggagcaaat tctcactcta ggctttatcg tgtttacttt ttattacac ttgacttgat 3180  
 tttctagttt ctatacaaa caccaatggg ttccatcttt ctgggtcct gattgctcaa 3240  
 gcacagtttg gctgatgaa gaggatttca actacacaat actatcattg tcaggactat 3300  
 gacctcaggc actctaaaca tatgtttgt ttggtcagca cagcgtttca aaaagtgaag 3360  
 ccactttata aatatttga gatgttcag gaaaatctgg atccccaggt aaggatagca 3420  
 gatggttttc agttatctcc agtccacgtt cacaaaatgt gaaggtgtgg agacacttac 3480  
 aaagctgctt cacttctcac tgtaaacatt agctctttcc actgcctacc tggaccccag 3540

tctaggaatt aaatctgcac ctaaccaagg tcctttgtaa gaaatgtcca ttcaagcagt 3600  
 cattctctgg gtatataata tgattttgac taccttatct ggtgttaaga tttgaagttg 3660  
 gccttttatt ggactaaagg ggaactcctt taagggtctc agttagcca agtttctttt 3720  
 gcttatatgt taatagtttt accctctgca ttggagagag gagtgcctta ctccaagaag 3780  
 ctttctcat ggttaccgtt ctctccatca tgccagcctt ctcaaccttt gcagaaatta 3840  
 ctagagagga tttgaatgtg ggacacaaag gtccatttg cagttagaaa atttgtgtcc 3900  
 acaaggacaa gaacaaagta tgagctttaa aactccatag gaaacttgtt aatcaacaaa 3960  
 gaagtgttaa tgctgcaagt aatctctttt ttaaaacttt ttgaagctac ttattttcag 4020

ccaaatagga atattagaga gggactggta gtgagaatat cagctctgtt tggatgggtg 4080  
 aaggtctcat ttattgaga ttttaagat acatgcaaag gtttggaaat agaacctcta 4140

ggcacctcc tcagtgtggg tgggctgaga gttaaagaca gtgtggctgc agtagcatag 4200  
 aggcgcttag aaattccact tgcaccgtag ggcatgctga taccatcca atagctgttg 4260  
 cccattgacc tctagtggg agtttctaga atactggtcc attcatgaga tattcaagat 4320  
 tcaagagtat ttcacttct gggttatcag cataaactgg aatgtagtgt cagaggatac 4380  
 tgtggcttgt tttgtttatg ttttttttc ttattcaaga aaaaagacca aggaataaca 4440  
 ttctgtagtt cctaaaaata ctgacttttt tcactactat acataaaggg aaagttttat 4500

tcttttatgg aacacttcag ctgtactcat gtattaaaat aggaatgtga atgctatata 4560  
 ctctttttat atcaaaagtc tcaagcactt atttttattc tatgcattgt ttgtctttta 4620  
 cataaataaa atgtttatta gattgaataa agcaaaatac tcaggtgagc atcctgcctc 4680  
 ctgttcccat tcctagtagc taaa 4704

<210> 63

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 targeting domain sequence 1

<400> 63

gcagaccgau gucuacucca 20

<210> 64

<211> 20

<212>

> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 targeting domain sequence 2

<400> 64

cccuaccan gacuuuuuuc 20

<210> 65

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 targeting domain sequence 3

<400> 65

gacaucucgc uguaaugcag 20

<210> 66

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 targeting domain sequence 4

<400> 66

cacauagaaga aagucucacc 20

<210> 67

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 targeting domain sequence 5

<400> 67

augauaguca cugacaacaa 20

<210> 68

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 targeting domain sequence 6

<400> 68

cuccaucugu gagaagccac 20

<210> 69

<211> 610

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 5' homology arm sequence 1

<400> 69

tacatgcaga ttttttgaag gcagaagctg tgcattttt tttcatgttc ccaatgtcct 60

gagcttagat aacactcagt aaatggtttg tctttttatt tggcaatatt gaggacctgc 120  
 tgtgtgctaa gtgcagttta cagtagtgaa gaagacatgg taccttccag catggagttc 180  
 cctgtccgtg ggggatggca agagtaggga aagacagatg tgaatcaag aggtagagtc 240  
 atagttcatt tagtttaagt tgtactgaat tgttacctag gaaaagtata aggtgctatg 300  
 aaaatgtata aaataagaca gttttccaag tttttctagg cctctcttaa gcagtgacat 360  
 ttaagctgaa gtttgaagga agagcagggg atgacgaaca gatggccaga ggcaggggaag 420  
 gctgaacgag catgcacttg catccctgaa ataaaaatta acaatatcgt atctacaaaa 480

actatgcaga tgctaaaatc tatagatgct caggcatgaa cccacttctt gacagtactt 540  
 acctaccaca tccaactcct tctctccttg ttttgtttcc ccatcagaat ataacaccag 600  
 caatcctgac 610

<210> 70

<211> 600

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 5' homology arm sequence 2

<400> 70

gtgcagttta cagtagtgaa gaagacatgg taccttccag catggagttc cctgtccgtg 60  
 ggggatggca agagtaggga aagacagatg tgaatcaag aggtagagtc atagttcatt 120  
 tagtttaagt tgtactgaat tgttacctag gaaaagtata aggtgctatg aaaatgtata 180

aaataagaca gttttccaag tttttctagg cctctcttaa gcagtgacat ttaagctgaa 240  
 gtttgaagga agagcagggg atgacgaaca gatggccaga ggcaggggaag gctgaacgag 300  
 catgcacttg catccctgaa ataaaaatta acaatatcgt atctacaaaa actatgcaga 360

tgctaaaatc tatagatgct caggcatgaa cccacttctt gacagtactt acctaccaca 420  
 tccaactcct tctctccttg ttttgtttcc ccatcagaat ataacaccag caatcctgac 480  
 ttgttgctag tcatattca agtgacaggc atcagcctcc tgccaccact gggagttgcc 540

atatctgtca tcatcatctt ctactgctac cgcgttaacc ggcagcagaa gctgagttca 600  
 <210> 71

<211> 600

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 5' homology arm sequence 3

<400> 71

atggagtcca gcgagcactg tgccatcadc ctggaagatg accgctctga catcagctcc 60  
 acgtgtgccca acaacatcaa ccacaacaca gagctgctgc ccattgagct ggacaccctg 120  
 gtaggggaaag gtcgctttgc tgaggtctat aaggccaagc tgaagcagaa cacttcagag 180  
 cagtttgaga cagtggcagt caagatcttt ccctatgagg agtatgcctc ttggaagaca 240  
 gagaaggaca tcttctcaga catcaatctg aagcatgaga acatactcca gttcctgacg 300  
 gctgaggagc ggaagacgga gttggggaaa caatactggc tgatcaccgc cttccacgcc 360

aagggcaacc tacaggagta cctgacgcgg catgtcatca gctgggagga cctgcgcaag 420  
 ctgggcagct ccctcgcccc ggggattgct cacctccaca gtgatcacac tccatgtggg 480  
 aggcccaaga tgcccatcgt gcacagggac ctcaagagct ccaatatcct cgtgaagaac 540  
 gacctaacct gctgcctgtg tgactttggg ctttcctgc gtctggacce tactctgtct 600

<210> 72

<211> 600

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 3' homology arm sequence 1

<400> 72

gtaagttaga gctagtgeta gatecccttt accttgagcc tggcctcacc ctacctcttg 60  
 atccatatct cctggctctt atctcaacaa gcctgtact ctggacactg gtctagggaa 120

tctagccaaa gtagggagtc tgcccttgagc atactctgct ctgtcctgcc tgagcatttt 180  
 tgctaatagga cagcatttct cctcctatct tcaaatcctt cccagttcag cacatttttt 240  
 cctcctggat caatcctcat ttctcttcca gcaaatgttt tttctttgtt tcaagcactg 300  
 ttagtacttt acctctattt ttccctctc ttatggttgt actcagtctt ttctgctcta 360  
 tactagctgt agttgtgttg gtttctttgt attaaaagca tcgtggaagg caatctccct 420  
 gaagtccaaa tctacatcca catggtcacc caagatatgt agcacaatgc cttgaacatt 480  
 gaaagtaaaa taagtaacttg tcgactgagt gagcacttcc actcttgaag cactctcaca 540  
 gattaaaatg gaaatgtttt tggctaagaa actattggaa ggtgattgga aatcaccaca 600

<210> 73

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 targeting domain sequence  
 <400> 73  
 guggaugacc uggcuaacag 20  
 <210> 74  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 1  
 <400> 74  
 gcagaccgat gtctactcca 20  
 <210> 75  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 2  
 <400> 75  
 gacatctcgc tgtaatgcag 20  
 <210> 76  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 3  
 <400> 76  
 acagtgatca cactccatgt 20  
 <210> 77  
 <211> 1189  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <220>

<223> EF1alpha promoter

<300>

<308> Genebank J04617.1

<309> 1994-11-07

<400> 77

cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gcccacagtc cccgagaagt 60  
 tggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaaactggg 120  
 aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggg tgggggagaa ccgtatataa 180

gtgcagtagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgcccacaga acacaggtaa 240  
 gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggcctt tgcgtgcctt 300  
 gaattacttc cacgcccctg gctgcagtac gtgattcttg atcccagact tcgggttggg 360  
 agtgggtggg agagttcgag gccttgcgct taaggagccc cttcgcctcg tgcttgagtt 420  
 gaggcctggc ctgggcgctg gggccgccgc gtgcgaatct ggtggcacct tcgcgctgt 480  
 ctgctgctt tcgataagtc tctagccatt taaaattttt gatgacctgc tgcgacgctt 540  
 tttttctggc aagatagctt tgtaaatgcg ggccaagatc tgcacactgg tatttcggtt 600  
 tttggggccg cgggcggcga cggggcccgt gctcccagc gcacatgttc ggcgaggcgg 660

ggcctgcgag cgcggccacc gagaatcgga cgggggtagt ctcaagctgg ccggcctgct 720  
 ctggtgcctg gcctcgcgcc gccgtgtatc gccccgcctt gggcggcaag gctggcccgg 780  
 tcggcaccag ttgcgtgagc ggaaagatgg ccgcttcccg gccttgcctc agggagctca 840  
 aatggagga cgcggcgcctc gggagagcgg gcgggtgagt cacccacaca aaggaaaagg 900  
 gcctttccgt cctcagcctg cgcttcatgt gactccacgg agtaccgggc gccgtccagg 960  
 cacctcgatt agttctcgag cttttggagt acgtcgtctt taggttgggg ggaggggttt 1020  
 tatgcatgag agtttcccca cactgagtgg gtggagactg aagttaggcc agcttggcac 1080  
 ttgatgtaat tctccttggg atttgccctt tttgagttg gatcttggtt cattctcaag 1140

cctcagacag tggttcaaaag tttttttctt ccatttcagg tgtcgtgaa 1189

<210> 78

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human HBB splice acceptor site

<400> 78

ctgacctctt ctcttctcc cacag 25  
 <210> 79  
 <211> 13  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Human IgG splice acceptor site  
 <400> 79

tttctctcca cag 13  
 <210> 80  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence A  
 <400> 80

gtagctctga tgagtgcaat 20  
 <210> 81  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence B  
 <400> 81

atgaatctct tcaactctagg 20  
 <210> 82  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> FKBP  
 <400> 82

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu

                  100                    105

<210> 83

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> FKBP12v36

<400> 83

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

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

                  35                    40                    45

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

                  50                    55                    60

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

65                    70                    75                    80

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

85 90 95  
 Leu Val Phe Asp Val Glu Leu Leu Lys Leu Glu  
 100 105  
 <210> 84  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> human C-Src acylation motif  
 <400> 84  
 Met Gly Ser Asn Lys Ser Lys Pro Lys Asp Ala Ser Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10 15  
 <210> 85  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> dual acylation motif  
 <220>  
 >  
 <221> VARIANT  
 <222> (4)...(4)  
 <223> Xaa is any amino acid  
 <400> 85  
 Met Gly Cys Xaa Cys  
 1 5  
 <210> 86  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> CAAX motif  
 <220>  
 <221> VARIANT  
 <222> (4)...(4)

<223> Xaa is any amino acid

<400> 86

Cys Ala Ala Xaa

1

<210> 87

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 target sequence C

<400> 87

acaggagtac ctgacgcggc

20

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 target sequence D

<400> 88

ctgttagcca ggtcatccac

20

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 target sequence E

<400> 89

gggtgtccag ctcaatgggc

20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 target sequence F

<400> 90  
 tcataatgca ctttgagaa 20

<210> 91  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence G

<400> 91  
 tgactttatt ctggaagatg 20

<210> 92  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 4

<400> 92  
 ggccgctgca catcgtcctg 20

<210> 93  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 5

<400> 93  
 gcggggtctg ccatgggtcg 20

<210> 94  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 6

<400> 94

agttgctcat gcaggatttc 20

<210> 95

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 target sequence 7

<400> 95

aagtcatggt aggggagctt 20

<210> 96

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 target sequence 8

<400> 96

agtcatggta ggggagcttg 20

<210> 97

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary gRNA complementary domain

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)...(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)...(20)

<223> n is a, c, g, or u

<400> 97

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaaagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugc 96

<210> 98  
 <211> 104  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223>  
 exemplary gRNA complementary domain  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)...(20)  
 <223> a, c, u, g, unknown or other  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)...(20)  
 <223> n is a, c, g, or u  
 <400> 98  
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uaugcugaaa agcauagcaa guuaaaaaaa 60  
 ggcuaaguccg uuaucaacuu gaaaaagugg caccgagucg gugc 104  
 <210> 99  
 <211> 106  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> exemplary gRNA complementary domain  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222>  
 > (1)...(20)  
 <223> a, c, u, g, unknown or other  
 <220>  
 <221> modified\_base  
 <222> (1)...(20)  
 <223> n is a, c, g, or u  
 <400> 99  
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uaugcuggaa acagcauagc aaguuaaaau 60

aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugc 106

<210> 100

<211> 116

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary gRNA complementary domain

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)...(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)...(20)

<223> n is a, c, g, or u

<400> 100

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uaugcuguuu uggaacaaa acagcauagc 60

aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugc 116

<210> 101

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary gRNA complementary domain

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)...(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)...(20)

<223> n is a, c, g, or u

<400> 101

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaauau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugc 96

<210> 102

<211> 96

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary gRNA complementary domain

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)...(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)...(20)

<223> n is a, c, g, or u

<400> 102

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaauagc aaguuaauau aaggcuaguc 60

cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugc 96

<210>

> 103

<211> 116

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary gRNA complementary domain

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)...(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)...(20)

<223> n is a, c, g, or u

<400> 103  
 nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guauuagagc uaugcuguau uggaacaau acagcauagc 60  
 aaguuauau aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugc 116

<210> 104  
 <211> 47  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223>  
 exemplary proximal and tail domain

<400> 104  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcu 47

<210> 105  
 <211> 49  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> exemplary proximal and tail domain

<400> 105  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cgguggugc 49

<210> 106  
 <211> 51  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> exemplary proximal and tail domain

<400> 106  
 aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcggau c 51

<210> 107  
 <211> 31  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> exemplary proximal and tail domain

<400> 107  
aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu g 31  
<210> 108  
<211> 18  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> exemplary proximal and tail domain  
<400> 108  
aaggcuaguc cguuauca 18  
<210> 109  
<211> 12  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> exemplary proximal and tail domain  
<400>  
> 109  
aaggcuaguc cg 12  
<210> 110  
<211> 102  
<212> RNA  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> exemplary chimeric gRNA  
<220>  
<221> modified\_base  
<222> (1)...(20)  
<223> a, c, u, g, unknown or other  
<220>  
<221> modified\_base  
<222> (1)...(20)  
<223> n is a, c, g, or u  
<400> 110  
nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uagaaaagc aaguuuuuuu aaggcuaguc 60

cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uu 102

<210> 111

<211> 102

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> exemplary chimeric gRNA

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)...(20)

<223> a, c, u, g, unknown or other

<220>

<221> modified\_base

<222> (1)...(20)

<223> n is a, c, g, or u

<400> 111

nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuaguac ucuggaaaca gaaucuacua aaacaaggca 60

aaaugccgug uuuauucugu caacuuguug gcgagauuuu uu 102

<210> 112

<211> 1344

<212> PRT

<213> streptococcus mutans

<220>

<223> Cas9

<400> 112

Lys Lys Pro Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly

1 5 10 15

Trp Ala Val Val Thr Asp Asp Tyr Lys Val Pro Ala Lys Lys Met Lys

20 25 30

Val Leu Gly Asn Thr Asp Lys Ser His Ile Glu Lys Asn Leu Leu Gly

35 40 45

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



Leu Thr Val Thr Asp Val Gly Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met  
 305 310 315 320

Ile Gln Arg Tyr Asn Glu His Gln Met Asp Leu Ala Gln Leu Lys Gln  
 325 330 335

Phe Ile Arg Gln Lys Leu Ser Asp Lys Tyr Asn Glu Val Phe Ser Asp  
 340 345 350

Val Ser Lys Asp Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Lys Thr Asn Gln  
 355 360 365

Glu Ala Phe Tyr Lys Tyr Leu Lys Gly Leu Leu Asn Lys Ile Glu Gly  
 370 375 380

Ser Gly Tyr Phe Leu Asp Lys Ile Glu Arg Glu Asp Phe Leu Arg Lys  
 385 390 395 400

Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu Gln  
 405 410 415

Glu Met Arg Ala Ile Ile Arg Arg Gln Ala Glu Phe Tyr Pro Phe Leu  
 420 425 430

Ala Asp Asn Gln Asp Arg Ile Glu Lys Leu Leu Thr Phe Arg Ile Pro  
 435 440 445

Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Lys Ser Asp Phe Ala Trp Leu  
 450 455 460

Ser Arg Lys Ser Ala Asp Lys Ile Thr Pro Trp Asn Phe Asp Glu Ile  
 465 470 475 480

Val Asp Lys Glu Ser Ser Ala Glu Ala Phe Ile Asn Arg Met Thr Asn  
 485 490 495

Tyr Asp Leu Tyr Leu Pro Asn Gln Lys Val Leu Pro Lys His Ser Leu  
 500 505 510

Leu Tyr Glu Lys Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys Tyr  
 515 520 525

Lys Thr Glu Gln Gly Lys Thr Ala Phe Phe Asp Ala Asn Met Lys Gln  
 530 535 540

Glu Ile Phe Asp Gly Val Phe Lys Val Tyr Arg Lys Val Thr Lys Asp

545                    550                    555                    560  
 Lys Leu Met Asp Phe Leu Glu Lys Glu Phe Asp Glu Phe Arg Ile Val  
                          565                    570                    575  
  
 Asp Leu Thr Gly Leu Asp Lys Glu Asn Lys Val Phe Asn Ala Ser Tyr  
                          580                    585                    590  
 Gly Thr Tyr His Asp Leu Cys Lys Ile Leu Asp Lys Asp Phe Leu Asp  
                          595                    600                    605  
 Asn Ser Lys Asn Glu Lys Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr  
                          610                    615                    620  
 Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Arg Lys Arg Leu Glu Asn Tyr Ser  
 625                    630                    635                    640  
  
 Asp Leu Leu Thr Lys Glu Gln Val Lys Lys Leu Glu Arg Arg His Tyr  
                          645                    650                    655  
 Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Ala Glu Leu Ile His Gly Ile Arg Asn  
                          660                    665                    670  
 Lys Glu Ser Arg Lys Thr Ile Leu Asp Tyr Leu Ile Asp Asp Gly Asn  
                          675                    680                    685  
 Ser Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile Asn Asp Asp Ala Leu Ser Phe  
                          690                    695                    700  
  
 Lys Glu Glu Ile Ala Lys Ala Gln Val Ile Gly Glu Thr Asp Asn Leu  
 705                    710                    715                    720  
 Asn Gln Val Val Ser Asp Ile Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly  
                          725                    730                    735  
 Ile Leu Gln Ser Leu Lys Ile Val Asp Glu Leu Val Lys Ile Met Gly  
                          740                    745                    750  
 His Gln Pro Glu Asn Ile Val Val Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln Phe  
                          755                    760                    765  
  
 Thr Asn Gln Gly Arg Arg Asn Ser Gln Gln Arg Leu Lys Gly Leu Thr  
                          770                    775                    780  
 Asp Ser Ile Lys Glu Phe Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro Val  
 785                    790                    795                    800



1045                                  1050                                  1055  
 His Ile Ser Asn Ile Lys Lys Val Leu Ser Tyr Pro Gln Val Asn Ile  
 1060                                  1065                                  1070  
 Val Lys Lys Val Glu Glu Gln Thr Gly Gly Phe Ser Lys Glu Ser Ile  
 1075                                  1080                                  1085  
  
 Leu Pro Lys Gly Asn Ser Asp Lys Leu Ile Pro Arg Lys Thr Lys Lys  
 1090                                  1095                                  1100  
 Phe Tyr Trp Asp Thr Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro Ile Val  
 1105                                  1110                                  1115                                  1120  
 Ala Tyr Ser Ile Leu Val Ile Ala Asp Ile Glu Lys Gly Lys Ser Lys  
 1125                                  1130                                  1135  
 Lys Leu Lys Thr Val Lys Ala Leu Val Gly Val Thr Ile Met Glu Lys  
 1140                                  1145                                  1150  
  
 Met Thr Phe Glu Arg Asp Pro Val Ala Phe Leu Glu Arg Lys Gly Tyr  
 1155                                  1160                                  1165  
 Arg Asn Val Gln Glu Glu Asn Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr Ser Leu  
 1170                                  1175                                  1180  
 Phe Lys Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Leu Leu Ala Ser Ala Arg Glu  
 1185                                  1190                                  1195                                  1200  
 Leu Gln Lys Gly Asn Glu Ile Val Leu Pro Asn His Leu Gly Thr Leu  
 1205                                  1210                                  1215  
  
 Leu Tyr His Ala Lys Asn Ile His Lys Val Asp Glu Pro Lys His Leu  
 1220                                  1225                                  1230  
 Asp Tyr Val Asp Lys His Lys Asp Glu Phe Lys Glu Leu Leu Asp Val  
 1235                                  1240                                  1245  
 Val Ser Asn Phe Ser Lys Lys Tyr Thr Leu Ala Glu Gly Asn Leu Glu  
 1250                                  1255                                  1260  
 Lys Ile Lys Glu Leu Tyr Ala Gln Asn Asn Gly Glu Asp Leu Lys Glu  
 1265                                  1270                                  1275                                  1280  
  
 Leu Ala Ser Ser Phe Ile Asn Leu Leu Thr Phe Thr Ala Ile Gly Ala  
 1285                                  1290                                  1295

Pro Ala Thr Phe Lys Phe Phe Asp Lys Asn Ile Asp Arg Lys Arg Tyr  
 1300 1305 1310  
 Thr Ser Thr Thr Glu Ile Leu Asn Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile  
 1315 1320 1325  
 Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp Leu Asn Lys Leu Gly Gly Asp  
 1330 1335 1340

<210> 113

<211> 1367

<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<220>

<223> Cas9

<400> 113

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

145                    150                    155                    160  
 Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro Asp  
                                  165                    170                    175  
 Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr Asn  
  
                                  180                    185                    190  
 Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala Lys  
                                  195                    200                    205  
 Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn Leu  
                                  210                    215                    220  
 Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn Leu  
 225                    230                    235                    240  
 Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe Asp  
  
                                  245                    250                    255  
 Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp Asp  
                                  260                    265                    270  
 Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp Leu  
                                  275                    280                    285  
 Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp Ile  
                                  290                    295                    300  
 Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser Met  
  
 305                    310                    315                    320  
 Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys Ala  
                                  325                    330                    335  
 Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe Asp  
                                  340                    345                    350  
 Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser Gln  
                                  355                    360                    365  
 Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp Gly  
  
                                  370                    375                    380  
 Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg Lys  
 385                    390                    395                    400

Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu Gly  
 405 410 415

Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe Leu  
 420 425 430

Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile Pro  
 435 440 445

Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp Met  
 450 455 460

Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu Val  
 465 470 475 480

Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr Asn  
 485 490 495

Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser Leu  
 500 505 510

Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys Tyr  
 515 520 525

Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln Lys  
 530 535 540

Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr Val  
 545 550 555 560

Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp Ser  
 565 570 575

Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly Thr  
 580 585 590

Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp Asn  
 595 600 605

Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr Leu  
 610 615 620

Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala His  
 625 630 635 640

Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr Thr



Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp Lys  
 900 905 910  
 Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr Lys  
 915 920 925  
 His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp Glu  
 930 935 940  
 Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser Lys  
 945 950 955 960  
 Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg Glu  
 965 970 975  
 Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val Val  
 980 985 990  
 Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe Val  
 995 1000 1005  
 Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys Ser  
 1010 1015 1020  
 Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser Asn  
 1025 1030 1035 1040  
 Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu Ile  
 1045 1050 1055  
 Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile Val  
 1060 1065 1070  
 Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser Met  
 1075 1080 1085  
 Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly Phe  
 1090 1095 1100  
 Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile Ala  
 1105 1110 1115 1120  
 Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser Pro  
 1125 1130 1135  
 Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly Lys

1140 1145 1150  
 Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile Met  
 1155 1160 1165  
 Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala Lys  
 1170 1175 1180  
 Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys Tyr  
 1185 1190 1195 1200  
 Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser Ala

1205 1210 1215  
 Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr Val  
 1220 1225 1230  
 Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser Pro  
 1235 1240 1245  
 Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His Tyr  
 1250 1255 1260  
 Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val Ile

1265 1270 1275 1280  
 Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys His  
 1285 1290 1295  
 Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu Phe  
 1300 1305 1310  
 Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp Thr  
 1315 1320 1325  
 Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp Ala

1330 1335 1340  
 Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile Asp  
 1345 1350 1355 1360  
 Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
 1365

<210> 114  
 <211> 1387  
 <212> PRT

<213> Streptococcus thermophilus

<220>

<223> Cas9

<400> 114

Thr Lys Pro Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly

1 5 10 15

Trp Ala Val Thr Thr Asp Asn Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Met Lys

20 25 30

Val Leu Gly Asn Thr Ser Lys Lys Tyr Ile Lys Lys Asn Leu Leu Gly

35 40 45

Val Leu Leu Phe Asp Ser Gly Ile Thr Ala Glu Gly Arg Arg Leu Lys

50 55 60

Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Arg Asn Arg Ile Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Glu Ile Phe Ser Thr Glu Met Ala Thr Leu Asp Asp Ala Phe

85 90 95

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

100 105 110

Ser Lys Tyr Pro Ile Phe Gly Asn Leu Val Glu Glu Lys Ala Tyr His

115 120 125

Asp Glu Phe Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Tyr Leu Ala Asp Ser

130 135 140

Thr Lys Lys Ala Asp Leu Arg Leu Val Tyr Leu Ala Leu Ala His Met

145 150 155 160

Ile Lys Tyr Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Glu Phe Asn Ser Lys

165 170 175

Asn Asn Asp Ile Gln Lys Asn Phe Gln Asp Phe Leu Asp Thr Tyr Asn

180 185 190

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

195 200 205

Glu Ile Val Lys Asp Lys Ile Ser Lys Leu Glu Lys Lys Asp Arg Ile



Ile Arg Lys Arg Asn Glu Lys Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Asp Val

465                      470                      475                      480

Ile Asp Lys Glu Ser Ser Ala Glu Ala Phe Ile Asn Arg Met Thr Ser

                                 485                      490                      495

Phe Asp Leu Tyr Leu Pro Glu Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser Leu

                                 500                      505                      510

Leu Tyr Glu Thr Phe Asn Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Arg Phe

                                 515                      520                      525

Ile Ala Glu Ser Met Arg Asp Tyr Gln Phe Leu Asp Ser Lys Gln Lys

                                 530                      535                      540

Lys Asp Ile Val Arg Leu Tyr Phe Lys Asp Lys Arg Lys Val Thr Asp

545                      550                      555                      560

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

                                 565                      570                      575

Glu Leu Lys Gly Ile Glu Lys Gln Phe Asn Ser Ser Leu Ser Thr Tyr

                                 580                      585                      590

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

                                 595                      600                      605

Ser Asn Glu Ala Ile Ile Glu Glu Ile Ile His Thr Leu Thr Ile Phe

                                 610                      615                      620

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

625                      630                      635                      640

Phe Asp Lys Ser Val Leu Lys Lys Leu Ser Arg Arg His Tyr Thr Gly

                                 645                      650                      655

Trp Gly Lys Leu Ser Ala Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp Glu Lys

                                 660                      665                      670

Ser Gly Asn Thr Ile Leu Asp Tyr Leu Ile Asp Asp Gly Ile Ser Asn

                                 675                      680                      685

Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ala Leu Ser Phe Lys Lys

                                 690                      695                      700

Lys Ile Gln Lys Ala Gln Ile Ile Gly Asp Glu Asp Lys Gly Asn Ile

705                    710                    715                    720  
 Lys Glu Val Val Lys Ser Leu Pro Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly  
  
                          725                    730                    735  
 Ile Leu Gln Ser Ile Lys Ile Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly  
                          740                    745                    750  
 Gly Arg Lys Pro Glu Ser Ile Val Val Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln  
                          755                    760                    765  
 Tyr Thr Asn Gln Gly Lys Ser Asn Ser Gln Gln Arg Leu Lys Arg Leu  
                          770                    775                    780  
 Glu Lys Ser Leu Lys Glu Leu Gly Ser Lys Ile Leu Lys Glu Asn Ile  
  
 785                    790                    795                    800  
 Pro Ala Lys Leu Ser Lys Ile Asp Asn Asn Ala Leu Gln Asn Asp Arg  
                          805                    810                    815  
 Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu Gln Asn Gly Lys Asp Met Tyr Thr Gly Asp  
                          820                    825                    830  
 Asp Leu Asp Ile Asp Arg Leu Ser Asn Tyr Asp Ile Asp His Ile Ile  
                          835                    840                    845  
 Pro Gln Ala Phe Leu Lys Asp Asn Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Val  
  
                          850                    855                    860  
 Ser Ser Ala Ser Asn Arg Gly Lys Ser Asp Asp Val Pro Ser Leu Glu  
 865                    870                    875                    880  
 Val Val Lys Lys Arg Lys Thr Phe Trp Tyr Gln Leu Leu Lys Ser Lys  
                          885                    890                    895  
 Leu Ile Ser Gln Arg Lys Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly  
                          900                    905                    910  
 Gly Leu Ser Pro Glu Asp Lys Ala Gly Phe Ile Gln Arg Gln Leu Val  
  
                          915                    920                    925  
 Glu Thr Arg Gln Ile Thr Lys His Val Ala Arg Leu Leu Asp Glu Lys  
                          930                    935                    940  
 Phe Asn Asn Lys Lys Asp Glu Asn Asn Arg Ala Val Arg Thr Val Lys  
 945                    950                    955                    960

Ile Ile Thr Leu Lys Ser Thr Leu Val Ser Gln Phe Arg Lys Asp Phe  
 965 970 975  
 Glu Leu Tyr Lys Val Arg Glu Ile Asn Asp Phe His His Ala His Asp  
 980 985 990  
 Ala Tyr Leu Asn Ala Val Val Ala Ser Ala Leu Leu Lys Lys Tyr Pro  
 995 1000 1005  
 Lys Leu Glu Pro Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr Pro Lys Tyr Asn Ser  
 1010 1015 1020  
 Phe Arg Glu Arg Lys Ser Ala Thr Glu Lys Val Tyr Phe Tyr Ser Asn  
 1025 1030 1035 1040  
 Ile Met Asn Ile Phe Lys Lys Ser Ile Ser Leu Ala Asp Gly Arg Val  
 1045 1050 1055  
 Ile Glu Arg Pro Leu Ile Glu Val Asn Glu Glu Thr Gly Glu Ser Val  
 1060 1065 1070  
 Trp Asn Lys Glu Ser Asp Leu Ala Thr Val Arg Arg Val Leu Ser Tyr  
 1075 1080 1085  
 Pro Gln Val Asn Val Val Lys Lys Val Glu Glu Gln Asn His Gly Leu  
 1090 1095 1100  
 Asp Arg Gly Lys Pro Lys Gly Leu Phe Asn Ala Asn Leu Ser Ser Lys  
 1105 1110 1115 1120  
 Pro Lys Pro Asn Ser Asn Glu Asn Leu Val Gly Ala Lys Glu Tyr Leu  
 1125 1130 1135  
 Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Tyr Ala Gly Ile Ser Asn Ser Phe Thr  
 1140 1145 1150  
 Val Leu Val Lys Gly Thr Ile Glu Lys Gly Ala Lys Lys Lys Ile Thr  
 1155 1160 1165  
 Asn Val Leu Glu Phe Gln Gly Ile Ser Ile Leu Asp Arg Ile Asn Tyr  
 1170 1175 1180  
 Arg Lys Asp Lys Leu Asn Phe Leu Leu Glu Lys Gly Tyr Lys Asp Ile  
 1185 1190 1195 1200  
 Glu Leu Ile Ile Glu Leu Pro Lys Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Ser Asp

1205 1210 1215  
 Gly Ser Arg Arg Met Leu Ala Ser Ile Leu Ser Thr Asn Asn Lys Arg

1220 1225 1230  
 Gly Glu Ile His Lys Gly Asn Gln Ile Phe Leu Ser Gln Lys Phe Val

1235 1240 1245  
 Lys Leu Leu Tyr His Ala Lys Arg Ile Ser Asn Thr Ile Asn Glu Asn

1250 1255 1260  
 His Arg Lys Tyr Val Glu Asn His Lys Lys Glu Phe Glu Glu Leu Phe

1265 1270 1275 1280  
 Tyr Tyr Ile Leu Glu Phe Asn Glu Asn Tyr Val Gly Ala Lys Lys Asn

1285 1290 1295  
 Gly Lys Leu Leu Asn Ser Ala Phe Gln Ser Trp Gln Asn His Ser Ile

1300 1305 1310  
 Asp Glu Leu Cys Ser Ser Phe Ile Gly Pro Thr Gly Ser Glu Arg Lys

1315 1320 1325  
 Gly Leu Phe Glu Leu Thr Ser Arg Gly Ser Ala Ala Asp Phe Glu Phe

1330 1335 1340  
 Leu Gly Val Lys Ile Pro Arg Tyr Arg Asp Tyr Thr Pro Ser Ser Leu

1345 1350 1355 1360  
 Leu Lys Asp Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Val Thr Gly Leu Tyr Glu

1365 1370 1375  
 Thr Arg Ile Asp Leu Ala Lys Leu Gly Glu Gly

1380 1385

<210> 115

<211> 1333

<212> PRT

<213> *Listeria innocua*

<220>

<223> Cas9

<400> 115

Lys Lys Pro Tyr Thr Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Trp Ala Val Leu Thr Asp Gln Tyr Asp Leu Val Lys Arg Lys Met Lys  
 20 25 30  
  
 Ile Ala Gly Asp Ser Glu Lys Lys Gln Ile Lys Lys Asn Phe Trp Gly  
 35 40 45  
 Val Arg Leu Phe Asp Glu Gly Gln Thr Ala Ala Asp Arg Arg Met Ala  
 50 55 60  
 Arg Thr Ala Arg Arg Arg Ile Glu Arg Arg Arg Asn Arg Ile Ser Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Gly Ile Phe Ala Glu Glu Met Ser Lys Thr Asp Ala Asn Phe  
 85 90 95  
  
 Phe Cys Arg Leu Ser Asp Ser Phe Tyr Val Asp Asn Glu Lys Arg Asn  
 100 105 110  
 Ser Arg His Pro Phe Phe Ala Thr Ile Glu Glu Glu Val Glu Tyr His  
 115 120 125  
 Lys Asn Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Glu Glu Leu Val Asn Ser  
 130 135 140  
 Ser Glu Lys Ala Asp Leu Arg Leu Val Tyr Leu Ala Leu Ala His Ile  
 145 150 155 160  
  
 Ile Lys Tyr Arg Gly Asn Phe Leu Ile Glu Gly Ala Leu Asp Thr Gln  
 165 170 175  
 Asn Thr Ser Val Asp Gly Ile Tyr Lys Gln Phe Ile Gln Thr Tyr Asn  
 180 185 190  
 Gln Val Phe Ala Ser Gly Ile Glu Asp Gly Ser Leu Lys Lys Leu Glu  
 195 200 205  
 Asp Asn Lys Asp Val Ala Lys Ile Leu Val Glu Lys Val Thr Arg Lys  
 210 215 220  
  
 Glu Lys Leu Glu Arg Ile Leu Lys Leu Tyr Pro Gly Glu Lys Ser Ala  
 225 230 235 240  
 Gly Met Phe Ala Gln Phe Ile Ser Leu Ile Val Gly Ser Lys Gly Asn  
 245 250 255  
 Phe Gln Lys Pro Phe Asp Leu Ile Glu Lys Ser Asp Ile Glu Cys Ala



Leu Pro Lys His Ser Leu Cys Tyr Gln Lys Tyr Leu Val Tyr Asn Glu  
 515 520 525  
 Leu Thr Lys Val Arg Tyr Ile Asn Asp Gln Gly Lys Thr Ser Tyr Phe  
 530 535 540  
  
 Ser Gly Gln Glu Lys Glu Gln Ile Phe Asn Asp Leu Phe Lys Gln Lys  
 545 550 555 560  
 Arg Lys Val Lys Lys Lys Asp Leu Glu Leu Phe Leu Arg Asn Met Ser  
 565 570 575  
 His Val Glu Ser Pro Thr Ile Glu Gly Leu Glu Asp Ser Phe Asn Ser  
 580 585 590  
 Ser Tyr Ser Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Val Gly Ile Lys Gln Glu  
 595 600 605  
  
 Ile Leu Asp Asn Pro Val Asn Thr Glu Met Leu Glu Asn Ile Val Lys  
 610 615 620  
 Ile Leu Thr Val Phe Glu Asp Lys Arg Met Ile Lys Glu Gln Leu Gln  
 625 630 635 640  
 Gln Phe Ser Asp Val Leu Asp Gly Val Val Leu Lys Lys Leu Glu Arg  
 645 650 655  
 Arg His Tyr Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Ala Lys Leu Leu Met Gly  
 660 665 670  
  
 Ile Arg Asp Lys Gln Ser His Leu Thr Ile Leu Asp Tyr Leu Met Asn  
 675 680 685  
 Asp Asp Gly Leu Asn Arg Asn Leu Met Gln Leu Ile Asn Asp Ser Asn  
 690 695 700  
 Leu Ser Phe Lys Ser Ile Ile Glu Lys Glu Gln Val Thr Thr Ala Asp  
 705 710 715 720  
 Lys Asp Ile Gln Ser Ile Val Ala Asp Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile  
 725 730 735  
  
 Lys Lys Gly Ile Leu Gln Ser Leu Lys Ile Val Asp Glu Leu Val Ser  
 740 745 750  
 Val Met Gly Tyr Pro Pro Gln Thr Ile Val Val Glu Met Ala Arg Glu



Glu Phe Val Tyr Gly Asp Tyr His Gln Phe Asp Trp Phe Lys Ala Asn  
 1010 1015 1020  
 Lys Ala Thr Ala Lys Lys Gln Phe Tyr Thr Asn Ile Met Leu Phe Phe  
 1025 1030 1035 1040  
 Ala Gln Lys Asp Arg Ile Ile Asp Glu Asn Gly Glu Ile Leu Trp Asp  
 1045 1050 1055  
  
 Lys Lys Tyr Leu Asp Thr Val Lys Lys Val Met Ser Tyr Arg Gln Met  
 1060 1065 1070  
 Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Ile Gln Lys Gly Glu Phe Ser Lys Ala  
 1075 1080 1085  
 Thr Ile Lys Pro Lys Gly Asn Ser Ser Lys Leu Ile Pro Arg Lys Thr  
 1090 1095 1100  
 Asn Trp Asp Pro Met Lys Tyr Gly Gly Leu Asp Ser Pro Asn Met Ala  
 1105 1110 1115 1120  
  
 Tyr Ala Val Val Ile Glu Tyr Ala Lys Gly Lys Asn Lys Leu Val Phe  
 1125 1130 1135  
 Glu Lys Lys Ile Ile Arg Val Thr Ile Met Glu Arg Lys Ala Phe Glu  
 1140 1145 1150  
 Lys Asp Glu Lys Ala Phe Leu Glu Glu Gln Gly Tyr Arg Gln Pro Lys  
 1155 1160 1165  
 Val Leu Ala Lys Leu Pro Lys Tyr Thr Leu Tyr Glu Cys Glu Glu Gly  
 1170 1175 1180  
  
 Arg Arg Arg Met Leu Ala Ser Ala Asn Glu Ala Gln Lys Gly Asn Gln  
 1185 1190 1195 1200  
 Gln Val Leu Pro Asn His Leu Val Thr Leu Leu His His Ala Ala Asn  
 1205 1210 1215  
 Cys Glu Val Ser Asp Gly Lys Ser Leu Asp Tyr Ile Glu Ser Asn Arg  
 1220 1225 1230  
 Glu Met Phe Ala Glu Leu Leu Ala His Val Ser Glu Phe Ala Lys Arg  
 1235 1240 1245  
  
 Tyr Thr Leu Ala Glu Ala Asn Leu Asn Lys Ile Asn Gln Leu Phe Glu

1250                      1255                      1260  
 Gln Asn Lys Glu Gly Asp Ile Lys Ala Ile Ala Gln Ser Phe Val Asp  
 1265                      1270                      1275                      1280  
 Leu Met Ala Phe Asn Ala Met Gly Ala Pro Ala Ser Phe Lys Phe Phe  
                                  1285                      1290                      1295  
 Glu Thr Thr Ile Glu Arg Lys Arg Tyr Asn Asn Leu Lys Glu Leu Leu  
                                  1300                      1305                      1310  
  
 Asn Ser Thr Ile Ile Tyr Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Ser Arg  
                                  1315                      1320                      1325  
 Lys Arg Leu Asp Asp  
                                  1330  
 <210> 116  
 <211> 1082  
 <212> PRT  
 <213> Neisseria meningitidis  
 <220>  
 <223> Cas9  
 <400> 116  
 Met Ala Ala Phe Lys Pro Asn Ser Ile Asn Tyr Ile Leu Gly Leu Asp  
   1                      5                      10                      15  
 Ile Gly Ile Ala Ser Val Gly Trp Ala Met Val Glu Ile Asp Glu Glu  
                                  20                      25                      30  
  
 Glu Asn Pro Ile Arg Leu Ile Asp Leu Gly Val Arg Val Phe Glu Arg  
                                  35                      40                      45  
 Ala Glu Val Pro Lys Thr Gly Asp Ser Leu Ala Met Ala Arg Arg Leu  
                                  50                      55                      60  
 Ala Arg Ser Val Arg Arg Leu Thr Arg Arg Arg Ala His Arg Leu Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Arg Thr Arg Arg Leu Leu Lys Arg Glu Gly Val Leu Gln Ala Ala Asn  
                                  85                      90                      95  
  
 Phe Asp Glu Asn Gly Leu Ile Lys Ser Leu Pro Asn Thr Pro Trp Gln  
                                  100                      105                      110

Leu Arg Ala Ala Ala Leu Asp Arg Lys Leu Thr Pro Leu Glu Trp Ser  
 115 120 125  
 Ala Val Leu Leu His Leu Ile Lys His Arg Gly Tyr Leu Ser Gln Arg  
 130 135 140  
 Lys Asn Glu Gly Glu Thr Ala Asp Lys Glu Leu Gly Ala Leu Leu Lys  
 145 150 155 160  
  
 Gly Val Ala Gly Asn Ala His Ala Leu Gln Thr Gly Asp Phe Arg Thr  
 165 170 175  
 Pro Ala Glu Leu Ala Leu Asn Lys Phe Glu Lys Glu Ser Gly His Ile  
 180 185 190  
 Arg Asn Gln Arg Ser Asp Tyr Ser His Thr Phe Ser Arg Lys Asp Leu  
 195 200 205  
 Gln Ala Glu Leu Ile Leu Leu Phe Glu Lys Gln Lys Glu Phe Gly Asn  
 210 215 220  
  
 Pro His Val Ser Gly Gly Leu Lys Glu Gly Ile Glu Thr Leu Leu Met  
 225 230 235 240  
 Thr Gln Arg Pro Ala Leu Ser Gly Asp Ala Val Gln Lys Met Leu Gly  
 245 250 255  
 His Cys Thr Phe Glu Pro Ala Glu Pro Lys Ala Ala Lys Asn Thr Tyr  
 260 265 270  
 Thr Ala Glu Arg Phe Ile Trp Leu Thr Lys Leu Asn Asn Leu Arg Ile  
 275 280 285  
  
 Leu Glu Gln Gly Ser Glu Arg Pro Leu Thr Asp Thr Glu Arg Ala Thr  
 290 295 300  
 Leu Met Asp Glu Pro Tyr Arg Lys Ser Lys Leu Thr Tyr Ala Gln Ala  
 305 310 315 320  
 Arg Lys Leu Leu Gly Leu Glu Asp Thr Ala Phe Phe Lys Gly Leu Arg  
 325 330 335  
 Tyr Gly Lys Asp Asn Ala Glu Ala Ser Thr Leu Met Glu Met Lys Ala  
 340 345 350  
  
 Tyr His Ala Ile Ser Arg Ala Leu Glu Lys Glu Gly Leu Lys Asp Lys



Ser Glu Asn Gln Asn Lys Gly Asn Gln Thr Pro Tyr Glu Tyr Phe Asn  
 610 615 620  
 Gly Lys Asp Asn Ser Arg Glu Trp Gln Glu Phe Lys Ala Arg Val Glu  
 625 630 635 640  
 Thr Ser Arg Phe Pro Arg Ser Lys Lys Gln Arg Ile Leu Leu Gln Lys  
 645 650 655  
 Phe Asp Glu Asp Gly Phe Lys Glu Arg Asn Leu Asn Asp Thr Arg Tyr  
 660 665 670  
  
 Val Asn Arg Phe Leu Cys Gln Phe Val Ala Asp Arg Met Arg Leu Thr  
 675 680 685  
 Gly Lys Gly Lys Lys Arg Val Phe Ala Ser Asn Gly Gln Ile Thr Asn  
 690 695 700  
 Leu Leu Arg Gly Phe Trp Gly Leu Arg Lys Val Arg Ala Glu Asn Asp  
 705 710 715 720  
 Arg His His Ala Leu Asp Ala Val Val Val Ala Cys Ser Thr Val Ala  
 725 730 735  
  
 Met Gln Gln Lys Ile Thr Arg Phe Val Arg Tyr Lys Glu Met Asn Ala  
 740 745 750  
 Phe Asp Gly Lys Thr Ile Asp Lys Glu Thr Gly Glu Val Leu His Gln  
 755 760 765  
 Lys Thr His Phe Pro Gln Pro Trp Glu Phe Phe Ala Gln Glu Val Met  
 770 775 780  
 Ile Arg Val Phe Gly Lys Pro Asp Gly Lys Pro Glu Phe Glu Glu Ala  
 785 790 795 800  
  
 Asp Thr Leu Glu Lys Leu Arg Thr Leu Leu Ala Glu Lys Leu Ser Ser  
 805 810 815  
 Arg Pro Glu Ala Val His Glu Tyr Val Thr Pro Leu Phe Val Ser Arg  
 820 825 830  
 Ala Pro Asn Arg Lys Met Ser Gly Gln Gly His Met Glu Thr Val Lys  
 835 840 845  
 Ser Ala Lys Arg Leu Asp Glu Gly Val Ser Val Leu Arg Val Pro Leu



<212> PRT

<213> Streptococcus pyogenes

<220>

<223> Cas9

<400> 117

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile

35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu

50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys

100 105 110

His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr

115 120 125

His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp

130 135 140

Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His

145 150 155 160

Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro

165 170 175

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

180 185 190

Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala

195 200 205

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





945                    950                    955                    960  
 Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg  
                                  965                    970                    975  
 Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val  
  
                                  980                    985                    990  
 Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe  
                                  995                    1000                    1005  
 Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys  
                                  1010                    1015                    1020  
 Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser  
 1025                    1030                    1035                    1040  
 Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu  
  
                                  1045                    1050                    1055  
 Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile  
                                  1060                    1065                    1070  
 Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser  
                                  1075                    1080                    1085  
 Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly  
                                  1090                    1095                    1100  
 Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile  
  
 1105                    1110                    1115                    1120  
 Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser  
                                  1125                    1130                    1135  
 Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly  
                                  1140                    1145                    1150  
 Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile  
                                  1155                    1160                    1165  
 Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala  
  
                                  1170                    1175                    1180  
 Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys  
 1185                    1190                    1195                    1200

Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser  
                   1205                  1210                  1215  
 Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr  
                   1220                  1225                  1230  
 Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser  
                   1235                  1240                  1245  
 Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His  
                   1250                  1255                  1260  
 Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val  
 1265                  1270                  1275                  1280  
 Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys  
                   1285                  1290                  1295  
 His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu  
                   1300                  1305                  1310  
 Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp  
                   1315                  1320                  1325  
 Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp  
                   1330                  1335                  1340  
 Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile  
 1345                  1350                  1355                  1360  
 Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
                   1365

<210> 118

<211> 1205

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> EF1alpha promoter

<400> 118

cgtgaggctc cggtgcccgt cagtgggcag agcgcacatc gccacagtc cccgagaagt 60  
 tggggggagg ggtcggcaat tgaaccggtg cctagagaag gtggcgcggg gtaaactggg 120  
 aaagtgatgt cgtgtactgg ctccgccttt ttcccagggg tgggggagaa ccgtatataa 180

gtgcactagt cgccgtgaac gttctttttc gcaacgggtt tgccgccaga acacaggtaa 240  
 gtgccgtgtg tggttcccgc gggcctggcc tctttacggg ttatggcct tgcgtgcctt 300  
 gaattacttc cacctggctg cagtacgtga ttcttgatcc cgagcttcgg gttggaagtg 360

ggtgggagag ttcgtggcct tgcgcttaag gagccccttc gcctcgtgct tgagtgtgg 420  
 cctggcctgg gcgctggggc gcgccgctgc gaatctggtg gcaccttcgc gcctgtctcg 480  
 ctgctttcga taagtctcta gccatttaa atttttgatg acctgctgcg acgctttttt 540  
 tctggcaaga tagtcttga aatgcgggcc aagatcagca cactggtatt tcggtttttg 600  
 gggcccgggg cggcgacggg gcccgctgct cccagcgcac atgttcggcg aggccggggc 660  
 tgcgagcgcg gccaccgaga atcggacggg gtagtctca agctgcccgg cctgctctgg 720  
 tcctggcct cgcgcccg tgtatcgcc cgccctgggc ggcaaggctg gcccggtcgg 780  
 caccagtgc gtgagcggaa agatggccgc ttcccggccc tgctcgagg agcacaanaat 840

ggaggacgcg gcgctcggga gagcggcgg gtgagtcacc cacacaaagg aaaaggcct 900  
 ttccgtcctc agccgtcgt tcatgtgact ccacggagta ccggcgccg tccaggcacc 960  
 tcgattagtt ctccagcttt tggagtacgt cgtctttagg ttggggggag gggttttatg 1020  
 cgatggagtt tccccacct gagtgggtgg agactgaagt taggccagct tggcacttga 1080  
 tgtaattctc ctggaattt gccctttttg agtttgatc ttggttcatt ctcaagcctc 1140  
 agacagtgtg tcaaagtttt tttcttccat ttcaggtgtc gtgaaaacta ccctaaaag 1200  
 ccaaa 1205

<210

> 119

<211> 544

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Ef1alpha promoter with HTLV1 enhancer

<400> 119

ggatctgcga tcgctccggt gcccgctcagt gggcagagcg cacatcgccc acagtccccg 60  
 agaagttggg gggagggtc ggcaattgaa ccggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa 120  
 actgggaaag tgatgctgtg tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt 180  
 atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc tttttcga cgggtttgcc gccagaacac 240  
 agctgaagct tcgaggggct cgcctctctc cttcacgcgc ccgccccct acctgaggcc 300  
 gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgctcccgc ctgtggtgcc tctgaactg 360

cgtcgccgt ctaggtaagt ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt cggcgctcc 420  
 cttggagcct acctagactc agccggctct ccacgctttg cctgaccctg cttgctcaac 480  
 tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg tgaccggcgc 540  
 ctac 544

<210> 120

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> P2A nucleotide sequence

<400> 120

ggatctggag cgacgaattt tagtctactg aaacaagcgg gagacgtgga ggaaaacct 60  
 ggacct 66

<210> 121

<211> 4107

<212> DNA

<213> Streptococcus pyogenes

<220>

<223> Cas9 codon optimized nucleic acid sequence

<400> 121

atggataaaa agtacagcat cgggctggac atcggtaaaa actcagtggg gtgggcccgtg 60  
 attacggagc agtacaaggt accctccaaa aaatttaaag tgctgggtaa cacggacaga 120  
 cactctataa agaaaaatct tattggagcc ttgctgttcg actcaggcga gacagccgaa 180  
 gccacaaggt tgaagcggac cgccaggagg cggtatacca ggagaaagaa ccgcatatgc 240  
 tacttgcaag aaatcttcag taacgagatg gcaaaggttg acgatagctt tttccatcgc 300  
 ctggaagaat cttttcttgt tgaggaagac aagaagcacg aacggcaccc catctttggc 360

aatattgtcg acgaagtggc atatcacgaa aagtaccga ctatctacca cctcaggaag 420  
 aagctgggtg actctaccga taaggcggac ctcagactta tttatittggc actcgcceac 480  
 atgattaaat ttagaggaca tttcttgatc gagggcgacc tgaaccggga caacagtgc 540  
 gtcgataage ttttcatcca acttgtcag acctacaatc aactgttcga agaaaacct 600  
 ataaatgctt caggagtgcg cgctaaagca atcctgtccg cgcgcctctc aaaatctaga 660  
 agacttgaga atctgattgc tcagttgccg ggggaaaaga aaaatggatt gtttgcaac 720  
 ctgatcgcce tcagtctcgg actgaccca aatttcaaaa gtaacttcga cctggccgaa 780

gacgctaagc tccagctgtc caaggacaca tacgatgacg acctcgacaa tctgctggcc 840  
  
cagattgggg atcagtacgc cgatctcttt ttggcagcaa agaacctgtc cgacgccatc 900  
ctgttgagcg atatcttgag agtgaacacc gaaattacta aagcacccct tagcgcatct 960  
atgatcaagc ggtacgacga gcatcatcag gatctgacct tgctgaagc tcttgtaggg 1020  
caacagctcc ccgaaaaata caaggaaatc ttctttgacc agagcaaaaa cggtacgct 1080  
ggctatatag atggtggggc cagtcaggag gaattctata aattcatcaa gcccattctc 1140  
gagaaaatgg acggcacaga ggagttgtg gtcaactta acaggaggga cctgctgcgg 1200  
aagcagcgga cctttgacaa cgggtctatc ccccaccaga ttcactgagg cgaactgcac 1260  
gcaatcctga ggaggcagga ggatTTTTT cTTTTtcta aagataaccg cgagaaaaata 1320  
  
gaaaagattc ttacattcag gatcccgtag tacgtgggac ctctcgcccg gggcaattca 1380  
cggtttgcct ggatgacaag gaagtcagag gagactatta caccttggaa cttcgaagaa 1440  
tggttgaca aggtgcatc tgcccagtct ttcactgagc ggatgacaaa ttttgacaag 1500  
aacctccta atgagaaggt gctgcccaca cattctctgc tctacgagta ctttaccgctc 1560  
tacaatgaac tgactaaagt caagtacgtc accgagggaa tgaggaagcc ggcattcctt 1620  
agtggagaac agaagaaggc gattgtagac ctgttgttca agaccaacag gaagtgact 1680  
gtgaagcaac ttaaagaaga ctactttaag aagatcgaat gttttgacag tgtggaatt 1740  
tcaggggttg aagaccgctt caatgcgtca ttggggactt accatgatct tetcaagatc 1800  
  
ataaaggaca aagacttctt ggacaacgaa gaaaatgagg atattctcga agacatcgtc 1860  
ctcacctga cctgttctga agacagggaa atgatagaag agcctttaa aacctatgcc 1920  
cacctcttcg acgataaagt tatgaagcag ctgaagcga ggagatacac aggatgggga 1980  
agattgtcaa ggaagctgat caatggaatt agggataaac agagtggcaa gaccatactg 2040  
gatttctca aatctgatgg cttcgccaat aggaacttca tgcaactgat tcacgatgac 2100  
tctcttacct tcaaggagga cattcaaaag gctcaggtga gcgggcaggg agactcctt 2160  
catgaacaca tcgcaattt ggcaggttcc cccgtatta aaaaggcat cttcaaaact 2220  
gtcaaggtgg tggatgaatt ggtcaaggta atgggcagac ataagccaga aatattgtg 2280  
  
atcgagatgg cccgcgaaaa ccagaccaca cagaagggcc agaaaaatag tagagagcgg 2340  
atgaagagga tcgaggagg catcaagag ctgggatctc agattctcaa agaacacccc 2400  
gtagaaaaca cacagctgca gaacgaaaaa ttgtacttgt actatctgca gaacggcaga 2460  
gacatgtacg tcgaccaaga acttgatatt aatagactgt ccgactatga cgtagacat 2520  
atcgtgcccc agtcttctt gaaggacgac tccattgata acaaagtctt gacaagaagc 2580  
gacaagaaca ggggtaaaag tgataatgtg cctagcgagg aggtggtgaa aaaaatgaag 2640

aactactggc gacagctgct taatgcaaag ctattacac aacggaagt cgataatctg 2700  
acgaaagcag agagaggtgg cttgtctgag ttggacaagg cagggtttat taagcggcag 2760  
  
ctggtggaaa ctaggcagat cacaaagcac gtggcgcaga ttttgacag ccgatgaac 2820  
acaaaatagc acgaaaatga taaactgata cgagaggtca aagtatcac gctgaaaagc 2880  
aagctggtgt ccgattttcg gaaagacttc cagttctaca aagttcgcga gattaataac 2940  
taccatcatg ctacagatgc gtacctgaac gctgttctcg ggaccgcctt gataaagaag 3000  
tacccaaagc tggaatccga gttcgtatac ggggattaca aagtgtacga tgtgaggaaa 3060  
atgatagcca agtccgagca ggagattgga aaggccacag ctaagtactt cttttattct 3120  
aacatcatga attttttaa gacggaaatt accctggcca acggagagat cagaaagcgg 3180  
ccccttatag agacaaatgg tgaacaggt gaaatcgtct gggataaggg cagggatttc 3240  
  
gctactgtga ggaaggtgct gagtatgcca caggtaaata tcgtgaaaaa aaccgaagta 3300  
cagaccggag gattttcaa ggaaagcatt ttgcctaaaa gaaactcaga caagctcatc 3360  
gcccgaaga aagattggga ccctaagaaa tacgggggat ttgactcacc caccgtagcc 3420  
tattctgtgc tgggtgtagc taagtgga aaaggaaagt ctaagaagct gaagtccgtg 3480  
aaggaactct tgggaatcac tatcatgga agatcatcct ttgaaaagaa ccctatcgat 3540  
ttcctggagg ctaagggtta caaggagtc aagaaagacc tcatcattaa actgcaaaaa 3600  
tactctctct tegagctgga aaatggcagg aagagaatgt tggccagcgc cggagagctg 3660  
caaaaggaa acgagcttgc tctgcctcc aaatatgta atttctcta tctcgttcc 3720  
  
cactatgaaa agctgaaagg gtctcccgaa gataacgagc agaagcagct gttcgtcga 3780  
cagcacaagc actatctgga tgaaataatc gaacaaataa gcgagttcag caaaagggtt 3840  
atcctggcgg atgctaatt ggacaaagta ctgtctgctt ataacaagca cgggataag 3900  
cctattaggg aacaagcga gaatataatt cacctcttta cactcacgaa tctcggagcc 3960  
cccgccct tcaatactt tgatacgact atcgaccgga aacggtatac cagtacaaa 4020  
gaggtcctcg atgccacct catccaccag tcaattactg gcctgtacga aacacggatc 4080  
gacctctctc aactgggcgg cgactag 4107  
  
<210  
> 122  
<211> 1368  
<212> PRT  
<213> Streptococcus pyogenes  
<220>  
<223> Cas9

<400> 122

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





Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly  
 740 745 750

Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln  
 755 760 765

Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile  
 770 775 780

Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro  
 785 790 795 800

Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu  
 805 810 815

Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg  
 820 825 830

Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys  
 835 840 845

Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg  
 850 855 860

Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys  
 865 870 875 880

Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys  
 885 890 895

Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp  
 900 905 910

Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr  
 915 920 925

Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp  
 930 935 940

Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser  
 945 950 955 960

Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg  
 965 970 975

Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val



Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser  
 1235 1240 1245  
 Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His  
 1250 1255 1260  
 Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val  
 1265 1270 1275 1280  
 Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys  
 1285 1290 1295  
 His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu  
 1300 1305 1310  
 Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp  
 1315 1320 1325  
 Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp  
 1330 1335 1340  
 Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile  
 1345 1350 1355 1360  
 Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp  
 1365

<210> 123

<211> 3249

<212> DNA

<213> Neisseria meningitidis

<220>

<223> Cas9 codon optimized nucleic acid sequence

<400> 123

atggccgcct tcaagcccaa ccccatcaac tacatcctgg gcctggacat cggcatcgcc 60  
 agcgtgggct gggccatggt ggagatcgac gaggacgaga accccatctg cctgatcgac 120  
 ctgggtgtgc gcgtgttcga gcgcgctgag gtgcccaaga ctggtgacag tctggctatg 180  
 gctcgccggc ttgctcgctc tgttcggcgc cttactcgcc ggcgcgctca cgccttctg 240  
 cgcgctcgcc gcctgctgaa gcgcgagggt gtgctgcagg ctgccgactt cgacgagaac 300  
 ggccatgatca agagcctgcc caacactcct tggcagctgc gcgctgccgc tctggaccgc 360  
 aagctgactc ctctggagtg gagcggcgtg ctgctgcacc tgatcaagca ccgcggtctac 420

ctgagccagc gcaagaacga gggcgagacc gccgacaagg agctgggtgc tctgctgaag 480  
 gccgtggccg acaacgcccc cgccctgcag actggtgact tccgactcc tgctgagctg 540  
 gccctgaaca agttcgagaa ggagagcggc cacatccgca accagcgcgg cgactacagc 600  
  
 cacaccttca gccgcaagga cctgcaggcc gagctgatcc tgctgttcga gaagcagaag 660  
 gaggttcgca acccccactg gagcggcggc ctgaaggagg gcatcgagac cctgctgatg 720  
 acccagcgcg ccgccctgag cggcgacgcc gtgcagaaga tgctgggcca ctgcaccttc 780  
 gagccagccg agcccaaggc cgccaagaac acctacaccg ccgagcgtt catctggctg 840  
 accaagctga acaacctgcg catcctggag cagggcagcg agcgcctcct gaccgacacc 900  
 gagcgcgcca cctgatgga cgagccctac cgcaagagca agctgacctg cggccaggcc 960  
 cgcaagctgc tgggtctgga ggacaccgcc ttcttcaagg gcctgcgcta cggcaaggac 1020  
 aacgccgagg ccagcacctt gatggagatg aaggcctacc acgccatcag ccgcgcctg 1080  
  
 gagaaggagg gcctgaagga caagaagat cctctgaacc tgagccccga gctgcaggac 1140  
 gagatcgga ccgcttcag cctgttcaag accgacgagg acatcaccgg ccgctgaag 1200  
 gaccgatcc agcccagat cctggaggcc ctgctgaagc acatcagctt cgacaagttc 1260  
 gtgcagatca gcctgaaggc cctgcgccgc atcgtgcccc tgatggagca gggcaagcgc 1320  
 tacgacgagg cctgcgccga gatctacggc gaccactacg gcaagaagaa caccgaggag 1380  
 aagatctacc tgctctctat ccccgccgac gagatccgca acccgtggt gctgcgcgcc 1440  
 ctgagccagg cccgcaaggt gatcaaccgc gtggtgcgcc gctacggcag ccccgccgc 1500  
 atccacatcg agaccgcccg cgaggtgggc aagagcttca aggaccgcaa ggagatcgag 1560  
  
 aagcgcagg aggagaaccg caaggaccgc gagaaggccg ccgccaagtt ccgcgagtac 1620  
 ttccccaaact tcgtgggcca gcccaagagc aaggacatcc tgaagctgcg cctgtacgag 1680  
 cagcagcacg gcaagtgcct gtacagcggc aaggagatca acctgggccc cctgaacgag 1740  
 aagggtacg tggagatcga ccacgccctg cccttcagcc gcacctggga cgacagcttc 1800  
 aacaacaagg tgctggtgct gggcagcagc aaccagaaca agggcaacca gaccctctac 1860  
 gagtacttca acggcaagga caacagccgc gactggcagg agttcaaggc ccgcgtggag 1920  
 accagccgct tccccgcag caagaagcag cgcatcctgc tgcagaagtt cgacgaggac 1980  
 ggcttcaagg agcgcacct gaacgacacc cgctacgtga accgcttctt gtgccagttc 2040  
  
 gtggccgacc gcatgcgct gaccggcaag ggcaagaagc gcgtgttcgc cagcaacggc 2100  
 cagatcacca acctgctgcg cggttctgg gcctgcgca aggtgcgcgc cgagaacgac 2160  
 cgccaccagc cctggacgc cgtggtggtg gcctgcagca ccgtggccat gcagcagaag 2220  
 atcaccgct tcgtgcgcta caaggagatg aacgccttcg acggtaaaac catcgacaag 2280

gagaccggcg aggtgctgca ccagaagacc cacttcccc agccctggga gttcttcgcc 2340  
 caggaggtga tgatccgctg gttcggcaag cccgacggca agcccagatt cgaggaggcc 2400  
 gacacccccg agaagctgcg caccctgctg gccgagaagc tgagcagccg ccttgaggcc 2460  
 gtgcacgagt acgtgactcc tctgttcgtg agccgcgccc ccaaccgcaa gatgagcggg 2520

cagggtcaca tggagaccgt gaagagcgcc aagcgctgg acgagggcgt gagcgtgctg 2580  
 cgcgtgcccc tgaccacgct gaagetgaag gacctggaga agatggtgaa ccgcgagcgc 2640  
 gagcccaagc tgiacgagcc cctgaaggcc cgcttgaggg cccacaagga cgaccccccc 2700  
 aaggccttcg ccgagccctt ctacaagtac gacaaggccg gcaaccgcac ccagcaggtg 2760  
 aaggccgtgc gcgtggagca ggtgcagaag accggcgtgt gggcgcgcaa ccacaacggc 2820  
 atcgccgaca acgccacat ggtgcgcgtg gacgtgttcg agaagggcga caagtactac 2880  
 ctggtgcccc tctacagctg gcaggtggcc aagggcatcc tgcccaccg cgccgtggtg 2940  
 cagggcaagg acgaggagga ctggcagctg atcgacgaca gttcaactt caagttcagc 3000

ctgcacccca acgacctggt ggaggtgatc accaagaagg cccgcatggt cggctacttc 3060  
 gccagctgcc accgcgccac cggcaacatc aacatccgca tccacgacct ggaccacaag 3120  
 atcggcaaga acggcatcct ggagggcatc ggcgtgaaga ccgacctgag cttccagaag 3180  
 taccagatcg acgagctggg caaggagatc cgccccgcc gcctgaagaa gcgccctcct 3240  
 gtgcgctaa 3249

<210> 124

<211> 1082

<212> PRT

<213> Neisseria meningitidis

<220>

<223> Cas9

<400> 124

Met Ala Ala Phe Lys Pro Asn Pro Ile Asn Tyr Ile Leu Gly Leu Asp

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



305                    310                    315                    320  
 Arg Lys Leu Leu Gly Leu Glu Asp Thr Ala Phe Phe Lys Gly Leu Arg  
  
                          325                    330                    335  
 Tyr Gly Lys Asp Asn Ala Glu Ala Ser Thr Leu Met Glu Met Lys Ala  
                          340                    345                    350  
 Tyr His Ala Ile Ser Arg Ala Leu Glu Lys Glu Gly Leu Lys Asp Lys  
                          355                    360                    365  
 Lys Ser Pro Leu Asn Leu Ser Pro Glu Leu Gln Asp Glu Ile Gly Thr  
                          370                    375                    380  
 Ala Phe Ser Leu Phe Lys Thr Asp Glu Asp Ile Thr Gly Arg Leu Lys  
  
 385                    390                    395                    400  
 Asp Arg Ile Gln Pro Glu Ile Leu Glu Ala Leu Leu Lys His Ile Ser  
                          405                    410                    415  
 Phe Asp Lys Phe Val Gln Ile Ser Leu Lys Ala Leu Arg Arg Ile Val  
                          420                    425                    430  
 Pro Leu Met Glu Gln Gly Lys Arg Tyr Asp Glu Ala Cys Ala Glu Ile  
                          435                    440                    445  
 Tyr Gly Asp His Tyr Gly Lys Lys Asn Thr Glu Glu Lys Ile Tyr Leu  
  
                          450                    455                    460  
 Pro Pro Ile Pro Ala Asp Glu Ile Arg Asn Pro Val Val Leu Arg Ala  
 465                    470                    475                    480  
 Leu Ser Gln Ala Arg Lys Val Ile Asn Gly Val Val Arg Arg Tyr Gly  
                          485                    490                    495  
 Ser Pro Ala Arg Ile His Ile Glu Thr Ala Arg Glu Val Gly Lys Ser  
                          500                    505                    510  
 Phe Lys Asp Arg Lys Glu Ile Glu Lys Arg Gln Glu Glu Asn Arg Lys  
  
                          515                    520                    525  
 Asp Arg Glu Lys Ala Ala Ala Lys Phe Arg Glu Tyr Phe Pro Asn Phe  
                          530                    535                    540  
 Val Gly Glu Pro Lys Ser Lys Asp Ile Leu Lys Leu Arg Leu Tyr Glu  
 545                    550                    555                    560

Gln Gln His Gly Lys Cys Leu Tyr Ser Gly Lys Glu Ile Asn Leu Gly  
 565 570 575  
 Arg Leu Asn Glu Lys Gly Tyr Val Glu Ile Asp His Ala Leu Pro Phe  
 580 585 590  
 Ser Arg Thr Trp Asp Asp Ser Phe Asn Asn Lys Val Leu Val Leu Gly  
 595 600 605  
 Ser Glu Asn Gln Asn Lys Gly Asn Gln Thr Pro Tyr Glu Tyr Phe Asn  
 610 615 620  
 Gly Lys Asp Asn Ser Arg Glu Trp Gln Glu Phe Lys Ala Arg Val Glu  
 625 630 635 640  
 Thr Ser Arg Phe Pro Arg Ser Lys Lys Gln Arg Ile Leu Leu Gln Lys  
 645 650 655  
 Phe Asp Glu Asp Gly Phe Lys Glu Arg Asn Leu Asn Asp Thr Arg Tyr  
 660 665 670  
 Val Asn Arg Phe Leu Cys Gln Phe Val Ala Asp Arg Met Arg Leu Thr  
 675 680 685  
 Gly Lys Gly Lys Lys Arg Val Phe Ala Ser Asn Gly Gln Ile Thr Asn  
 690 695 700  
 Leu Leu Arg Gly Phe Trp Gly Leu Arg Lys Val Arg Ala Glu Asn Asp  
 705 710 715 720  
 Arg His His Ala Leu Asp Ala Val Val Val Ala Cys Ser Thr Val Ala  
 725 730 735  
 Met Gln Gln Lys Ile Thr Arg Phe Val Arg Tyr Lys Glu Met Asn Ala  
 740 745 750  
 Phe Asp Gly Lys Thr Ile Asp Lys Glu Thr Gly Glu Val Leu His Gln  
 755 760 765  
 Lys Thr His Phe Pro Gln Pro Trp Glu Phe Phe Ala Gln Glu Val Met  
 770 775 780  
 Ile Arg Val Phe Gly Lys Pro Asp Gly Lys Pro Glu Phe Glu Glu Ala  
 785 790 795 800  
 Asp Thr Pro Glu Lys Leu Arg Thr Leu Leu Ala Glu Lys Leu Ser Ser



Ser Phe Gln Lys Tyr Gln Ile Asp Glu Leu Gly Lys Glu Ile Arg Pro

1060

1065

1070

Cys Arg Leu Lys Lys Arg Pro Pro Val Arg

1075

1080

<210> 125

<211> 3159

<212> DNA

<213> staphylococcus aureus

<220>

<223> Cas9 codon optimized nucleic acid sequence

<400> 125

atgaaaagga actacattct ggggctggac atcgggatta caagcgtggg gtatgggatt 60  
 attgactatg aaacaaggga cgtgatcgac gcaggcgtca gactgttcaa ggaggccaac 120  
 gtggaaaaca atgagggacg gagaagcaag aggggagcca ggcgctgaa acgacggaga 180  
 aggcacagaa tccagagggt gaagaaactg ctgttcgatt acaacctgct gaccgacat 240  
 tctgagctga gtggaattaa tccttatgaa gccagggtga aaggcctgag tcagaagctg 300  
 tcagaggaag agttttccgc agctctgctg cacctggcta agcgcggagg agtgcataac 360  
 gtcaatgagg tgaagagga caccggcaac gagctgtcta caaaggaaca gatctcacgc 420

aatagcaaag ctctggaaga gaagtatgtc gcagagctgc agctggaacg gctgaagaaa 480  
 gatggcgagg tgagagggtc aattaatagg ttcaagacaa gcgactacgt caaagaagcc 540  
 aagcagctgc tgaagtgca gaagccttac caccagctgg atcagagctt catcgatact 600  
 tataatcgacc tgctggagac tccgagaacc tactatgagg gaccaggaga agggagcccc 660  
 ttcggatgga aagacatcaa ggaatggtac gagatgctga tgggacattg cacctatfff 720  
 ccagaagagc tgagaagcgt caagtacgct tataacgcag atctgtacaa cgcctgaat 780  
 gacctgaaca acctggtcat caccagggat gaaaacgaga aactggaata ctatgagaag 840  
 ttccagatca tcgaaaactg gtttaagcag aagaaaaagc ctacactgaa acagattgct 900

aaggagatcc tggatcaacga agaggacatc aagggtacc gggtgacaag cactggaaaa 960  
 ccagagtcca ccaatctgaa agtgtatcac gatattaagg acatcacagc acggaagaaa 1020  
 atcattgaga acgccgaact gctggatcag attgctaaga tcctgactat ctaccagagc 1080  
 tccgaggaca tccaggaaga gctgactaac ctgaacagcg agctgacca ggaagagatc 1140  
 gaacagatta gtaatctgaa ggggtacacc ggaacacaca acctgtccct gaaagctatc 1200  
 aatctgattc tggatgagct gtggcataca aacgacaatc agattgcaat ctttaaccgg 1260

ctgaagctgg tcccaaaaaa ggtggacctg agtcagcaga aagagatccc aaccacactg 1320  
 gtggacgatt tcattctgtc acccgtggtc aagcggagct tcatccagag catcaaagtg 1380  
  
 atcaacgcca tcatcaagaa gtacggcctg cccaatgata tcattatcga getggctagg 1440  
 gagaagaaca gcaaggacgc acagaagatg atcaatgaga tgcagaaacg aaaccggcag 1500  
 accaatgaac gcattgaaga gattatccga actaccggga aagagaacgc aaagtacctg 1560  
 attgaaaaaa tcaagctgca cgatatgcag gagggaaagt gtctgtattc tetggaggcc 1620  
 atccccctgg aggacctgct gaacaatcca ttcaactacg aggtcgatca tattatcccc 1680  
 agaagcgtgt ccttcgacaa ttcctttaac aacaaggtgc tggccaagca ggaagagaac 1740  
 tctaaaaagg gcaataggac tcctttccag tacctgtcta gttcagattc caagatctct 1800  
 tacgaaacct ttaaaaagca cattctgaat ctggccaaag gaaagggccg catcagcaag 1860  
  
 accaaaaagg agtacctgct ggaagagcgg gacatcaaca gattctccgt ccagaaggat 1920  
 tttattaacc ggaatctggt ggacacaaga tacgctactc gcggcctgat gaatctgctg 1980  
 cgatcctatt tccgggtgaa caatctggat gtgaaagtca agtccatcaa cggcgggttc 2040  
 acatcttttc tgaggcgcaa atggaagttt aaaaaggagc gcaacaaagg gtacaagcac 2100  
 catgccgaag atgctctgat tatcgcaaat gccgacttca tctttaagga gtggaaaaag 2160  
 ctggacaaaag ccaagaaagt gatggagaac cagatgttcg aagagaagca ggccgaatct 2220  
 atgcccgaaa tegagacaga acaggagtac aaggagattt tcatcactcc tcaccagatc 2280  
 aagcatatca aggatttcaa ggactacaag tactctcacc gggaggataa aaagccaac 2340  
  
 agagagctga tcaatgacac cctgtatagt acaagaaaag acgataaggg gaataccctg 2400  
 attgtgaaca atctgaacgg actgtacgac aaagataatg acaagctgaa aaagctgac 2460  
 aacaaaagtc ccgagaagct gctgatgtac caccatgac ctcagacata tcagaaactg 2520  
 aagctgatta tggagcagta cggcgcagag aagaaccac tgtataagta ctatgaagag 2580  
 actgggaact acctgaccaa gtatagcaaa aaggataatg gccccgtgat caagaagatc 2640  
 aagtactatg ggaacaagct gaatgcccat ctggacatca cagacgatta ccctaacagt 2700  
 cgcaacaagg tggccaagct gtcaactgaag ccatacagat tcgatgtcta tetggacaac 2760  
 ggcgtgtata aatttgtgac tgtcaagaat ctggatgtca tcaaaaagga gaactactat 2820  
  
 gaagtgaata gcaagtgcta cgaagaggct aaaaagctga aaaagattag caaccaggca 2880  
 gagttcatcg cctcctttta caacaacgac ctgattaaga tcaatggcga actgtatagg 2940  
 gtcacggggg tgaacaatga tctgctgaac cgcattgaag tgaatatgat tgacatcact 3000  
 taccgagagt atctggaaaa catgaatgat aagcgccecc ctcgaattat caaaacaatt 3060  
 gcctctaaga ctcagaglat caaaaagtac tcaaccgaca ttctgggaaa cctgtatgag 3120

gtgaagagca aaaagcaccc tcagattatc aaaaagggc 3159

<210> 126

<211> 1053

<212> PRT

<213> Staphylococcus aureus

<220>

<223> Cas9

<400> 126

Met Lys Arg Asn Tyr Ile Leu Gly Leu Asp Ile Gly Ile Thr Ser Val

1 5 10 15

Gly Tyr Gly Ile Ile Asp Tyr Glu Thr Arg Asp Val Ile Asp Ala Gly

20 25 30

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

35 40 45

Ser Lys Arg Gly Ala Arg Arg Leu Lys Arg Arg Arg Arg His Arg Ile

50 55 60

Gln Arg Val Lys Lys Leu Leu Phe Asp Tyr Asn Leu Leu Thr Asp His

65 70 75 80

Ser Glu Leu Ser Gly Ile Asn Pro Tyr Glu Ala Arg Val Lys Gly Leu

85 90 95

Ser Gln Lys Leu Ser Glu Glu Glu Phe Ser Ala Ala Leu Leu His Leu

100 105 110

Ala Lys Arg Arg Gly Val His Asn Val Asn Glu Val Glu Glu Asp Thr

115 120 125

Gly Asn Glu Leu Ser Thr Lys Glu Gln Ile Ser Arg Asn Ser Lys Ala

130 135 140

Leu Glu Glu Lys Tyr Val Ala Glu Leu Gln Leu Glu Arg Leu Lys Lys

145 150 155 160

Asp Gly Glu Val Arg Gly Ser Ile Asn Arg Phe Lys Thr Ser Asp Tyr

165 170 175

Val Lys Glu Ala Lys Gln Leu Leu Lys Val Gln Lys Ala Tyr His Gln



Gln Lys Glu Ile Pro Thr Thr Leu Val Asp Asp Phe Ile Leu Ser Pro  
 435 440 445

Val Val Lys Arg Ser Phe Ile Gln Ser Ile Lys Val Ile Asn Ala Ile  
 450 455 460

Ile Lys Lys Tyr Gly Leu Pro Asn Asp Ile Ile Ile Glu Leu Ala Arg  
 465 470 475 480

Glu Lys Asn Ser Lys Asp Ala Gln Lys Met Ile Asn Glu Met Gln Lys  
 485 490 495

Arg Asn Arg Gln Thr Asn Glu Arg Ile Glu Glu Ile Ile Arg Thr Thr  
 500 505 510

Gly Lys Glu Asn Ala Lys Tyr Leu Ile Glu Lys Ile Lys Leu His Asp  
 515 520 525

Met Gln Glu Gly Lys Cys Leu Tyr Ser Leu Glu Ala Ile Pro Leu Glu  
 530 535 540

Asp Leu Leu Asn Asn Pro Phe Asn Tyr Glu Val Asp His Ile Ile Pro  
 545 550 555 560

Arg Ser Val Ser Phe Asp Asn Ser Phe Asn Asn Lys Val Leu Val Lys  
 565 570 575

Gln Glu Glu Asn Ser Lys Lys Gly Asn Arg Thr Pro Phe Gln Tyr Leu  
 580 585 590

Ser Ser Ser Asp Ser Lys Ile Ser Tyr Glu Thr Phe Lys Lys His Ile  
 595 600 605

Leu Asn Leu Ala Lys Gly Lys Gly Arg Ile Ser Lys Thr Lys Lys Glu  
 610 615 620

Tyr Leu Leu Glu Glu Arg Asp Ile Asn Arg Phe Ser Val Gln Lys Asp  
 625 630 635 640

Phe Ile Asn Arg Asn Leu Val Asp Thr Arg Tyr Ala Thr Arg Gly Leu  
 645 650 655

Met Asn Leu Leu Arg Ser Tyr Phe Arg Val Asn Asn Leu Asp Val Lys  
 660 665 670

Val Lys Ser Ile Asn Gly Gly Phe Thr Ser Phe Leu Arg Arg Lys Trp



Lys Asn Leu Asp Val Ile Lys Lys Glu Asn Tyr Tyr Glu Val Asn Ser  
 930 935 940

Lys Cys Tyr Glu Glu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Ile Ser Asn Gln Ala  
 945 950 955 960

Glu Phe Ile Ala Ser Phe Tyr Asn Asn Asp Leu Ile Lys Ile Asn Gly  
 965 970 975

Glu Leu Tyr Arg Val Ile Gly Val Asn Asn Asp Leu Leu Asn Arg Ile  
 980 985 990

Glu Val Asn Met Ile Asp Ile Thr Tyr Arg Glu Tyr Leu Glu Asn Met  
 995 1000 1005

Asn Asp Lys Arg Pro Pro Arg Ile Ile Lys Thr Ile Ala Ser Lys Thr  
 1010 1015 1020

Gln Ser Ile Lys Lys Tyr Ser Thr Asp Ile Leu Gly Asn Leu Tyr Glu  
 1025 1030 1035 1040

Val Lys Ser Lys Lys His Pro Gln Ile Ile Lys Lys Gly  
 1045 1050

<210> 127

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 target sequence 9

<400> 127

attgcactca tcagagctac

20

<210> 128

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> TGFBR2 target sequence 10

<400> 128

cctagagtga agagattcat

20

<210> 129  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 11  
 <400> 129  
 ccaatgaatc tcttcactct 20  
 <210> 130  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 12  
 <400> 130  
 aaagtcatgg taggggagct 20  
 <210> 131  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 13  
 <400> 131  
 gtgagcaatc cccgggcga 20  
 <210> 132  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 14  
 <400> 132  
 gtcgttcttc acgaggatat 20  
 <210> 133  
 <211> 20

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 15  
 <400> 133  
 gccgcgtcag gtactcctgt 20  
 <210> 134  
  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 16  
 <400> 134  
 gacgcggcat gtcacagct 20  
 <210> 135  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 17  
 <400> 135  
 gcttctgctg ccggttaacg 20  
 <210> 136  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 18  
 <400> 136  
 gtggatgacc tggctaacag 20  
  
 <210> 137  
 <211> 20  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 19  
 <400> 137  
 gtgatcacac tccatgtggg 20  
 <210> 138  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 20  
 <400> 138  
 gccattgag ctggacacc 20  
 <210> 139  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 21  
 <400> 139  
 gcggtcatct tccaggatga 20  
  
 <210> 140  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 22  
 <400> 140  
 gggagctgcc cagcttgcc 20  
 <210> 141  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> TGFBR2 target sequence 23  
 <400> 141  
 gttgatgttg ttggcacacg 20  
 <210> 142  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 24  
 <400> 142  
 ggcacatcttgg gcctcccaca 20  
 <210> 143  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 25  
 <400> 143  
 gcggcatgtc atcagctggg 20  
 <210> 144  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 26  
 <400> 144  
 gctcctcagc cgtcaggaac 20  
 <210> 145  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 27  
 <400> 145

gctggtgta tattctgatg 20

<210> 146  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 28  
 <400> 146

ccgacttctg aacgtgcgg 20

<210> 147  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 29  
 <400> 147

tgctggcga acgcgtccac 20

<210> 148  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 30  
 <400> 148

cccgacttct gaacgtgcgg 20

<210> 149  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 31  
 <400> 149

ccaccgcacg ttcagaagtc 20

<210> 150  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 32  
 <400> 150  
 tcaccgact tctgaacgtg 20  
 <210> 151  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 33  
 <400> 151  
 cccaccgcac gttcagaagt 20  
 <210> 152  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 34  
 <400> 152  
 cgagcagcgg ggtctgcat 20  
 <210> 153  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 35  
 <400> 153  
 acgagcagcg ggtctgcca 20  
 <210> 154  
 <211> 20

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 36  
 <400> 154  
 agcgggtct gccatgggc 20

<210> 155  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 37  
 <400> 155  
 cctgagcagc ccccgaccca 20

<210> 156  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 38  
 <400> 156  
 aacgtcggg gggatcgtgc 20

<210> 157  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 39  
 <400> 157  
 ggacgatgtg cagcgccac 20

<210> 158  
 <211> 20  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 40  
 <400> 158  
 gtccacagga cgatgtgcag 20  
 <210> 159  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 41  
 <400> 159  
 catgggtcgg gggctgctca 20  
 <210> 160  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 42  
 <400> 160  
 ccatgggtcg ggggctgctc 20  
  
 <210> 161  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 43  
 <400> 161  
 cagcggggtc tgccatgggt 20  
 <210> 162  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>

<223> TGFBR2 target sequence 44  
 <400> 162  
 atgggtcggg ggctgctcag 20  
 <210> 163  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 45  
 <400> 163  
 cggggtctgc catgggtcgg 20  
  
 <210> 164  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 46  
 <400> 164  
 aggaagtctg tgtggctgta 20  
 <210> 165  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 47  
 <400> 165  
 ctccatctgt gagaagccac 20  
 <210> 166  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 48  
 <400> 166

atgatagtca ctgacaacaa 20

<210> 167  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 49  
 <400> 167

gatgctgcag ttgctcatgc 20

<210> 168  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 50  
 <400> 168

acagccacac agacttcctg 20

<210> 169  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 51  
 <400> 169

gaagccacag gaagtctgtg 20

<210> 170  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 52  
 <400> 170

ttctgtggc ttctcacaga 20

<210> 171  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 53  
 <400> 171  
 ctgtggcttc tcacagatgg 20  
 <210> 172  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 54  
 <400> 172  
 tcacaaaatt tacacagttg 20  
 <210> 173  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 55  
 <400> 173  
 ccctacat gactttattc 20  
 <210> 174  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 56  
 <400> 174  
 ccagaataaa gtcatggtag 20  
 <210> 175  
 <211> 20

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 57  
 <400> 175  
 gacaacatca tcttctcaga 20

<210> 176  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 58  
 <400> 176  
 tccagaataa agtcatggta 20

<210> 177  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 59  
 <400> 177  
 ggtaggggag cttgggtca 20

<210> 178  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 60  
 <400> 178  
 ttctcaaag tgcattatga 20

<210> 179  
 <211> 20  
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 61  
 <400> 179  
 catcttcag aataaagtca 20  
 <210> 180  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 62  
 <400> 180  
 cacatgaaga aagtctcacc 20  
 <210> 181  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 63  
 <400> 181  
 ttccagaata aagtcaggt 20  
 <210> 182  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> TGFBR2 target sequence 64  
 <400> 182  
 ttttccttca taatgcactt 20  
 <210> 183  
 <211> 326  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <220>

<223> Human IgG2 Fc

<300>

<308> Uniprot P10859

<309> 2008-12-16

<400> 183

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

100 105 110

Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp

130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly

145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn

165 170 175

Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp

180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro

195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu

210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn

225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

245 250 255

Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

260 265 270

Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys

275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys

290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu

305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325

<210> 184

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> Human IgG4 Fc

<300>

<308> Uniprot P01861

<309> 1986-07-21

<400> 184

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr  
 65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro  
 100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
 115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
 130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
 145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe  
 165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
 180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu  
 195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
 210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys  
 225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
 245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
 260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
 275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser



<223> Spacer

<400> 187

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val

1 5 10 15  
Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu

20 25 30  
Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser

35 40 45  
Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu

50 55 60  
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Gln Ser Thr

65 70 75 80  
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn

85 90 95  
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser

100 105 110  
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln

115 120 125  
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val

130 135 140  
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val

145 150 155 160  
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro

165 170 175  
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr

180 185 190  
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val

195 200 205  
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

210 215 220  
Ser Leu Gly Lys

225

<210> 188

<211> 164

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta isoform 1 precursor protein

<300>

<308> NP\_932170.1

<309> 2020-03-28

<400> 188

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu

1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys

20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala

35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met

85 90 95

Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn

100 105 110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met

115 120 125

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly

130 135 140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala

145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

<210> 189

<211> 163

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<223> CD3 zeta isoform 2 precursor protein

<300>

<308> NP\_000725.1

<309> 2020-02-20

<400> 189

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu

1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys

20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala

35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr

50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg

65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met

85 90 95

Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu

100 105 110

Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys

115 120 125

Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu

130 135 140

Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu

145 150 155 160

Pro Pro Arg