



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0035877
(43) 공개일자 2022년03월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) A61K 35/28 (2015.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 15/87 (2006.01)
C12N 5/0789 (2010.01) C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1138 (2013.01)
A61K 35/28 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7041969
(22) 출원일자(국제) 2020년05월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년12월22일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/034391
(87) 국제공개번호 WO 2020/237217
국제공개일자 2020년11월26일
(30) 우선권주장
62/852,238 2019년05월23일 미국(US)
62/962,127 2020년01월16일 미국(US)

(71) 출원인
보르 바이오파마 인크.
미국 02140 매사추세츠주 케임브리지 케임브리지
파크 드라이브 100 스위트 400
(72) 발명자
라이디어드, 존
미국 02067 매사추세츠주 샤론 폴 리비어 로드 18
미쉬라, 비부, 프라사드
미국 01880 매사추세츠주 웨이크필드 몬트로즈 애
비뉴 58
(74) 대리인
양영준, 이상남

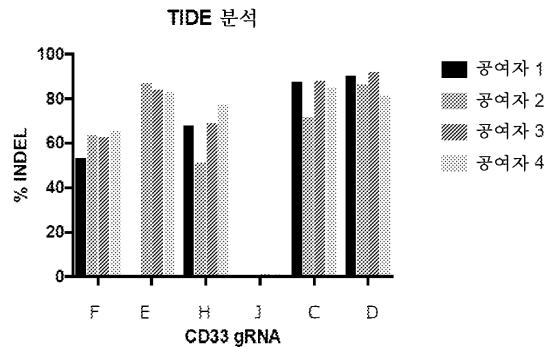
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 CD33 변형을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본 개시내용의 일부 측면은, 예를 들어, 내인성 CD33 유전자에 변형 (예를 들어, 삽입 또는 결실)을 갖는 신규 세포를 제공한다. 본 개시내용의 일부 측면은 이러한 변형을 만드는 데 사용될 수 있는 조성물, 예를 들어, gRNA를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 15/87 (2013.01)

C12N 5/0647 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

C12N 2310/315 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

표적화 도메인을 포함하고, 여기서 표적화 도메인이 서열식별번호(SEQ ID NO): 10의 서열을 포함하는 것인 gRNA.

청구항 2

표적화 도메인을 포함하고, 여기서 표적화 도메인이 서열식별번호: 9의 서열을 포함하는 것인 gRNA.

청구항 3

표적화 도메인을 포함하고, 여기서 표적화 도메인이 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 것인 gRNA.

청구항 4

표적화 도메인을 포함하고, 여기서 표적화 도메인이 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 것인 gRNA.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 상보성 도메인, 연결 도메인, 제1 상보성 도메인에 상보적인 제2 상보성 도메인, 및 근위 도메인을 포함하는 gRNA.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 단일 가이드 RNA (sgRNA)인 gRNA.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 포함하는 gRNA.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 1개 이상의 포스포로티오에이트 또는 티오PACE 연결을 포함하는 gRNA.

청구항 9

(i) 조혈 줄기 또는 전구 세포를 제공하고,
(ii) 세포 내로 (a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 gRNA; 및 (b) gRNA에 결합하는 Cas9 분자를 도입하며,
이에 의해 유전자 조작된 세포를 생산하는 것을 포함하는,
유전자 조작된 세포를 생산하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, Cas 분자가 SpCas9 엔도뉴클레아제, SaCas9 엔도뉴클레아제, 또는 Cpf1 엔도뉴클레아제를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서, (i) 및 (ii)가 미리 형성된 리보핵단백질 복합체로서 세포 내로 도입되는 것인 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 리보핵단백질 복합체가 전기천공을 통해 세포 내로 도입되는 것인 방법.

청구항 13

제9항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된, 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.

청구항 14

복수의 제13항의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 세포 집단.

청구항 15

제14항에 있어서, 하나 이상의 조작되지 않은 CD33 유전자를 포함하는 하나 이상의 세포를 추가로 포함하는 세포 집단.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 야생형 대응 세포 집단에 의해 발현되는 CD33의 20% 미만을 발현하는 세포 집단.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 조혈 줄기 세포 및 조혈 전구 세포 양쪽 모두를 포함하는 세포 집단.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, CD33 이외의 계통-특이적 세포 표면 항원을 코딩하는 유전자에서 제2 돌연변이를 추가로 포함하는 세포 집단.

청구항 19

제18항에 있어서, CD33 이외의 계통-특이적 세포 표면 항원을 코딩하는 유전자가 CLL-1 또는 CD123인 세포 집단.

청구항 20

제14항 내지 제19항 중 어느 한 항의 세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 대상체가 조혈 악성종양을 갖는 것인 방법.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 대상체에게 CD33을 표적화하는 작용제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 작용제가 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 것인 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원

[0002]

본 출원은 2019년 5월 23일에 출원된 미국 일련 번호 62/852,238 및 2020년 1월 16일에 출원된 미국 일련 번호 62/962,127을 우선권 주장하고, 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003]

서열 목록

[0004]

본 출원은 ASCII 양식으로 전자적으로 제출되고, 이에 의해 전문이 참조로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2020년 5월 21일에 생성된 상기 ASCII 카피는 파일명이 V0291.70004W000 - Sequence Listing.txt이고, 크기가 23,508 바이트이다.

배경 기술

배경

암 환자에게 항-CD33 암 요법이 투여되는 경우, 요법은 CD33+ 암 세포뿐만 아니라, "표적에 적중하지만 백혈병을 벗어나는" 효과로 비암성 CD33+ 세포 또한 고갈시킬 수 있다. 조혈 줄기 세포 (HSC) 및 조혈 전구 세포 (HPC)는 전형적으로 CD33을 발현하기 때문에, 비암성 CD33+ 세포의 상실은 환자의 조혈계를 고갈시킬 수 있다. 이러한 고갈을 다루기 위해, 대상체에게 CD33 유전자에서의 변형을 포함하는 구조 세포 (예를 들어, HSC 및/또는 HPC)가 투여될 수 있다. 이러한 CD33-변형 세포는 항-CD33 암 요법에 저항성일 수 있고, 따라서 항-CD33 요법 동안 또는 후에 조혈계를 재생할 수 있다.

발명의 내용

발명의 개요

본 개시내용은, 예를 들어, 내인성 CD33 유전자에 변형 (예를 들어, 삽입 또는 결실)을 갖는 신규 세포를 제공한다. 또한 본 개시내용은 이러한 변형을 만드는 데 사용될 수 있는 조성물, 예를 들어, gRNA를 제공한다.

열거된 실시양태

1. 표 1의 표적 도메인 (예를 들어, 서열식별번호(SEQ ID NO): 1-8 중 임의의 것의 표적 도메인)에 결합하는 표적화 도메인을 포함하는 gRNA.
2. 서열식별번호: 2-4 또는 서열식별번호: 6-8 중 임의의 것의 표적 도메인에 결합하는 표적화 도메인을 포함하는 gRNA.
3. 서열식별번호: 1의 표적 도메인에 결합하는 표적화 도메인을 포함하는 gRNA.
4. 서열식별번호: 5의 표적 도메인에 결합하는 표적화 도메인을 포함하고, 여기서 표적화 도메인이 서열식별번호: 1을 포함하지 않는 gRNA.
5. 서열식별번호: 5의 표적 도메인에 결합하는 표적화 도메인을 포함하고, 여기서 표적화 도메인이 적어도 21개의 뉴클레오타이드의 길이인 gRNA.
6. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 표적 도메인의 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 이루거나 또는 이에 상보적이거나, 또는 표적화 도메인이 표적 도메인과의 0, 1, 2, 또는 3개의 미스매치를 포함하는 gRNA.
7. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 서열식별번호: 13의 적어도 16개 (예를 들어, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 또는 26개)의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하는 gRNA.
8. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 서열식별번호: 13의 적어도 16개 (예를 들어, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 또는 26개)의 연속적인 뉴클레오타이드를 포함하고, 표적 도메인의 적어도 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 뉴클레오타이드와 염기 쌍을 이루거나 또는 이와 상보적인 gRNA.
9. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 상기 표적화 도메인이 표적 도메인 내에서, 예를 들어, 표적 도메인의 뉴클레오타이드 위치 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 직후에 절단 이벤트 (예를 들어, 단일 가닥 파손 또는 이중 가닥 파손)를 제공하도록 구성된 gRNA.
10. 서열식별번호: 1-4 중 임의의 것의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 gRNA.
11. 표적화 도메인을 포함하고, 여기서 표적화 도메인이 서열식별번호: 9의 서열을 포함하는 gRNA.
12. 표적화 도메인을 포함하고, 여기서 표적화 도메인이 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 gRNA.
13. 표적화 도메인을 포함하고, 여기서 표적화 도메인이 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 gRNA.
14. 표적화 도메인을 포함하고, 여기서 표적화 도메인이 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 gRNA.
15. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 단일 가이드 RNA (sgRNA)인 gRNA.

- [0025] 16. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 16개 이상의 뉴클레오타드의 길이인 gRNA.
- [0026] 17. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 또는 26개의 뉴클레오타드의 길이인 gRNA.
- [0027] 18. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 서열식별번호: 1-4 또는 9-12 중 임의의 것 또는 그의 역 상보물의 서열, 또는 상기 중 임의의 것에 대해 적어도 90% 또는 95%의 동일성을 갖는 서열, 또는 상기 중 임의의 것에 비교하여 1, 2, 또는 3개 이하의 돌연변이를 갖는 서열을 포함하는 gRNA.
- [0028] 19. 실시양태 18에 있어서, 2개의 돌연변이가 서로 인접하지 않은 gRNA.
- [0029] 20. 실시양태 18에 있어서, 3개의 돌연변이 중 어느 것도 서로 인접하지 않은 gRNA.
- [0030] 21. 실시양태 18-20 중 어느 하나에 있어서, 1, 2, 또는 3개의 돌연변이가 치환인 gRNA.
- [0031] 22. 실시양태 18-20 중 어느 하나에 있어서, 돌연변이 중 1개 이상이 삽입 또는 결실인 gRNA.
- [0032] 23. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 서열식별번호: 1-4 중 임의의 것의 서열을 포함하는 gRNA.
- [0033] 24. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 서열식별번호: 1의 서열을 포함하는 gRNA.
- [0034] 25. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 서열식별번호: 2의 서열을 포함하는 gRNA.
- [0035] 26. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 서열식별번호: 3의 서열을 포함하는 gRNA.
- [0036] 27. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 서열식별번호: 4의 서열을 포함하는 gRNA.
- [0037] 28. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 서열식별번호: 9의 서열을 포함하는 gRNA.
- [0038] 29. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 서열식별번호: 10의 서열을 포함하는 gRNA.
- [0039] 30. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 서열식별번호: 11의 서열을 포함하는 gRNA.
- [0040] 31. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 서열식별번호: 12의 서열을 포함하는 gRNA.
- [0041] 32. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 1개 이상의 화학적 변형 (예를 들어, 핵염기, 당 또는 백본 부분에 대한 화학적 변형)을 포함하는 gRNA.
- [0042] 33. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 예를 들어, 본원에 기술된 위치에, 1개 이상의 2'-O-메틸 뉴클레오타드를 포함하는 gRNA.
- [0043] 34. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 예를 들어, 본원에 기술된 위치에, 1개 이상의 포스포로티오에이트 또는 티오PACE 연결을 포함하는 gRNA.
- [0044] 35. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, Cas9 분자에 결합하는 gRNA.
- [0045] 36. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 약 18-23개, 예를 들어, 20개의 뉴클레오타드의 길이인 gRNA.
- [0046] 37. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, tracrRNA에 결합하는 gRNA.
- [0047] 38. 실시양태 1-36 중 어느 하나에 있어서, 스캐폴드 서열을 포함하는 gRNA.
- [0048] 39. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 하기 중 1개 이상 (예를 들어, 모두)를 포함하는 gRNA:
- [0049] 제1 상보성 도메인;
- [0050] 연결 도메인;
- [0051] 제1 상보성 도메인에 상보적인 제2 상보성 도메인;
- [0052] 근위 도메인; 및
- [0053] 꼬리 도메인.
- [0054] 40. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 제1 상보성 도메인을 포함하는 gRNA.

- [0055] 41. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 연결 도메인을 포함하는 gRNA.
- [0056] 42. 실시양태 40 또는 41에 있어서, 제1 상보성 도메인에 상보적인 제2 상보성 도메인을 포함하는 gRNA.
- [0057] 43. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 근위 도메인을 포함하는 gRNA.
- [0058] 44. 선행 실시양태 중 어느 하나에 있어서, 꼬리 도메인을 포함하는 gRNA.
- [0059] 45. 실시양태 39-44 중 어느 하나에 있어서, 표적화 도메인이 하기 중 1개 이상 (예를 들어, 모두)에 이중인 gRNA:
- [0060] 제1 상보성 도메인;
- [0061] 연결 도메인;
- [0062] 제1 상보성 도메인에 상보적인 제2 상보성 도메인;
- [0063] 근위 도메인; 및
- [0064] 꼬리 도메인.
- [0065] 46. a) 실시양태 1-45 중 어느 하나의 gRNA, 또는 이러한 gRNA를 코딩하는 핵산, 및
- [0066] b) 제2 gRNA, 또는 제2 gRNA를 코딩하는 핵산
- [0067] 을 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0068] 47. 실시양태 46에 있어서, 제1 gRNA가 CCCCAGGACTACTCACTCCT (서열식별번호: 1)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0069] 48. 실시양태 46 또는 47에 있어서, 제2 gRNA가 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적화하는 키트 또는 조성물.
- [0070] 49. 실시양태 46-48 중 어느 하나에 있어서, 제2 gRNA가 CD33 이외의 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적화하는 키트 또는 조성물.
- [0071] 50. 실시양태 46-49 중 어느 하나에 있어서, 제2 gRNA가 CLL-1을 표적화하는 (예를 들어, 제2 gRNA가 GGTGGCTATTGTTTGAGTG (서열식별번호: 23)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는) 키트 또는 조성물.
- [0072] 51. 실시양태 46-50 중 어느 하나에 있어서, 제2 gRNA가 CD123을 표적화하는 (예를 들어, 제2 gRNA가 TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (서열식별번호: 24) 또는 AGTCCCACATCCTGGTGCG (서열식별번호: 25)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는) 키트 또는 조성물.
- [0073] 52. 실시양태 46-51 중 어느 하나에 있어서, 제2 gRNA가 TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (서열식별번호: 24)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0074] 53. 실시양태 46-52 중 어느 하나에 있어서, 제2 gRNA가 AGTCCCACATCCTGGTGCG (서열식별번호: 25)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0075] 54. 실시양태 46-53 중 어느 하나에 있어서, 제2 gRNA가 표 A의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0076] 55. 실시양태 46-54 중 어느 하나에 있어서, (a)의 gRNA가 CCCCAGGACTACTCACTCCT (서열식별번호: 1)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하고, 제2 gRNA가 GGTGGCTATTGTTTGAGTG (서열식별번호: 23)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0077] 56. 실시양태 46-54 중 어느 하나에 있어서, (a)의 gRNA가 CCCCAGGACTACTCACTCCT (서열식별번호: 1)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하고, 제2 gRNA가 TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (서열식별번호: 24)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0078] 57. 실시양태 46-54 중 어느 하나에 있어서, (a)의 gRNA가 CCCCAGGACTACTCACTCCT (서열식별번호: 1)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하고, 제2 gRNA가 AGTCCCACATCCTGGTGCG (서열식별번호: 25)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0079] 58. 실시양태 46-57 중 어느 하나에 있어서, 제3 gRNA, 또는 제3 gRNA를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는 키트

또는 조성물.

- [0080] 59. 실시양태 58에 있어서, 제3 gRNA가 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적화하는 키트 또는 조성물.
- [0081] 60. 실시양태 58에 있어서, 제3 gRNA가 CD33, CLL-1, 또는 CD123을 표적화하는 키트 또는 조성물.
- [0082] 61. 실시양태 58-53 중 어느 하나에 있어서, (a)의 gRNA가 CCCCAGGACTACTCACTCCT (서열식별번호: 1)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하고, 제2 gRNA가 TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (서열식별번호: 24)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하며, 제3 gRNA가 AGTTCACATCCTGGTGCG (서열식별번호: 25)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0083] 62. 실시양태 58-60 중 어느 하나에 있어서, (a)의 gRNA가 CCCCAGGACTACTCACTCCT (서열식별번호: 1)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하고, 제2 gRNA가 TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (서열식별번호: 24)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하며, 제3 gRNA가 GGTGGCTATTGTTGCAGTG (서열식별번호: 23)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0084] 63. 실시양태 58-60 중 어느 하나에 있어서, (a)의 gRNA가 CCCCAGGACTACTCACTCCT (서열식별번호: 1)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하고, 제2 gRNA가 AGTTCACATCCTGGTGCG (서열식별번호: 25)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하며, 제3 gRNA가 GGTGGCTATTGTTGCAGTG (서열식별번호: 23)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0085] 64. 실시양태 58-63 중 어느 하나에 있어서, 제4 gRNA, 또는 제4 gRNA를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0086] 65. 실시양태 64에 있어서, 제4 gRNA가 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적화하는 키트 또는 조성물.
- [0087] 66. 실시양태 64에 있어서, 제4 gRNA가 CD33, CLL-1, 또는 CD123을 표적화하는 키트 또는 조성물.
- [0088] 67. 실시양태 64-66 중 어느 하나에 있어서, (a)의 gRNA가 CCCCAGGACTACTCACTCCT (서열식별번호: 1)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하고, 제2 gRNA가 TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (서열식별번호: 24)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하고, 제3 gRNA가 AGTTCACATCCTGGTGCG (서열식별번호: 25)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하며, 제4 gRNA가 GGTGGCTATTGTTGCAGTG (서열식별번호: 23)의 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함하는 키트 또는 조성물.
- [0089] 68. 실시양태 64-67 중 어느 하나에 있어서, (a)의 gRNA, 제2 gRNA, 제3 gRNA, 및 제4 gRNA가 혼합된 키트 또는 조성물.
- [0090] 69. 실시양태 64-67 중 어느 하나에 있어서, (a)의 gRNA, 제2 gRNA, 제3 gRNA, 및 제4 gRNA가 별개의 용기에 있는 키트 또는 조성물.
- [0091] 70. 실시양태 46-67 중 어느 하나에 있어서, (a) 및 (b)가 혼합된 키트 또는 조성물.
- [0092] 71. 실시양태 46-67 중 어느 하나에 있어서, (a) 및 (b)가 별개의 용기에 있는 키트 또는 조성물.
- [0093] 72. 실시양태 46-71 중 어느 하나에 있어서, (a)의 핵산 및 (b)의 핵산이 동일한 핵산의 일부분인 키트 또는 조성물.
- [0094] 73. 실시양태 46-71 중 어느 하나에 있어서, (a)의 핵산 및 (b)의 핵산이 별개의 핵산인 키트 또는 조성물.
- [0095] 74. (a) 표 1의 표적 도메인 (예를 들어, 서열식별번호: 1-8 중 임의의 것의 표적 도메인)에서의 돌연변이; 및
- [0096] (b) CD33 이외의 계통-특이적 세포 표면 항원을 코딩하는 유전자에서의 제2 돌연변이
- [0097] 를 포함하는 유전자 조작된 조혈 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포).
- [0098] 75. 실시양태 74에 있어서, (a)의 돌연변이가 서열식별번호: 1의 표적 도메인에 있는 유전자 조작된 조혈 세포.
- [0099] 76. 실시양태 74에 있어서, (a)의 돌연변이가 서열식별번호: 2의 표적 도메인에 있는 유전자 조작된 조혈 세포.
- [0100] 77. 실시양태 74에 있어서, (a)의 돌연변이가 서열식별번호: 3의 표적 도메인에 있는 유전자 조작된 조혈 세포.
- [0101] 78. 실시양태 74에 있어서, (a)의 돌연변이가 서열식별번호: 4의 표적 도메인에 있는 유전자 조작된 조혈 세포.
- [0102] 79. 실시양태 74-78 중 어느 하나에 있어서, (a)의 돌연변이가 삽입, 결실 또는 치환 (예를 들어, 단일 뉴클레

오티드 변이체)을 포함하는 유전자 조작된 조혈 세포.

- [0103] 80. 실시양태 74-79 중 어느 하나에 있어서, CD33 내에 1개의 nt 또는 2개의 nt의 삽입, 또는 1개의 nt, 2개의 nt, 4개의 nt, 또는 5개의 nt의 결실을 포함하는 유전자 조작된 조혈 세포
- [0104] 81. 실시양태 74-79 중 어느 하나에 있어서, 본원에 기술된 바와 같은 indel, 예를 들어, 본원에 기술된 gRNA (예를 들어, gRNA A, gRNA B, gRNA C, 또는 gRNA D 중 임의의 것)에 의해 생산되거나 또는 생산가능한 indel을 포함하는 유전자 조작된 조혈 세포.
- [0105] 82. 실시양태 74-79 중 어느 하나에 있어서, 본원에 기술된 CRISPR 시스템, 예를 들어, 실시예 1, 2, 4, 5, 또는 6의 방법에 의해 생산되거나 또는 생산가능한 indel을 포함하는 유전자 조작된 조혈 세포.
- [0106] 83. 실시양태 79에 있어서, 결실이 완전히 서열식별번호: 1-8 중 임의의 것의 표적 도메인 내에 있는 유전자 조작된 세포.
- [0107] 84. 실시양태 83에 있어서, 결실이 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 또는 17개의 뉴클레오티드의 길이인 유전자 조작된 세포.
- [0108] 85. 실시양태 79에 있어서, 결실이 서열식별번호: 1-8 중 임의의 것의 표적 도메인의 외부에 1개 또는 양쪽 모두의 종점을 갖는 유전자 조작된 세포.
- [0109] 86. 실시양태 79-85 중 어느 하나에 있어서, 돌연변이가 프레임 이동을 발생시키는 유전자 조작된 세포.
- [0110] 87. 실시양태 79-85 중 어느 하나에 있어서, 제2 돌연변이가 삽입, 결실 또는 치환 (예를 들어, 단일 뉴클레오티드 변이체)을 포함하는 유전자 조작된 조혈 세포.
- [0111] 88. CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 조혈 세포 줄기 또는 전구 세포의 샘플에서 CD33의 발현을 감소시키기 위한, 실시양태 1-45 중 어느 하나의 gRNA 또는 실시양태 39-66 중 어느 하나의 조성물 또는 키트의 용도.
- [0112] 89. 조혈 세포 줄기 또는 전구 세포의 샘플에서 CD33의 발현을 감소시키기 위한 CRISPR/Cas9 시스템의 용도로서, 여기서 CRISPR/Cas9 시스템의 gRNA가 실시양태 1-45 중 어느 하나의 gRNA 또는 실시양태 46-73 중 어느 하나의 조성물 또는 키트의 gRNA인 용도.
- [0113] 90. (i) 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포, 예를 들어, 야생형 조혈 줄기 또는 전구 세포)를 제공하고,
- [0114] (ii) 세포 내로 (a) 실시양태 1-45 중 어느 하나의 가이드 RNA (gRNA) 또는 실시양태 46-73 중 어느 하나의 조성물 또는 키트의 gRNA; 및 (b) gRNA에 결합하는 엔도뉴클레아제 (예를 들어, Cas9 분자)를 도입하며,
- [0115] 이에 의해 유전자 조작된 세포를 생산하는 것
- [0116] 을 포함하는, 유전자 조작된 세포를 생산하는 방법.
- [0117] 91. (i) 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포, 예를 들어, 야생형 조혈 줄기 또는 전구 세포)를 제공하고,
- [0118] (ii) 세포 내로 (a) 실시양태 1-45 중 어느 하나의 gRNA 또는 실시양태 46-73 중 어느 하나의 조성물 또는 키트의 gRNA; 및 (b) gRNA에 결합하는 Cas9 분자를 도입하며,
- [0119] 이에 의해 유전자 조작된 세포를 생산하는 것
- [0120] 을 포함하는, 유전자 조작된 세포를 생산하는 방법.
- [0121] 92. 실시양태 88-91 중 어느 하나에 있어서, 야생형 대응 세포에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 갖는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 발생시키는 방법 또는 용도.
- [0122] 93. 실시양태 88-92 중 어느 하나에 있어서, 야생형 대응 세포에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 갖는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 발생시키는 방법 또는 용도.
- [0123] 94. 실시양태 88-93 중 어느 하나에 있어서, 복수의 조혈 줄기 또는 전구 세포에서 수행되는 방법 또는 용도.
- [0124] 95. 실시양태 88-94 중 어느 하나에 있어서, 복수의 조혈 줄기 세포 및 복수의 조혈 전구 세포를 포함하는 세포 집단에서 수행되는 방법 또는 용도.

- [0125] 96. 실시양태 88-95 중 어느 하나에 있어서, 실시양태 182-206 중 어느 하나에 따른 세포 집단을 생산하는 방법 또는 용도.
- [0126] 97. 실시양태 88-96 중 어느 하나에 있어서, (a) 및 (b)의 핵산이 1개의 벡터 상에 코딩되고, 벡터가 세포 내로 도입되는 방법.
- [0127] 98. 실시양태 97에 있어서, 벡터가 바이러스 벡터인 방법.
- [0128] 99. 실시양태 98에 있어서, (a) 및 (b)가 미리 형성된 리보핵단백질 복합체로서 세포 내로 도입되는 방법.
- [0129] 100. 실시양태 99에 있어서, 리보핵단백질 복합체가 전기천공을 통해 세포 내로 도입되는 방법.
- [0130] 101. 실시양태 88-100 중 어느 하나에 있어서, 엔도뉴클레아제 (예를 들어, Cas9 분자)가 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산 분자 (예를 들어, mRNA 분자 또는 바이러스 벡터, 예를 들어, AAV)를 세포 내로 전달하는 것에 의해 세포 내로 도입되는 방법.
- [0131] 102. 실시양태 88-101 중 어느 하나에 있어서, 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포)가 CD34+인 방법.
- [0132] 103. 실시양태 88-102 중 어느 하나에 있어서, 조혈 줄기 또는 전구 세포가 대상체의 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터의 것인 방법.
- [0133] 104. 실시양태 88-103 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 조혈 장애, 예를 들어, 조혈 악성종양, 예를 들어, 백혈병, 예를 들어, AML을 갖는 것인 방법.
- [0134] 105. 실시양태 88-104 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 암을 갖고, 여기서 암 세포가 CD33을 발현하는 (예를 들어, 적어도 복수의 암 세포가 CD33을 발현하는) 방법.
- [0135] 106. 실시양태 88-105 중 어느 하나에 있어서, 야생형 대응 세포에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 야기하는 돌연변이를 발생시키는 방법 또는 용도.
- [0136] 107. 실시양태 88-106 중 어느 하나에 있어서, 야생형 대응 세포에 비교하여 야생형 CD33의 감소된 발현 수준을 야기하는 돌연변이를 발생시키는 방법 또는 용도.
- [0137] 108. 실시양태 88-107 중 어느 하나에 있어서, 야생형 대응 세포에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 갖는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 생산하는 방법 또는 용도.
- [0138] 109. 실시양태 88-108 중 어느 하나에 있어서, 야생형 대응 세포에 비교하여 야생형 CD33의 감소된 발현 수준을 갖는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 생산하는 방법 또는 용도.
- [0139] 110. 실시양태 88-109 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0140] 111. 실시양태 1-45 중 어느 하나의 gRNA를 코딩하는 핵산 (예를 들어, DNA).
- [0141] 112. 표 1의 표적 도메인 (예를 들어, 서열식별번호: 1-8 중 임의의 것의 표적 도메인)에 돌연변이를 포함하고, 예를 들어, 여기서 돌연변이가 유전자 조작의 결과인 유전자 조작된 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포).
- [0142] 113. 표 1의 표적 도메인 (예를 들어, 서열식별번호: 1-8 중 임의의 것의 표적 도메인)으로부터 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10개의 뉴클레오티드 (상류 또는 하류) 이내에 돌연변이를 포함하는 유전자 조작된 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포).
- [0143] 114. 실시양태 113에 있어서, 돌연변이가 서열식별번호: 1, 2, 또는 4 중 임의의 것으로부터 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10개의 뉴클레오티드 (상류 또는 하류) 이내에 있는 유전자 조작된 세포.
- [0144] 115. 실시양태 113에 있어서, 돌연변이가 서열식별번호: 3의 하류의 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10개의 뉴클레오티드 이내에 있는 유전자 조작된 세포.
- [0145] 116. 실시양태 113에 있어서, 돌연변이가 서열식별번호: 3의 상류의 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10개의 뉴클레오티드 이내에 있는 유전자 조작된 세포.
- [0146] 117. 서열식별번호: 1의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.

- [0147] 118. 서열식별번호: 1의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0148] 119. 서열식별번호: 1의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0149] 120. 서열식별번호: 2의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0150] 121. 서열식별번호: 2의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0151] 122. 서열식별번호: 2의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0152] 123. 서열식별번호: 3의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0153] 124. 서열식별번호: 3의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0154] 125. 서열식별번호: 3의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0155] 126. 서열식별번호: 4의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0156] 127. 서열식별번호: 4의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0157] 128. 서열식별번호: 4의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0158] 129. 서열식별번호: 5의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0159] 130. 서열식별번호: 5의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0160] 131. 서열식별번호: 5의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0161] 132. 서열식별번호: 6의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0162] 133. 서열식별번호: 6의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0163] 134. 서열식별번호: 6의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0164] 135. 서열식별번호: 7의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0165] 136. 서열식별번호: 7의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0166] 137. 서열식별번호: 7의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0167] 138. 서열식별번호: 8의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0168] 139. 서열식별번호: 8의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0169] 140. 서열식별번호: 8의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포.
- [0170] 141. 실시양태 112-140 중 어느 하나에 있어서, CD33의 유전자 편집 이전의 부위의 서열에 비교하여 돌연변이 또는 서열 변화를 포함하지 않는 예상된 탈표적 부위를 포함하는 유전자 조작된 세포.

- [0171] 142. 실시양태 112-141 중 어느 하나에 있어서, CD33의 유전자 편집 이전의 부위의 서열에 비교하여 돌연변이 또는 서열 변화를 포함하지 않는 2개의 예상된 탈표적 부위를 포함하는 유전자 조작된 세포.
- [0172] 143. 실시양태 112-142 중 어느 하나에 있어서, CD33의 유전자 편집 이전의 부위의 서열에 비교하여 돌연변이 또는 서열 변화를 포함하지 않는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20개의 예상된 탈표적 부위를 포함하는 유전자 조작된 세포.
- [0173] 144. 실시양태 112-143 중 어느 하나에 있어서, 임의의 예상된 탈표적 부위, 예를 들어, 표적 도메인에 비교하여 1, 2, 3, 또는 4개의 미스매치를 갖는 인간 게놈 내의 임의의 부위 내에 돌연변이를 포함하지 않는 유전자 조작된 세포.
- [0174] 145. 실시양태 112-144 중 어느 하나에 있어서, 표적 도메인에 비교하여 1개의 미스매치를 갖는 인간 게놈 내의 임의의 부위 내에 돌연변이를 포함하지 않는 유전자 조작된 세포.
- [0175] 146. 실시양태 112-145 중 어느 하나에 있어서, 표적 도메인에 비교하여 1 또는 2개의 미스매치를 갖는 인간 게놈 내의 임의의 부위 내에 돌연변이를 포함하지 않는 유전자 조작된 세포.
- [0176] 147. 실시양태 112-146 중 어느 하나에 있어서, 표적 도메인에 비교하여 1, 2, 또는 3개의 미스매치를 갖는 인간 게놈 내의 임의의 부위 내에 돌연변이를 포함하지 않는 유전자 조작된 세포.
- [0177] 148. 실시양태 112-147 중 어느 하나에 있어서, 표적 도메인에 비교하여 1, 2, 3, 또는 4개의 미스매치를 갖는 인간 게놈 내의 임의의 부위 내에 돌연변이를 포함하지 않는 유전자 조작된 세포.
- [0178] 149. 실시양태 112-148 중 어느 하나에 있어서, 돌연변이가 삽입, 결실 또는 치환 (예를 들어, 단일 뉴클레오타이드 변이체)을 포함하는 유전자 조작된 세포.
- [0179] 150. 실시양태 149에 있어서, 결실이 완전히 서열식별번호: 1-8 중 임의의 것의 표적 도메인 내에 있는 유전자 조작된 세포.
- [0180] 151. 실시양태 150에 있어서, 결실이 1, 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 또는 17개의 뉴클레오타이드의 길이인 유전자 조작된 세포.
- [0181] 152. 실시양태 149에 있어서, 결실이 서열식별번호: 1-8 중 임의의 것의 표적 도메인의 외부에 1개 또는 양쪽 모두의 종점을 갖는 유전자 조작된 세포.
- [0182] 153. 실시양태 112-152 중 어느 하나에 있어서, 돌연변이가 프레임 이동을 발생시키는 유전자 조작된 세포.
- [0183] 154. 실시양태 112-153 중 어느 하나에 있어서, 돌연변이가 야생형 대응 세포에 비교하여 야생형 CD33의 감소된 발현 수준 (예를 들어, 야생형 대응 세포에서의 수준의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만)을 발생시키는 유전자 조작된 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포).
- [0184] 155. 실시양태 112-153 중 어느 하나에 있어서, 세포가 야생형 대응 세포에 비교하여 야생형 CD33 단백질의 감소된 수준 (예를 들어, 야생형 대응 세포에서의 수준의 50%, 40%, 30%, 20%, 15%, 10%, 또는 5% 미만)을 갖는 유전자 조작된 세포.
- [0185] 156. 실시양태 112-155 중 어느 하나에 있어서, CD33을 발현하지 않는 유전자 조작된 세포.
- [0186] 157. 실시양태 112-156 중 어느 하나에 있어서, 돌연변이가 CD33 발현의 결여를 발생시키는 유전자 조작된 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포).
- [0187] 158. 실시양태 112-157 중 어느 하나에 있어서, 야생형 대응 세포에 의해 발현되는 CD33의 20% 미만을 발현하는 유전자 조작된 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포)
- [0188] 159. 실시양태 112-158 중 어느 하나에 있어서, CD33의 감소된 발현 수준이 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 분화된 (예를 들어, 최종적으로 분화된) 세포에서의 것이고, 야생형 대응 세포가 야생형 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 분화된 (예를 들어, 최종적으로 분화된) 세포인 유전자 조작된 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포).
- [0189] 160. 실시양태 158에 있어서, 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 분화된 세포가 골수모세포, 단핵모세포, 단핵구, 대식세포, 또는 천연 킬러 세포인 유전자 조작된 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포)

- [0190] 161. 실시양태 112-160 중 어느 하나에 있어서, CD34+인 유전자 조작된 세포.
- [0191] 162. 실시양태 112-161 중 어느 하나에 있어서, 대상체의 골수 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포로부터의 것인 유전자 조작된 세포.
- [0192] 163. 실시양태 162에 있어서, 대상체가 조혈 악성종양, 예를 들어, AML을 갖는 인간 환자인 유전자 조작된 세포.
- [0193] 164. 실시양태 162 또는 163에 있어서, 대상체가 암을 갖고, 여기서 암 세포가 CD33을 발현하는 (예를 들어, 적어도 복수의 암 세포가 CD33을 발현하는) 유전자 조작된 세포.
- [0194] 165. 실시양태 162에 있어서, 대상체가 건강한 인간 공여자 (예를 들어, HLA-매칭 공여자)인 유전자 조작된 세포.
- [0195] 166. 실시양태 112-165 중 어느 하나에 있어서, CRISPR 엔도뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터-기반 뉴클레아제 (TALEN), 또는 메가뉴클레아제로부터 선택된 뉴클레아제, 또는 이러한 뉴클레아제를 코딩하는 핵산 (예를 들어, DNA 또는 RNA)을 추가로 포함하고, 여기서 임의적으로 뉴클레아제가 CD33에 대해 특이적인 유전자 조작된 세포.
- [0196] 167. 실시양태 112-165 중 어느 하나에 있어서, CD33에 대해 특이적인 gRNA (예를 들어, 단일 가이드 RNA), 또는 이러한 gRNA를 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는 유전자 조작된 세포.
- [0197] 168. 실시양태 167에 있어서, gRNA가 본원에 기술된 gRNA, 예를 들어, 실시양태 1-45 중 어느 하나의 gRNA인 유전자 조작된 세포.
- [0198] 169. 실시양태 112-168 중 어느 하나에 있어서, 세포를 CRISPR 엔도뉴클레아제, 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터-기반 뉴클레아제 (TALEN), 또는 메가뉴클레아제로부터 선택된 뉴클레아제와 접촉시키는 것을 포함하는 프로세스에 의해 (예를 들어, 세포를 뉴클레아제 또는 뉴클레아제를 코딩하는 핵산과 접촉시킴으로써) 제조된 유전자 조작된 세포.
- [0199] 170. 실시양태 112-168 중 어느 하나에 있어서, 세포를 니카제 또는 촉매적으로 불활성인 Cas9 분자 (dCas9) (예를 들어, 기능성 도메인, 예를 들어, 데아미나제 또는 데메틸라제 도메인에 융합됨)와 접촉시키는 것을 포함하는 프로세스에 의해 (예를 들어, 세포를 뉴클레아제 또는 뉴클레아제를 코딩하는 핵산과 접촉시킴으로써) 제조된 유전자 조작된 세포.
- [0200] 171. 실시양태 112-170 중 어느 하나에 있어서, CD33의 양쪽 카피가 돌연변이체인 유전자 조작된 세포.
- [0201] 172. 실시양태 171에 있어서, CD33의 양쪽 카피가 동일한 돌연변이를 갖는 유전자 조작된 세포.
- [0202] 173. 실시양태 171에 있어서, CD33의 양쪽 카피가 상이한 돌연변이를 갖는 유전자 조작된 세포.
- [0203] 174. 실시양태 112-171 중 어느 하나에 있어서, 제1 돌연변이를 갖는 CD33의 제1 카피, 및 제2 돌연변이를 갖는 CD33의 제2 카피를 포함하고, 여기서 제1 및 제2 돌연변이가 상이한 유전자 조작된 세포.
- [0204] 175. 실시양태 174에 있어서, CD33의 제1 카피가 제1 결실을 포함하는 유전자 조작된 세포.
- [0205] 176. 실시양태 174 또는 175에 있어서, CD33의 제2 카피가 제2 결실을 포함하는 유전자 조작된 세포.
- [0206] 177. 실시양태 174-176 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제2 결실이 중첩되는 유전자 조작된 세포.
- [0207] 178. 실시양태 174-177 중 어느 하나에 있어서, 제1 결실의 중점이 제2 결실 내에 있는 유전자 조작된 세포.
- [0208] 179. 실시양태 174-178 중 어느 하나에 있어서, 제1 결실의 양쪽 모두의 중점이 제2 결실 내에 있는 유전자 조작된 세포.
- [0209] 180. 실시양태 174-176 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제2 결실이 중점을 공유하는 유전자 조작된 세포.
- [0210] 181. 실시양태 174-176 중 어느 하나에 있어서, 제1 및 제2 돌연변이가 각각 독립적으로 1개의 nt 또는 2개의 nt의 삽입, 또는 1개의 nt, 2개의 nt, 4개의 nt, 또는 5개의 nt의 결실로부터 선택되는 유전자 조작된 세포.
- [0211] 182. 복수의 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 (예를 들어, 조혈 줄기 세포, 조혈 전구 세포, 또는 그의 조합물을 포함하는) 세포 집단.

- [0212] 183. 서열식별번호: 1의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 세포 집단.
- [0213] 184. 서열식별번호: 1의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0214] 185. 서열식별번호: 1의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0215] 186. 서열식별번호: 2의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 세포 집단.
- [0216] 187. 서열식별번호: 2의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0217] 188. 서열식별번호: 2의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0218] 189. 서열식별번호: 3의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 세포 집단.
- [0219] 190. 서열식별번호: 3의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0220] 191. 서열식별번호: 3의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0221] 192. 서열식별번호: 4의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 세포 집단.
- [0222] 193. 서열식별번호: 4의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0223] 194. 서열식별번호: 4의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0224] 195. 서열식별번호: 5의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 세포 집단.
- [0225] 196. 서열식별번호: 5의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0226] 197. 서열식별번호: 5의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0227] 198. 서열식별번호: 6의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 세포 집단.
- [0228] 199. 서열식별번호: 6의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포

집단.

- [0229] 200. 서열식별번호: 6의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0230] 201. 서열식별번호: 7의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 세포 집단.
- [0231] 202. 서열식별번호: 7의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0232] 203. 서열식별번호: 7의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0233] 204. 서열식별번호: 8의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 세포 집단.
- [0234] 205. 서열식별번호: 8의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에 비교하여 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0235] 206. 서열식별번호: 8의 표적 도메인에 돌연변이를 포함하는 복수의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하고, 여기서 돌연변이가 야생형 대응 세포 집단에서의 CD33 수준의 20% 미만인 CD33의 감소된 발현 수준을 발생시키는 세포 집단.
- [0236] 207. 실시양태 182-206 중 어느 하나에 있어서, 세포 집단이 CD33-야생형 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 유래된 동일한 분화된 세포 유형에 의해 발현되는 CD33의 수준과 관련하여 감소된 수준으로 CD33을 발현하는 세포 유형으로 분화될 수 있는 세포 집단.
- [0237] 208. 실시양태 182-207 중 어느 하나에 있어서, 조혈 줄기 또는 전구 세포가 그의 자손인 골수 전구 세포가 CD33-야생형 조혈 줄기 또는 전구 세포의 자손인 골수 전구 세포와 비교하여 CD33 수준이 부족하도록 조작된 세포 집단.
- [0238] 209. 실시양태 182-208 중 어느 하나에 있어서, 조혈 줄기 또는 전구 세포가 그의 자손인 골수 세포 (예를 들어, 최종적으로 분화된 골수 세포)가 CD33-야생형 조혈 줄기 또는 전구 세포의 자손인 골수 세포 (예를 들어, 최종적으로 분화된 골수 세포)와 비교하여 CD33 수준이 부족하도록 조작된 세포 집단.
- [0239] 210. 실시양태 182-209 중 어느 하나에 있어서, 1개 이상의 조작되지 않은 CD33 유전자를 포함하는 1개 이상의 세포를 추가로 포함하는 세포 집단.
- [0240] 211. 실시양태 182-210 중 어느 하나에 있어서, CD33에 대해 동형접합성 야생형인 1개 이상의 세포를 추가로 포함하는 세포 집단.
- [0241] 212. 실시양태 182-211 중 어느 하나에 있어서, 집단 내의 세포의 약 0-1%, 1-2%, 2-5%, 5-10%, 10-15%, 또는 15-20%가 CD33에 대해 동형접합성 야생형이고, 예를 들어, CD33에 대해 동형접합성 야생형인 조혈 줄기 또는 전구 세포인 세포 집단.
- [0242] 213. 실시양태 182-212 중 어느 하나에 있어서, CD33에 대해 이형접합성 야생형인 1개 이상의 세포를 추가로 포함하는 세포 집단.
- [0243] 214. 실시양태 182-213 중 어느 하나에 있어서, 집단 내의 세포의 약 0-1%, 1-2%, 2-5%, 5-10%, 10-15%, 또는 15-20%가 CD33에 대해 이형접합성 야생형이고, 예를 들어, 1개의 야생형 CD33 카피 및 1개의 돌연변이체 CD33 카피를 포함하는 조혈 줄기 또는 전구 세포인 세포 집단.
- [0244] 215. 실시양태 182-214 중 어느 하나에 있어서, 집단 내의 CD33 카피의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 돌연변이체인 세포 집단.
- [0245] 216. 실시양태 182-215 중 어느 하나에 있어서, 복수의 상이한 CD33 돌연변이를 포함하고, 예를 들어, 적어도

2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 상이한 돌연변이를 포함하는 세포 집단.

- [0246] 217. 실시양태 182-216 중 어느 하나에 있어서, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 상이한 돌연변이를 포함하는 세포 집단.
- [0247] 218. 실시양태 182-216 중 어느 하나에 있어서, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 상이한 삽입을 포함하는 세포 집단.
- [0248] 219. 실시양태 182-218 중 어느 하나에 있어서, 복수의 삽입 및 복수의 결실을 포함하는 세포 집단.
- [0249] 220. 실시양태 182-219 중 어느 하나에 있어서, 야생형 대응 세포 집단에 의해 발현되는 CD33의 20% 미만을 발현하는 세포 집단.
- [0250] 221. 실시양태 182-220 중 어느 하나에 있어서, 예를 들어, 유동 세포측정법 검정 (예를 들어, 세포가 항-CD33 항체 (예를 들어, 항체 P67.7)와 접촉됨)을 사용하여, 예를 들어, 실시예 1에 따른 검정을 사용하여 결정 시, 집단 내의 세포의 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 CD33을 발현하지 않는 세포 집단.
- [0251] 222. 실시양태 182-221 중 어느 하나에 있어서, CD33의 감소된 발현 수준이 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 분화된 (예를 들어, 최종적으로 분화된) 세포에서의 것이고, 야생형 대응 세포가 야생형 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 분화된 (예를 들어, 최종적으로 분화된) 세포인 세포 집단.
- [0252] 223. 실시양태 222에 있어서, 조혈 줄기 또는 전구 세포로부터 분화된 세포가 골수모세포, 단핵모세포, 단핵구, 대식세포, 또는 천연 킬러 세포인 세포 집단.
- [0253] 224. 실시양태 182-223 중 어느 하나에 있어서, 집단 내의 세포의 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%가 생존 세포인 세포 집단.
- [0254] 225. 실시양태 182-224 중 어느 하나에 있어서, 집단의 유전자 조작된 세포 중 1개 이상 (예를 들어, 집단 내의 유전자 조작된 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 또는 40%)가 LT-HSC인 세포 집단.
- [0255] 226. 실시양태 182-225 중 어느 하나에 있어서, 예를 들어, 유동 세포측정법에 의해, 예를 들어, 실시예 6의 검정에 따라 결정 시, 집단의 유전자 조작된 세포 중 1개 이상 (예를 들어, 집단 내의 유전자 조작된 세포의 적어도 10%, 20%, 30%, 또는 40%)가 CD38-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+인 세포 집단.
- [0256] 227. 실시양태 182-226 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, 예를 들어, 투여 8, 12, 또는 16주 후에 검정했을 때, 대상체에서 CD45+ 세포를 생산하는 세포 집단.
- [0257] 228. 실시양태 227에 있어서, CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단으로 생산된 CD45+ 세포의 수준과 유사한 수준의 hCD45+ 세포를 생산하는 세포 집단.
- [0258] 229. 실시양태 227 또는 228에 있어서, CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단에 의해 생산된 hCD45+ 세포의 수준의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 수준의 CD45+ 세포를 생산하는 세포 집단.
- [0259] 230. 실시양태 182-229 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, 예를 들어, 투여 8, 12, 또는 16주 후에 검정했을 때, 대상체에서 CD14+ 세포를 생산하는 세포 집단.
- [0260] 231. 실시양태 230에 있어서, CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단으로 생산된 CD14+ 세포의 수준과 유사한 수준의 hCD45+ 세포를 생산하는 세포 집단.
- [0261] 232. 실시양태 230 또는 231에 있어서, CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단에 의해 생산된 hCD14+ 세포의 수준의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 수준의 CD45+ 세포를 생산하는 세포 집단.
- [0262] 233. 실시양태 182-232 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, 예를 들어, 투여 8, 12, 또는 16주 후에 검정했을 때, 대상체에서 CD11b+ 세포를 생산하는 세포 집단.
- [0263] 234. 실시양태 233에 있어서, CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단으로 생산된 CD11b+ 세포의 수준과 유사한 수준의 hCD45+ 세포를 생산하는 세포 집단.
- [0264] 235. 실시양태 233 또는 235에 있어서, CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단에 의해 생산된 hCD11b + 세포의 수준의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 수준의 CD45+ 세포를 생산하는 세포 집단.

- [0265] 236. 실시양태 182-235 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, 예를 들어, 투여 8, 12, 또는 16주 후에 검정했을 때, 대상체에서 CD19+ 세포를 생산하는 세포 집단.
- [0266] 237. 실시양태 236에 있어서, CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단으로 생산된 CD19+ 세포의 수준과 유사한 수준의 hCD45+ 세포를 생산하는 세포 집단.
- [0267] 238. 실시양태 236 또는 237에 있어서, CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단에 의해 생산된 hCD19+ 세포의 수준의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 수준의 CD45+ 세포를 생산하는 세포 집단.
- [0268] 239. 실시양태 182-238 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, 예를 들어, 투여 8, 12, 또는 16주 후에 검정했을 때, 대상체에서 림프성 세포, 단핵구, 과립구, 또는 호중구, 또는 그의 임의의 조합을 생산하는 세포 집단.
- [0269] 240. 실시양태 239에 있어서, CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단으로 생산된 림프성 세포, 단핵구, 과립구, 또는 호중구, 또는 그의 임의의 조합의 수준과 유사한 수준의 상기 세포 유형을 생산하는 세포 집단.
- [0270] 241. 실시양태 239 또는 240에 있어서, CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단에 의해 생산된 림프성 세포, 단핵구, 과립구, 또는 호중구, 또는 그의 임의의 조합의 수준의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 수준의 상기 세포 유형을 생산하는 세포 집단.
- [0271] 242. 실시양태 227-241 중 어느 하나에 있어서, 생산된 세포가 대상체로부터 수득된 혈액 샘플, 골수 샘플, 또는 비장 샘플에서 검출되는 세포 집단.
- [0272] 243. 실시양태 182-242 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, 대상체에서 적어도 8, 12, 또는 16주 동안 지속되는 세포 집단.
- [0273] 244. 실시양태 182-243 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, 다계통 조혈 재구성을 제공하는 세포 집단.
- [0274] 245. 실시양태 182-244 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, 비수입 전구 세포를 생산하고, 임의적으로 여기서 비수입 전구 세포의 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단으로 생산된 상기 세포 유형의 수준과 유사하고, 임의적으로 여기서 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단에 의해 생산된 상기 세포 유형의 수준의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 세포 집단.
- [0275] 246. 실시양태 182-244 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, hCD34+hCD38⁻ 세포를 생산하고, 임의적으로 여기서 비수입 전구 세포의 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단으로 생산된 상기 세포 유형의 수준과 유사하고, 임의적으로 여기서 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단에 의해 생산된 상기 세포 유형의 수준의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 세포 집단.
- [0276] 247. 실시양태 182-246 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, 수입 전구 세포를 생산하고, 임의적으로 여기서 비수입 전구 세포의 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단으로 생산된 상기 세포 유형의 수준과 유사하고, 임의적으로 여기서 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단에 의해 생산된 상기 세포 유형의 수준의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 세포 집단.
- [0277] 248. 실시양태 182-247 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, hCD34+hCD38⁺ 세포를 생산하고, 임의적으로 여기서 비수입 전구 세포의 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단으로 생산된 상기 세포 유형의 수준과 유사하고, 임의적으로 여기서 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단에 의해 생산된 상기 세포 유형의 수준의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 세포 집단.
- [0278] 249. 실시양태 182-248 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, CD3⁺ T 세포를 생산하고, 임의적으로 여기서 비수입 전구 세포의 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단으로 생산된 상기 세포 유형의 수준과 유사하고, 임의적으로 여기서 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단에 의해 생산된 상기 세포 유형의 수준의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 세포 집단.
- [0279] 250. 실시양태 182-249 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, CD123⁺ 세포를 생산하고, 임의적으로 여기서 비수입 전구 세포의 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단으로 생산된 상기 세포 유형의 수준과 유사하고, 임의적으로 여기서 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단에 의해 생산된 상기 세포 유형의 수준의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 세포 집단.

- [0280] 251. 실시양태 182-250 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 투여되는 경우, CD10+ 세포를 생산하고, 임의적으로 여기서 비수임 전구 세포의 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단으로 생산된 상기 세포 유형의 수준과 유사하고, 임의적으로 여기서 수준이 CD33 야생형인 다른 면에서 유사한 세포 집단에 의해 생산된 상기 세포 유형의 수준의 적어도 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 세포 집단.
- [0281] 252. 실시양태 182-251 중 어느 하나에 있어서, 조혈 줄기 세포 및 조혈 전구 세포를 포함하는 세포 집단.
- [0282] 253. 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 포함하는 제약 조성물.
- [0283] 254. 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단을 포함하는 제약 조성물.
- [0284] 255. 하기 중 임의의 2개 또는 모두를 포함하는 혼합물, 예를 들어, 반응 혼합물:
- [0285] a) 실시양태 1-45 중 어느 하나의 gRNA, 또는 실시양태 46-73 중 어느 하나의 조성물 또는 키트의 gRNA;
- [0286] b) 세포, 예를 들어, 조혈 세포, 예를 들어, HSC 또는 HPC, 예를 들어, 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 세포.
- [0287] 256. 실시양태 255에 있어서, 세포가 야생형 세포 또는 CD33에 돌연변이를 갖는 세포인 혼합물, 예를 들어, 반응 혼합물.
- [0288] 257. 하기 중 임의의 2개 이상 (예를 들어, 3개 또는 모두)을 포함하는 키트:
- [0289] a) 실시양태 1-45 중 어느 하나의 gRNA, 또는 실시양태 46-73 중 어느 하나의 조성물 또는 키트의 gRNA;
- [0290] b) 세포, 예를 들어, 조혈 세포, 예를 들어, HSC 또는 HPC, 예를 들어, 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 세포;
- [0291] c) Cas9 분자; 및
- [0292] d) CD33을 표적화하는 작용제, 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 작용제.
- [0293] 258. 실시양태 253에 있어서, (a) 및 (b), (a) 및 (c), (a) 및 d), (b) 및 (c), (b) 및 (d), 또는 (c) 및 (d)를 포함하는 키트.
- [0294] 259. 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포), 또는 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단을 제조하는 방법으로,
- [0295] (i) 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 또는 전구 세포, 예를 들어, 야생형 조혈 줄기 또는 전구 세포)를 제공하고,
- [0296] (ii) 세포 내로 표적 도메인을 절단하는 뉴클레아제 (예를 들어, 엔도뉴클레아제)를 도입하며,
- [0297] 이에 의해 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포를 수득하는 것을 포함하는 방법.
- [0298] 260. 실시양태 259에 있어서, (ii)가 세포 내로 표적 도메인에 결합하는 gRNA (예를 들어, 실시양태 1-45 중 어느 하나의 gRNA) 및 이러한 gRNA에 결합하는 엔도뉴클레아제를 도입하는 것을 포함하는 방법.
- [0299] 261. 실시양태 259에 있어서, 엔도뉴클레아제가 ZFN, TALEN, 또는 메가뉴클레아제인 방법.
- [0300] 262. 대상체에게 복수의 실시양태 112-181의 세포, 또는 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단을 투여하는 것을 포함하는, 대상체에게 HSC, HPC, 또는 HSPC를 공급하는 방법.
- [0301] 263. 복수의 실시양태 112-181의 세포, 또는 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.
- [0302] 264. 실시양태 262 또는 263에 있어서, 대상체가 암을 갖고, 여기서 암 세포가 CD33을 발현하는 (예를 들어, 적어도 복수의 암 세포가 CD33을 발현하는) 방법.
- [0303] 265. 실시양태 262-264 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 CD33을 표적화하는 작용제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함하고, 여기서 작용제가 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 방법.
- [0304] 266. 실시양태 265에 있어서, CD33을 표적화하는 작용제가 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 면역 세포인 방법.
- [0305] 267. 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는

전구 세포 또는 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단으로, 여기서 치료가 이를 필요로 하는 대상체에게 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 세포 집단의 유효량을 투여하는 것을 포함하고, 대상체에게 CD33을 표적화하는 작용제의 유효량의 투여하는 것을 추가로 포함하며, 여기서 작용제가 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 방법.

- [0306] 268. 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한, CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 CD33을 표적화하는 작용제로서, 치료가 이를 필요로 하는 대상체에게 CD33을 표적화하는 작용제의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함하고, 대상체에게 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단의 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.
- [0307] 269. 조혈 장애를 치료하는 데 사용하기 위한, 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단, 및 CD33에 결합하는 항원-결합 단편을 포함하는 CD33을 표적화하는 작용제의 조합물로서, 치료가 이를 필요로 하는 대상체에게 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 세포 집단, 및 CD33에 결합하는 작용제의 유효량을 투여하는 것을 포함하는 조합물.
- [0308] 270. 암 면역요법에서 사용하기 위한, 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단.
- [0309] 275. 암 면역요법에서 사용하기 위한, 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단으로서, 여기서 대상체가 조혈 장애를 갖는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 세포 집단.
- [0310] 276. 조혈 장애를 갖는 대상체의 조혈 재증식에서 사용하기 위한, 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단.
- [0311] 277. 조혈 장애를 치료하는 방법에서 사용하기 위한, 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단으로서, 이에 의해 본원에 기술된 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 본원에 기술된 세포 집단이 대상체를 재증식시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 세포 집단.
- [0312] 278. 면역요법에서 CD33을 표적화하는 작용제의 세포독성 효과를 감소시키는 데 사용하기 위한, 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단.
- [0313] 275. CD33을 표적화하는 작용제를 사용하는 면역요법 방법에서 사용하기 위한, 실시양태 112-181 중 어느 하나의 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 실시양태 182-251 중 어느 하나의 세포 집단으로서, 이에 의해 본원에 기술된 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 본원에 기술된 세포 집단이 CD33을 표적화하는 작용제의 세포독성 효과를 감소시키는 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 세포 집단.
- [0314] 276. 실시양태 262-275 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 세포 집단이 CD33을 표적화하는 작용제와 동반적으로 투여되는 방법, 세포, 작용제, 또는 조합물.
- [0315] 277. 실시양태 262-275 중 어느 하나에 있어서, 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 세포 집단이 CD33을 표적화하는 작용제 이전에 투여되는 방법, 세포, 작용제, 또는 조합물.
- [0316] 278. 실시양태 262-275 중 어느 하나에 있어서, CD33을 표적화하는 작용제가 유전자 조작된 조혈 줄기 또는 전구 세포 또는 세포 집단 이전에 투여되는 방법, 세포, 작용제, 또는 조합물.
- [0317] 279. 실시양태 262-278 중 어느 하나에 있어서, 면역 세포가 T 세포인 방법, 세포, 작용제, 또는 조합물.
- [0318] 280. 실시양태 262-279 중 어느 하나에 있어서, 면역 세포, 유전자 조작된 조혈 줄기 및/또는 전구 세포, 또는 양쪽 모두가 동종이형인 방법, 세포, 작용제, 또는 조합물.
- [0319] 281. 실시양태 262-279 중 어느 하나에 있어서, 면역 세포, 유전자 조작된 조혈 줄기 및/또는 전구 세포, 또는 양쪽 모두가 자가인 방법, 세포, 작용제, 또는 조합물.
- [0320] 282. 실시양태 262-281 중 어느 하나에 있어서, 키메라 수용체 내의 항원-결합 단편이 인간 CD33에 특이적으로 결합하는 단일쇄 항체 단편 (scFv)인 방법, 세포, 작용제, 또는 조합물.
- [0321] 283. 실시양태 262-282 중 어느 하나에 있어서, 조혈 장애가 암이고, 암 내의 적어도 복수의 암 세포가 CD33을

발현하는 방법, 세포, 작용제, 또는 조합물.

[0322] 284. 실시양태 262-283 중 어느 하나에 있어서, 대상체가 조혈 악성종양, 예를 들어, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병 (예를 들어, 급성 골수성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병 또는 만성 림프모구성 백혈병, 및 만성 림프구성 백혈병), 또는 다발성 골수종으로부터 선택된 조혈 악성종양을 갖는 것인 방법, 세포, 작용제, 또는 조합물.

[0323] 상기 요약은 본원에 개시된 기술의 실시양태, 장점, 특색 및 용법 중 일부를 비제한적인 방식으로 예시하기 위한 것이다. 본원에 개시된 기술의 다른 실시양태, 장점, 특색 및 용법이 상세한 설명, 도면, 실시예 및 청구범위로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0324] 도면의 간단한 설명

도 1은 TIDE 분석에 의해 측정된 상이한 CD33 gRNA들의 유전자 편집 효율을 나타내는 그래프이다. x축은 검정된 gRNA를 지시하고, y축은 gRNA 표적 좌위에 삽입 또는 결실을 갖는 세포의 백분율을 지시한다. 각각의 gRNA에 대한 4개의 막대는 4명의 상이한 HSC 공여자를 지시한다.

도 2는 FACS 분석에 의해 측정된 상이한 CD33 gRNA들의 유전자 편집 효율을 나타내는 그래프이다. x축은 검정된 gRNA를 지시하고, y축은 CD33 표면 발현에 대해 양성인 세포의 백분율을 지시한다. 각각의 gRNA에 대한 4개의 막대는 4명의 상이한 HSC 공여자를 지시한다.

도 3은 TIDE 분석에 의해 측정된 상이한 CD33 gRNA들의 유전자 편집 효율을 나타내는 그래프이다. x축은 검정된 gRNA를 지시하고, y축은 gRNA 표적 좌위에 삽입 또는 결실을 갖는 세포의 백분율을 지시한다. 각각의 gRNA에 대한 4개의 막대는 4명의 상이한 HSC 공여자를 지시한다.

도 4는 FACS 분석에 의해 측정된 상이한 CD33 gRNA들의 유전자 편집 효율을 나타내는 그래프이다. x축은 검정된 gRNA를 지시하고, y축은 CD33 표면 발현에 대해 양성인 세포의 백분율을 지시한다. 각각의 gRNA에 대한 3개의 막대는 3명의 상이한 HSC 공여자를 지시한다.

도 5a-5d는 CD19 및 CD33 양쪽 모두의 효율적인 다중 게놈 편집을 나타내는 TIDE 검정의 결과를 나타내는 도표이다. 5a: NALM-6 세포에서의 CD19, CD33, 및 CD19+CD33의 게놈 편집을 나타내는 차트. 5b: HSC에서의 CD19, CD33, 및 CD19+CD33의 게놈 편집을 나타내는 차트. 5c: HL-60 세포에서의 CD19, CD33, 및 CD19+CD33의 게놈 편집을 나타내는 차트. 5d: NALM-6 세포에서의 CD19, CD33, 및 CD19 및 CD33 양쪽 모두의 게놈 편집을 나타내는 차트.

도 6a-6c는 단일 RNA 뉴클레오펙션에 비교하여, HSC 및 세포주의 생존율에 대한 CD19 및 CD33 양쪽 모두의 다중 게놈 편집의 효과를 나타내는 뉴클레오펙션 검정의 결과를 나타내는 도표를 포함한다. 뉴클레오펙션에 사용된 gRNA가 X축에 지시된다. 6a: 게놈 편집 후의 HSC 세포의 퍼센트 생존율을 나타내는 차트. 6b: 게놈 편집 후의 Nalm-6 세포의 퍼센트 생존율을 나타내는 차트. 왼쪽에서 오른쪽으로, 각각의 막대 3개 세트는 0, 24h, 및 48h에 상응한다. 6c: 게놈 편집 후의 HL-60 세포의 퍼센트 생존율을 나타내는 차트. 왼쪽에서 오른쪽으로, 각각의 4개의 막대 세트는 0, 48h, 96h, 및 7d에 상응한다.

도 7은 AML 세포주에서의 표적 발현을 나타낸다. MOLM-13 및 THP-1 세포 및 비염색 대조군에서의 CD33, CD123, 및 CLL1의 발현을 유동 세포측정법 분석에 의해 결정하였다. X축은 항체 염색의 강도를 지시하고, Y축은 세포 수에 상응한다.

도 8은 CD33- 및 CD123-변형 MOLM-13 세포를 나타낸다. 야생형 (WT), CD33^{-/-}, CD123^{-/-} 및 CD33^{-/-} CD123^{-/-} MOLM-13 세포에서의 CD33 및 CD123의 발현을 유동 세포측정법에 의해 평가하였다. CD33^{-/-} 또는 CD123^{-/-} MOLM-13 세포의 생성을 위해, WT MOLM-13 세포에 CD33- 또는 CD123-표적화 RNP를 전기천공한 후, CD33- 또는 CD123-음성 세포의 유동 세포측정법 분류가 이어졌다. CD33^{-/-} 세포에 CD123-표적화 RNP를 전기천공함으로써 CD33^{-/-}CD123^{-/-} MOLM-13 세포가 생성되었고, CD123-음성 집단에 대해 분류되었다. X축은 항체 염색의 강도를 지시하고, Y축은 세포 수에 상응한다.

도 9는 CD33 및 CD123 CAR-T의 시험관내 세포독성 검정을 나타낸다. 항-CD33 CAR-T 및 항-CD123 CAR-T를 야생형 (WT), CD33^{-/-}, CD123^{-/-}, 및 CD33^{-/-} CD123^{-/-} MOLM-13 세포와 함께 인큐베이션하고, 세포독성을 유동 세포측정법에 의해 평가하였다. 형질도입되지 않은 T 세포가 모의 CAR-T 대조군으로서 사용되었다. CARpool 군은 항-

CD33 및 항-CD123 CAR-T 세포의 1:1 풀링 조합으로 구성되었다. 스튜던트 t 검정이 사용되었다. ns = 유의하지 않음; *P < 0.05; **P < 0.01. Y축은 특이적 사멸의 백분율을 지시한다.

도 10은 CD33^{-/-} 및 CLL1^{-/-} 변형 HL-60 세포를 나타낸다. 야생형 (WT), CD33^{-/-}, CLL1^{-/-}, 및 CD33^{-/-} CLL1^{-/-} HL-60 세포에서의 CD33 및 CLL1의 발현을 유동 세포측정법에 의해 평가하였다. CD33^{-/-} 또는 CLL1^{-/-} HL-60 세포의 생성을 위해, WT HL-60 세포에 CD33^{-/-} 또는 CLL1^{-/-} 표적화 RNP를 전기천공한 후, CD33^{-/-} 또는 CLL1^{-/-} 음성 세포의 유동 세포측정법 분류가 이어졌다. CD33^{-/-} 세포에 CLL1^{-/-} 표적화 RNP를 전기천공함으로써 CD33^{-/-} CLL1^{-/-} HL-60 세포가 생성되었고, CLL1^{-/-} 음성 집단에 대해 분류되었다. X축은 항체 염색의 강도를 지시하고, Y축은 세포 수에 상응한다.

도 11은 CD33 및 CLL1 CAR-T의 시험관내 세포독성 검정을 나타낸다. 항-CD33 CAR-T 및 항-CLL1 CAR-T를 야생형 (WT), CD33^{-/-}, CLL1^{-/-}, 및 CD33^{-/-} CLL1^{-/-} HL-60 세포와 함께 인큐베이션하고, 세포독성을 유동 세포측정법에 의해 평가하였다. 형질도입되지 않은 T 세포가 모의 CAR-T 대조군으로서 사용되었다. CARpool 군은 항-CD33 및 항-CLL1 CAR-T 세포의 1:1 풀링 조합으로 구성되었다. 스튜던트 t 검정이 사용되었다. ns = 유의하지 않음; *P < 0.05; **P < 0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001. Y축은 특이적 사멸의 백분율을 지시한다.

도 12는 CD34⁺ 세포의 유전자-편집 효율을 나타낸다. 인간 CD34⁺ 세포에 Cas9 단백질 및 CD33^{-/-}, CD123^{-/-}, 또는 CLL1^{-/-} 표적화 gRNA를 단독으로 또는 조합하여 전기천공하였다. CD33, CD123, 또는 CLL1 좌위의 편집 효율을 생어(Sanger) 시퀀싱 및 TIDE 분석에 의해 결정하였다. Y축은 편집 효율 (TIDE에 의한 %)을 지시한다.

도 13a-13c는 유전자-편집된 CD34⁺ 세포의 시험관내 콜로니 형성을 나타낸다. 대조군 또는 CD33, CD123, CLL1^{-/-} 변형 CD34⁺ 세포를 전기천공 2일 후에 메토컬트(Methocult)에 플레이팅하고, 14일 후에 콜로니 형성에 대해 채점하였다. BFU-E: 파열 형성 단위-적혈구; CFU-GM: 콜로니 형성 단위-과립구/대식세포; CFU-GEMM: 다능성 골수 전구 세포 (과립구, 적혈구, 단핵구, 및 거대핵세포를 생성함)의 콜로니 형성 단위. 스튜던트 t 검정이 사용되었다.

도 14a-14c는 겐투주맵 오조가미신 (GO) 처리 후의 다양한 시점의 CD33 gRNA A로 편집된 CD34 + HSC의 집단의 분석을 나타내는 도표 및 표를 포함한다. **14a:** 겐투주맵 오조가미신 처리 후의 CD33 편집의 분석을 나타내는 사진. CD33 gRNA A를 사용하여 편집된 샘플 내의 편집된 세포 ("KO")의 백분율을 TIDE 분석에 의해 평가하였다. **14b:** 지시된 바와 같은 시간에 걸쳐 겐투주맵 오조가미신의 부재 하의 지시된 세포 집단 내의 퍼센트 CD14⁺ 세포 (골수 분화)를 나타내는 차트. **14c:** 지시된 바와 같은 시간에 걸쳐 겐투주맵 오조가미신 처리 후의 지시된 세포 집단 내의 퍼센트 CD14⁺ 세포 (골수 분화)를 나타내는 차트.

도 15는 전기천공 및 편집 후의 지시된 시간에 걸쳐 gRNA A, gRNA B, gRNA O 또는 gCtrl (대조군)에 의해 편집된 CD33KO mPB CD34⁺ HSPC의 생존율을 나타낸다.

도 16은 CD33KO 세포 또는 대조군 세포가 이식된 NSG 마우스의 혈액, 비장 및 골수로부터 분리된 세포를 분석하는 데 사용된 유동 세포측정법 분석 및 게이팅 프로토콜의 개략도이다.

도 17a-17d는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, O, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후 제8주의 혈액 μ l 당 hCD33⁺ 세포, hCD45⁺ 세포, hCD14⁺ 세포, 또는 CD11b⁺ 세포 각각의 정량을 나타낸다.

도 18a-18c는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, O, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후의 혈액 내의 제8주, 제12주 또는 제16주 각각의 hCD45⁺ 세포의 백분율의 정량을 나타낸다.

도 19a-19c는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, O, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후의 혈액 내의 제8주, 제12주 또는 제16주 각각의 hCD33⁺ 세포의 백분율의 정량을 나타낸다.

도 20a-20c는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, O, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후의 혈액 내의 제8주, 제12주 또는 제16주 각각의 hCD19⁺ 세포의 백분율의 정량을 나타낸다.

도 21a-21c는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, O, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는

는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후의 혈액 내의 제8주, 제12주 또는 제16주 각각의 hCD14⁺ 세포의 백분율의 정량을 나타낸다.

도 22a-22c는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, 0, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후의 혈액 내의 제8주, 제12주 또는 제16주 각각의 hCD11b⁺ 세포의 백분율의 정량을 나타낸다.

도 23a-23c는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, 0, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후의 혈액 내의 제8주, 제12주 또는 제16주 각각의 CD33+CD14⁺ (왼쪽 그래프) 또는 CD33KO 유래 단핵구 (hCD33-CD14⁺) (오른쪽 그래프)의 퍼센트의 정량을 나타낸다.

도 24a-24b는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, 0, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후 제16주의 골수 내의 hCD45⁺ 세포 또는 hCD33⁺ 세포 각각의 백분율의 정량을 나타낸다.

도 25a-25d는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, 0, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후의 골수 내의 제16주의 hCD19⁺ 세포, hCD14⁺ 세포, hCD11b⁺ 세포, 또는 hCD3⁺ 세포 각각의 백분율의 정량을 나타낸다.

도 26a-26b는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, 0, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후 제16주의 골수 내의 hCD33+CD14⁺ 세포 또는 hCD33-CD14⁺ 세포 각각의 백분율의 정량을 나타낸다.

도 27a-d는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, 0, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후의 골수 내의 제16주의 hCD34⁺ 세포, hCD38⁺ 세포, hCD34+38⁻ 비수입 전구 세포, 또는 hCD34+CD38⁺ 수입 전구 세포 각각의 백분율의 정량을 나타낸다.

도 28a는 하기 gRNA로 편집된 CD33KO 세포가 투여된 마우스에서의 편집된 세포의 백분율을 나타낸다: gRNA 0 (왼쪽 패널), gRNA A (중앙 패널), 또는 gRNA B (오른쪽 패널). **도 28b-28d**는 CD33KO 세포를 생성시키는 것에서 사용된 각각의 gRNA (각각 gRNA 0, gRNA A, 및 gRNA B)에 대해 단리된 골수 세포에서 관찰된 상이한 편집 이벤트들을 나타내는 상위 5개의 INDEL 종을 나타낸다. gRNA 0에 대한 X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 5개의 INDEL 종은 -1bp, -2bp, +1bp, -2bp, 및 -5bp이다. gRNA A에 대한 X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 5개의 INDEL 종은 -1bp, +1bp, -1bp, -3bp, 및 -2bp이다. gRNA B에 대한 X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 5개의 INDEL 종은 +1bp, -3bp, -1bp, -2bp, 및 -1bp이다.

도 29a-29f는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, 0, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후 제16주의 비장 내의 hCD45⁺ 세포, hCD33⁺ 세포, hCD14⁺ 세포, hCD11b⁺ 세포, hCD19⁺ 세포, 또는 hCD3⁺ 세포 각각의 백분율의 정량을 나타낸다.

도 30a-30c는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, 0, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후 제16주의 혈액 내의 hCD11b⁺ 세포, hCD33+CD11b⁺ 세포, 또는 hCD33-CD11b⁺ 세포 각각의 백분율의 정량을 나타낸다.

도 31a-31c는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, 0, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후 제16주의 골수 내의 hCD11b⁺ 세포, hCD33+CD11b⁺ 세포 또는 hCD33-CD11b⁺ 세포 각각의 백분율의 정량을 나타낸다.

도 32a는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, 0, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후 제16주의 혈액 내의 hCD123⁺ 세포의 백분율의 정량을 나타낸다. **도 32b**는 지시된 gRNA (X축의 왼쪽에서 오른쪽으로의 gRNA: 대조군, 0, A 또는 B)로 편집된 대조군 세포 또는 CD33KO 세포의 마우스에서의 이식 후 제16주의 골수 내의 hCD123⁺ 세포 (왼쪽) 또는 hCD10⁺ 세포 (오른쪽)의 백분율의 정량을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0325] 발명의 상세한 설명

[0326] 정의

- [0327] 표적 도메인과의 gRNA 상호작용과 관련하여 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "결합하다"는 gRNA 분자 및 표적 도메인이 복합체를 형성하는 것을 지칭한다. 복합체는 듀플렉스 구조를 형성하는 2개의 가닥, 또는 다중 가닥 복합체를 형성하는 3개 이상의 가닥을 포함할 수 있다. 결합은 더욱 포괄적인 프로세스, 예컨대 Cas 엔도뉴클레아제에 의한 표적 도메인의 절단에서의 단계를 구성할 수 있다. 일부 실시양태에서, gRNA는 완벽한 상보성으로 표적 도메인에 결합하고, 다른 실시양태에서, gRNA는 부분적인 상보성으로, 예를 들어, 1개 이상의 미스매치가 있으면서 표적 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, gRNA가 표적 도메인에 결합할 때, gRNA의 전체 표적화 도메인이 표적화 도메인과 염기 쌍을 이룬다. 다른 실시양태에서, 표적 도메인의 일부분만 및/또는 표적화 도메인의 일부분만 서로 염기 쌍을 이룬다. 한 실시양태에서, 상호작용은 표적 도메인-매개 절단 이벤트를 매개하는 데 충분하다.
- [0328] 본원에서 사용된 바와 같은 "Cas9 분자"는 gRNA와 상호작용할 수 있고, gRNA와 협력하여 표적 도메인을 포함하는 부위로 귀소 또는 국소화할 수 있는 분자 또는 폴리펩티드를 지칭한다. Cas9 분자는 천연 발생 Cas9 분자, 및 천연 발생 Cas9 분자와 예를 들어 적어도 1개의 아미노산 잔기만큼 상이한 조작, 변경 또는 변형된 Cas9 분자를 포함한다.
- [0329] 용어 "gRNA" 및 "가이드 RNA"는 전체적으로 상호교환가능하게 사용되고, 표적 핵산으로의 gRNA/Cas9 분자 복합체의 특이적인 표적화 또는 귀소를 촉진하는 핵산을 지칭한다. gRNA는 본원에서 때때로 sgRNA로 지칭되는 단일 분자형 (단일 RNA 분자를 가짐), 또는 모듈형 (1개를 초과하고 전형적으로 2개인 별개의 RNA 분자를 포함함)일 수 있다. gRNA는 숙주 세포의 게놈 내의 표적 도메인에 결합할 수 있다. gRNA (예를 들어, 그의 표적화 도메인)은 부분적으로 또는 완전히 표적 도메인에 상보적일 수 있다. gRNA는 "스캐폴드 서열" (예를 들어, tracrRNA 서열)을 또한 포함할 수 있고, 이는 (예를 들어, gRNA 서열의 표적화 도메인에 의해) gRNA 서열에 결합된 표적 도메인에 Cas9 분자를 동원시킨다. 스캐폴드 서열은 적어도 1개의 스템-루프(stem-loop) 구조를 포함할 수 있고, 엔도뉴클레아제를 동원시킨다. 예시적인 스캐폴드 서열을, 예를 들어, 문헌 [Jinek, et al. Science (2012) 337(6096):816-821], [Ran, et al. Nature Protocols (2013) 8:2281-2308], PCT 출원 번호 WO2014/093694, 및 PCT 출원 번호 WO2013/176772에서 확인할 수 있다.
- [0330] 용어 "돌연변이"는 참조 서열, 예를 들어, 상응하는 야생형 핵산에 비교된 핵산에서의 유전자 변화 (예를 들어, 삽입, 결실, 또는 치환)를 지칭하도록 본원에서 사용된다. 일부 실시양태에서, 유전자에 대한 돌연변이는 유전자에 의해 생산된 단백질을 탈표적화시킨다. 일부 실시양태에서, 탈표적화된 CD33 단백질은 CD33을 표적화하는 작용제에 결합되지 않거나, 또는 더 낮은 수준으로 결합된다.
- [0331] gRNA의 "표적화 도메인"은 표적 핵산 상의 "표적 도메인"에 상보적이다. gRNA의 코어 도메인에 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 표적 핵산의 가닥은 본원에서 표적 핵산의 "상보적 가닥"으로 지칭된다. 표적화 도메인의 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 확인할 수 있다.
- [0332] 뉴클레아제
- [0333] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 뉴클레아제를 사용하여 본원에 기술된 세포 (예를 들어, HSC 또는 HPC)가 제조된다. 예시적인 뉴클레아제는 Cas 분자 (예를 들어, Cas9 또는 Cas12a), TALEN, ZFN, 및 메가뉴클레아제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 뉴클레아제는 본원에 기술된 CD33 gRNA (예를 들어, 표 2에 따름)와 조합되어 사용된다.
- [0334] Cas9 분자
- [0335] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 CD33 gRNA는 Cas9 분자와 복합체를 이룬다. 다양한 Cas9 분자가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, gRNA/Cas9 분자 복합체를 CD33 내의 표적 도메인에 표적화하기 위한 원하는 PAM 특이성을 갖는 Cas9 분자가 선택된다. 일부 실시양태에서, 세포의 유전자 조작은 1개 이상 (예를 들어, 1, 2, 3 개 이상)의 Cas9 분자를 세포 내로 도입하는 것을 또한 포함한다.
- [0336] 다양한 종의 Cas9 분자가 본원에 기술된 방법 및 조성물에서 사용될 수 있다. 실시양태에서, Cas9 분자는 에스. 피오게네스(*S. pyogenes*) (SpCas9), 에스. 아우레우스(*S. aureus*) (SaCas9) 또는 에스. 썬모필루스(*S. thermophilus*)의 것이거나 또는 그로부터 유래된다. 추가적인 적절한 Cas9 분자는 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*) (NmCas9), 아시도보락스 아베나에(*Acidovorax avenae*), 악티노바실루스 플레우로뉴모니아에(*Actinobacillus pleuropneumoniae*), 악티노바실루스 속시노게네스(*Actinobacillus succinogenes*), 악티노바실루스 수이스(*Actinobacillus suis*), 악티노마이세

스(*Actinomyces*) 종, 시클리필루스 데니트리피칸스(*cycliphilus denitrificans*), 아미노모나스 파우시보란스(*Aminomonas paucivorans*), 바실루스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실루스 스미티이(*Bacillus smithii*), 바실루스 투링기엔시스(*Bacillus thuringiensis*), 박테로이데스(*Bacteroides*) 종, 블라스토피렐라 마리나(*Blastopirellula marina*), 브라디리조비움(*Bradyrhizobium*) 종, 브레비바실루스 라테로스포르스(*Brevibacillus laterosporus*), 캄필로박터 콜라이(*Campylobacter coli*), 캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*) (CjCas9), 캄필로박터 라리(*Campylobacter lari*), 칸디다투스 푸니세이스피릴룸(*Candidatus Puniceispirillum*), 클로스트리디움 셀룰로리티쿰(*Clostridium cellulolyticum*), 클로스트리디움 페르프링겐스(*Clostridium perfringens*), 코리네박테리움 아콜렌스(*Corynebacterium accolens*), 코리네박테리움 디프테리아(*Corynebacterium diphtheria*), 코리네박테리움 마트루코티이(*Corynebacterium matruchotii*), 디노로세오박터 시바에(*Dinoroseobacter shibae*), 유박테리움 돌리쿰(*Eubacterium dolichum*), 감마 프로테오박테리움(*gamma proteobacterium*), 글루코나세토박터 디아조트로피쿠스(*Gluconacetobacter diazotrophicus*), 헤모필루스 파라인플루엔자에(*Haemophilus parainfluenzae*), 헤모필루스 스푸토룸(*Haemophilus sputorum*), 헬리코박터 카나덴시스(*Helicobacter canadensis*), 헬리코박터 시나에디(*Helicobacter cinaedi*), 헬리코박터 무스텔라에(*Helicobacter mustelae*), 일리오박터 폴리트로푸스(*Ilyobacter polytropus*), 킨젤라 킹가에(*Kingella kingae*), 락토바실루스 크리스파투스(*Lactobacillus crispatus*), 리스테리아 이바노비이(*Listeria ivanovii*), 리스테리아 모노시토크네스(*Listeria monocytogenes*), 리스테리아세아에 박테리움(*Listeriaceae bacterium*), 메틸로시스티스(*Methylocystis*) 종, 메틸로시누스 트리코스포리움(*Methylosinus trichosporium*), 모빌룬쿠스 물리에리스(*Mobiluncus mulieris*), 네이세리아 바실리포르미스(*Neisseria bacilliformis*), 네이세리아 시네레아(*Neisseria cinerea*), 네이세리아 플라베센스(*Neisseria flavescens*), 네이세리아 락타미카(*Neisseria lactamica*), 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*), 네이세리아(*Neisseria*) 종, 네이세리아 와드스워티이(*Neisseria wadsworthii*), 니트로소모나스(*Nitrosomonas*) 종, 파르비바쿨룸 라바멘티보란스(*Parvibaculum lavamentivorans*), 파스테우렐라 톨토시다(*Pasteurella multocida*), 파스코락토박테리움 숙시나투텐스(*Phascolarctobacterium succinatutens*), 랄스토니아 시지기이(*Ralstonia syzygii*), 로도슈도모나스 팔루스트리스(*Rhodopseudomonas palustris*), 로도볼룸(*Rhodovulum*) 종, 시몬시엘라 무엘레리(*Simonsiella muelleri*), 스피نگ모나스(*Sphingomonas*) 종, 스포로락토바실루스 비네아에(*Sporolactobacillus vineae*), 스타필로코쿠스 루그두넨시스(*Staphylococcus lugdunensis*), 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*) 종, 서브돌리그라눌룸(*Subdoligranulum*) 종, 티스트렐라 모빌리스(*Tistrella mobilis*), 트레포네마(*Treponema*) 종, 또는 베르미네프로박터 에이세니아에(*Verminephrobacter eiseniae*)의 것이거나 또는 그로부터 유래된 것을 포함한다.

- [0337] 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 천연 발생 Cas9 분자이다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는, 예를 들어, 적어도 1개의 아미노산 잔기만큼, 참조 서열, 예를 들어, 가장 유사한 천연 발생 Cas9 분자 또는 전문이 본원에 참조로 포함된 W02015157070의 표 50의 서열과 상이한 조작, 변경 또는 변형된 Cas9 분자이다.
- [0338] 천연 발생 Cas9 분자는 전형적으로 인식 (REC) 엽 및 뉴클레아제 (NUC) 엽의 2개의 엽을 포함하고, 각각은, 예를 들어, W02015157070, 예를 들어, 그의 도 9A-9B에 기술된 도메인을 추가로 포함한다 (상기 출원은 전문이 본원에 참조로 포함된다).
- [0339] REC 엽은 아르기닌-풍부 브리지 나선(bridge helix) (BH), REC1 도메인, 및 REC2 도메인을 포함한다. REC 엽은 Cas9-특이적 기능성 도메인인 것으로 보인다. BH 도메인은 긴 알파 나선 및 아르기닌 풍부 영역이고, 에스. 피로게네스 Cas9의 서열의 아미노산 60-93을 포함한다. REC1 도메인은 반복:항-반복 듀플렉스, 예를 들어, gRNA 또는 tracrRNA의 것의 인식에서 수반된다. REC1 도메인은 에스. 피로게네스 Cas9의 서열의 아미노산 94 내지 179 및 308 내지 717에 2개의 REC1 모티프를 포함한다. 이러한 2개의 REC1 도메인은, 선형 1차 구조에서는 REC2 도메인에 의해 분리되지만, 3차 구조에서는 REC1 도메인을 형성하도록 조립된다. REC2 도메인, 또는 그의 일부분 또한 반복:항-반복 듀플렉스의 인식에서 역할을 할 수 있다. REC2 도메인은 에스. 피로게네스 Cas9의 서열의 아미노산 180-307을 포함한다.
- [0340] NUC 엽은 RuvC 도메인 (본원에서 RuvC-유사 도메인으로도 지칭됨), HNH 도메인 (본원에서 HNH-유사 도메인으로도 지칭됨), 및 PAM-상호작용 (PI) 도메인을 포함한다. RuvC 도메인은 레트로바이러스 인테그라제 수퍼패밀리 구성원과 구조적 유사성을 공유하고, 단일 가닥, 예를 들어, 표적 핵산 분자의 비-상보적 가닥을 절단한다. RuvC 도메인은 각각 에스. 피로게네스 Cas9의 서열의 아미노산 1-59, 718-769, 및 909-1098의 3개의 분할된 RuvC 모티프 (RuvC I, RuvCII, 및 RuvCIII)이고, 종종 관련 기술 분야에서 통상적으로 RuvCI 도메인, 또는 N-말단 RuvC 도메인, RuvCII 도메인, 및 RuvCIII 도메인으로 지칭됨)로부터 조립된다. REC1 도메인과 유사하게, 3개의 RuvC 모티프는 1차 구조에서는 선형적으로 다른 도메인에 의해 분리되지만, 3차 구조에서는, 3개의 RuvC

모티프가 조립되어 RuvC 도메인을 형성한다. HNH 도메인은 HNH 엔도뉴클레아제와 구조적 유사성을 공유하고, 단일 가닥, 예를 들어, 표적 핵산 분자의 상보적 가닥을 절단한다. HNH 도메인은 RuvC II-III 모티프 사이에 놓이고, 에스. 피로게네스 Cas9의 서열의 아미노산 775-908을 포함한다. PI 도메인은 표적 핵산 분자의 PAM과 상호작용하고, 에스. 피로게네스 Cas9의 서열의 아미노산 1099-1368을 포함한다.

[0341] 천연 발생 박테리아 Cas9 분자 (Jinek et al., *Science*, 343(6176): 1247997, 2014) 및 에스. 피로게네스 Cas9와 가이드 RNA (예를 들어, crRNA 및 tracrRNA의 합성 융합물) (문헌 [Nishimasu et al., *Cell*, 156:935-949, 2014]; 및 [Anders et al., *Nature*, 2014, doi: 10.1038/nature13579])에 대한 결정 구조가 결정되었다.

[0342] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 Cas9 분자는 뉴클레아제 활성, 예를 들어, 이중 가닥 파손 활성을 갖는다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 엔도뉴클레아제의 촉매 잔기 중 하나를 불활성화시키도록 변형되었다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 Nickase이고, 단일 가닥 파손을 일으킨다. 예를 들어, 문헌 [Dabrowska et al. *Frontiers in Neuroscience* (2018) 12(75)]을 참조한다. 효소의 RuvC 및 HNH 촉매 도메인에서의 1개 이상의 돌연변이가 Cas9 효율을 개선시킬 수 있는 것으로 나타났다. 예를 들어, 문헌 [Sarai et al. *Currently Pharma. Biotechnol.* (2017) 18(13)]을 참조한다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 제2 도메인, 예를 들어, DNA 또는 염색질을 변형시키는 도메인, 예를 들어, 데아미나제 또는 데메틸라제 도메인에 융합된다. 일부 이러한 실시양태에서, Cas9 분자는 그의 엔도뉴클레아제 활성을 제거하도록 변형된다.

[0343] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 Cas9 분자는 상동성 기반 복구 (HDR)를 위한 주형과 함께 투여된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 Cas9 분자는 HDR 주형 없이 투여된다.

[0344] 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 효소의 특이성을 강화하도록 (예를 들어, 탈표적 효과를 감소시키고, 강건한 표적 적응 절단을 유지하도록) 변형된다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 특이성이 강화된 Cas9 변이체 (예를 들어, eSPCas9)이다. 예를 들어, 문헌 [Slaymaker et al. *Science* (2016) 351 (6268): 84-88]을 참조한다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 정확도가 높은 Cas9 변이체 (예를 들어, SpCas9-HF1)이다. 예를 들어, 문헌 [Kleinstiver et al. *Nature* (2016) 529: 490-495]을 참조한다.

[0345] 다양한 Cas9 분자가 관련 기술 분야에 공지되어 있고, 다양한 공급원으로부터 취득될 수 있고/거나 효소의 하나 이상의 활성 또는 특이성을 조정하도록 조작/변형될 수 있다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 하나 이상의 PAM 서열을 인식하도록 조작/변형되었다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 조작/변형 없이 Cas9 분자가 인식하는 PAM 서열과 상이한 하나 이상의 PAM 서열을 인식하도록 조작/변형되었다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 효소의 탈표적 활성을 감소시키도록 조작/변형되었다.

[0346] 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제 활성의 특이성을 변경시키도록 (예를 들어, 탈표적 절단을 감소시키고, 세포에서의 엔도뉴클레아제 활성 또는 수명을 감소시키고, 상동성 기반 재조합을 증가시키고, 비-상동성 단부 연결을 감소시키도록) Cas9 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 추가로 변형된다. 예를 들어, 문헌 [Komor et al. *Cell* (2017) 168: 20-36]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제의 PAM 인식을 변경시키도록 Cas9 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 변형된다. 예를 들어, Cas9 분자 SpCas9는 PAM 서열 NGG를 인식하는 반면, 엔도뉴클레아제의 1개 이상의 변형을 포함하는 SpCas9의 완화된 변이체 (예를 들어, VQR SpCas9, EQR SpCas9, VRER SpCas9)는 PAM 서열 NGA, NGAG, NGCG를 인식할 수 있다. 변형된 Cas9 분자의 PAM 인식은 이러한 Cas9 분자가 변형되지 않은 Cas9 분자에 비교하여 더 많은 잠재적인 PAM 서열을 인식하면 "완화된" 것으로 간주된다. 예를 들어, Cas9 분자 SaCas9는 PAM 서열 NNGRRT를 인식하는 반면, 1개 이상의 변형을 포함하는 SaCas9의 완화된 변이체 (예를 들어, KKH SaCas9)는 PAM 서열 NNNRRT를 인식할 수 있다. 한 예에서, Cas9 분자 FnCas9는 PAM 서열 NNG를 인식하는 반면, 엔도뉴클레아제의 1개 이상의 변형을 포함하는 FnCas9의 완화된 변이체 (예를 들어, RHA FnCas9)는 PAM 서열 YG를 인식할 수 있다. 한 예에서, Cas9 분자는 치환 돌연변이 S542R 및 K607R을 포함하는 Cpf1 엔도뉴클레아제이고, PAM 서열 TYCV를 인식한다. 한 예에서, Cas9 분자는 치환 돌연변이 S542R, K607R, 및 N552R을 포함하는 Cpf1 엔도뉴클레아제이고, PAM 서열 TATV를 인식한다. 예를 들어, 문헌 [Gao et al. *Nat. Biotechnol.* (2017) 35(8): 789-792]을 참조한다.

[0347] 일부 실시양태에서, 1개를 초과하는 (예를 들어, 2개, 3개, 또는 이를 초과하는 개수의) Cas 분자, 예를 들어, Cas9 분자가 사용된다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자 중 적어도 1개는 Cas9 효소이다. 일부 실시양태에서, Cas 분자 중 적어도 1개의 Cpf1 효소이다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자 중 적어도 1개는 스트렙토코쿠스 피로게네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자 중 적어도 1개는 스트렙토코쿠스 피로게네스로부터 유래되고, 적어도 1개의 Cas9 분자는 스트렙토코쿠스 피로게네스가 아닌 생물로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 염기 편집기이다. 염기 편집기 엔도뉴클레아제는 기능성 도메인에

융합된 촉매적으로 불활성인 Cas9 분자를 일반적으로 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Eid et al. *Biochem. J.* (2018) 475(11): 1955-1964]; [Rees et al. *Nature Reviews Genetics* (2018) 19:770-788]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 촉매적으로 불활성인 Cas9 분자는 dCas9이다. 일부 실시양태에서, 촉매적으로 불활성인 Cas9 분자 (dCas9)는 1개 이상의 우라실 글리코실라제 억제제 (UGI) 도메인에 융합된다. 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제는 아데닌 염기 편집기 (ABE), 예를 들어 RNA 아데닌 데아미나제 TadA로부터 진화된 ABE에 융합된 dCas9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제는 시티딘 데아미나제 효소 (예를 들어, APOBEC 데아미나제, pmCDA1, 활성화-유도 시티딘 데아미나제 (AID))에 융합된 dCas9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 촉매적으로 불활성인 Cas9 분자는 활성이 감소되었고, nCas9이다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 1개 이상의 우라실 글리코실라제 억제제 (UGI) 도메인에 융합된 nCas9를 포함한다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 아데닌 염기 편집기 (ABE), 예를 들어 RNA 아데닌 데아미나제 TadA로부터 진화된 ABE에 융합된 nCas9를 포함한다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 시티딘 데아미나제 효소 (예를 들어, APOBEC 데아미나제, pmCDA1, 활성화-유도 시티딘 데아미나제 (AID))에 융합된 nCas9를 포함한다.

[0348] 염기 편집기의 예는, 비제한적으로, BE1, BE2, BE3, HF-BE3, BE4, BE4max, BE4-Gam, YE1-BE3, EE-BE3, YE2-BE3, YEE-CE3, VQR-BE3, VRER-BE3, SaBE3, SaBE4, SaBE4-Gam, Sa(KKH)-BE3, 타겟(Target)-AID, 타겟-AID-NG, xBE3, eA3A-BE3, BE-PLUS, TAM, CRISPR-X, ABE7.9, ABE7.10, ABE7.10*, xABE, ABESa, VQR-ABE, VRER-ABE, Sa(KKH)-ABE, 및 CRISPR-SKIP를 포함한다. 염기 편집기의 추가적인 예를, 예를 들어, 미국 공개 번호 2018/0312825A1, 미국 공개 번호 2018/0312828A1, 및 PCT 공개 번호 WO 2018/165629A1에서 확인할 수 있고, 이들은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0349] 일부 실시양태에서, 표적 부위에서의 염기 절단 복구를 억제하고 세포 미스매치 복구를 유도하도록 염기 편집기가 추가로 변형되었다. 본원에 기술된 Cas9 분자 중 임의의 것이 Cas9 분자를 분해 및 엑소뉴클레아제 활성으로부터 보호하기 위해 Gam 도메인 (박테리오파지 뮤 단백질)에 융합될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Eid et al. *Biochem. J.* (2018) 475(11): 1955-1964]을 참조한다.

[0350] 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 Cas 엔도뉴클레아제의 클래스 2 유형 V에 속한다. 클래스 2 유형 V Cas 엔도뉴클레아제는 유형 V-A, 유형 V-B, 유형 V-C, 및 유형 V-U로 추가로 카테고리화될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Stella et al. *Nature Structural & Molecular Biology* (2017)]을 참조한다. 일부 실시양태에서, Cas 분자는 유형 V-A Cas 엔도뉴클레아제, 예컨대 Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 유형 V-B Cas 엔도뉴클레아제, 예컨대 C2c1 엔도뉴클레아제이다. 예를 들어, 문헌 [Shmakov et al. *Mol Cell* (2015) 60: 385-397]을 참조한다. 일부 실시양태에서, Cas 분자는 Mad7이다. 대안적으로 또는 추가적으로, Cas9 분자는 Cpf1 뉴클레아제 또는 그의 변이체이다. 관련 기술 분야의 통상의 기술자가 이해할 바와 같이, Cpf1 뉴클레아제는 Cas12a로 지칭될 수도 있다. 예를 들어, 문헌 [Strohkendl et al. *Mol. Cell* (2018) 71: 1-9]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 조성물 또는 방법은 프로베텔라(*Provetella*) 종 또는 프란시셀라(*Francisella*) 종, 아시다미노코쿠스(*Acidaminococcus*) 종 (AsCpf1), 라크노스피라세아에 박테리움(*Lachnospiraceae bacterium*) (LpCpf1), 또는 유박테리움 렉탈(*Eubacterium rectale*)로부터 유래된 Cpf1 뉴클레아제를 수반하거나, 또는 숙주 세포가 이를 발현한다. 일부 실시양태에서, Cpf1 뉴클레아제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 숙주 세포에서의 발현에 대해 코돈 최적화될 수 있다. 일부 실시양태에서, Cpf1 엔도뉴클레아제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 단백질의 활성을 변경하도록 추가로 변형될 수 있다.

[0351] 일부 실시양태에서, Cas 분자 (예를 들어, Cas9 또는 Cas12a)의 촉매적으로 불활성인 변이체가 본원에 기술된 방법에 따라 사용된다. Cpf1 (Cas12a)의 촉매적으로 불활성인 변이체는 dCas12a로 지칭될 수 있다. 본원에 기술된 바와 같이, Cpf1의 촉매적으로 불활성인 변이체는 염기 편집기를 형성하도록 기능성 도메인에 융합될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Rees et al. *Nature Reviews Genetics* (2018) 19:770-788]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 촉매적으로 불활성인 Cas9 분자는 dCas9이다. 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제는 1개 이상의 우라실 글리코실라제 억제제 (UGI) 도메인에 융합된 dCas12a를 포함한다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 아데닌 염기 편집기 (ABE), 예를 들어 RNA 아데닌 데아미나제 TadA로부터 진화된 ABE에 융합된 dCas12a를 포함한다. 일부 실시양태에서, Cas 분자는 시티딘 데아미나제 효소 (예를 들어, APOBEC 데아미나제, pmCDA1, 활성화-유도 시티딘 데아미나제 (AID))에 융합된 dCas12a를 포함한다.

[0352] 대안적으로 또는 추가적으로, Cas9 분자는 Cas14 엔도뉴클레아제 또는 그의 변이체일 수 있다. Cas14 엔도뉴클레아제는 고세균으로부터 유래되고, 크기가 더 작은 경향이 있다 (예를 들어, 400-700개의 아미노산). 추가적으로, Cas14 엔도뉴클레아제는 PAM 서열을 필요로 하지 않는다. 예를 들어, 문헌 [Harrington et al. *Science*

(2018)]을 참조한다.

- [0353] 본원에 기술된 Cas9 분자 중 임의의 것이 원하는 시간에 Cas9 분자의 발현 및/또는 활성의 수준을 조절하도록 조정될 수 있다. 예를 들어, 세포 주기의 특정 기(들) 동안 Cas9 분자의 발현 및/또는 활성의 수준을 증가시키는 것이 유리할 수 있다. 세포 주기의 G1기 동안 상동성 기반 복구의 수준이 감소되고, 따라서 S기, G2기, 및/또는 M기 동안 Cas9 분자의 발현 및/또는 활성의 수준을 증가시키는 것이 Cas 엔도뉴클레아제 편집 후의 상동성 기반 복구를 증가시킬 수 있다는 것이 입증되었다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자의 발현 및/또는 활성의 수준이 세포 주기의 S기, G2기, 및/또는 M기 동안 증가된다. 한 예에서, Cas9 분자는 인간 제미닌(Geminin)의 N-말단 영역에 융합된다. 예를 들어, 문헌 [Gutschner et al. Cell Rep. (2016) 14(6): 1555-1566]을 참조한다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자의 발현 및/또는 활성의 수준이 G1기 동안 감소된다. 한 예에서, Cas9 분자는 G1기 동안 감소된 활성을 갖도록 변형된다. 예를 들어, 문헌 [Lomova et al. Stem Cells (2018)]을 참조한다.
- [0354] 대안적으로 또는 추가적으로, 본원에 기술된 Cas9 분자 중 임의의 것이 후성유전학적 변형체 (예를 들어, 염색질-변형 효소, 예를 들어, DNA 메틸라제, 히스톤 데아세틸라제)에 융합될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Kungulovski et al. Trends Genet. (2016) 32(2):101-113]을 참조한다. 후성유전학적 변형체에 융합된 Cas9 분자는 "에피펙터(epieffector)"로 지칭될 수 있고, 시기적 및/또는 일시적 엔도뉴클레아제 활성을 허용할 수 있다. 일부 실시양태에서, Cas9 분자는 염색질-변형 효소에 융합된 dCas9이다.
- [0355] *아연 핑거 뉴클레아제*
- [0356] 일부 실시양태에서, 아연 핑거 (ZFN) 기술을 사용하여 본원에 기술된 세포 또는 세포 집단이 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, ZFN은 본원에 기술된, 예를 들어, 표 1에 기술된 표적 도메인을 인식한다. 일반적으로, 아연 핑거가 매개하는 게놈 편집은 아연 핑거 뉴클레아제의 사용을 수반하고, 이는 전형적으로 아연 핑거 DNA 결합 도메인 및 뉴클레아제 도메인을 포함한다. 아연 핑거 결합 도메인은 임의의 관심 표적 도메인을 인식하고 이에 결합하도록 조작될 수 있고, 예를 들어, 약 3개의 뉴클레오티드 내지 약 21개의 뉴클레오티드의 길이, 또는 약 8개 내지 약 19개의 뉴클레오티드의 길이 범위의 DNA 서열을 인식하도록 디자인될 수 있다. 아연 핑거 결합 도메인은 전형적으로 적어도 3개의 아연 핑거 인식 영역 (예를 들어, 아연 핑거)을 포함한다.
- [0357] (인식 부위에서) DNA에 서열-특이적으로 결합할 수 있고 결합 부위에서 또는 결합 부위 근처에서 DNA를 절단할 수 있는 제한 엔도뉴클레아제 (제한 효소)가 관련 기술 분야에 공지되어 있고, 게놈 편집에서 사용하기 위한 ZFN을 형성시키는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, IIS형 제한 엔도뉴클레아제는 인식 부위로부터 이동된 부위에서 DNA를 절단하고, 분리가능한 결합 및 절단 도메인을 갖는다. 한 예에서, DNA 절단 도메인은 FokI 엔도뉴클레아제로부터 유래될 수 있다.
- [0358] *TALEN*
- [0359] 일부 실시양태에서, TALEN 기술을 사용하여 본원에 기술된 세포 또는 세포 집단이 생산된다. 일부 실시양태에서, TALEN은 본원에 기술된, 예를 들어, 표 1에 기술된 표적 도메인을 인식한다. 일반적으로, TALEN은 원하는 표적 DNA 분자에 특이적으로 결합하고 이를 절단할 수 있는 조작된 제한 효소이다. TALEN은 DNA 절단 도메인에 융합된 전사 활성화제-유사 이펙터 (TALE) DNA-결합 도메인을 전형적으로 함유한다. DNA 결합 도메인은 위치 12 및 13에 2개의 분기성 아미노산 RVD (반복 가변성 디펩티드 모티프)가 있는 고도로 보존된 아미노산 33-34개의 서열을 함유할 수 있다. RVD 모티프는 핵산 서열에 대한 결합 특이성을 결정하고, 원하는 DNA 서열에 특이적으로 결합하도록 조작될 수 있다. 한 예에서, DNA 절단 도메인은 FokI 엔도뉴클레아제로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 적절한 배향 및 간격의 표적 게놈 내의 부위에 대한 독특한 DNA 결합 도메인이 있는 2개의 구축물을 사용하여, FokI 도메인은 이량체로서 기능한다.
- [0360] 관심 표적 유전자에 대해 특이적인 TALEN이 이중 가닥 파손 (DSB)을 일으키기 위해 세포 내부에서 사용될 수 있다. 복구 메커니즘이 비-상동성 단부 연결을 통해 파손을 부적절하게 복구하면, 파손 부위에 돌연변이가 도입될 수 있다. 예를 들어, 부적절한 복구는 프레임 이동 돌연변이를 도입할 수 있다. 대안적으로, 원하는 서열을 갖는 외래 DNA 분자가 TALEN과 함께 세포 내로 도입될 수 있다. 외래 DNA의 서열 및 염색체 서열에 따라, 이러한 프로세스는 결합을 수정하거나 또는 DNA 단편을 관심 표적 유전자 내로 도입하거나, 또는 이러한 결합을 내인성 유전자 내로 도입하고, 따라서 표적 유전자의 발현을 감소시키는 데 사용될 수 있다.
- [0361] 본원에서 제공되는 가이드 RNA 및 유전자 조작 방법과 관련하여 사용하기에 적절한 엔도뉴클레아제 및 뉴클레아제 변이체의 예시적이고 비제한적인 일부 실시양태가 상기에서 기술되었다. 추가적인 적절한 뉴클레아제 및 뉴클레아제 변이체가 본 개시내용 및 관련 기술 분야의 지식을 기초로 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 명백

할 것이다. 본 개시내용은 이와 관련하여 제한되지 않는다.

[0362] gRNA 서열 및 구성

[0363] 일반적인 gRNA 구성

[0364] gRNA는 다수의 도메인을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 단일분자형 sgRNA, 또는 키메라 gRNA는, 예를 들어, 5'에서 3'으로 하기를 포함한다:

[0365] 표적화 도메인 (CD33 유전자 내의 표적 핵산에 상보적임);

[0366] 제1 상보성 도메인;

[0367] 연결 도메인;

[0368] 제2 상보성 도메인 (제1 상보성 도메인에 상보적임);

[0369] 근위 도메인; 및

[0370] 임의적으로, 꼬리 도메인.

[0371] 이제 각각의 이러한 도메인이 더욱 상세하게 기술된다.

[0372] 표적화 도메인은 표적 핵산 상의 표적 서열에 상보적인, 예를 들어, 적어도 80, 85, 90, 또는 95% 상보적인, 예를 들어, 완전히 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 표적화 도메인은 RNA 분자의 일부분이고, 따라서 우라실 (U) 염기를 포함할 것인 한편, gRNA 분자를 코딩하는 임의의 DNA는 티민 (T) 염기를 포함할 것이다. 이론에 의해 제한되기를 원치 않으면서, 한 실시양태에서, 표적화 도메인과 표적 서열의 상보성이 gRNA /Cas9 분자 복합체와 표적 핵산의 상호작용의 특이성에 기여하는 것으로 여겨진다. 표적화 도메인 및 표적 서열 쌍에서, 표적화 도메인 내의 우라실 염기가 표적 서열 내의 아데닌 염기와 쌍을 이룰 것으로 이해된다. 한 실시양태에서, 표적 도메인 자체는 5'에서 3'으로의 방향으로, 임의적인 제2 도메인, 및 코어 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 코어 도메인은 표적 서열과 완전히 상보적이다. 한 실시양태에서, 표적화 도메인은 뉴클레오타이드 5 내지 50개의 길이이다. 표적화 도메인은 뉴클레오타이드 15-25개, 뉴클레오타이드 18-22개, 또는 뉴클레오타이드 19-21개의 길이이다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 뉴클레오타이드 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 또는 25개의 길이이다. 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은 뉴클레오타이드 10-30개, 또는 15-25개의 길이이다.

[0373] 일부 실시양태에서, 표적화 도메인은, 예를 들어, 전문이 참조로 포함된 국제 출원 W02015157070에 기술된 바와 같이, 코어 도메인 및 제2 표적화 도메인을 포함한다. 한 실시양태에서, 코어 도메인은 표적화 도메인의 3' 단부로부터의 약 8 내지 약 13개의 뉴클레오타이드 (예를 들어, 표적화 도메인의 가장 3'인 8 내지 13의 뉴클레오타이드)를 포함한다. 한 실시양태에서, 제2 도메인은 코어 도메인의 5'에 위치한다. 다수의 실시양태에서, 코어 도메인은 표적 서열의 상응하는 영역과의 정확한 상보성을 갖는다. 다른 실시양태에서, 코어 도메인은 표적 서열의 상응하는 뉴클레오타이드와 상보적이지 않은 1개 이상의 뉴클레오타이드를 가질 수 있다.

[0374] 제1 상보성 도메인은 제2 상보성 도메인과 상보적이고, 한 실시양태에서, 적어도 일부의 생리학적 조건 하에 듀플렉스 영역을 형성하도록 제2 상보성 도메인에 대한 충분한 상보성을 갖는다. 한 실시양태에서, 제1 상보성 도메인은 뉴클레오타이드 5 내지 30개의 길이이다. 한 실시양태에서, 제1 상보성 도메인은 3개의 서브도메인을 포함하고, 이는 5'에서 3'으로의 방향으로 5' 서브도메인, 중앙 서브도메인, 및 3' 서브도메인이다. 한 실시양태에서, 5' 서브도메인은 뉴클레오타이드 4 내지 9개, 예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 길이이다. 한 실시양태에서, 중앙 서브도메인은 뉴클레오타이드 1, 2, 또는 3개, 예를 들어, 1개의 길이이다. 한 실시양태에서, 3' 서브도메인은 뉴클레오타이드 3 내지 25개, 예를 들어, 4 내지 22개, 4 내지 18개, 또는 4 내지 10개, 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 길이이다. 제1 상보성 도메인은 천연 발생의 제1 상보성 도메인과 상동성을 공유할 수 있거나 또는 그로부터 유래될 수 있다. 한 실시양태에서, 이는 에스. 피로게네스, 에스. 아우레우스 또는 에스. 쉐모필루스의 제1 상보성 도메인과의 적어도 50%의 상동성을 갖는다.

[0375] 상기 언급된 도메인의 서열 및 배치가 W02015157070에 더욱 상세하게 기술되어 있고, 이는 88-112면을 포함하여 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0376] 연결 도메인은 단일분자형 gRNA의 제1 상보성 도메인과 제2 상보성 도메인을 연결하는 역할을 한다. 연결 도메

인은 제1 및 제2 상보성 도메인을 공유결합으로 또는 비-공유결합으로 연결할 수 있다. 한 실시양태에서, 연결은 공유결합이다. 한 실시양태에서, 연결 도메인은 제1 상보성 도메인과 제2 상보성 도메인 사이에 개재된 공유 결합이거나 또는 이러한 공유 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 연결 도메인은 1개 이상, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 전체 내용이 본원에 참조로 포함된 W02018126176에 개시된 바와 같이, 연결 도메인은 적어도 1개의 비-뉴클레오타이드 결합을 포함한다.

[0377] 제2 상보성 도메인은, 적어도 부분적으로, 제1 상보성 도메인과 상보적이고, 한 실시양태에서, 적어도 일부의 생리학적 조건 하에 듀플렉스 영역을 형성하도록 제2 상보성 도메인에 대한 충분한 상보성을 갖는다. 한 실시양태에서, 제2 상보성 도메인은 제1 상보성 도메인과의 상보성이 결여된 서열, 예를 들어, 듀플렉스 영역 밖으로 루프를 이루는 서열을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 제2 상보성 도메인은 뉴클레오타이드 5 내지 27개의 길이이다. 한 실시양태에서, 제2 상보성 도메인은 제1 상보성 영역보다 더 길다. 한 실시양태에서, 상보적 도메인은 뉴클레오타이드 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개의 길이이다. 한 실시양태에서, 제2 상보성 도메인은 3개의 서브도메인을 포함하고, 이는 5'에서 3'으로의 방향으로 5' 서브도메인, 중앙 서브도메인, 및 3' 서브도메인이다. 한 실시양태에서, 5' 서브도메인은 뉴클레오타이드 3 내지 25개, 예를 들어, 4 내지 22개, 4 내지 18개, 또는 4 내지 10개, 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 길이이다. 한 실시양태에서, 중앙 서브도메인은 뉴클레오타이드 1, 2, 3, 4 또는 5개, 예를 들어, 3개의 길이이다. 한 실시양태에서, 3' 서브도메인은 뉴클레오타이드 4 내지 9개, 예를 들어, 4, 5, 6, 7, 8 또는 9개의 길이이다. 한 실시양태에서, 제1 상보성 도메인의 5' 서브도메인 및 3' 서브도메인은 각각 제2 상보성 도메인의 3' 서브도메인 및 5' 서브도메인에 상보적이고, 예를 들어, 완전히 상보적이다.

[0378] 한 실시양태에서, 근위 도메인은 뉴클레오타이드 5 내지 20개의 길이이다. 한 실시양태에서, 근위 도메인은 천연 발생 근위 도메인과 상동성을 공유할 수 있거나, 또는 그로부터 유래될 수 있다. 한 실시양태에서, 이는 에스. 피로게네스, 에스. 아우레우스 또는 에스. 썬모필루스의 근위 도메인과의 적어도 50%의 상동성을 갖는다.

[0379] 광범위한 꼬리 도메인이 gRNA에서 사용하기에 적절하다. 한 실시양태에서, 꼬리 도메인은 뉴클레오타이드 0 (부재), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 길이이다. 일부 실시양태에서, 꼬리 도메인 뉴클레오타이드는 천연 발생 꼬리 도메인의 5' 단부로부터의 서열로부터의 것이거나 또는 그와 상동성을 공유한다. 한 실시양태에서, 꼬리 도메인은 서로 상보적이고, 적어도 일부의 생리학적 조건 하에 듀플렉스 영역을 형성하는 서열들을 포함한다. 한 실시양태에서, 꼬리 도메인은 부재하거나, 또는 뉴클레오타이드 1 내지 50개의 길이이다. 한 실시양태에서, 꼬리 도메인은 천연 발생 근위 꼬리 도메인과 상동성을 공유할 수 있거나, 또는 그로부터 유래될 수 있다. 한 실시양태에서, 이는 에스. 피로게네스, 에스. 아우레우스 또는 에스. 썬모필루스의 꼬리 도메인과의 적어도 50%의 상동성을 갖는다. 한 실시양태에서, 꼬리 도메인은 시험관내 또는 생체내 전사의 방법과 관련된 3' 단부의 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0380] 일부 실시양태에서, 모듈형 gRNA는 하기를 포함한다:

[0381] 예를 들어 5'에서 3'으로, 하기를 포함하는 제1 가닥;

[0382] 표적화 도메인 (CD33 유전자 내의 표적 핵산에 상보적임) 및

[0383] 제1 상보성 도메인; 및

[0384] 바람직하게는 5'에서 3'으로, 하기를 포함하는 제2 가닥:

[0385] 임의적으로, 5' 확장 도메인;

[0386] 제2 상보성 도메인;

[0387] 근위 도메인; 및

[0388] 임의적으로, 꼬리 도메인.

[0389] 일부 실시양태에서, gRNA는 화학적으로 변형된다. 예를 들어, gRNA는 포스포로티오에이트 백본 변형, 2'-O-Me-변형 당 (예를 들어, 3' 및 5' 말단 중 하나 또는 양쪽 모두에), 2'-F-변형 당, 리보스 당의 이고리형 뉴클레오타이드-cEt 로의 교체, 3' 티오PACE (MSP), 또는 그의 임의의 조합으로부터 선택된 1개 이상의 변형을 포함할 수 있다. 적절한 gRNA 변형이, 예를 들어, 문헌 [Rahdar et al. PNAS December 22, 2015 112 (51) E7110-E7117] 및

[Hendel et al., Nat Biotechnol. 2015 Sep; 33(9): 985-989]에서 기술되고, 이들 각각은 전문이 본원에 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 gRNA는 1개 이상의 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 뉴클레오타이드, 예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 gRNA는 변형된 뉴클레오타이드 (예를 들어, 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 뉴클레오타이드)를 3개의 말단 위치 및 5' 단부 및/또는 3개의 말단 위치 및 3' 단부에 포함한다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, 전문이 참조로 포함된 국제 출원 WO/2017/214460, WO/2016/089433, 및 WO/2016/164356에 기술된 바와 같이, gRNA는 1개 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0390]

일부 실시양태에서, 본원에 기술된 gRNA는 화학적으로 변형된다. 예를 들어, gRNA는 1개 이상의 2'-O 변형 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, gRNA는 2'-O 변형 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 gRNA의 5' 단부에 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 2'-O 변형 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 gRNA의 3' 단부에 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 2'-O-변형 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 gRNA의 5' 및 3' 단부 양쪽 모두에 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형되고, 예를 들어 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형되고, 예를 들어 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형되고, 예를 들어 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 네 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형되고, 예를 들어 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시양태에서, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형되지 않는다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 네 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형되고, 예를 들어 2'-O-메틸-변형된다. 일부 실시양태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드는 인접한 뉴클레오타이드에 대한 포스페이트 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드는 인접한 뉴클레오타이드에 대한 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 2'-O-메틸 뉴클레오타이드는 인접한 뉴클레오타이드에 대한 티오PACE 연결을 포함한다.

[0391]

일부 실시양태에서, gRNA는 1개 이상의 2'-O-변형 및 3'인-변형 뉴클레오타이드, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오타이드를 gRNA의 5' 단부에 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오타이드를 gRNA의 3' 단부에 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트 뉴클레오타이드를 gRNA의 5' 및 3' 단부에 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 1개 이상의 비-가교 산소 원자가 황 원자로 교체된 백본을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형되고, 예를 들어 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형된다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형되고, 예를 들어 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형된다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형되고, 예를 들어 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형된다. 일부 실시양태에서, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형되지 않는다. 일부 실시양태에서, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된 당을 갖지 않는다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 네 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형되고, 예를 들어 2'-O-메틸 3'포스포로티오에이트-변형된다. 일부 실시양태에서, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형되지 않는다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 네 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형되고, 예

를 들어 2'-0-메틸 3' 포스포로티오에이트-변형된다.

[0392] 일부 실시양태에서, gRNA는 1개 이상의 2'-O-변형 및 3'-인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'티오PACE 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'티오PACE 뉴클레오타이드를 gRNA의 5' 단부에 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'티오PACE 뉴클레오타이드를 gRNA의 3' 단부에 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어, 2'-O-메틸 3'티오PACE 뉴클레오타이드를 gRNA의 5' 및 3' 단부에 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 1개 이상의 비-가교 산소 원자가 황 원자로 교체되고, 1개 이상의 비-가교 산소 원자가 아세테이트 기로 교체된 백본을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형된다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형된다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형된다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 네 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형된다. 일부 실시양태에서, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형되지 않는다. 일부 실시양태에서, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드는 화학적으로 변형된 당을 갖지 않는다. 일부 실시양태에서, gRNA는 gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 네 번째 뉴클레오타이드에서 2'-O-변형 및 3'인-변형, 예를 들어 2'-O-메틸 3'티오PACE-변형된다.

[0393] 일부 실시양태에서, gRNA는 화학적으로 변형된 백본을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 비-가교 산소 원자가 황 원자로 교체되었다. 일부 실시양태에서, gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드 각각이 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드 각각이 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드 각각이 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 네 번째 뉴클레오타이드 각각이 포스포로티오에이트 연결을 포함한다.

[0394] 일부 실시양태에서, gRNA는 티오PACE 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA는 1개 이상의 비-가교 산소 원자가 황 원자로 교체되고 1개 이상의 비-가교 산소 원자가 아세테이트 기로 교체된 백본을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드 각각이 티오PACE 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드 각각이 티오PACE 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드 각각이 티오PACE 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 네 번째 뉴클레오타이드 각각이 티오PACE 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, gRNA의 5' 단부의 뉴클레오타이드, gRNA의 5' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, 5' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 두 번째 뉴클레오타이드, gRNA의 3' 단부로부터 세 번째 뉴클레오타이드, 및 gRNA의 3' 단부로부터 네 번째 뉴클레오타이드 각각이 티오PACE 연결을 포함한다.

[0395] 본원에서 제공되는 가이드 RNA 및 유전자 조작 방법과 관련하여 사용하기에 적절한 변형, 예를 들어, 화학적 변형의 일부 예시적이고 비제한적인 실시양태가 상기에서 기술되었다. 추가적인 적절한 변형, 예를 들어, 화학적 변형이 본 개시내용, 및 각각 전문이 본원에 참조로 포함된 문헌 [Hendel, A. et al., Nature Biotech., 2015, Vol 33, No. 9]; WO/2017/214460; WO/2016/089433; 및/또는 WO/2016/164356에 기술된 것들을 포함하지만 이에 제한되지 않는 관련 기술 분야의 지식을 기초로, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0396] CD33을 표적화하는 gRNA

[0397] 본 개시내용은 엔도뉴클레아제를 인간 CD33에 표적화할 수 있는 유용한 다수의 gRNA를 제공한다. 하기 표 1은 본원에 기술된 gRNA에 의해 결합될 수 있는 내인성 인간 CD33 내의 표적 도메인을 예시한다.

[0398] **표 1.** 다양한 본원에 기술된 gRNA에 의해 결합되는 인간 CD33의 표적 도메인. 각각의 표적 도메인에 대해, 첫 번째 서열은 gRNA의 표적화 도메인 서열에 상응하는 서열을 나타내고, 두 번째 서열은 그의 역 상보물이다.

gRNA 명칭	표적 도메인 서열
gRNA A	CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 1) AGGAGTGAGTAGTCCTGGGG (SEQ ID NO: 5)
gRNA B	ACCGAGGAGTGAGTAGTCCT (SEQ ID NO: 2) AGGACTACTCACTCCTCGGT (SEQ ID NO: 6)
gRNAC	GGTGGGGGCAGCTGACAACC (SEQ ID NO: 3) GGTTGTCAGCTGCCCCCACC (SEQ ID NO: 7)
gRNAD	CGGTGCTCATAATCACCCCA (SEQ ID NO: 4) TGGGGTGATTATGAGCACCG (SEQ ID NO: 8)

[0399]

[0400] **표 2.** 인간 CD33에 상보적인 gRNA의 표적화 도메인. 각각의 gRNA에 대해, 첫 번째 서열은 티민을 포함하는 DNA 등가물을 나타내고, 두 번째 서열은 티민 대신 우라실을 포함하는 RNA 등가물을 나타낸다.

gRNA 명칭	gRNA 서열	PAM
gRNAA	CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 1) CCCCAGGACUACUCACUCCU (SEQ ID NO: 9)	CGG
gRNAB	ACCGAGGAGTGAGTAGTCCT (SEQ ID NO: 2) ACCGAGGAGUGAGUAGUCCU (SEQ ID NO: 10)	GGG
gRNAC	GGTGGGGGCAGCTGACAACC (SEQ ID NO: 3) GGUGGGGGCAGCUGACAACC (SEQ ID NO: 11)	AGG
gRNAD	CGGTGCTCATAATCACCCCA (SEQ ID NO: 4) CGGUGCUCAUAAUCACCCCA (SEQ ID NO: 12)	CGG

[0401]

[0402] CD33 (CCDS33084.1) cDNA 서열이 하기에서 서열식별번호: 13으로서 제공된다. 엑손 3에 밑줄이 그어진다.

ATGCCGCTGCTGCTACTGCTGCCCCCTGCTGTGGGCAGGGGCCCTGGCTATGGATCCAAATTTCTGGCT
GCAAGTGCAGGAGTCACTGACGGTACAGGAGGGTTTGTGCGTCTCGTGCCCTGCACTTTCTTCCATC
CCATACCTACTACGACAAGAACTCCCCAGTTCATGGTTACTGGTTCGGGAAGGAGCCATTATATCC
AGGGACTCTCCAGTGGCCACAAACAAGCTAGATCAAGAAGTACAGGAGGAGACTCAGGGCAGATTCCG
CCTCCTTGGGGATCCAGTAGGAACAAGTCTCCTGAGCATCGTAGACGCCAGGAGAGGGATAATG
GTTCACTACTTCTTTTCGGATGGAGAGAGGAAGTACCAAATACAGTTACAAATCTCCCCAGCTCTCTGTG
CATGTGACAGACTTGACCCACAGGCCCAAATCCTCATCCCTGGCACTCTAGAACCCGGCCACTCCAA
AAACCTGACCTGCTGCTGTCTCGGGCCTGTGAGCAGGGAACACCCCCGATCTTCTCCTGGTTGTGACG
CTGCCCCACCTCCTTGGGGCCCCAGGACTACTCACTCCTCGGTGCTCATAATCACCCCACGGCCCCAG
GACCACGGCACCAACCTGACCTGTGAGGTGAAGTTCGCTGGAGCTGGTGTGACTACGGAGAGAACCAT
CCAGCTCAACGTACCTATGTTCCACAGAACCAACAACCTGGTATCTTTCCAGGAGATGGCTCAGGGA
AACAAGAGACCAGAGCAGGAGTGGTTCATGGGGCCATTGGAGGAGCTGGTGTACAGCCCTGCTCGCT
CTTTGTCTCTGCCTCATCTTCTTCATAGTGAAGACCCACAGGAGGAAAGCAGCCAGGACAGCAGTGGG
CAGGAATGACACCCACCCCTACCACAGGGTCAGCCTCCCCGAAACACCAGAAGAAGTCCAAGTTACATG
GCCCCACTGAAACCTCAAGCTGTTGAGGTGCCGCCCTACTGTGAGATGGATGAGGAGCTGCATTAT
GCTTCCCTCAACTTTTCATGGGATGAATCCTTCCAAGGACACCTCCACCGAATACTCAGAGGTGAGGAC
CCAGTGA (SEQ ID NO: 13)

[0403]

[0404] CD33의 엑손 3이 하기에서 서열식별번호: 14로 별도로 제공된다. 밑줄은 gRNA A, gRNA B, gRNA C, gRNA D (또는 그의 역 상보물)에 상보적인 영역을 지시한다. gRNA A, gRNA B, 및 gRNA D에 대한 표적 영역이 부분적으로 중첩된다는 것을 주지한다.

ACTTGACCCACAGGCCCAAATCCTCATCCCTGGCACTCTAGAACCCGGCCACTCCAAAAACCTGACC
TGCTCTGTGTCCTGGCCCTGTGAGCAGGGAACACCCCGATCTTCTCCTGGTTGTGTCAGCTGCCCCCAG
CTCCTTGGGGCCCCAGGACTACTCACTCCTCGGTGCTCATAATCACCCCACGGCCCCAGGACCACGGCA
CCAACCTGACCTGTGAGGTGAAGTTCGCTGGAGCTGGTGTGACTACGGAGAGAACCATCCAGCTCAAC
GTCACCT (SEQ ID NO: 14)

[0405]

[0406] 이중 gRNA 조성물 및 그의 용도

[0407] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 gRNA (예를 들어, 표 2의 gRNA)는, 예를 들어, 뉴클레아제를 게놈 내의 2개의 부위로 지시하기 위해, 제2 gRNA와 조합되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 예를 들어, 세포가 항-CD33 작용제 및 제2 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 작용제인 2개의 작용제에 대해 저항성일 수 있도록, CD33 및 제2 계통-특이적 세포 표면 항원이 결핍된 조혈 세포를 생산하는 것이 요망된다. 일부 실시양태에서, 2개의 절단을 만들고 2개의 절단 부위 사이에 결실을 생성시키기 위해, 세포를 CD33의 상이한 영역을 표적화하는 2개의 상이한 gRNA와 접촉시키는 것이 바람직하다. 따라서, 본 개시내용은 다양한 gRNA 조합을 제공한다.

[0408] 일부 실시양태에서, 2개 이상 (예를 들어, 3개, 4개 또는 이를 초과하는 개수)의 본원에 기술된 gRNA가 혼합된다. 일부 실시양태에서, 각각의 gRNA는 별개의 용기에 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 키트 (예를 들어, 1개 이상의 표 2에 따른 gRNA를 포함하는 키트)는 Cas9 분자, 또는 Cas9 분자를 코딩하는 핵산을 또한 포함한다.

[0409] 일부 실시양태에서, 제1 및 제2 gRNA는 표 2에 따른 gRNA 또는 그의 변이체이다.

[0410] 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 본원에 기술된 CD33 gRNA (예를 들어, 표 2의 gRNA 또는 그의 변이체)이고, 제2 gRNA는 하기로부터 선택된 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적화한다: BCMA, CD19, CD20, CD30, ROR1, B7H6, B7H3, CD23, CD38, C형 렉틴 유사 분자-1, CS1, IL-5, L1-CAM, PSCA, PSMA, CD138, CD133, CD70, CD7, CD13, NKG2D, NKG2D 리간드, CLEC12A, CD11, CD123, CD56, CD34, CD14, CD66b, CD41, CD61, CD62, CD235a, CD146, CD326, LMP2, CD22, CD52, CD10, CD3/TCR, CD79/BCR, 및 CD26.

[0411] 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 본원에 기술된 CD33 gRNA (예를 들어, 표 2에 따른 gRNA 또는 그의 변이체)이고, 제2 gRNA는 특정 유형의 암과 연관된 계통-특이적 세포-표면 항원, 예컨대 비제한적으로 CD20, CD22 (비-호지킨 림프종, B-세포 림프종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL)), CD52 (B-세포 CLL), CD33 (급성 골수성 백혈병 (AML)), CD10 (gp100) (공통 (프리(pre)-B) 급성 림프구성 백혈병 및 악성 흑색종), CD3/T-세포 수용체 (TCR) (T-세포 림프종 및 백혈병), CD79/B-세포 수용체 (BCR) (B-세포 림프종 및 백혈병), CD26 (상피 및 림프계 악성종양), 인간 백혈구 항원 (HLA)-DR, HLA-DP, 및 HLA-DQ (림프계 악성종양), RCAS1 (부인과 암종,

담도 선암종 및 췌장의 관 선암종), 뿐만 아니라 전립선 특이적 막 항원을 표적화한다.

[0412] 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 본원에 기술된 CD33 gRNA (예를 들어, 표 2에 따른 gRNA 또는 그의 변이체)이고, 제2 gRNA는 하기로부터 선택된 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적화한다: CD7, CD13, CD19, CD22, CD20, CD25, CD32, CD38, CD44, CD45, CD47, CD56, 96, CD117, CD123, CD135, CD174, CLL-1, 플레이트 수용체 β , IL1RAP, MUC1, NKG2D/NKG2DL, TIM-3, 또는 WT1.

[0413] 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 본원에 기술된 CD33 gRNA (예를 들어, 표 2에 따른 gRNA 또는 그의 변이체)이고, 제2 gRNA는 하기로부터 선택된 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적화한다: CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32a, CD32b, CD32c, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64a, CD65, CD65s, CD66a, CD66b, CD66c, CD66F, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75S, CD77, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85A, CD85C, CD85D, CD85E, CD85F, CD85G, CD85H, CD85I, CD85J, CD85K, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD99R, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD113, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CD137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD14, CDw145, CD146, CD147, CD148, CD150, CD152, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156a, CD156b, CD156c, CD157, CD158b1, CD158b2, CD158d, CD158e1/e2, CD158f, CD158g, CD158h, CD158i, CD158j, CD158k, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD163, CD164, CD165, CD166, CD167a, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, CD174, CD175, CD175s, CD176, CD177, CD178, CD179a, CD179b, CD180, CD181, CD182, CD183, CD184, CD185, CD186, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CDw198, CDw199, CD200, CD201, CD202b, CD203c, CD204, CD205, CD206, CD207, CD208, CD209, CD210a, CDw210b, CD212, CD213a1, CD213a2, CD215, CD217, CD218a, CD218b, CD220, CD221, CD222, CD223, CD224, CD225, CD226, CD227, CD228, CD229, CD230, CD231, CD232, CD233, CD234, CD235a, CD235b, CD236, CD236R, CD238, CD239, CD240, CD241, CD242, CD243, CD244, CD245, CD246, CD247, CD248, CD249, CD252, CD253, CD254, CD256, CD257, CD258, CD261, CD262, CD263, CD264, CD265, CD266, CD267, CD268, CD269, CD270, CD272, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD286, CD288, CD289, CD290, CD292, CDw293, CD294, CD295, CD296, CD297, CD298, CD299, CD300a, CD300c, CD300e, CD301, CD302, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD307e, CD309, CD312, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD321, CD322, CD324, CD325, CD326, CD327, CD328, CD329, CD331, CD332, CD333, CD334, CD335, CD336, CD337, CD338, CD339, CD340, CD344, CD349, CD350, CD351, CD352, CD353, CD354, CD355, CD357, CD358, CD359, CD360, CD361, CD362 또는 CD363.

[0414] 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 본원에 기술된 CD33 gRNA (예를 들어, 표 2에 따른 gRNA 또는 그의 변이체)이고, 제2 gRNA는 하기로부터 선택된 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적화한다: CD19; CD123; CD22; CD30; CD171; CS-1 (CD2 서브세트 1, CRACC, SLAMF7, CD319, 및 19A24로도 지칭됨); C형 렉틴-유사 분자-1 (CLECL1); 표피 성장 인자 수용체 변이체 III (EGFRvIII); 강글리오시드 G2 (CD2); 강글리오시드 GD3 (aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlep(1-1)Cer); TNF 수용체 패밀리 구성원 B 세포 성숙 (BCMA), Tn 항원 ((Tn Ag) 또는 (GalNAc.알파.-Ser/Thr)); 전립선-특이적 막 항원 (PSMA); 수용체 타이로신 키나제-유사 고 아 수용체 1 (ROR1); Fms-유사 타이로신 키나제 3 (FLT3); 종양-연관 당단백질 72 (TAG72); CD38; CD44v6; 암 배아 항원 (CEA); 상피 세포 부착 분자 (EPCAM); B7H3 (CD276); KIT (CD117); 인터루킨-13 수용체 서브유닛 알파-2 (IL-13Ra2 또는 CD213A2); 메소텔린(Mesothelin); 인터루킨 11 수용체 알파 (IL-11Ra); 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA); 프로테아제 세린 21 (테스티신(Testisin) 또는 PRSS21); 혈관 내피 성장 인자 수용체 2 (VEGFR2); 루이스(Lewis)(Y) 항원; CD24; 혈소판-유래 성장 인자 수용체 베타 (PDGFR-베타); 단계-특이적 배아 항원-4 (SSEA-4); CD20; 플레이트 수용체 알파; 수용체 타이로신-단백질 키나제 ERBB2 (Her2/neu); 뮤신 (Mucin) 1, 세포 표면 회합 (MUC1); 표피 성장 인자 수용체 (EGFR); 신경 세포 부착 분자 (NCAM); 프로스타제; 전립선산 포스파타제 (PAP); 돌연변이된 신장 인자 2 (ELF2M); 에프린(Ephrin) B2; 섬유모세포 활성화 단백질 알파 (FAP); 인슐린-유사 성장 인자 I 수용체 (IGF-I 수용체), 탄산 탈수효소 IX (CAIX), 프로테아솜

(Proteasome) (프로솜(Prosome), 마크로페인(Macropain)) 서브유닛, 베타 유형 9 (LMP2); 당단백질 100 (gp100); 파손점 클러스터 영역 (BCR) 및 아벨슨(Abelson) 무린 백혈병 바이러스 종양유전자 호모로그 1 (Abl) 로 이루어진 종양유전자 융합 단백질 (bcr-abl); 타이로시나제; 에프린 A형 수용체 2 (EphA2); 푸코실 GM1; 시알릴 루이스 부착 분자 (sLe); 강글리오시드 GM3 (aNeu5Ac(2-3)bdGalp(1-4)bdG1cp(1-1)Cer); 트랜스글루타미나제 5 (TGS5); 고분자량-흑색종-연관 항원 (HMMWAA); o-아세틸-GD2 강글리오시드 (OAcGD2); 플레이트 수용체 베타; 종양 내피 마커 1 (TEM1/CD248); 종양 내피 마커 7-관련 (TEM7R); 클라우딘 6 (CLDN6); 갑상선 자극 호르몬 수용체 (TSHR); G 단백질-커플링 수용체 클래스 C 그룹 5, 구성원 D (GPC5D); X 염색체 오픈 리딩 프레임 61 (CXORF61); CD97; CD179a; 역형성 림프종 키나제 (ALK); 폴리시알산; 태반-특이적 1 (PLAC1); 글로보H글리코세라미드 (글로보H)의 육당류 부분; 유선 분화 항원 (NY-BR-1); 유로플라킨 2 (UPK2); A형 간염 바이러스 세포 수용체 1 (HAVCR1); 아드레날린수용체 베타 3 (ADRB3); 파넥신 3 (PANX3); G 단백질-커플링 수용체 20 (GPR20); 림프구 항원 6 복합체; 좌위 K 9 (LY6K); 후각 수용체 51E2 (OR51E2); TCR 감마 대안적 리딩 프레임 단백질 (TARP); 윌름즈(Wilms) 종양 단백질 (WT1); 암/고환 항원 1 (NY-ESO-1); 암/고환 항원 2 (LAGE-1a); 흑색종-연관 항원 1 (MAGE-A1), 12p 염색체에 위치하는 ETS 전위-변이체 유전자 6 (ETV6-AML); 정자 단백질 17 (SPA17); X 항원 패밀리를 구성원 1A (XAGE1); 안지오포이에틴-결합 세포 표면 수용체 2 (Tie 2); 흑색종 암 고환 항원-1 (MAD-CT-1); 흑색종 암 고환 항원-2 (MAD-CT-2); Fos-관련 항원 1; 종양 단백질 p53 (p53); p53 돌연변이체; 프로스테인; 서바이빙; 텔로머라제; 전립선 암종 종양 항원-1 (PCTA-1 또는 갈렉틴(Galectin) 8), T 세포에 의해 인식되는 흑색종 항원 1 (MelanA 또는 MART1); 래트 육종 (Ras) 돌연변이체; 인간 텔로머라제 역전사효소 (hTERT); 육종 전위 파손점; 아팍토시스의 흑색종 억제제 (ML-1AP); ERG (막횡단 프로테아제, 세린 2 (TMPRSS2) ETS 융합 유전자); N-아세틸 글루코사아미널-트랜스퍼라제 V (NA17); 페어드 박스 단백질 Pax-3 (PAX3); 안드로젠 수용체; 시클린 B1; v-myc 조류 골수세포종 바이러스 종양유전자 신경모세포종 유래 호모로그 (MYCN); Ras 호모로그 패밀리를 구성원 C (RhoC); 타이로시나제-관련 단백질 2 (TRP-2); 시토크롬 P450 1B1 (CYP1B1); CCCTC-결합 인자 (아연 핑거 단백질)-유사 (BORIS 또는 각인 부위의 조절인자의 형제(Brother of the Regulator of Imprinted Sites)), T 세포에 의해 인식되는 편평세포 암종 항원 3 (SART3); 페어드 박스 단백질 Pax-5 (PAX5); 프로아크로신 결합 단백질 sp32 (OY-TES1); 림프구-특이적 단백질 타이로신 키나제 (LCK); A 키나제 앵커 단백질 4 (AKAP-4); 활액 육종, X 파손점 2 (SSX2); 고급 당화 최종 산물에 대한 수용체 (RAGE-1); 신장 유비쿼터스 1 (RU1); 신장 유비쿼터스 2 (RU2); 레구메인; 인간 유두종 바이러스 E6 (HPV E6); 인간 유두종 바이러스 E7 (HPV E7); 장 카르복시 에스테라제; 돌연변이된 열 충격 단백질 70-2 (mut hsp70-2); CD79a; CD79b; CD72; 백혈구-연관 면역글로불린-유사 수용체 1 (LAIR1); IgA 수용체의 Fc 단편 (FCAR 또는 CD89); 백혈구 면역글로불린-유사 수용체 서브패밀리 A 구성원 2 (LILRA2); CD300 분자-유사 패밀리를 구성원 f (CD300LF); C형 렉틴 도메인 패밀리를 구성원 A (CLEC12A); 골수 기질 세포 항원 2 (BST2); EGF-유사 모듈-함유 유신-유사 호르몬 수용체-유사 2 (EMR2); 림프구 항원 75 (LY75); 글리피칸(Glypican)-3 (GPC3); Fc 수용체-유사 5 (FCRL5); 및 면역글로불린 람다-유사 폴리펩티드 1 (IGLL1).

[0415] 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 본원에 기술된 CD33 gRNA (예를 들어, 표 2에 따른 gRNA 또는 그의 변이체)이고, 제2 gRNA는 하기로부터 선택된 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적화한다: CD11a, CD18, CD19, CD20, CD31, CD34, CD44, CD45, CD47, CD51, CD58, CD59, CD63, CD97, CD99, CD100, CD102, CD123, CD127, CD133, CD135, CD157, CD172b, CD217, CD300a, CD305, CD317, CD321, 및 CLL1.

[0416] 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 본원에 기술된 CD33 gRNA (예를 들어, 표 2에 따른 gRNA 또는 그의 변이체)이고, 제2 gRNA는 하기로부터 선택된 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적화한다: CD123, CLL1, CD38, CD135 (FLT3), CD56 (NCAM1), CD117 (c-KIT), FRβ (FOLR2), CD47, CD82, TNFRSF1B (CD120B), CD191, CD96, PTPRJ (CD148), CD70, LILRB2 (CD85D), CD25 (IL2Rα파), CD44, CD96, NKG2D 리간드, CD45, CD7, CD15, CD19, CD20, CD22, CD37, 및 CD82.

[0417] 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 본원에 기술된 CD33 gRNA (예를 들어, 표 2에 따른 gRNA 또는 그의 변이체)이고, 제2 gRNA는 하기로부터 선택된 계통-특이적 세포-표면 항원을 표적화한다: CD7, CD11a, CD15, CD18, CD19, CD20, CD22, CD25, CD31, CD34, CD37, CD38, CD44, CD45, CD47, CD51, CD56, CD58, CD59, CD63, CD70, CD82, CD85D, CD96, CD97, CD99, CD100, CD102, CD117, CD120B, CD123, CD127, CD133, CD135, CD148, CD157, CD172b, CD191, CD217, CD300a, CD305, CD317, CD321, CLL1, FRβ (FOLR2), 또는 NKG2D 리간드.

[0418] 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 본원에 기술된 CD33 gRNA (예를 들어, 표 2에 따른 gRNA 또는 그의 변이체)이고, 제2 gRNA는 CLL-1을 표적화한다. 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 본원에 기술된 CD33 gRNA (예를 들어, 표 2에 따른 gRNA 또는 그의 변이체)이고, 제2 gRNA는 CD123을 표적화한다.

[0419] 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 본원에 기술된 CD33 gRNA (예를 들어, 표 2에 따른 gRNA 또는 그의 변이체)이고, 제2 gRNA는 표 A로부터의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 표적화 도메인을 포함하는 CD33 gRNA이고, 여기서 표적화 도메인은 서열식별번호: 9의 서열을 포함하고, 제2 gRNA는 표 A의 서열에 상응하는 표적화 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 표적화 도메인을 포함하는 CD33 gRNA이고, 여기서 표적화 도메인은 서열식별번호: 10의 서열을 포함하고, 제2 gRNA는 표 A의 서열에 상응하는 표적화 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 표적화 도메인을 포함하는 CD33 gRNA이고, 여기서 표적화 도메인은 서열식별번호: 11의 서열을 포함하고, 제2 gRNA는 표 A의 서열에 상응하는 표적화 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 gRNA는 표적화 도메인을 포함하는 CD33 gRNA이고, 여기서 표적화 도메인은 서열식별번호: 12의 서열을 포함하고, 제2 gRNA는 표 A의 서열에 상응하는 표적화 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 gRNA는 WO2017/066760, WO2019/046285, WO/2018/160768, 또는 문헌 [Borot et al. PNAS June 11, 2019 116 (24) 11978-11987] 중 임의의 것에 개시된 gRNA이고, 이들 각각은 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0420] 표 A. 예시적인 gRNA 스페이서 서열. 특정 gRNA 스페이서 서열에는 텍스트에서 공백으로 지시된 PAM 서열이 이어진다.

gRNA 표적	gRNA 스페이서 서열	서열식별번호
hCD33	ACCTGTCAGGTGAAGTTCGC TGG	26
hCD33	TGGCCGGGTTCTAGAGTGCC AGG	27
hCD33	GGCCGGGTTCTAGAGTGCCA GGG	28
hCD33	CACCGAGGAGTGAGTAGTCC TGG	29
hCD33	TCCAGCGAACTTCACCTGAC AGG	30
CD33(인트론 1 내)	GCTGTGGGGAGAGGGGTTGT	31
CD33(인트론 1 내)	CTGTGGGGAGAGGGGTTGTC	32
CD33(인트론 1 내)	TGGGGAACGAGGGTCAGCT	33
CD33(인트론 1 내)	GGGCCCTGTGGGGAACGA	34
CD33(인트론 1 내)	AGGGCCCTGTGGGGAACG	35
CD33(인트론 1 내)	GCTGACCCTCGTTTCCAC	36
CD33(인트론 1 내)	CTGACCCTCGTTTCCACACA	37
CD33(인트론 1 내)	TGACCCTCGTTTCCACAG	38
CD33(인트론 1 내)	CCATAGCCAGGGCCCTGTG	39
CD33(인트론 2 내)	GCATGTGACAGGTGAGGCAC	40
CD33(인트론 2 내)	TGAGGCACAGGCTTCAGAAG	41
CD33(인트론 2 내)	AGGCTTCAGAAGTGCCGCA	42
CD33(인트론 2 내)	GGCTTCAGAAGTGCCGCAA	43
CD33(인트론 2 내)	GTACCCATGAACCTCCCTTG	44
CD33(인트론 2 내)	GTGGCCGCAAGGGAAGTTCA	45
CD33(인트론 2 내)	TGGCCGCAAGGGAAGTTCAT	46
CD33(인트론 2 내)	GGAAGTTCATGGGTACTGCA	47
CD33(인트론 2 내)	TTCATGGGTACTGCAGGGCA	48
CD33(인트론 2 내)	CTAAACCCCTCCAGTACCA	49
CD33(인트론 1 내)	CACTCACCTGCCACAGCAG	50
CD33(인트론 1 내)	CCCTGCTGTGGGCAGGTGAG	51
CD33(인트론 1 내)	TGGGCAGGTGAGTGGCTGTG	52
CD33(인트론 1 내)	GGTGAGTGGCTGTGGGGAGA	53
CD33(인트론 1 내)	GTGAGTGGCTGTGGGGAGAG	54
CD33 (엑손 2)	ATCCATAGCCAGGGCCCCTG	55
CD33 (엑손 2)	TCCATAGCCAGGGCCCCTGT	56
CD33 (엑손 2)	CCATAGCCAGGGCCCCTGTG	39
CD33 (엑손 2)	TCGTTTCCACAGGGGCC	57
CD33 (엑손 2)	TGGCTATGGATCCAAATTC	58
CD33 (엑손 2)	TGGGGAACGAGGGTCAGCT	33
CD33 (엑손 2)	GGGCCCTGTGGGGAACGA	34
CD33 (엑손 2)	AGAAATTTGGATCCATAGCC AGG	59
CD33 (엑손 3)	ATCCCTGGCACTCTAGAACC CGG	60
CD33 (엑손 3)	CCTCACTAGACTTGACCCAC AGG	61

[0421]

[0422] 2개의 돌연변이를 포함하는 세포

- [0423] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 조작된 세포는 제1 돌연변이는 CD33 내에 있고, 제2 돌연변이는 제2 계통-특이적 세포 표면 항원 내에 있는 2개의 돌연변이를 포함한다. 이러한 세포는, 일부 실시양태에서, 2개의 작용제에 대해 저항성일 수 있다: 항-CD33 작용제, 및 제2 계통-특이적 세포 표면 항원을 표적화하는 작용제. 일부 실시양태에서, 이러한 세포는 2개 이상의 본원에 기술된 gRNA, 예를 들어, 표 2의 gRNA 및 제2 gRNA를 사용하여 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, 예를 들어, ZFN 또는 TALEN을 사용하여, 세포가 생산될 수 있다. 본 개시내용은 본원에 기술된 세포를 포함하는 집단을 또한 제공한다.
- [0424] 일부 실시양태에서, 제2 돌연변이는 계통-특이적 세포-표면 항원, 예를 들어, 선행 섹션에서 열거된 것을 코딩하는 유전자에 있다. 일부 실시양태에서, 제2 돌연변이는 표 A에 열거된 부위에 있다.
- [0425] 전형적으로, 본원에서 제공되는 방법 및 조성물에 의해 발생하는 돌연변이, 예를 들어, 표적 유전자, 예컨대 CD33 및/또는 본 개시내용에서 언급된 임의의 다른 표적 유전자에서의 돌연변이는 표적 유전자에 의해 코딩되는 유전자 생성물의 기능 상실, 예를 들어, CD33 유전자에서의 돌연변이의 경우, CD33 단백질의 기능 상실을 초래한다. 일부 실시양태에서, 기능 상실은 유전자 생성물의 발현 수준의 감소, 예를 들어, 더 낮은 발현 수준으로의 감소, 또는 유전자 생성물의 발현의 완전한 폐지이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이는 유전자 생성물의 비-기능성 변이체의 발현을 초래한다. 예를 들어, 코딩 서열에서 조기 종결 코돈을 생성시키는 돌연변이의 경우, 말단절단된 유전자 생성물, 또는 넌센스 또는 미스센스 돌연변이를 생성시키는 돌연변이의 경우, 유전자 생성물을 비-기능성 있게 하는 변경된 아미노산 서열을 특징으로 하는 유전자 생성물. 일부 실시양태에서, 유전자 생성물의 기능은 결합 파트너의 결합 또는 인식이다. 일부 실시양태에서, 유전자 생성물, 예를 들어, CD33, 제2 계통-특이적 세포-표면 항원, 또는 양쪽 모두의 발현의 감소는 야생형 또는 조작되지 않은 대응 세포에서의 수준의 50% 이하, 40% 이하, 30% 이하, 20% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 2% 이하, 또는 1% 이하이다.
- [0426] 일부 실시양태에서, 본원에서 제공되는 방법에 의해 및/또는 본원에서 제공되는 조성물을 사용하여 생성된 세포의 집단 내의 CD33의 카피의 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%가 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 세포 집단 내의 제2 계통-특이적 세포 표면 항원의 카피의 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%가 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 세포 집단 내의 CD33 및 제2 계통-특이적 세포 표면 항원의 카피의 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%가 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 집단은 1개 이상의 야생형 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 집단은 CD33의 1개의 야생형 카피를 포함하는 1개 이상의 세포를 포함한다. 일부 실시양태에서, 집단은 제2 계통-특이적 세포 표면 항원의 1개의 야생형 카피를 포함하는 1개 이상의 세포를 포함한다.
- [0427] 세포
- [0428] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 뉴클레아제 및/또는 gRNA를 사용하여 CD33의 변형을 갖는 세포 (예를 들어, HSC 또는 HPC)가 제조된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 뉴클레아제 및/또는 gRNA를 사용하여 CD33의 변형 및 제2 계통-특이적 세포 표면 항원의 변형을 갖는 세포 (예를 들어, HSC 또는 HPC)가 제조된다. 세포 자체를 뉴클레아제 및/또는 gRNA와 접촉시킴으로써 세포가 제조될 수 있거나, 또는 세포가 뉴클레아제 및/또는 gRNA와 접촉된 세포의 딸세포일 수 있는 것으로 이해된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 세포 (예를 들어, HSC)는 대상체의 조혈계를 재구성시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 세포 (예를 들어, HSC)는 하기 중 하나 이상 (예를 들어, 모두)이 가능하다: 인간 대상체에서의 이식, 골수 계통 세포 생산, 및 림프 계통 세포 생산.
- [0429] 일부 실시양태에서, 세포는 단 1개의 유전자 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 CD33 좌위에서만 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포는 제2 좌위에서 유전자 변형된다. 일부 실시양태에서, 세포는 트랜스제닉 단백질을 포함하지 않고, 예를 들어, CAR을 포함하지 않는다.
- [0430] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 변형된 세포는 실질적으로 CD33 단백질을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 변형된 세포는 실질적으로 야생형 CD33 단백질을 포함하지 않지만, 돌연변이체 CD33 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 CD33 단백질은 치료 목적을 위한 CD33을 표적화하는 작용제에 의해 결합되지 않는다.
- [0431] 일부 실시양태에서, 세포는 조혈 세포, 예를 들어, 조혈 줄기 세포이다. 조혈 줄기 세포 (HSC)는 전형적으로 골수 및 림프 전구 세포 양쪽 모두를 발생시킬 수 있고, 이는 추가로 골수 세포 (예를 들어, 단핵구, 대식세포,

호중구, 호염기구, 수지상 세포, 적혈구, 혈소판 등) 및 림프성 세포 (예를 들어, T 세포, B 세포, NK 세포)를 각각 발생시킬 수 있다. HSC는 세포 표면 마커 CD34의 발현을 특징으로 하고 (예를 들어, CD34+), 이는 HSC의 확인 및/또는 단리에 사용될 수 있으며, 세포 표면 마커의 부재는 세포 계통으로의 수입과 연관된다.

[0432] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 세포 집단은 복수의 조혈 줄기 세포를 포함하고, 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 세포 집단은 복수의 조혈 전구 세포를 포함하며, 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 세포 집단은 복수의 조혈 줄기 세포 및 복수의 조혈 전구 세포를 포함한다.

[0433] 일부 실시양태에서, HSC는 대상체, 예컨대 인간 대상체로부터 획득된다. HSC를 획득하는 방법이, 예를 들어, PCT/US2016/057339에 기술되어 있고, 이는 전문이 본원에 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, HSC는 말초 혈액 HSC이다. 일부 실시양태에서, 포유동물 대상체는 비-인간 영장류, 설치류 (예를 들어, 마우스 또는 래트), 소, 돼지, 말, 또는 가축이다. 일부 실시양태에서, HSC는 인간 대상체, 예컨대 조혈 악성종양이 있는 인간 대상체로부터 획득된다. 일부 실시양태에서, HSC는 건강한 공여자로부터 획득된다. 일부 실시양태에서, HSC는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포가 후속적으로 투여될 대상체로부터 획득된다. 세포가 획득된 동일한 대상체에게 투여되는 HSC는 자가 세포로 지칭되는 한편, 세포가 투여될 대상체가 아닌 대상체로부터 획득되는 HSC는 동종이형 세포로 지칭된다.

[0434] 일부 실시양태에서, 세포 집단 내의 CD33의 카피의 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 또는 적어도 95%가 돌연변이를 갖는다. 예를 들어, 집단이 복수의 상이한 CD33 돌연변이를 포함할 수 있고, 복수의 돌연변이 중 각각의 돌연변이가 돌연변이를 갖는 세포 집단 내의 CD33의 카피의 퍼센트에 기여한다.

[0435] 일부 실시양태에서, 유전자 조작된 조혈 세포에서의 CD33 발현이 천연 발생 조혈 세포 (예를 들어, 야생형 대응물)에서의 CD33 발현에 비교된다. 일부 실시양태에서, 유전자 조작은 천연 발생 조혈 세포 (예를 들어, 야생형 대응물)에서의 CD33 발현에 비교하여 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%만큼 CD33의 발현 수준의 감소를 발생시킨다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 유전자 조작된 조혈 세포는 천연 발생 조혈 세포 (예를 들어, 야생형 대응물)에 비교하여 20% 미만, 19% 미만, 18% 미만, 17% 미만, 16% 미만, 15% 미만, 14% 미만, 13% 미만, 12% 미만, 11% 미만, 10% 미만, 9% 미만, 8% 미만, 7% 미만, 6% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 또는 1% 미만의 CD33을 발현한다.

[0436] 일부 실시양태에서, 유전자 조작은 천연 발생 조혈 세포에서의 야생형 CD33의 발현 수준에 비교하여 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%만큼 야생형 CD33의 발현 수준의 감소를 발생시킨다. 즉, 일부 실시양태에서, 유전자 조작된 조혈 세포는 천연 발생 조혈 세포 (예를 들어, 야생형 대응물)에 비교하여 20% 미만, 19% 미만, 18% 미만, 17% 미만, 16% 미만, 15% 미만, 14% 미만, 13% 미만, 12% 미만, 11% 미만, 10% 미만, 9% 미만, 8% 미만, 7% 미만, 6% 미만, 5% 미만, 4% 미만, 3% 미만, 2% 미만, 또는 1% 미만의 CD33을 발현한다.

[0437] 일부 실시양태에서, 유전자 조작은 적절한 대조군 (예를 들어, 세포 또는 복수의 세포)에 비교하여 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 만큼 야생형 계통-특이적 세포 표면 항원 (예를 들어, CD33)의 발현 수준의 감소를 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 적절한 대조군은 동일한 대상체로부터의 복수의 조작되지 않은 세포에서 측정되거나 예상되는 야생형 계통-특이적 세포 표면 항원의 수준을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적절한 대조군은 건강한 대상체로부터의 복수의 세포에서 측정되거나 예상되는 야생형 계통-특이적 세포 표면 항원의 수준을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적절한 대조군은 건강한 개체의 풀 (예를 들어, 10, 20, 50, 또는 100명의 개체)로부터의 세포 집단에서 측정되거나 예상되는 야생형 계통-특이적 세포 표면 항원의 수준을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적절한 대조군은 본원에 기술된 치료, 예를 들어, 항-CD33 요법을 필요로 하는 대상체에서 측정되거나 예상되는 야생형 계통-특이적 세포 표면 항원의 수준을 포함하고, 예를 들어, 여기서 대상체는 암을 갖고, 암 세포가 CD33을 발현한다.

[0438] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 제조 방법은 야생형 세포, 예를 들어, 야생형 조혈 줄기 또는 전구 세포를 제공하는 단계를 포함한다. 일부 실시양태에서, 야생형 세포는 계통-특이적 세포 표면 항원 (예를 들어, CD33, CD123, 및/또는 CLL1)의 2개의 기능성 카피를 포함하는 (예를 들어, 발현하는) 편집되지 않은 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 서열식별번호: 13에 따른 CD33 유전자 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 서

열식별번호: 13에서 코딩되는 CD33 단백질을 코딩하는 CD33 유전자 서열을 포함하고, 예를 들어, CD33 유전자 서열은 서열식별번호: 13에 비교하여 1개 이상의 침묵 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 방법에서 사용되는 세포는 천연 발생 세포 또는 조작되지 않은 세포이다. 일부 실시양태에서, 야생형 세포는 계통-특이적 세포 표면 항원 (예를 들어, CD33)을 발현하거나, 또는 HL60 또는 MOLM-13 세포와 유사한 (또는 그의 90%-110%, 80%-120%, 70%-130%, 60%-140%, 또는 50%-150% 이내인) 수준으로 계통-특이적 세포 표면 항원을 발현하는 더 분화된 세포를 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 야생형 세포는 계통-특이적 세포 표면 항원에 결합하는 항체 (예를 들어, 항-CD33 항체, 예를 들어, P67.6)에 결합하거나, 또는 HL60 또는 MOLM-13 세포에 대한 항체 결합과 유사한 (또는 그의 90%-110%, 80%-120%, 70%-130%, 60%-140%, 또는 50%-150% 이내인) 수준으로 항체에 결합하는 더 분화된 세포를 발생시킨다. 예를 들어, 유동 세포측정법에 의해, 예를 들어, 실시예 4에 기술된 바와 같이, 항체 결합을 측정할 수 있다.

[0439] 치료 및 투여 방법

[0440] 일부 실시양태에서, 유효 개수의 본원에 기술된 CD33-변형 세포가 항-CD33 요법, 예를 들어, 항-CD33 암 요법과 조합되어 투여된다. 일부 실시양태에서, 변형된 CD33 및 변형된 제2 계통-특이적 세포 표면 항원을 포함하는 유효 개수의 세포가 항-CD33 요법, 예를 들어, 항-CD33 암 요법과 조합되어 투여된다. 일부 실시양태에서, 항-CD33 요법은 항체, ADC, 또는 CAR을 발현하는 면역 세포를 포함한다.

[0441] 작용제 (예를 들어, CD33-변형 세포 및 항-CD33 요법)가 조합되어 투여되는 경우, 작용제는 동시에 또는 시간적으로 가까운 상이한 시간에 투여될 수 있는 것으로 이해된다. 추가로, 작용제들이 혼합되거나 또는 별개의 부피에 있을 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 조합 투여는 동일한 치료 과정, 예를 들어, 암을 항-CD33 요법으로 치료하는 과정 중의 투여를 포함하고, 대상체에게 유효 개수의 CD33-변형 세포가 동반적으로 또는 순차적으로, 예를 들어, 항-CD33 요법으로의 치료 전, 동안 또는 후에 투여될 수 있다.

[0442] 일부 실시양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 CD33을 표적화하는 작용제는 CD33에 결합할 수 있는 항원-결합 단편 (예를 들어, 단일쇄 항체)을 포함하는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포이다. 면역 세포는, 예를 들어, T 세포 (예를 들어, CD4+ 또는 CD8+ T 세포) 또는 NK 세포일 수 있다.

[0443] 키메라 항원 수용체 (CAR)는 적어도 세포의 항원 결합 도메인, 막횡단 도메인, 및 기능성 신호전달 도메인, 예를 들어, 자극 분자로부터 유래되는 것을 포함하는 세포질 신호전달 도메인을 포함하는 제조합 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 한 일부 실시양태에서, 세포질 신호전달 도메인은 적어도 1개의 공동자극 분자, 예컨대 4-1BB (즉, CD137), CD27 및/또는 CD28 또는 이러한 분자의 단편으로부터 유래된 1개 이상의 기능성 신호전달 도메인을 추가로 포함한다. CAR의 세포의 항원 결합 도메인은 CD33-결합 항체 단편을 포함할 수 있다. 항체 단편은 1개 이상의 CDR, 가변 영역 (또는 그의 일부분), 불변 영역 (또는 그의 일부분), 또는 상기 중 임의의 것의 조합을 포함할 수 있다.

[0444] 항-인간 CD33 항체의 예시적인 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 아미노산 및 핵산 서열이 하기에서 제공된다. CDR 서열은 아미노산 서열에서 볼드체로 표시되고, 밑줄이 그어진다.

[0445] 항-CD33 중쇄 가변 영역의 아미노산 서열 (서열식별번호: 15)

QVQLQQPGAIEVVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYIIHWIKQTPGQGLEWVGVIYPGNDDISYNQ**
KFQGGKATLTADKSTTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR**EVRLRYFDV**WGQGTITVTVSS

[0446]

[0447] 항-CD33 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열 (서열식별번호: 16)

EIVLTQSPGSLAVSPGERVTMSC**KSSQSVFFSSSQKNYLA**WYQQIPGQSPRLLIY**WASTRES**
GVFDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDLAIIY**CHQYLSRT**FGQGTKLEIKR

[0448]

[0449] 본원에 기술된 바와 같은 CD33을 표적화하는 작용제를 구축하는 데 사용하기 위한 항-CD33 항체 결합 단편은 서열식별번호: 15 및 서열식별번호: 16에서의 것과 동일한 중쇄 및/또는 경쇄 CDR 영역을 포함할 수 있다. 이러한 항체는 프레임워크 영역 중 1개 이상에서 아미노산 잔기 변이를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 항-CD33 항체 단편은 서열식별번호: 15와 적어도 70%의 서열 동일성 (예를 들어, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상)을 공유하는 중쇄 가변 영역을 포함할 수 있고/거나 서열식별번호: 16과 적어도 70%의 서열 동일성 (예를 들어, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 이상)을 공유하는 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있다.

[0450] 예시적인 키메라 수용체 성분 서열이 하기 표 3에서 제공된다.

[0451] 표 3: 키메라 수용체의 예시적인 성분

키메라 수용체 성분	아미노산 서열
항원-결합 단편	경쇄- GSTSSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO: 17)-중쇄
CD28 공동자극 도메인	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFHIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTR KHYPYAPPRDFAAYRS (SEQ ID NO: 18)
ICOS 공동자극 도메인 (볼드체), ICOS 막횡단 도메인 (이탤릭체) 및 ICOS의 세포외 도메인의 일부분 (밑줄)	<u>LSIFDPPPFKVTLTGGYLHIYESQLCCQLK</u> <i>WLP</i> <u>IGCAAFVVVCILGCIL</u> <u>CWLTKKKYSSS</u> VHDPNGEYMFMR <u>AVNTAKKSRLTDVTL</u> (SEQ ID NO: 19)
ICOS 공동자극 도메인	CWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMR <u>AVNTAKKSRLTDVTL</u> (SEQ ID NO: 20)
CD28로부터의 힌지 도메인 (이탤릭체) 및 막횡단 도메인 (볼드체) 을 포함하는 CD28/ICOS 키메라 (ICOS 부분이 밑줄로 표시됨)	<i>IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP</i> <u>LPGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFHIFWVRSKRSRLHSDYMFMR</u> <u>AVNTAKKSRLTDVTL</u> (SEQ ID NO: 21)
CD3 ζ 세포질 신호전달 도메인	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRR EEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQE GLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGK GHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO: 22)

[0452]

[0453]

포유동물 (예를 들어, 인간)에게 투여되는 세포, 예를 들어, 면역 세포 또는 조혈 세포의 전형적인 개수는, 예를 들어, 백만개 내지 천억개의 세포의 범위일 수 있지만, 이러한 예시적인 범위 미만 또는 초과 양 또한 본 개시내용의 범주 내에 속한다.

[0454]

일부 실시양태에서, CD33을 표적화하는 작용제는 항체-약물 접합체 (ADC)이다. ADC는 독소 또는 약물 분자에 접합된 항체 또는 그의 항원-결합 단편을 포함하는 분자일 수 있다. 항체 또는 그의 단편이 상응하는 항원에 결합하는 것은 독소 또는 약물 분자를 항원을 자신의 세포 표면에 제시하는 세포 (예를 들어, 표적 세포)로 전달하는 것을 허용하고, 이에 의해 표적 세포의 사멸을 발생시킨다.

[0455]

일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 15에 의해 제공되는 중쇄 가변 영역과 동일한 중쇄 CDR, 및 서열식별번호: 16에 의해 제공되는 경쇄 가변 영역과 동일한 경쇄 CDR을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체의 항원-결합 단편은 서열식별번호: 15에 의해 제공되는 중쇄 가변 영역 및 서열식별번호: 16에 의해 제공되는 것과 동일한 경쇄 가변 영역을 갖는다.

[0456]

항체-약물 접합에서의 사용과 상용성인 독소 또는 약물은 관련 기술 분야에 공지되어 있고, 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 예를 들어, 문헌 [Peters et al. *Biosci. Rep.*(2015) 35(4): e00225]; [Beck et al. *Nature Reviews Drug Discovery* (2017) 16:315-337]; [Marin-Acevedo et al. *J. Hematol. Oncol.*(2018)11: 8]; [Elgundi et al. *Advanced Drug Delivery Reviews* (2017) 122: 2-19]을 참조한다.

[0457]

일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체는 항체 및 약물 분자를 부착시키는 링커 (예를 들어, 펩티드 링커, 예컨대 절단가능한 링커)를 추가로 포함할 수 있다.

[0458]

항체-약물 접합체의 예는, 비제한적으로, 브렌투시맙 베도틴, 글렘바투무맙 베도틴/CDX-011, 데파톡시주맙 마포도틴/ABT-414, PSMA ADC, 폴라투주맙 베도틴/RG7596/DCDS4501A, 데닌투주맙 마포도틴/SGN-CD19A, AGS-16C3F,

CDX-014, RG7841/DLYE5953A, RG7882/DMUC406A, RG7986/DCDS0780A, SGN-LIV1A, 엔포르투맵 베도틴/ASG-22ME, AG-15ME, AGS67E, 텔리소투맵 베도틴/ABBV-399, ABBV-221, ABBV-085, GSK-2857916, 티소투맵 베도틴/HuMax-TF-ADC, HuMax-Ax1-ADC, 피나투맵 베도틴/RG7593/DCDT2980S, 리파스투맵 베도틴/RG7599/DNIB0600A, 인두사투맵 베도틴/MLN-0264/TAK-264, 반도르투맵 베도틴/RG7450/DSTP3086S, 소피투맵 베도틴/RG7458/DMUC5754A, RG7600/DMOT4039A, RG7336/DEDN6526A, ME1547, PF-06263507/ADC 5T4, 트라스투맵 엠탄신/T-DM1, 미르베톡시맵 소라브탄신/IMGN853, 콜록시맵 라브탄신/SAR3419, 나라톡시맵 엠탄신/IMGN529, 인다톡시맵 라브탄신/BT-062, 아네투맵 라브탄신/BAY 94-9343, SAR408701, SAR428926, AMG 224, PCA062, HKT288, LY3076226, SAR566658, 로르보투맵 메르탄신/IMGN901, 칸투맵 메르탄신/SB-408075, 칸투맵 라브탄신/IMGN242, 라프리톡시맵 엠탄신/IMGN289, IMGN388, 비바투맵 메르탄신, AVE9633, BIIB015, MLN2704, AMG 172, AMG 595, LOP 628, 바다스톡시맵 탈리린/SGN-CD33A, SGN-CD70A, SGN-CD19B, SGN-CD123A, SGN-CD352A, 로발피투맵 테시린/SC16LD6.5, SC-002, SC-003, ADCT-301/HuMax-TAC-PBD, ADCT-402, MEDI3726/ADC-401, IMGN779, IMGN632, 겐투맵 오조가미신, 이노투맵 오조가미신/CMC-544, PF-06647263, CMD-193, CMB-401, 트라스투맵 듀오카르마진/SYD985, BMS-936561/MDX-1203, 사시투맵 고비테칸/IMMU-132, 라베투맵 고비테칸/IMMU-130, DS-8201a, U3-1402, 밀라투맵 독소루비신/IMMU-110/hLL1-DOX, BMS-986148, RC48-ADC/허투맵-vc-MMAE, PF-06647020, PF-06650808, PF-06664178/RN927C, 루파르투맵 아마도틴/BAY1129980, 아프루투맵 익사도틴/BAY1187982, ARX788, AGS62P1, XMT-1522, AbGn-107, MEDI4276, DSTA4637S/RG7861을 포함한다. 한 예에서, 항체-약물 접합체는 겐투맵 오조가미신이다.

[0459] 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체가 세포-표면 계통-특이적 단백질의 에피토프에 결합하는 것은 항체-약물 접합체의 내재화를 유도하고, 약물 (또는 독소)이 세포 내에서 방출될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체가 세포-표면 계통-특이적 단백질의 에피토프에 결합하는 것은 독소 또는 약물의 내재화를 유도하고, 이는 독소 또는 약물이 계통-특이적 단백질을 발현하는 세포 (표적 세포)를 사멸시키게 한다. 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체가 세포-표면 계통-특이적 단백질의 에피토프에 결합하는 것은 독소 또는 약물의 내재화를 유도하고, 이는 계통-특이적 단백질을 발현하는 세포 (표적 세포)의 활성을 조절할 수 있다. 본원에 기술된 항체-약물 접합체에서 사용되는 독소 또는 약물의 유형은 임의의 특정 유형에 제한되지 않는다.

[0460] 실시예

[0461] 실시예 1: 인간 세포에서의 CD33의 유전자 편집

[0462] sgRNA 구축물의 디자인

[0463] 표적 영역에 근접한 SpCas9 PAM (5'-NGG-3')에 대한 수동 검사에 의해 표 4에 지시된 sgRNA가 디자인되었고, 온라인 검색 알고리즘 (예를 들어, 벤츨링(Benchling) 알고리즘, 문헌 [Doench et al. 2016, Hsu et al. 2013])으로 인간 게놈에서의 잠재적인 탈표적 부위를 최소화함으로써 예상되는 특이성에 따라 우선 순위가 정해졌다. 모든 디자인된 합성 sgRNA는 5' 및 3' 단부 양쪽 모두의 3개의 말단 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드가 있도록 생산되었었다. 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 ("ms"로 약칭됨)를 함유하였고, ms-sgRNA를 HPLC로 정제하였다. Cas9 단백질은 신테고(Synthego)에서 구입하였다.

[0464] 표 4: CD33 gRNA의 표적화 도메인의 서열. 상응하는 gRNA는 등가의 RNA 서열을 포함할 수 있다.

gRNA 명칭	서열	PAM	엑손
gRNA C	GGTGGGGGCAGCTGACAACC (SEQ ID NO: 3)	AGG	엑손 3
gRNA D	CGGTGCTCATAATCACCCCA (SEQ ID NO: 4)	CGG	엑손 3
gRNA A	CCCCAGGACTACTCACTCCT(SEQ ID NO: 1)	CGG	엑손 3
gRNA B	ACCGAGGAGTGAGTAGTCCT (SEQ ID NO: 2)	GGG	엑손 3

[0465]

[0466] 임차 인간 CD34+ HSC에서의 편집

[0467] 가동화된 말초 혈액으로부터 유래된 동결된 CD34+ HSC를 헤마케어(Hemacare) 또는 프레드 허친슨 캔서 센터(Fred Hutchinson Cancer Center)로부터 구입하고, 제조사의 설명서에 따라 해동하였다. HSC를 편집하기 위해, $\sim 1 \times 10^6$ 개의 HSC를 해동하고, 스템스팬(StemSpan) CC110 각테일이 보충된 스템스팬 SFEM 배지 (스템셀 테

크놀러지즈(StemCell Technologies))에서 24-48시간 동안 배양한 후, RNP를 전기천공시켰다. HSC에 전기천공시키기 위해, 1.5×10^5 개의 세포를 펠릿화시키고, 20 μ l 론자(Lonza) P3 용액에 재현탁시키고, 10 μ l Cas9 RNP와 혼합하였다. 론자 뉴클레오이펙터(Nucleofector) 2 (프로그램 DU-100) 및 인간 P3 세포 뉴클레오이펙션 키트(VPA-1002, 론자)를 사용하여 CD34+ HSC에 전기천공시켰다.

[0468] 게놈 DNA 분석

[0469] 모든 게놈 분석을 위해, DNA를 세포로부터 수확하고, 표적 영역에 플랭킹된 프라이머로 증폭시키고, 정제하고, 대립유전자 변형 빈도를 TIDE (분해에 의한 Indel 추적(Tracking of Indels by Decomposition))를 사용하여 분석하였다. 모의-형질감염 샘플로부터의 참조 서열을 사용하여 분석을 수행하였다. 파라미터는 10개의 뉴클레오타이드의 디폴트 최대 indel 크기, 및 고품질 추적으로 최대의 가능한 윈도우를 커버하는 분해 윈도우로 설정되었다. 3.5%의 검출 감도 미만의 모든 TIDE 분석은 0%로 설정되었다.

[0470] 유동 세포측정법 분석

[0471] 생존 HL60 또는 CD34+ HSC를 항-CD33 항체 (P67.7)를 사용하여 CD33에 대해 염색하고, 어툰 NxT(Attune NxT) 유동 세포측정기 (라이프 테크놀러지즈(Life Technologies))에서 유동 세포측정법에 의해 분석하였다.

[0472] 결과

[0473] 상기 기술된 바와 같이 Cas9 단백질 및 지시된 CD33-표적화 gRNA를 인간 CD34+ 세포에 전기천공하였다.

[0474] TIDE에 의해 평가된 바와 같은 % INDEL (도 1 및 도 3) 또는 유동 세포측정법에 의한 표면 CD33 단백질 발현 (도 2 및 도 4)에 의해 편집 백분율을 결정하였다. 유동 세포측정법 분석으로부터 편집 효율을 결정하였다.

[0475] 도 1에 나타난 바와 같이, gRNA F, gRNA 55E, gRNA H, gRNA C, 및 gRNA D가 세포의 약 50-100%의 범위에서 높은 비율의 indel을 제공하였다. 이에 비교하여, gRNA J는 훨씬 더 낮은 비율의 indel을 제공하였다. gRNA E는 공여자 2-4에서는 높은 indel 빈도를 나타냈지만, 공여자 1에서는 그렇지 않았다. 도 1의 다른 gRNA는 공여자 간에 더욱 유사한 결과를 나타냈다.

[0476] 도 2에 나타난 바와 같이, gRNA F, gRNA E, gRNA H, gRNA C, 및 gRNA D의 gRNA는 FACS에 의해 검출된 바와 같이 CD33 발현의 현저한 감소를 나타냈다. gRNA J는, 도 1에서 관찰된 이의 더 낮은 활성과 일관되게, CD33 발현에서 유사한 감소를 나타내지 않았다.

[0477] 도 3에 나타난 바와 같이, gRNA A 및 gRNA B는 세포의 약 60-90%의 범위에서 높은 비율의 indel을 제공하였다.

[0478] 도 4에 나타난 바와 같이, gRNA A 및 gRNA B는 FACS에 의해 검출된 바와 같이 CD33 발현의 현저한 감소를 나타냈다.

[0479] 이들 및 기타 gRNA의 서브세트의 유전자 편집 효율을 HL60 AML (전골수모세포 백혈병) 세포주에서 테스트하였다. 지시된 gRNA를 사용하여 CRISPR/Cas9를 통해 HL-60 세포를 유전자 편집하였다. 전기천공 6일 후에 CD33-양성 세포의 백분율을 유동 세포측정법에 의해 평가하여, CD33을 녹아웃시키는 것에서의 유효성을 평가하였다. 게놈 DNA를 PCR 증폭시키고, 상기 기술된 바와 같이 TIDE에 의해 분석하여, INDEL (삽입/결실)에 의해 평가되는 바와 같은 편집 백분율을 결정하였다.

표 5. CD33 gRNA의 유전자 편집 효율

gRNA	%CD33+ (FACS)	%INDEL (TIDE)
모의	99.6%	n/a
gRNA F	10.2%	87.3%
gRNA E	9.73%	89.9%
gRNA G	45.2%	47.1%
gRNA H	13.8%	88.6%
gRNA I	14.8%	58.1%
gRNA J	99.7%	--
gRNAC	7.9%	77.7%
gRNAK	8.6%	77.3%
gRNA L	17.1%	71.7%
gRNA D	5.4%	93%
gRNAM	8.5%	32.9%
gRNA N	65.1%	52.5%

실시예 2: 효율적인 다중 게놈 편집

통상적인 방법 또는 본원에 기술된 것에 따라 HSC 세포에서의 CD19 및 CD33 유전자의 효율적인 이중 게놈 편집을 NALM-6 세포 또는 HSC에서 수행하였다. 하기 표 8은 CD19의 엑손 2 및 CD33의 엑손 3을 표적화하는 gRNA를 제공한다.

표 6. CD19 및 CD33의 이중 편집을 위한 가이드 RNA 표적화 도메인 서열. 상응하는 gRNA는 등가의 RNA 서열을 포함할 수 있다.

유전자	서열	PAM	위치
CD19	CACAGCGTTATCTCCCTCTG (SEQ ID NO: 62)	GGT	엑손 2
CD33 (gRNA A)	CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 1)	CGG	엑손 3

벌크-편집 세포에서 게놈 DNA를 단리하고, TIDE 검정을 수행하여, NALM-6, HL-60 세포 및 HSC에서의 게놈 편집을 검사하였다. 결과가 도 5a-5d에서 도시된다. 이러한 연구로부터 수득된 결과는 HSC의 ~70%가 CD19 유전자의 양쪽 좌위에 돌연변이를 포함하고, HSC의 ~80%가 CD33 유전자의 양쪽 좌위에 돌연변이를 포함한다는 것을 나타내고, 이는 이중-편집 세포의 적어도 50%가 적어도 1개의 염색체 상에 편집된 CD19 유전자 및 편집된 CD33 유전자 양쪽 모두를 갖는다는 것을 지시한다. 유사한 수준의 편집된 세포가 HL-60 세포 및 Nalm-6 세포에서 관찰되었다.

실시예 3: 생존율에 대한 다중 좌위 편집의 효과

세포 생존율에 대한 다중 좌위에서의 게놈 편집의 효과를 NALM-6, HL-60 세포 및 HSC에서 평가하였다. 뉴클레오택션 2일 전에, HSPC를 해동하거나 또는 Nalm-6 또는 HL-60 세포를 계대시켰다. 24시 및 48시 (뉴클레오택션 일)에, 세포를 계수하고, 세포 생존율을 평가하였다. 표 6의 gRNA를 포함하는 복합체로 뉴클레오택션을 수행하였고, 본원에 기술된 물질 및 방법에 따라 수행하였다. 지시된 시점에 세포를 계수하고, 세포 생존율을 평가하였다. 결과가 도 6a-6c에서 도시되고, 이는 이중 Cas9/gRNA 전달이 세포주에서 생존율을 손상시키지 않는다는 것을 지시한다. 단일 가이드 RNA를 넘어서는 추가적인 독성이 HSC에서 관찰되지 않았다.

[0489] 실시예 4: 2개의 세포 표면 항원에 대해 편집된 세포의 생성 및 평가

[0490] 결과

[0491] 편집되지 않은 MOLM-13 세포 및 THP-1 세포 (양쪽 모두 인간 AML 세포주)에서 유동 세포측정법에 의해 CD33, CD123 및 CLL1 (CLEC12A)의 세포 표면 수준을 측정하였다. MOLM-13 세포는 높은 수준의 CD33 및 CD123 및 중등도 내지 낮은 수준의 CLL1이 있었다. HL-60 세포는 높은 수준의 CD33 및 CLL1, 및 낮은 수준의 CD123이 있었다 (도 7).

[0492] 본원에 기술된 바와 같은 gRNA 및 Cas9를 사용하여 MOLM-13 세포에서 CD33 및 CD123을 돌연변이시키고, CD33 및 CD123-변형 세포를 유동 세포측정법 분류에 의해 정제하고, CD33 및 CD123의 세포 표면 수준을 측정하였다. 야생형 MOLM-13 세포에서 CD33 및 CD123 수준이 높았다; CD33의 편집은 낮은 CD33 수준만 발생시켰고, CD123의 편집은 낮은 CD123 수준만 발생시켰으며, CD33 및 CD123 양쪽 모두의 편집은 CD33 및 CD123 양쪽 모두의 낮은 수준을 발생시켰다 (도 8). 그 후, 편집된 세포를 본원에 기술된 바와 같은 시험관내 세포독성 검정을 사용하여 CART 이펙터 세포에 대한 저항성에 대해 테스트하였다. 4개의 세포 유형 (야생형, CD33^{-/-}, CD123^{-/-}, 및 CD33^{-/-}CD123^{-/-}) 모두가 모의 CAR 대조군 조건에서 낮은 수준의 특이적 사멸을 경험하였다 (도 9, 가장 왼쪽의 막대 세트). CD33 CAR 세포가 야생형 및 CD123^{-/-} 세포를 효과적으로 사멸시킨 한편, CD33^{-/-} 및 CD33^{-/-}CD123^{-/-} 세포는 CD33 CAR에 대한 통계적으로 유의한 저항성을 나타냈다 (도 9, 두 번째 막대 세트). CD123 CAR 세포가 야생형 및 CD33^{-/-} 세포를 효과적으로 사멸시킨 한편, CD123^{-/-} 및 CD33^{-/-}CD123^{-/-} 세포는 CD123 CAR에 대한 통계적으로 유의한 저항성을 나타냈다 (도 9, 세 번째 막대 세트). CD33 CAR 및 CD123 CAR 세포의 풀이 야생형 세포, CD33^{-/-} 세포, 및 CD123^{-/-} 세포를 효과적으로 사멸시킨 한편, CD33^{-/-}CD123^{-/-} 세포는 CAR 세포의 풀에 대한 통계적으로 유의한 저항성을 나타냈다 (도 9, 가장 오른쪽의 막대 세트). 이러한 실험은 2개의 항원 (CD33 및 CD123)의 녹아웃이 세포를 양쪽 모두의 항원을 표적화하는 CAR 세포에 대해 보호하였음을 입증한다. 또한, 편집된 세포의 집단은 양쪽 항원의 양쪽 대립유전자에서 편집된 세포를 충분히 높은 비율로 함유하였고, 세포 표면 항원의 세포 표면 수준이 충분히 낮아서, 양쪽 유형의 CAR 세포에 대한 통계적으로 유의한 저항성이 달성되었다.

[0493] 본원에 기술된 바와 같은 gRNA 및 Cas9를 사용하여 HL-60에서 CD33 및 CLL1을 돌연변이시키고, CD33 및 CLL1-변형 세포를 유동 세포측정법 분류에 의해 정제하고, CD33 및 CLL1의 세포 표면 수준을 측정하였다. 야생형 HL-60 세포에서 CD33 및 CLL1 수준이 높았다; CD33의 편집은 낮은 CD33 수준만 발생시켰고, CLL1의 편집은 낮은 CLL1 수준만 발생시켰으며, CD33 및 CLL1 양쪽 모두의 편집은 CD33 및 CLL1 양쪽 모두의 낮은 수준을 발생시켰다 (도 10). 그 후, 편집된 세포를 본원에 기술된 바와 같은 시험관내 세포독성 검정을 사용하여 CART 이펙터 세포에 대한 저항성에 대해 테스트하였다. 4개의 세포 유형 (야생형, CD33^{-/-}, CLL1^{-/-}, 및 CD33^{-/-}CLL1^{-/-}) 모두가 모의 CAR 대조군 조건에서 낮은 수준의 특이적 사멸을 경험하였다 (도 11, 가장 왼쪽의 막대 세트). CD33 CAR 세포가 야생형 및 CLL1^{-/-} 세포를 효과적으로 사멸시킨 한편, CD33^{-/-} 및 CD33^{-/-}CLL1^{-/-} 세포는 CD33 CAR에 대한 통계적으로 유의한 저항성을 나타냈다 (도 11, 두 번째 막대 세트). CLL1 CAR 세포가 야생형 및 CD33^{-/-} 세포를 효과적으로 사멸시킨 한편, CLL1^{-/-} 및 CD33^{-/-}CLL1^{-/-} 세포는 CLL1 CAR에 대한 통계적으로 유의한 저항성을 나타냈다 (도 11, 세 번째 막대 세트). CD33 CAR 및 CLL1 CAR 세포의 풀이 야생형 세포, CD33^{-/-} 세포, 및 CLL1^{-/-} 세포를 효과적으로 사멸시킨 한편, CD33^{-/-}CLL1^{-/-} 세포는 CAR 세포의 풀에 대한 통계적으로 유의한 저항성을 나타냈다 (도 11, 가장 오른쪽의 막대 세트). 이러한 실험은 2개의 항원 (CD33 및 CLL1)의 녹아웃이 세포를 양쪽 모두의 항원을 표적화하는 CAR 세포에 대해 보호하였음을 입증한다. 또한, 편집된 세포의 집단은 양쪽 항원의 양쪽 대립유전자에서 편집된 세포를 충분히 높은 비율로 함유하였고, 세포 표면 항원의 세포 표면 수준이 충분히 낮아서, 양쪽 유형의 CAR 세포에 대한 통계적으로 유의한 저항성이 달성되었다.

[0494] 인간 CD34+ 세포에서의 유전자 편집의 효율을 본원에 기술된 바와 같은 TIDE 분석을 사용하여 정량하였다. 내인성 CD33 좌위에서, CD33이 단독으로 또는 CD123 또는 CLL1과 조합되어 표적화되었을 때 약 70-90%의 편집 효율이 관찰되었다 (도 12, 왼쪽 그래프). 내인성 CD123 좌위에서, CD123이 단독으로 또는 CD33 또는 CLL1과 조합되어 표적화되었을 때 약 60%의 편집 효율이 관찰되었다 (도 12, 중앙 그래프). 내인성 CLL1 좌위에서, CLL1이 단독으로 또는 CD33 또는 CD123과 조합되어 표적화되었을 때 약 40-70%의 편집 효율이 관찰되었다 (도 12, 오른쪽 그래프). 이러한 실험은 인간 CD34+ 세포가 2개의 세포 표면 항원 좌위에서 높은 빈도로 편집될 수 있

다는 것을 예시한다.

[0495] 본원에 기술된 바와 같은 콜로니 형성 검정에 의해 측정된 바와 같은 유전자-편집 인간 CD34+ 세포의 분화 잠재력. 개별적으로 또는 모든 쌍별 조합으로 CD33, CD123, 또는 CLL1에 대해 편집된 세포가 BFU-E 콜로니 (과열 형성 단위-적혈구)를 생산하였고, 이는 세포가 이러한 검정에서 유의한 분화 잠재력을 유지한다는 것을 나타낸다 (도 13a). 편집된 세포는 CFU-G/M/GM 콜로니를 또한 생산하였고, 이는 세포가 이러한 검정에서 편집되지 않은 대조군으로부터 통계적으로 구별할 수 없는 분화 잠재력을 유지한다는 것을 나타낸다 (도 13b). 편집된 세포는 검출가능한 CFU-GEMM 콜로니를 또한 생산하였다 (도 13c). 콜로니 형성 단위 (CFU)-G/M/GM 콜로니는 CFU-G (과립구), CFU-M (대식세포), 및 CFU-GM (과립구/대식세포) 콜로니를 지칭한다. CFU-GEMM (과립구/적혈구/대식세포/거대핵세포) 콜로니는 CFU-GM 콜로니를 발생시키는 세포에 대한 전구세포인 덜 분화된 세포로부터 발생된다. 종합하면, 분화 검정은 2개의 좌위에서 편집된 인간 CD34+ 세포가 다양한 세포 유형으로 분화되는 능력을 유지한다는 것을 지시한다.

[0496] 물질 및 방법

[0497] AML 세포주

[0498] 인간 AML 세포주 HL-60는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection) (ATCC)에서 획득되었다. HL-60 세포를 20% 열-불활성화 하이클론(HyClone) 소 태아 혈청 (GE 헬스케어(GE Healthcare))이 보충된 이스코브 변형 둘베코 배지 (IMDM, 깁코(Gibco))에서 배양하였다. 인간 AML 세포주 MOLM-13는 애덱스바이오 테크놀로지스(AddexBio Technologies)로부터 획득되었다. MOLM-13 세포를 10% 열-불활성화 하이클론 소 태아 혈청 (GE 헬스케어)이 보충된 RPMI-1640 배지 (ATCC)에서 배양하였다.

[0499] 가이드 RNA 디자인

[0500] 모든 sgRNA는 표적 영역에 근접한 SpCas9 PAM (5'-NGG-3')에 대한 수동 검사에 의해 디자인되었고, 온라인 검색 알고리즘 (예를 들어, 벤츨링(Benchling) 알고리즘, 문헌 [Doench et al. 2016, Hsu et al. 2013])으로 인간 게놈에서의 잠재적인 탈표적 부위를 최소화함으로써 예상되는 특이성에 따라 우선 순위가 정해졌다. 모든 디자인된 합성 sgRNA는 신테고에서 구입하였고, 5' 및 3' 단부 양쪽 모두의 3개의 말단 위치에 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드가 있었다. 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 ("ms"로 약칭됨)를 함유하였고, ms-sgRNA를 HPLC로 정제하였다. Cas9 단백질은 알테르본(Aldervon)에서 구입하였다. 전형적으로, 본원에 서의 실시예에 기술된 gRNA는 뉴클레오타이드 (nt) 20개의 표적화 서열, nt 12개의 crRNA 반복 서열, nt 4개의 테트라루프 서열, 및 nt 64개의 tracrRNA 서열을 포함하는 sgRNA이다.

[0501] 표 14: CD33, CD123, 또는 CLL-1을 표적화하는 gRNA의 표적화 도메인의 서열. 상응하는 gRNA는 등가의 RNA 서열을 포함할 수 있다.

표적 유전자	서열	PAM	표적 위치
CD33 (gRNA A)	CCCCAGGACTACTCACTCCT (SEQ ID NO: 1)	CGG	CD33 엑손 3
CD123	TTTCTTGAGCTGCAGCTGGG (SEQ ID NO: 24)	CGG	CD123 엑손 5
	AGTTCCCACATCCTGGTGCG (SEQ ID NO: 25)	GGG	CD123 엑손 6
CLL1	GGTGGCTATTGTTTGCAGTG (SEQ ID NO: 23)	TGG	CLL1 엑손 4

[0502]

[0503] AML 세포주 전기천공

[0504] Cas9 단백질 및 ms-sgRNA (1:1 중량비)를 혼합하고, 전기천공 전에 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다. 각각 프로그램 THP-1 및 Opt-3으로 맥스사이트 ATx 일렉트로포레이터 시스템(MaxCyte ATx Electroporator System)을 사용하여 Cas9 리보핵단백질 복합체 (RNP)를 MOLM-13 및 HL-60 세포에 전기천공시켰다. 세포를 유동 세포측정법 분류까지 5-7일 동안 37℃에서 인큐베이션하였다.

- [0505] 인간 CD34+ 세포 배양 및 전기천공
- [0506] 냉동보존된 인간 CD34+ 세포를 헤마케로부터 구입하고, 제조사의 설명서에 따라 해동하였다. 인간 CD34+ 세포를 인간 시토카인 (Flt3, SCF, 및 TPO, 모두 펩프로테크(Peprotech)로부터 구입함)이 보충된 GMP SCGM 배지 (셀제닉스(CellGenix))에서 2일 동안 배양하였다. 론자 4D-뉴클레오이펙터 및 P3 프라이머리 셀 키트(Primary Cell Kit) (프로그램 CA-137)를 사용하여 Cas9 RNP (1:1 중량비의 Cas9 단백질 및 ms-sgRNA)를 CD34+ 세포에 전기천공시켰다. 이중 ms-sgRNA로의 전기천공의 경우, 동일한 양의 각각의 ms-sgRNA가 첨가되었다. 분석할 때까지 세포를 37°C에서 배양하였다.
- [0507] 게놈 DNA 분석
- [0508] prepGEM DNA 추출 키트 (ZyGEM)를 사용하여 전기천공 2일 후에 세포로부터 게놈 DNA를 추출하였다. 관심 게놈 영역을 PCR로 증폭시켰다.
- [0509] PCR 앰플리콘을 생어 시퀀싱 (진위즈(Genewiz))로 분석하였고, 대립유전자 변형 빈도를 tide.deskgen.com의 웹드와이드웹에서 이용가능한 TIDE (분해에 의한 Indel 추적) 소프트웨어를 사용하여 계산하였다.
- [0510] 시험관내 콜로니 형성 단위 (CFU) 검정
- [0511] 전기천공 2일 후, 500개의 CD34+ 세포를 이중으로 6웰 플레이트에서 1.1 mL의 메틸셀룰로스 (메토컬트 H4034 옵티멈(MethoCult H4034 Optimum), 스템 셀 테크놀로지스)에 플레이팅하고, 2주 동안 배양하였다. 그 후, 콜로니를 계수하고, 스템비전(StemVision) (스스템 셀 테크놀로지스)을 사용하여 채점하였다.
- [0512] 유동 세포측정법 분석 및 분류
- [0513] 인간 CD33 (P67.6), CD123 (9F5), 및 CLL1 (REA431)에 대한 형광색소-접합 항체를 각각 바이오레전드 (Biolegend), BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences) 및 밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotec)에서 구입하였다. 모든 항체는 그의 각각의 이소형 대조군과 함께 테스트되었다. 세포를 인간 트루스테인 FcX(TruStain FcX)의 존재 하에 30분 동안 얼음 상에서 특이적 항체와 함께 인큐베이션함으로써 세포 표면 염색을 수행하였다. 모든 염색에 대해, 죽은 세포는 DAPI (바이오레전드) 염색에 의해 분석에서 제외되었다. 모든 샘플을 어튼 NxT 유동 세포측정기 (써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific)) 및 플로우조(FlowJo) 소프트웨어 (트리스타(TreeStar))로 획득하고 분석하였다.
- [0514] 유동 세포측정법 분류를 위해, 세포를 형광색소-접합 항체로 염색한 후 모플로우 아스트리오스 셀 소터(Moflow Astrios Cell Sorter) (백맨 쿨터(Beckman Coulter))로 분류하였다.
- [0515] CAR 구축물 및 렌티바이러스 생산
- [0516] CD33/CLL-1 다중 세포독성 실험에 사용된 항-CD33 CAR-T을 제외하고, CD33, CD123, 및 CLL-1을 표적화하는 2세대 CAR이 구축되었다. 각각의 CAR은 CD8 α 신호 펩티드, CD8 α 힌지 및 막횡단 영역을 사용하는 세포외 scFv 항원-결합 도메인, 4-1BB 공동자극 도메인, 및 CD3 ξ 신호전달 도메인으로 이루어졌다. 항-CD33 scFv 서열은 클론 P67.6 (마일로타그(MyloTag))으로부터, 항-CD123 scFv 서열은 클론 32716으로부터, CLL-1 scFv 서열은 클론 1075.7로부터 수득되었다. 항-CD33 및 항-CD123 CAR 구축물은 scFv의 중쇄에서 경쇄로의 배향을 사용하고, 항-CLL1 CAR 구축물은 경쇄에서 중쇄로의 배향을 사용한다. 중쇄 및 경쇄는 (GGGS)3 링커 (서열식별 번호: 63)에 의해 연결되었다. 각각의 표적에 대한 CAR cDNA 서열을 pCDH-EF1a-MCS-T2A-GFP 발현 벡터의 다중 클로닝 부위 내로 서브클로닝하였고, 제조사의 프로토콜 (시스템 바이오사이언시즈(System Biosciences))에 따라 렌티바이러스가 생성되었다. 리포펙타민(Lipofectamine) 3000 (써모피셔)을 사용하여 293TN 세포 (시스템 바이오사이언시즈)의 일시적인 형질감염에 의해 렌티바이러스가 생성될 수 있다. 항-CD33 scFv의 경쇄 및 중쇄 (클론 My96), CD8 α 힌지 도메인, ICOS 막횡단 도메인, ICOS 신호전달 도메인, 4-1BB 신호전달 도메인 및 CD3 ξ 신호전달 도메인을 렌티바이러스 플라스미드 pHIV-ZsGreen 내로 클로닝함으로써 CAR 구축물이 생성되었다.
- [0517] CAR 형질도입 및 확장
- [0518] 제조사의 프로토콜 (스스템 셀 테크놀로지스)에 따라 항-CD4 및 항-CD8 마이크로비드를 사용하는 자기 비드 분리기에 의해 류코 팩(Leuko Pak) (스스템 셀 테크놀로지스)으로부터 인간 1차 T 세포를 분리하였다. 정제된 CD4+ 및 CD8+ T 세포를 1:1로 혼합하고, 1:1의 비드 대 세포 비로 항-CD3/CD28 커플링 다이내비드(Dynabead) (써모 피셔)를 사용하여 활성화시켰다. 사용된 T 세포 배양 배지는 면역 세포 혈청 대체물, L-글루타민 및 글루타맥스 (GlutaMAX) (모두 써모 피셔로부터 구입함) 및 100 IU/mL의 IL-2 (펩프로테크)가 보충된 CTS 옵티마이저(CTS

Optimizer) T 세포 확장 배지였다. 활성화 24시간 후에 폴리브렌 (시그마 (Sigma))의 존재 하의 스피노클레이션(spinoculation)에 의해 T 세포 형질도입을 수행하였다. CAR-T 세포를 냉동보존 전에 9일 동안 배양하였다. 모든 실험 전에, T 세포를 해동하고, 37℃에서 4-6시간 동안 휴지시켰다.

[0519] 유동 세포측정법을 기초로 하는 CAR-T 세포독성 검정

[0520] 음성 대조군 세포의 생존에 상대적으로 표적 세포의 생존을 비교함으로써 표적 세포의 세포독성을 측정하였다. CD33/CD123 다중 세포독성 검정의 경우, 야생형 및 CRISPR/Cas9 편집 MOLM-13 세포가 표적 세포로서 사용된 한편, CD33/CLL-1 다중 세포독성 검정의 경우에는 야생형 및 CRISPR/Cas9 편집 HL60 세포가 표적 세포로서 사용되었다. 야생형 Raji 세포주 (ATCC)가 양쪽 실험에 대해 음성 대조군으로서 사용되었다. 제조사의 설명서에 따라 각각 셀트레이스 바이올렛(CellTrace Violet) (CTV) 및 CFSE (썬모 피셔)로 표적 세포 및 음성 대조군 세포를 염색하였다. 염색 후, 표적 세포 및 음성 대조군 세포를 1:1로 혼합하였다.

[0521] 항-CD33, CD123, 또는 CLL1 CAR-T 세포가 이펙터 T 세포로서 사용되었다. 형질도입되지 않은 T 세포 (모의 CAR-T)가 대조군으로서 사용되었다. CARpool 군의 경우, 적합한 CAR-T 세포가 1:1로 혼합되었다. 이펙터 T 세포를 표적 세포/음성 대조군 세포 혼합물과 1:1의 이펙터 대 표적 비로 이중으로 공동-배양하였다. 이펙터 T 세포가 없는 표적 세포/음성 대조군 세포 혼합물 단독의 군이 대조군으로서 포함되었다. 유동 세포측정법 분석 전에 세포를 24시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 프로피듐 아이오다이드 (썬모피셔)가 생존성 염료로서 사용되었다. 비 세포 용해를 계산하기 위해, 생존 표적 세포 대 생존 음성 대조군 세포의 비율 (표적 비율로 명명됨)이 사용되었다. $((\text{이펙터 세포의 부재 하의 표적 비율} - \text{이펙터 세포의 존재 하의 표적 비율}) / (\text{이펙터의 존재 하의 표적 비율})) \times 100\%$ 로서 비 세포 용해를 계산하였다.

[0522] 실시예 5: 조작된 HSC에 대한 겐투주맙 오조가미신의 효과

[0523] 가동화된 말초 혈액으로부터 유래된 동결된 CD34+ HSPC를 해동하고, 72시간 동안 배양한 후, Cas9 및 sgRNA를 포함하는 리보핵단백질을 전기천공시켰다. 하기 조건으로 샘플에 전기천공시켰다:

[0524] i. 모의 (Cas9 단독),

[0525] ii. KO sgRNA (CD33 gRNA A)

[0526] 세포를 72시간 동안 회복시키고, 게놈 DNA를 수집하고, 분석하였다.

[0527] CD33-양성 세포의 백분율을 유동 세포측정법으로 평가하여, gRNA A로의 편집이 CD33을 녹아웃시키는 데 효과적이었음을 확인하였다 (데이터는 제시되지 않음). HSC에서의 편집 이벤트가 다양한 indel 서열을 발생시키는 것으로 밝혀졌다 (데이터는 제시되지 않음).

[0528] (i) 겐투주맙 오조가미신 (GO)에 대한 CD33 엑손2 결실이 있는 세포의 감수성

[0529] 시험관내 독성을 결정하기 위해, 세포를 배양 배지에서 GO와 함께 인큐베이션하고, 생존 세포의 수를 경시적으로 정량하였다. 하기 표에 나타난 바와 같이, CD33 gRNA A로 생성된 CD33 녹아웃 세포가 전장 CD33을 발현하는 세포 (모의)보다 GO 처리에 더 저항성이었다. CD33KO 세포에서 관찰된 50% 편집이 분열 세포에서 충분한 보호로 간주된다.

유전자형	3일 후		7일 후		15일 후	
	세포 수 (백만개/ ml)	% 생존율	세포 수 (백만개/ ml)	% 생존율	세포 수 (백만개/ ml)	% 생존율
모의	0.8	90	0.65	97	0.43	97
CD33 gRNA A	1.4	90	1.54	96	1.0	97

[0530]

[0531] (ii) CD33-변형 세포의 강화

[0532] CD33 변형 세포가 GO-처리 후 강화되었는지를 검정하기 위해, CD34+ HSPC를 표준 Cas9/gRNA 비의 50%로 편집하였다. 벌크 세포 집단을 GO 처리 전 및 후에 분석하였다. 도 14a에 나타난 바와 같이, GO 처리 전에는, TIDE

에 의해 검정 시 51%의 gRNA A 변형 세포 (KO). GO-처리 후, CD33 변형 세포가 강화되어 KO 세포의 백분율이 80%로 증가하였다. 이러한 데이터는 GO-처리 후 CD33 변형 세포가 강화되었음을 지시하였다.

(iii) CD34+ HSPC의 시험관내 분화

분화 후 다양한 날에 GO 처리 전 및 후의 골수 분화에 대해 세포 집단을 평가하였다. 도 14b 및 14c에 나타난 바와 같이, CD33 gRNA A로 생성된 CD33 녹아웃 세포가 분화 마커 CD14의 증가된 발현을 나타낸 반면, 전장 CD33을 발현하는 세포 (모의)는 분화되지 않았다.

실시예 6: 생체 내에서의 CD33KO CD34+ 세포의 지속성의 평가

가동화된 말초 혈액 CD34+ HSC (mPB CD34+HSPC)에서의 편집

실시예 1에 기술된 바와 같이 gRNA (신테고)가 디자인되었다. mPB CD34+ HSPC를 프레드 허친슨 캔서 센터로부터 구입하고, 제조사의 설명서에 따라 해동하였다. 그 후, 이러한 세포를 CD33-표적화 가이드 RNA인 gRNA A (서열식별번호: 1), gRNA B (서열식별번호: 2), gRNA O (CCTCACTAGACTTGACCCAC) (서열식별번호: 64), 뿐만 아니라 인간 또는 마우스 게놈 내의 어떠한 영역도 표적화하지 않도록 디자인된 비-CD33 표적화 대조군 gRNA (gCtrl)를 사용하여 실시예 1에 기술된 바와 같이 CRISPR/Cas9를 통해 편집하였다.

생체의 편집 4, 24, 및 48시간 후, 유동 세포측정법 및 7AAD 생존성 염료를 사용하여 생존율의 편집된 CD33KO 세포 및 대조군 세포의 백분율을 정량하였다 (도 15). 도 15에 나타난 바와 같이, 3개 모두의 gRNA (A, B, 또는 O)를 사용하여 편집된 CD33KO 세포가 높은 수준으로 생존하였고 (약 80-95%의 생존 세포가 관찰됨), 전기천공 및 유전자 편집 후에 경시적으로 생존으로 유지되었다. 이는 비-CD33 표적화 대조군 gRNA인 gCtrl로 편집된 대조군 세포에서 관찰된 것과 유사하였다.

추가적으로, 생체의 편집 48시간 후에, 세포로부터 게놈 DNA를 수확하고, 표적 영역에 플랭킹된 프라이머로 PCR 증폭시키고, 정제하고, INDEL (삽입/결실)에 의해 평가되는 바와 같은 백분율 편집을 결정하기 위해, TIDE로 분석하였다. 표 10에 나타난 바와 같이, gRNA A 및 gRNA B가 높은 비율의 indel, 구체적으로는 각각 93.1% 및 91.3%를 제공하였다. 이는 대조군 CD33-표적화 gRNA인 gRNA O로부터의 indel의 비율과 유사하였다.

표 10. CD33 gRNA의 유전자 편집 효율

gRNA	% INDEL (TIDE)
gRNA A	93.1%
gRNA B	81.3%
gRNA O	92.7%

TIDE 분석 후, 지시된 CD33 표적화 gRNA로의 편집 후의 장기-HSC (LT-HSC)의 백분율을 유동 세포측정법에 의해 정량하여, CD38-CD34+CD45RA-CD90+CD49f+인 세포에 대해 게이팅하였다. 특정 gRNA로의 편집 후의 LT-HSC의 백분율이 표 11에서 제시된다. 이러한 검정은 생체 내에서의 CD33KO 세포의 지속성의 조사를 위한 마우스 내로의 주사 전에, 편집된 세포의 냉동보존 시에 행해졌다. 편집된 세포를 바이알 당 1 mL 부피의 배지에서 5×10^6 개의 세포/mL로 CS10 배지 (스탬 셀 테크놀로지)에서 냉동보존하였다.

표 11 CD34+ HSC의 생체의 편집 후의 LT-HSC 집단의 정량

군	세포	%LT-HSC	전체 집단의 %
1	gCtrl	39.4	2.5
2	gRNA O	36.2	2.03
3	gRNA A	39	2.3
4	gRNA B	36.6	2.1

생체 내에서의 CD33KO mPB CD34+ HSPC의 이식 효율 및 지속성 조사

6 내지 8주령의 암컷 NSG 마우스 (JAX)를 2-7일 동안 순응시켰다. 순응 후, X선 조사기에 의해 175 cGy 전신 조사를 사용하여 마우스에 방사선을 조사하였다. 이는 연구 제0일로 간주되었다. 조사 4-10시간 후에, 마우스

에 gRNA A, gRNA B, 또는 gRNA O로 편집된 CD33KO 또는 gCtrl로 편집된 대조군 세포를 이식하였다 (n=15). 냉동보존된 세포를 해동하고, 바이오래드(BioRad) TC-20 자동 세포 계수기를 사용하여 계수하였다. 해동된 바이알에서 생존 세포의 수를 정량하였고, 이를 마우스에서의 이식을 위한 전체 개수의 세포를 제조하는 데 사용하였다 (표 12). 마우스에게 100 μ l 부피로 1×10^6 개의 편집된 세포의 단일 정맥내 주사를 제공하였다. 4개의 군의 각각의 마우스에 대해 체중 및 임상 관찰을 주 1회 기록하였다.

표 12 해동된 편집된 CD33KO 세포 및 대조군 세포의 생존율

군	세포	해동된 바이알	전체 세포의 예상된 # (5×10^6 /바이알)	해동된 바이알 내의 전체 생존 세포의 계산된 #
1	gCtrl	5	25×10^6	22.4×10^6 (87% 생존율)
2	gRNA O	5	25×10^6	19.7×10^6 (80.5% 생존율)
3	gRNA A	5	25×10^6	24.4×10^6 (82% 생존율)
4	gRNA B	5	25×10^6	24.7×10^6 (80.5% 생존율)

이식 후 제8주 및 제12주에, 유동 세포측정법에 의한 분석을 위해 각각의 마우스로부터 안와 후방 출혈에 의해 50 μ l의 혈액을 수집하였다. 이식 후 제16주에, 마우스를 희생시키고, 유동 세포측정법에 의한 분석을 위해 혈액, 비장, 및 골수를 수집하였다. 대퇴골 및 경골로부터 골수를 분리하였다. 대퇴골로부터의 골수는 표적 적 중 편집 분석에 또한 사용되었다. 유동 세포측정법에 의해 측정된 마커 및 사용된 항체 (바이오레전드 또는 BD 바이오사이언스)가 표 13에서 표시된다. FACSCanto™ 10 색상 및 BDFACSDiva™ 소프트웨어를 사용하여 유동 세포측정법을 수행하였다. 도 16의 유동 세포측정법 실험 디자인 및 게이팅 프로토콜의 개략도에 도시된 바와 같이, 먼저 세포를 7AAD 생존성 염료 (라이브/데드 분석)를 사용하여 생존율에 의해 분류하였다. 그 후, 생존 세포를 인간 CD45 (hCD45)의 발현에 대해 게이팅하였지만, 마우스 CD45 (mCD45)는 아니었다. 그 후, hCD45+인 이러한 세포를 인간 CD19 (hCD19)의 발현 (림프성 세포, 특히 B 세포)에 대해 추가로 게이팅하였다. 인간 CD45 (hCD45)를 발현하는 세포를 적어도 hCD33, hCD11b, 및 hCD14를 포함하는 골수 계통의 다양한 세포 마커의 존재에 대해 또한 게이팅하고 분석하였다.

표 13 유동 세포측정법에 의한 세포 정량에 사용된 마커 및 사용된 항체

마커 (h=인간)	항체
7AAD(생존성 염료)	N/A
hCD45	HI30
mCD45	30-F11
hCD33	P67.6
hCD3	OKT3
hCD11b	ICRF44
hCD38	HB-7
hCD19	HIB19
hCD34	561
hCD14	MOP9
hCD123	6H6
hCD10	HI10a

이식 동물의 혈액으로부터 수득된 세포 샘플로부터의 결과

이식 후 제8주에, hCD33 (도 17a), hCD45 (도 17b), hCD14 (도 17c) 및 hCD11b (도 18d)를 발현하는 세포의 μ l

당 전체 개수를 gRNA A (A), gRNA B (B), 또는 gRNA O (O)로 편집된 CD33KO mPB CD34+ HSPC 세포가 제공된 마우스 또는 대조군 gRNA 편집된 세포 (대조군, gCtrl)가 제공된 마우스에서 정량하였다. 도 17a에 나타난 바와 같이, CD33KO 세포 (X축에 도시된 바와 같이, gRNA O, A, 또는 B로 편집됨)가 제공된 마우스는 대조군 세포에 비교하여 hCD33+ 세포가 매우 적었다 (μl 당 ≥ 5 개의 세포). hCD45+ 세포, hCD14+, 및 CD11b+ 세포의 개수는 이식된 편집된 세포와 관계 없이 모든 마우스에 걸쳐 유사하였다. 이러한 결과는 마우스의 혈액에서의 gRNA A 또는 gRNA B로 편집된 CD33KO 세포의 성공적인 이식을 지시한다.

[0554] 이식 후 제8주, 제12주 및 제16주에, 대조군 gRNA (gCtrl)로 편집된 대조군 세포, 또는 CD33KO 세포 (X축에 도시된 바와 같이, gRNA O, A, 또는 B로 편집됨)가 제공된 4개 군의 마우스 (n=15마리의 마우스/군)에서 hCD45+인 유핵 혈액 세포의 백분율을 정량하였다. 이는 hCD45+ 절대 세포 카운트를 마우스 CD45+ (mCD45) 절대 세포 카운트로 나누는 것에 의해 정량되었다 (도 18a-18c). 이식 후 제8주 (도 18a), 제12주 (도 18b), 및 제16주 (도 18d)에, 대조군과 CD33KO 군 사이에서 등가 수준의 hCD45+ 세포가 혈액에서 관찰되었다.

[0555] 대조군 및 CD33KO 마우스 군에서 이식 후 제8주 (도 19a), 제12주 (도 19b), 및 제16주 (도 19c)에 혈액 내의 hCD33+ 세포의 백분율을 또한 정량하였다. 도 19a-19c에 도시된 바와 같이, CD33KO 세포 (X축에 도시된 바와 같이, gRNA O, A, 또는 B로 편집됨)가 이식된 마우스는 제8주, 제12주 및 제16주에 대조군 세포가 이식된 마우스에 비교하여 hCD33+ 세포의 수준이 유의하게 더 낮았다. 추가로, gRNA A 또는 gRNA B로 편집된 CD33KO 세포의 이식이, gRNA, gRNA O로 편집된 CD33KO 세포의 이식과 같이, 혈액 내의 hCD33+ 세포의 유사한 낮은 수준을 발생시켰다.

[0556] 다음으로, CD33KO 세포 (X축에 도시된 바와 같이, gRNA O, A, 또는 B로 편집됨) 또는 대조군 세포가 이식된 마우스에서 이식 후 제8주 (도 20a, 21a, 22a), 제12주 (도 20b, 21b, 22b), 및 제16주 (도 20c, 21c, 22c)에 혈액 내의 CD19+ 림프성 세포 (도 20a-20c), hCD14+ 단핵구 (도 21a-21c), 및 hCD11b+ 과립구/호중구 (도 22a-22c)의 백분율을 정량하였다. 혈액 내의 hCD19+ 세포, hCD14+ 세포, 및 hCD11b+ 세포의 수준이 대조군과 CD33KO 군 사이에서 등가였고, 이러한 세포의 수준이 이식 후 제8주에서 제16주까지 등가로 유지되었다. 이러한 데이터는 유사한 수준의 인간 골수 및 림프성 세포 집단이 CD33KO 세포가 제공된 마우스 및 대조군 세포가 제공된 마우스에 존재하였음을 지시하였다.

[0557] 마지막으로, 대조군 세포가 이식된 마우스 및 CD33KO 세포가 이식된 마우스의 혈액에서 이식 후 제8주, 제12주 및 제16주 (각각 도 23a-23c)에 인간 CD33KO 유래 단핵구 세포 (hCD33-CD14+)의 백분율을 정량하였다. 제8주에, 대조군 세포가 이식된 마우스에서, hCD33+CD14+ 단핵구가 혈액에서 관찰되었지만, CD33KO 유래 단핵구 (hCD33-CD14+)는 관찰되지 않았다 (도 23a, 왼쪽 그래프). 대조적으로, CD33KO 세포 (X축에 도시된 바와 같이, gRNA O, A, 또는 B로 편집됨)가 이식된 마우스에서는, hCD33+CD14+ 단핵구가 관찰되지 않았지만, 세포의 약 1-3%가 CD33KO 유래 단핵구 (hCD33-CD14+)였다 (도 23b, 오른쪽 그래프). 유사하게, 제12주 및 제16주 (각각 도 23b 및 23c)에, CD33KO 유래 단핵구 (hCD33-CD14+)의 백분율 증가가 CD33KO 세포가 이식된 마우스에서 관찰된 반면 (도 23b 및 23c, 오른쪽 그래프), 대조군 마우스에서는 hCD33+CD14+ 단핵구의 수 증가가 관찰되었다 (도 23b 및 23c, 왼쪽 그래프). 이러한 데이터는 경시적으로 혈액에서 확장 및 지속될 수 있는 gRNA A, gRNA B, 또는 gRNA O로 편집된 CD33KO 세포의 성공적인 이식을 지시한다. 또한, CD33KO 세포가 이식된 마우스에서의 CD33KO 유래 단핵구 (hCD33-CD14+)의 전체 집단이 분석된 모든 시점에서 대조군 세포가 이식된 마우스에서의 hCD33+CD14+ 단핵구와 유사하였다.

[0558] 이식 동물의 골수로부터 수득된 세포 샘플로부터의 결과

[0559] 이식 후 제16주에, 대조군 세포 또는 CD33KO 세포 (X축에 도시된 바와 같이, gRNA O, A, 또는 B로 편집됨)가 이식된 마우스의 골수에서 hCD45+ 세포의 백분율 (도 24a) 및 hCD33+ 세포의 백분율 (도 24b)을 정량하였다. hCD45+ 세포의 백분율이 대조군 및 CD33KO 군에 걸쳐 등가였고, 이는 유핵 골수 세포 빈도의 상실이 없음을 지시한다. hCD33+ 세포의 백분율은 대조군에 비교하여 CD33KO 군에서 유의하게 더 낮았고, 이는 이러한 군에서의 유핵 혈액 세포로부터의 CD33의 상실을 지시한다. 이러한 데이터는 NSG 마우스의 골수에서의 CD33KO HSC의 장기 지속성을 또한 입증한다.

[0560] 추가적으로, 이식 후 제16주에, 골수 내의 CD19+ 림프성 세포 (도 25a), hCD14+ 단핵구 (도 25b), hCD11b+ 과립구/호중구 (도 25d), 및 hCD3+ T 세포 (도 25e)의 백분율을 정량하였다. 골수 내의 hCD19+ 세포, hCD14+ 세포, hCD11b+ 세포, 및 hCD3+의 수준이 대조군과 CD33KO 군 사이에서 등가였다. 이러한 데이터는 마우스에서의 편집된 CD33KO 세포로부터의 다계통 인간 조혈 계구성을 지시한다.

- [0561] 대조군 및 CD33KO 세포가 이식된 마우스에서 이식 후 제16주에 CD33KO 유래 단핵구 (hCD33-CD14+) (도 26b) 및 hCD33+CD14+ 단핵구 (도 26a)의 백분율을 정량하였다. CD33KO 유래 단핵구 (hCD33-CD14+)가 CD33KO 세포 (X축에 도시된 바와 같이, gRNA O, A, 또는 B로 편집됨)가 이식된 마우스의 골수에서 관찰되었다. 추가로, CD33KO 세포가 이식된 마우스에서의 CD33KO 유래 단핵구 (hCD33-CD14+) 집단이 NSG 마우스의 골수에서 이식 후 제16주에 대조군 세포가 이식된 마우스에서 관찰된 hCD33+CD14+ 단핵구 집단의 집단과 유사하게 유지되었다.
- [0562] 제16주에, 대조군 세포가 이식된 마우스 또는 CD33KO 세포 (X축에 도시된 바와 같이, gRNA O, A, 또는 B로 편집됨)가 이식된 마우스의 골수에서 hCD34+ 세포 (도 27a), hCD38+ 세포 (도 27b), hCD34+hCD38- 비수입 전구 세포 (도 27c), 및 hCD34+hCD38+ 수입 전구 세포 (도 27d)의 백분율을 정량하였다. 유사한 수준의 hCD34+ 세포, hCD38+ 세포, hCD34+hCD38- 비수입 전구 세포, 및 hCD34+hCD38+ 수입 전구 세포가 대조군 및 CD33KO 군에서 관찰된 바와 같이, 이러한 결과는 CD33KO 세포가 이식된 마우스의 골수에서의 보존된 전구 세포 집단을 입증하였다.
- [0563] 마지막으로, 편집된 CD33KO 세포가 이식된 마우스에서 표적 적중 CD33 편집을 분석하기 위해, 이식 후 제16주에 단리된 골수 샘플에서 앰플리콘 시퀀싱을 수행하였다. 도 28a는 하기 gRNA로 편집된 CD33KO 세포가 투여된 마우스에서의 편집된 세포의 백분율을 나타낸다: gRNA O (왼쪽 패널), gRNA A (중앙 패널), 또는 gRNA B (오른쪽 패널). 사용된 모든 gRNA에서 CD33의 높은 백분율의 표적 적중 편집이 입증되었다 (약 60-90%). 도 28b-28d는 CD33KO 세포를 생성시키는 것에서 사용된 각각의 gRNA에 대해, 단리된 골수 세포에서 관찰된 상이한 편집 이벤트들을 나타내는 상위 5개의 INDEL 중을 나타낸다. gRNA A 및 gRNA B가, gRNA O와 유사하게, CD33 유전자에서 크기가 염기 쌍 1 내지 5개 범위인 다양한 삽입 및 결실을 발생시켰다.
- [0564] *이식 동물의 비장으로부터 수득된 세포 샘플로부터의 결과*
- [0565] 이식 후 제16주에, 대조군 세포 또는 CD33KO 세포 (X축에 도시된 바와 같이, gRNA O, A, 또는 B로 편집됨)가 이식된 마우스의 비장에서 hCD45+ 세포의 백분율 (도 29a) 및 hCD33+ 세포의 백분율 (도 29b)을 또한 정량하였다. hCD45+ 세포의 백분율이 대조군 및 CD33KO 군에 걸쳐 증가였다. hCD33+ 세포의 백분율은 대조군에 비교하여 CD33KO 군에서 유의하게 더 낮았다. 이러한 데이터는 NSG 마우스의 비장에서의 CD33KO HSC의 장기 지속성을 또한 입증한다.
- [0566] 추가적으로, 이식 후 제16주에, 비장 내의 hCD14+ 단핵구 (도 29c), hCD11b+ 과립구/호중구 (도 25d), CD19+ 림프성 세포 (도 29e), 및 hCD3+ T 세포 (도 29f)의 백분율을 정량하였다. 비장 내의 hCD14+ 세포, hCD11b+ 세포, hCD19+ 세포, 및 hCD3+의 수준이 대조군과 CD33KO 군 사이에서 증가였다. 이러한 데이터는 편집된 CD33KO 세포가 NSG 마우스의 비장에서 다계통 인간 조혈 세포 재구성이 가능하였음을 지시한다.
- [0567] *호중구를 평가하는 혈액 및 골수에서의 결과*
- [0568] 이식 후 제16주에, 대조군 세포 또는 CD33KO 세포 (X축에 도시된 바와 같이, gRNA O, A, 또는 B로 편집됨)가 이식된 마우스의 혈액 및 골수에서 hCD11b+ 세포 (도 30a (혈액), 31a (골수)), hCD33+CD11b+ 호중구 세포 (도 30b (혈액), 31b (골수)), 및 CD33KO 유래 호중구 (hCD33-CD11b+) (도 30c (혈액), 31c (골수))의 백분율을 정량하였다. CD33KO 유래 호중구 (hCD33-CD11b+)가 CD33KO 세포가 이식된 마우스의 혈액 및 골수에서 관찰되었다. 추가로, CD33KO 세포가 이식된 마우스에서의 CD33KO 유래 호중구 (hCD33-CD11b+) 집단이 NSG 마우스의 혈액 및 골수 양쪽 모두에서 이식 후 제16주에 대조군 세포가 이식된 마우스에서 관찰된 hCD33+CD11b+ 호중구 집단의 집단과 유사하게 유지되었다.
- [0569] *골수 및 림프계 전구 세포를 평가하는 혈액 및 골수에서의 결과*
- [0570] 또한, 제16주에, 대조군 세포 또는 CD33KO 세포 (X축에 도시된 바와 같이, gRNA O, A, 또는 B로 편집됨)가 이식된 마우스에서 혈액 내의 hCD123+ 세포의 백분율 (도 32a) 및 골수 내의 hCD123+ 세포의 백분율 (도 32b, 왼쪽), 및 골수 내의 hCD10+ 세포의 백분율 (도 32b, 오른쪽)을 정량하였다. 이러한 데이터는 골수 및 림프계 전구 세포의 수준이 대조군 및 CD33KO 군에 대해 제16주에 혈액 및 골수에서 유사하였음을 나타낸다.
- [0571] *전반적인 결론*
- [0572] 종합하면, 이러한 데이터는 gRNA A 또는 B로 편집된 CD33KO mPB CD34+ HSPC가 성공적인 이식을 발생시켰고, 조혈 조직, 특히 혈액, 골수 및 비장에서 장기 지속성을 입증하였음을 지시한다. 추가적으로, 증가 수준의 인간 CD45+ 세포 및 골수 및 림프성 세포 집단이 대조군 세포 또는 gRNA A 또는 B로 편집된 CD33KO mPB CD34+ HSPC가 이식된 마우스에서 관찰되었다. 마지막으로, 앰플리콘 시퀀싱 분석에서, gRNA A 또는 B로 편집된 CD33KO

mPB CD34+ HSPC가 이식된 모든 마우스에서 표적 적중 편집의 제16주의 지속성이 입증되었다.

[0573] **등가물 및 범주**

[0574] 관련 기술 분야의 통상의 기술자는 본원에 기술된 예시적인 실시양태의 다수의 등가물을 인지하거나, 또는 일차적인 실험을 사용하여 이를 확인할 수 있을 것이다. 본 개시내용의 범주는 상기 설명에 제한되도록 의도되지 않는다.

[0575] 단수형태 예컨대 "하나"는 반대로 지시되거나 또는 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 한 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 군의 2개 이상의 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 청구범위 또는 설명은 반대로 지시되거나 또는 문맥으로부터 달리 명백하지 않는 군 구성원 중 하나, 하나 초과 또는 모두가 존재하면 충족되는 것으로 간주된다. 2개 이상의 군 구성원 사이에 "또는"을 포함하는 군의 개시는 정확하게 하나의 군 구성원이 존재하는 실시양태, 하나를 초과하는 군 구성원이 존재하는 실시양태, 및 모든 군 구성원이 존재하는 실시양태를 제공한다. 간결성의 목적을 위해, 이러한 실시양태들은 본원에서 개별적으로 표기되지 않았지만, 각각의 이러한 실시양태가 본원에서 제공되고 구체적으로 청구 또는 포기될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0576] 본 발명이 청구범위 중 하나 이상 또는 설명의 하나 이상의 관련된 부분으로부터의 하나 이상의 제한, 요소, 절, 또는 설명 용어가 또 다른 청구항에 도입되는 모든 변경, 조합 및 순열을 포함한다는 것을 이해하여야 한다. 예를 들어, 또 다른 청구항에 종속적인 청구항이 동일한 기본 청구항에 종속적인 임의의 다른 청구항에서 확인되는 제한 중 하나 이상을 포함하도록 변형될 수 있다. 추가로, 청구항이 조성물을 언급하는 경우, 달리 지시되지 않는 한 또는 모순 또는 불일치가 발생할 것이 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 명백하지 않는 한, 본원에 개시된 제조 또는 사용 방법 중 임의의 것에 따라 또는 존재하는 경우의 관련 기술 분야에 공지된 방법에 따라 조성물을 제조 또는 사용하는 방법이 포함된다는 것을 이해하여야 한다.

[0577] 요소가 목록으로서 제시되는 경우, 모든 가능한 개별적인 요소 또는 요소의 하위군이 또한 개시된다는 것과 임의의 요소 또는 요소의 하위군이 군으로부터 제거될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 용어 "포함하는"은 개방적인 것으로 의도되고, 추가적인 요소, 특색 또는 단계의 포함을 허용한다는 것이 또한 주지된다. 일반적으로, 실시양태가 특정 요소, 특색 또는 단계를 포함하는 것으로 지칭되는 경우, 이러한 요소, 특색 또는 단계로 이루어지거나 또는 본질적으로 이루어지는 실시양태가 또한 제공된다는 것을 이해하여야 한다. 간결성을 위해, 이러한 실시양태들은 본원에서 개별적으로 표기되지 않았지만, 각각의 이러한 실시양태가 본원에서 제공되고 구체적으로 청구 또는 포기될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

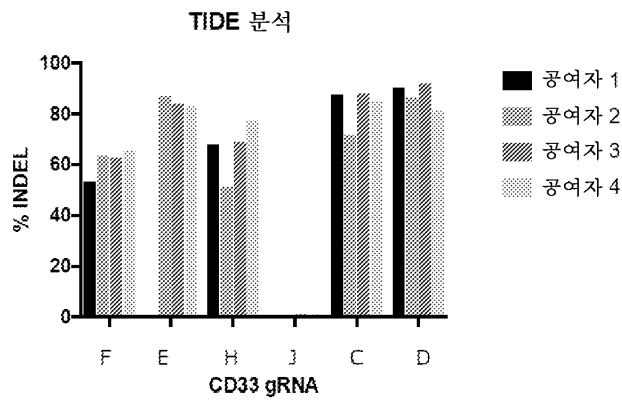
[0578] 범위가 제공되는 경우, 종점이 포함된다. 추가로, 달리 지시되거나 또는 문맥 및/또는 관련 기술 분야의 통상의 기술자의 이해로부터 달리 명백하지 않는 한, 범위로서 표현되는 값은 일부 실시양태에서, 문맥적으로 명확하게 달리 지시되지 않는 한 범위의 하한 단위의 1/10까지, 언급된 범위 내의 임의의 특정 값을 취할 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 간결성을 위해, 각각의 범위 내의 값이 본원에서 개별적으로 표기되지 않았지만, 각각의 이러한 값이 본원에서 제공되고 구체적으로 청구 또는 포기될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 달리 지시되거나 또는 문맥 및/또는 관련 기술 분야의 통상의 기술자의 이해로부터 달리 명백하지 않는 한, 범위로서 표현되는 값은 제공된 범위 내의 임의의 하위범위를 취할 수 있고, 여기서 하위범위의 종점은 범위의 하한 단위의 1/10과 동일한 정도의 정확도로 표현된다는 것을 또한 이해하여야 한다.

[0579] 추가적으로, 본 발명의 임의의 특정 실시양태가 임의의 1개 이상의 청구항으로부터 명시적으로 제외될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 범위가 제공되는 경우, 범위 내의 임의의 값이 임의의 1개 이상의 청구항으로부터 명시적으로 제외될 수 있다. 간결성을 위해, 1개 이상의 요소, 특색, 목적 또는 측면이 제외된 모든 실시양태가 본원에 명시적으로 기재되지 않는다. 본 개시내용은 상기 실시양태 중 임의의 1개 이상의 모든 조합, 뿐만 아니라 상세한 설명 및 실시예에 기재된 실시양태 중 임의의 1개 이상과의 조합을 구상한다.

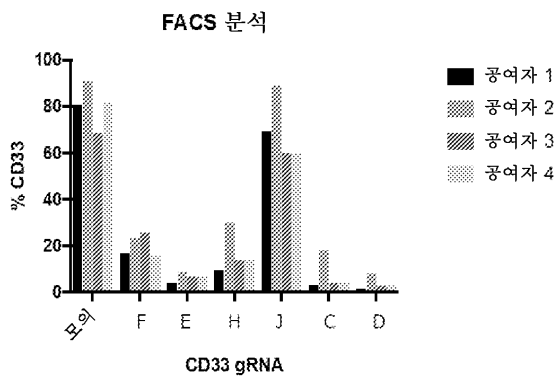
[0580] 본원에 기술된 것과 유사하거나 등가인 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 테스트에서 사용될 수 있지만, 적절한 방법 및 물질이 본원에서 기술된다. 본원에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 기타 참고문헌 (예를 들어, 서열 데이터베이스 참조 번호)은 전문이 참조로 포함된다. 예를 들어, 본원에서, 예를 들어, 임의의 본원의 표에서 언급된 모든 진뱅크(GenBank), 유니진(Unigene), 및 엔트레즈(Entrez) 서열이 참조로 포함된다. 달리 상술되지 않는 한, 임의의 본원의 표를 포함하여 본원에서 상술된 서열 수탁 번호는 2019년 5월 23일 현재의 데이터베이스 엔트리를 지칭한다. 1개의 유전자 또는 단백질이 복수의 서열 수탁 번호를 참조하는 경우, 모든 서열 변이체가 포함된다.

도면

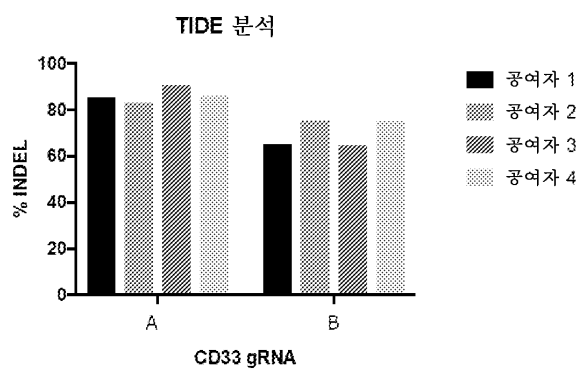
도면1



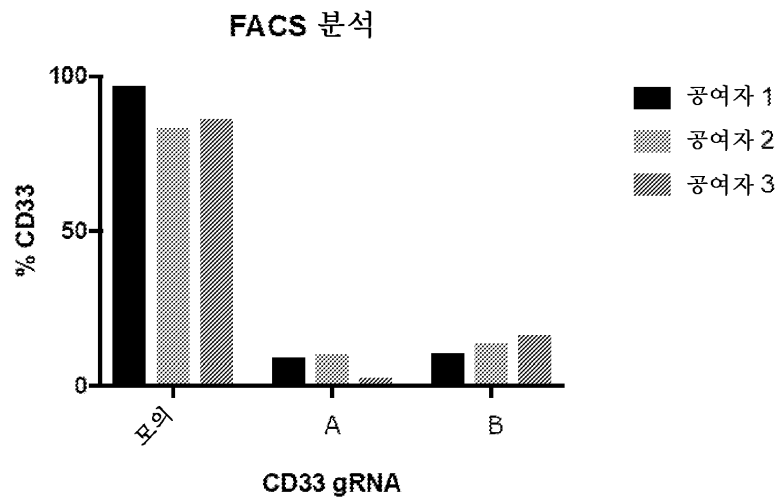
도면2



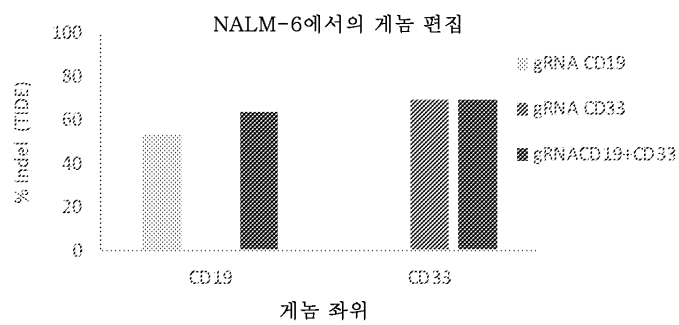
도면3



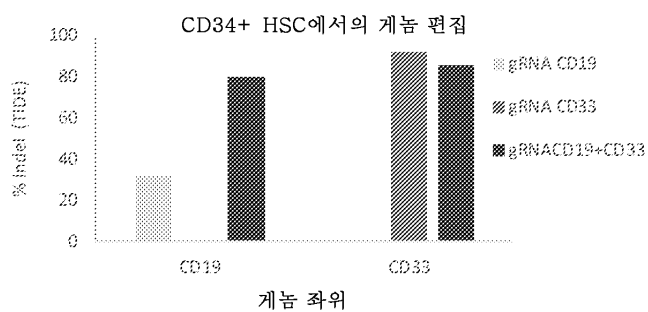
도면4



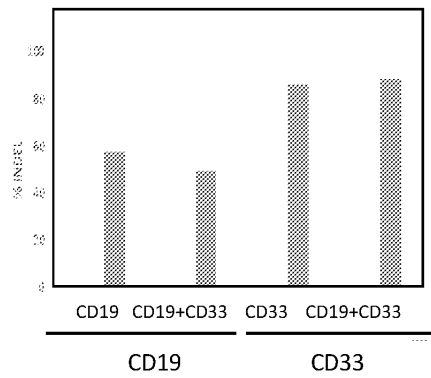
도면5a



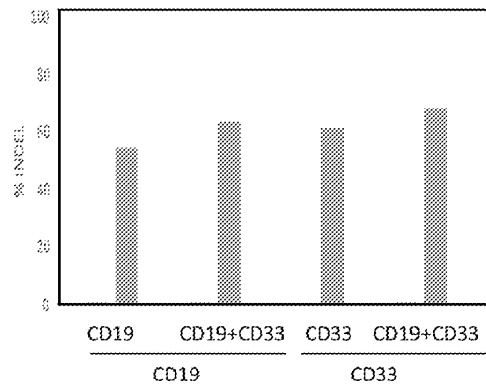
도면5b



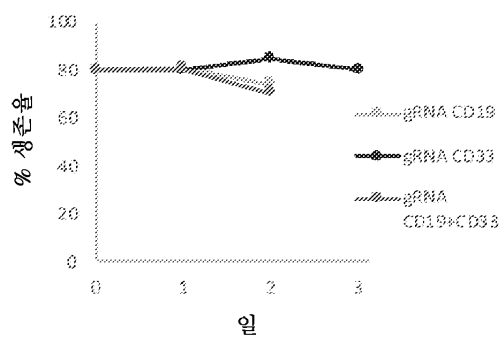
도면5c



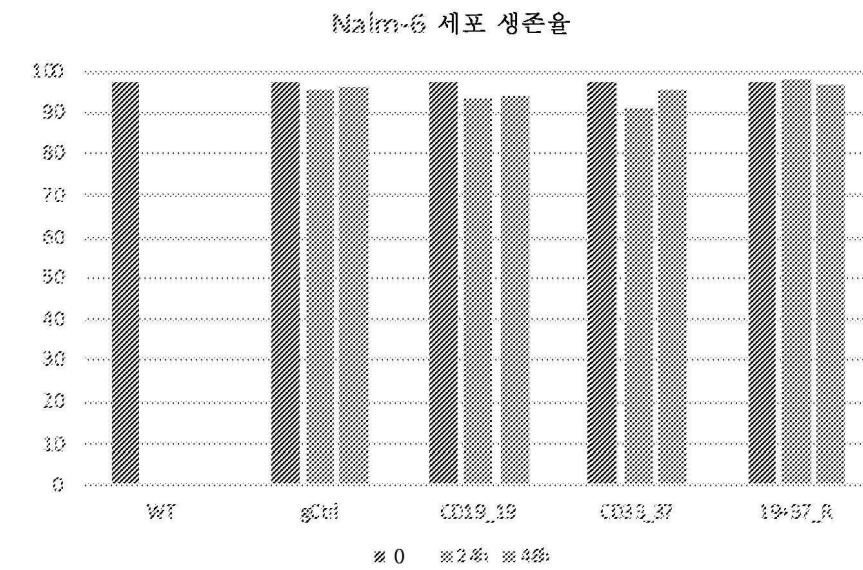
도면5d



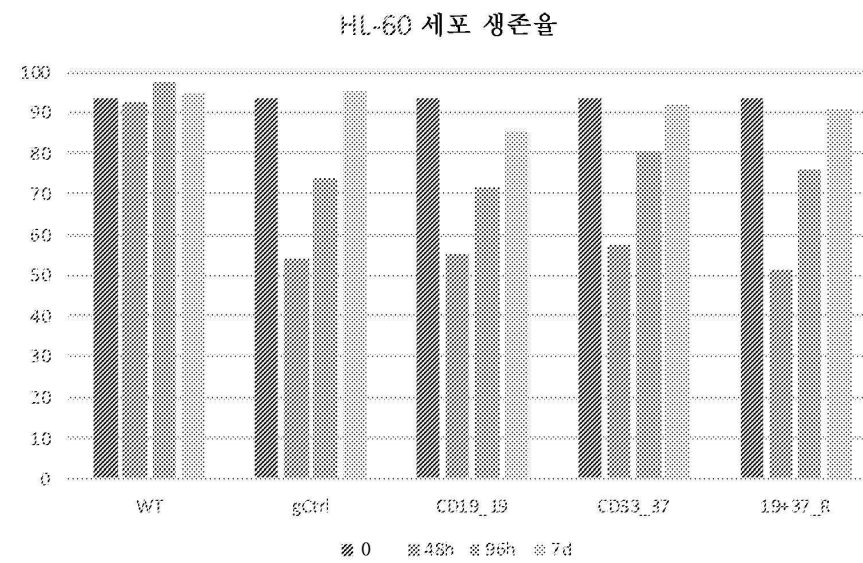
도면6a



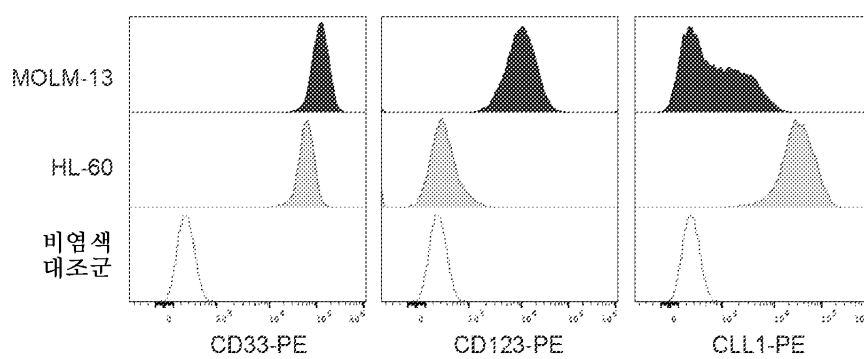
도면6b



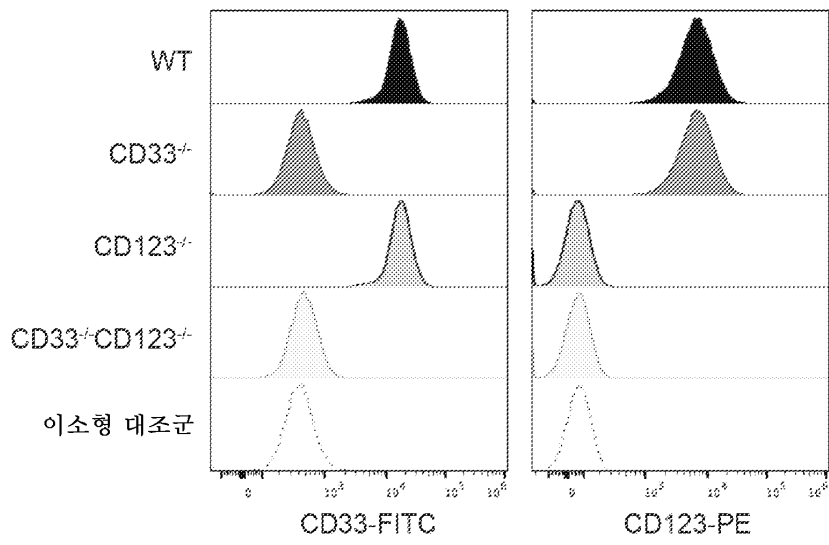
도면6c



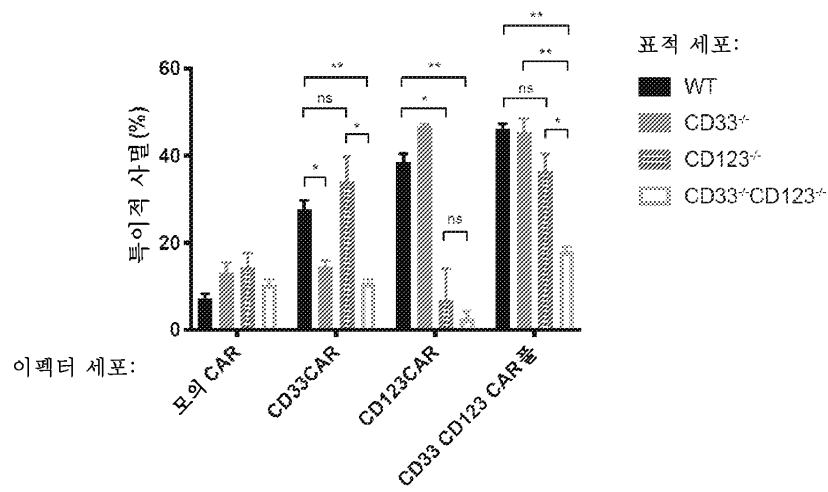
도면7



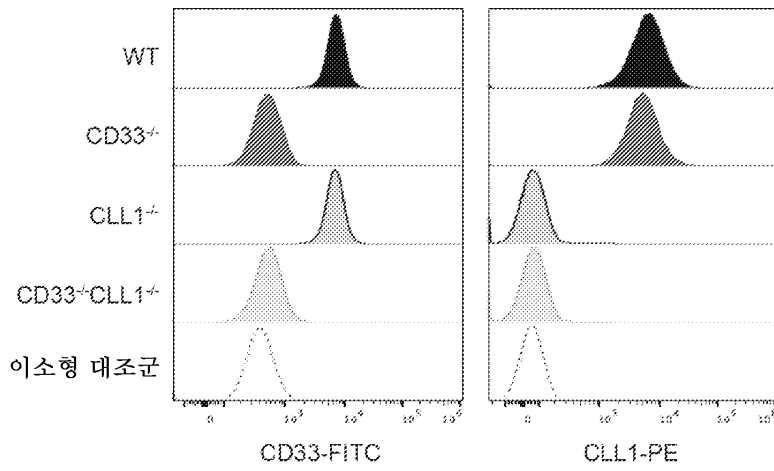
도면8



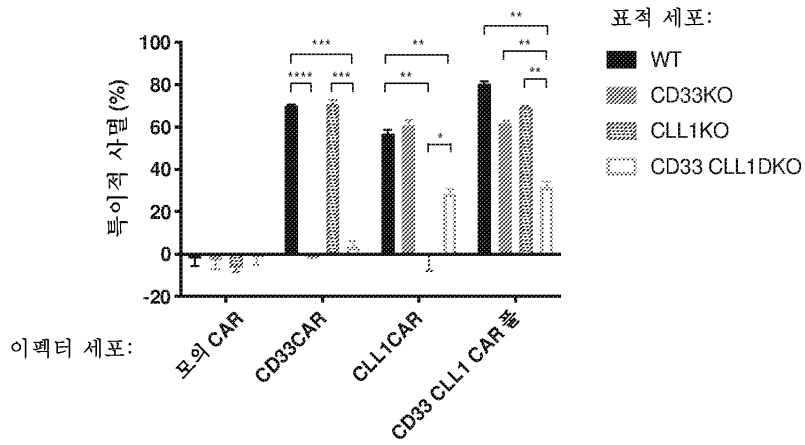
도면9



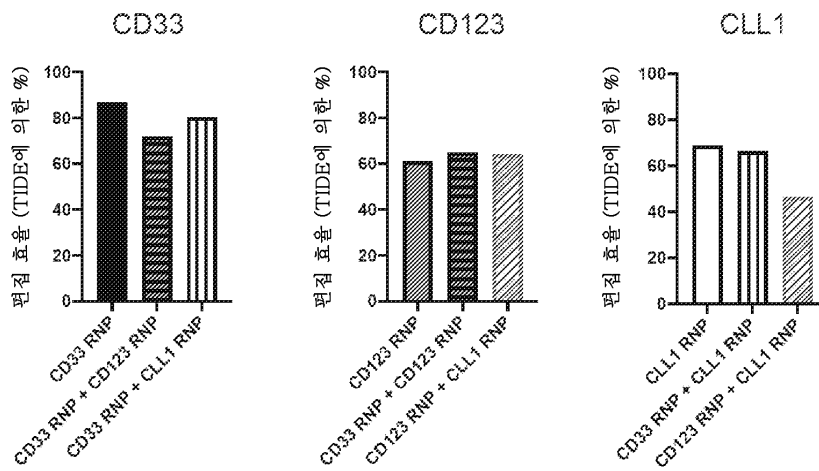
도면10



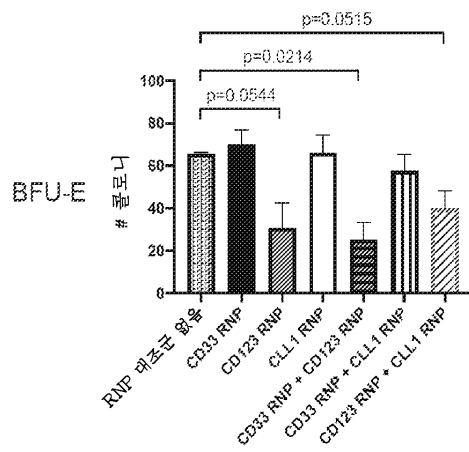
도면11



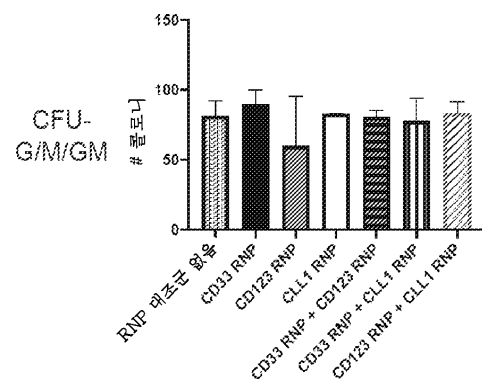
도면12



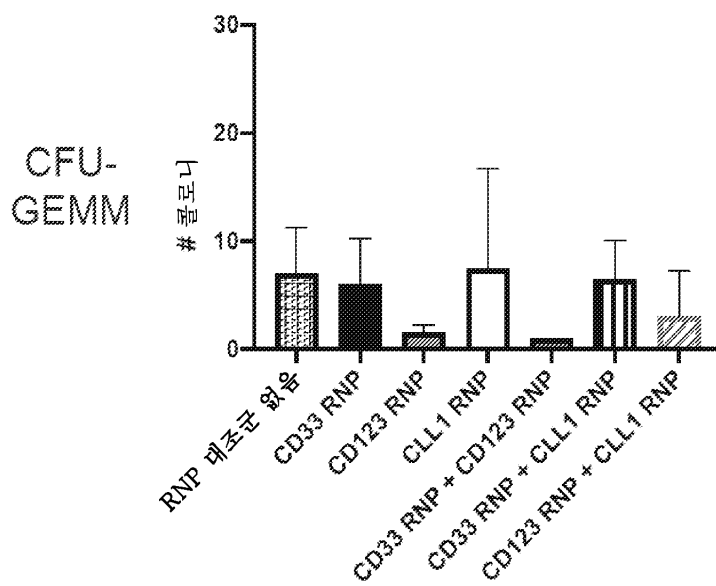
도면13a



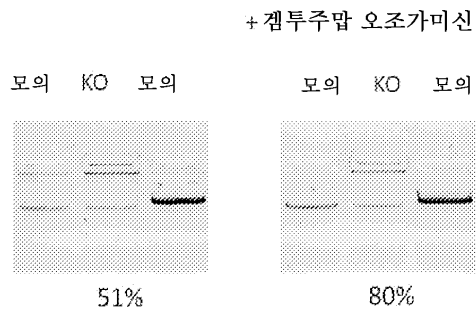
도면13b



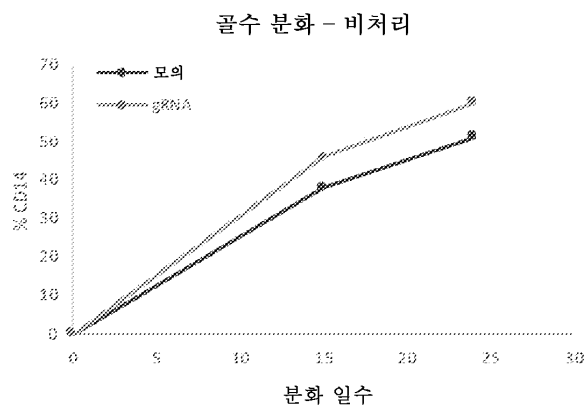
도면13c



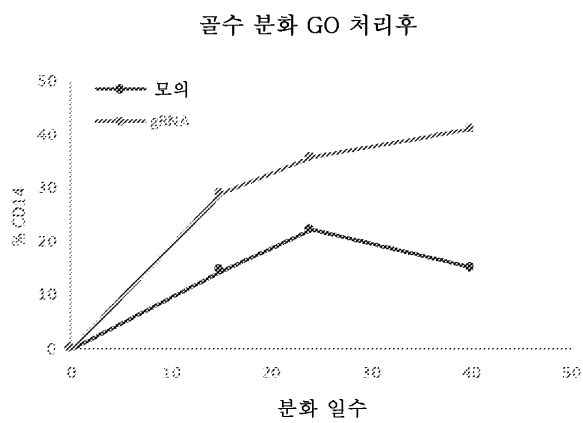
도면14a



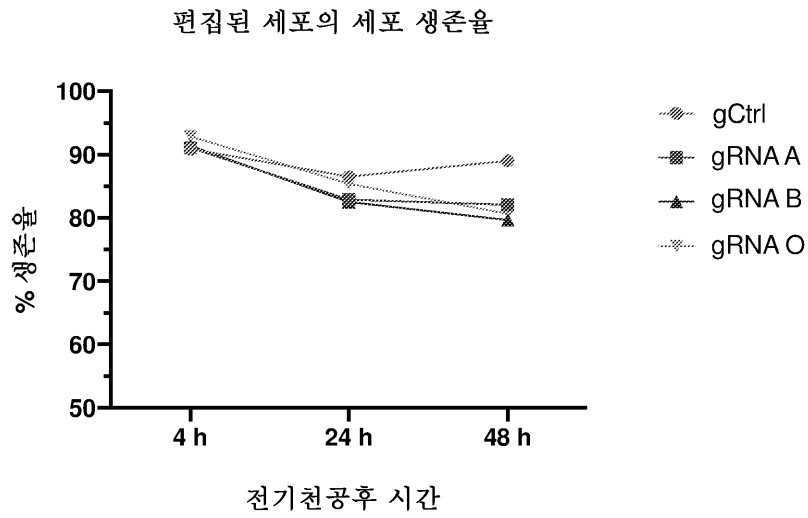
도면14b



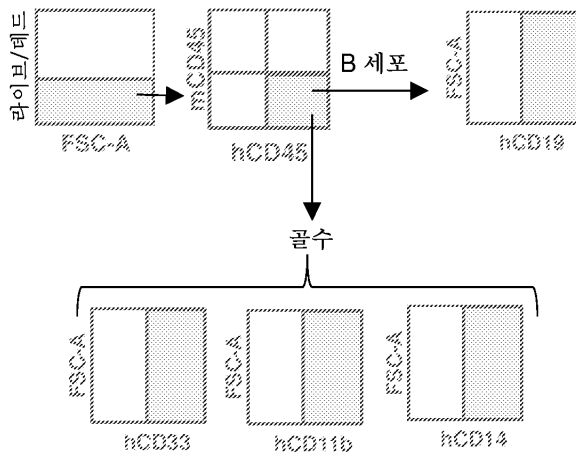
도면14c



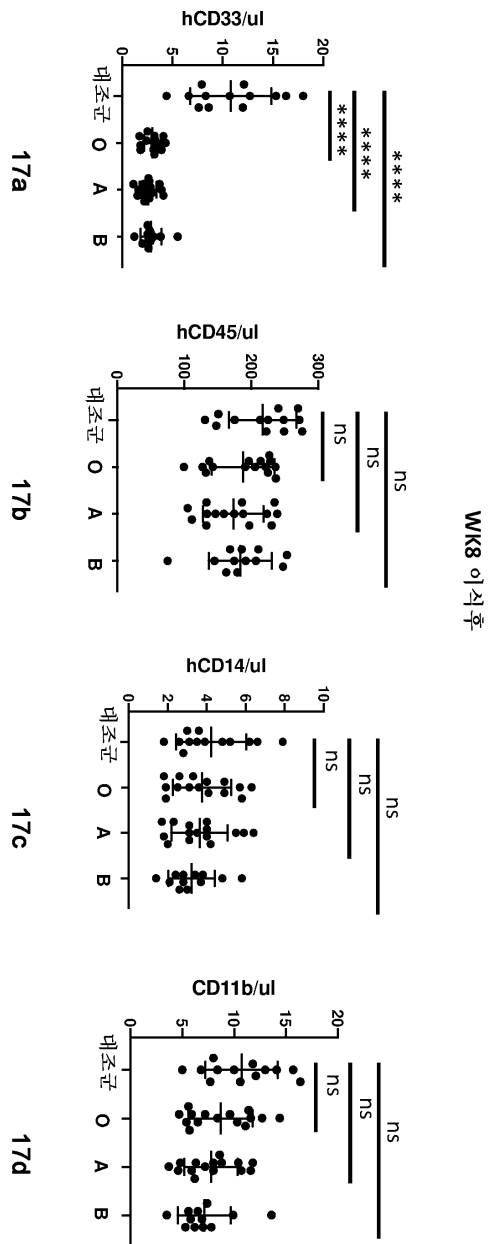
도면15



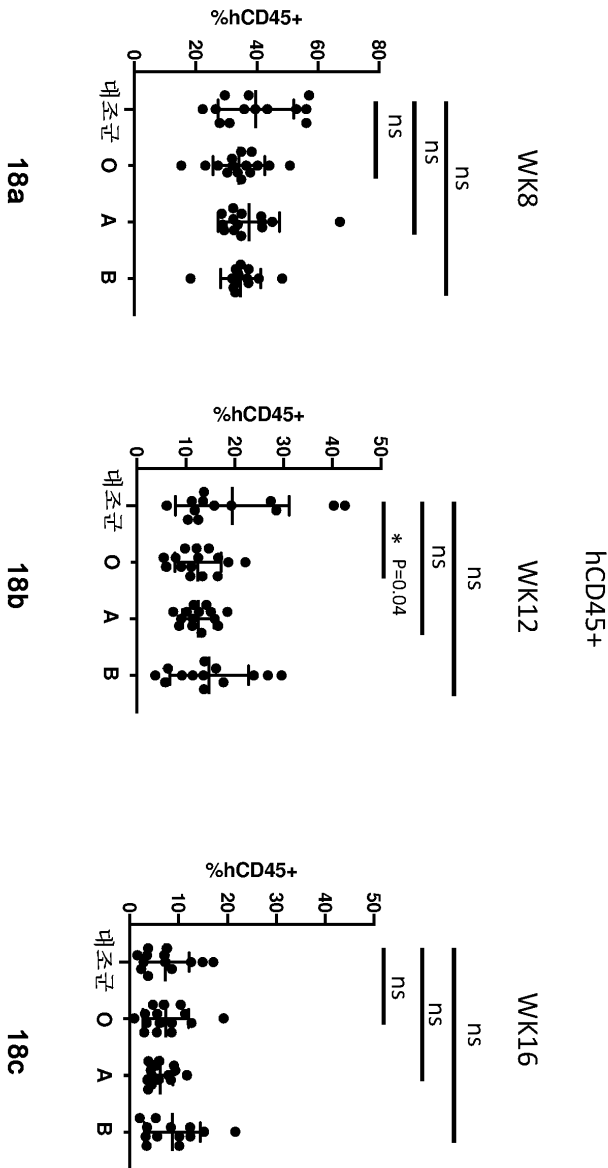
도면16



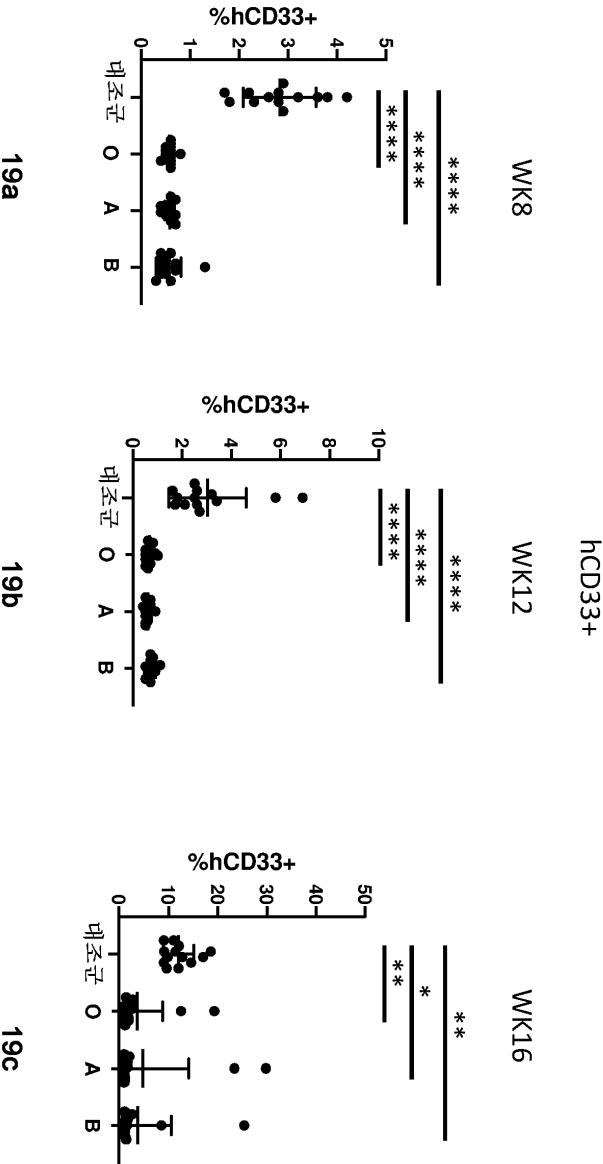
도면17



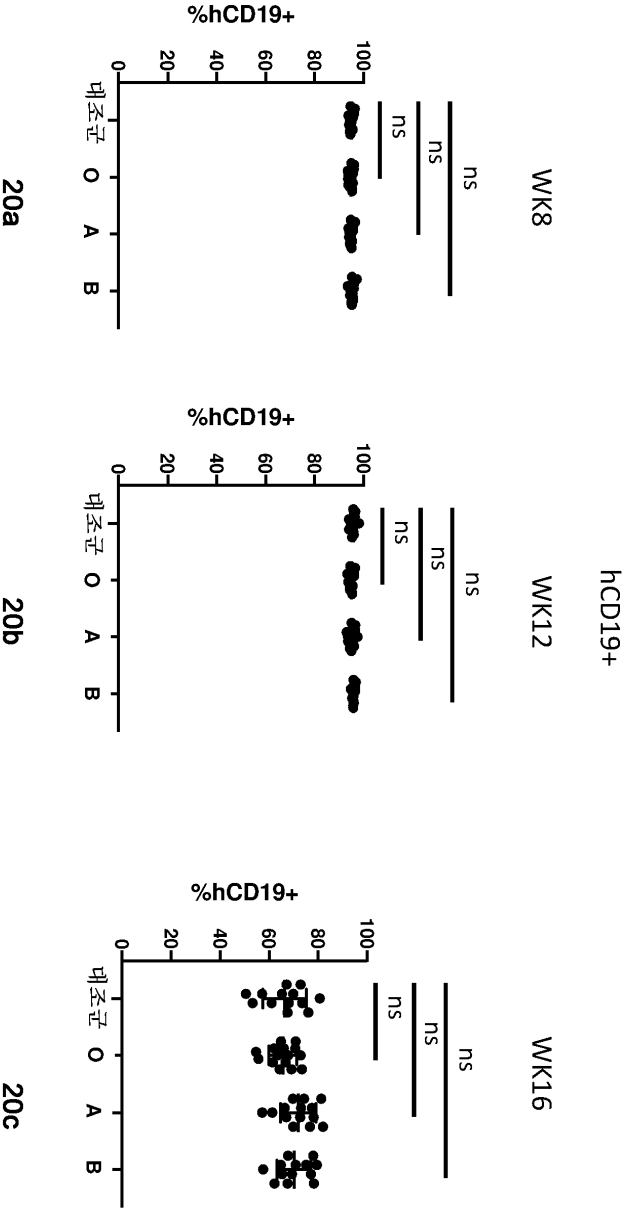
도면18



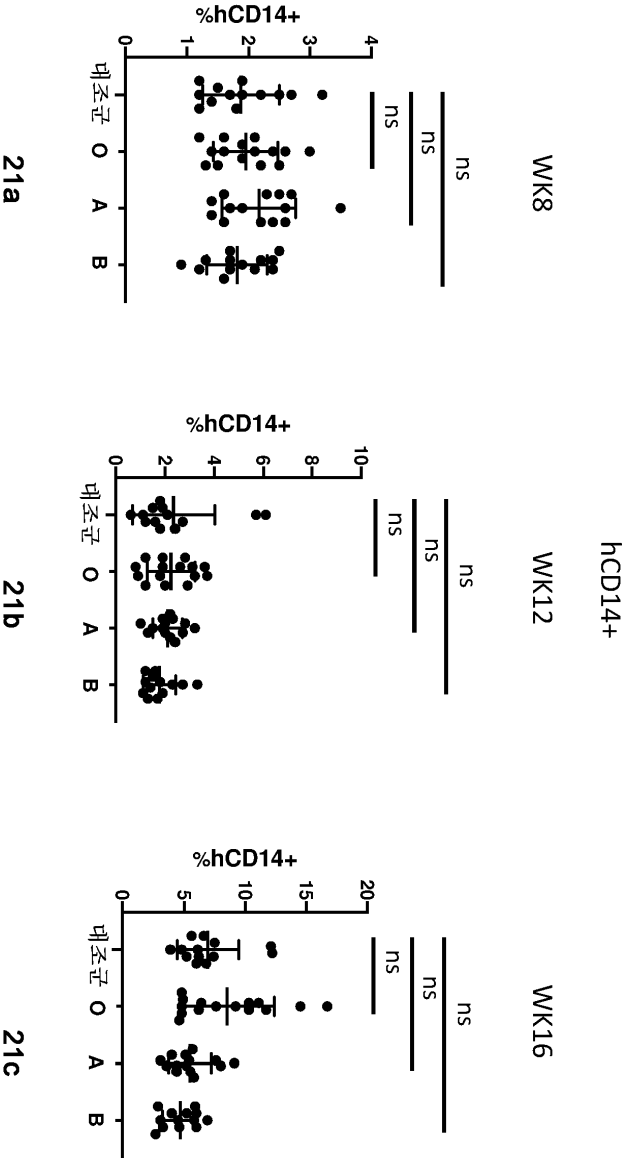
도면19



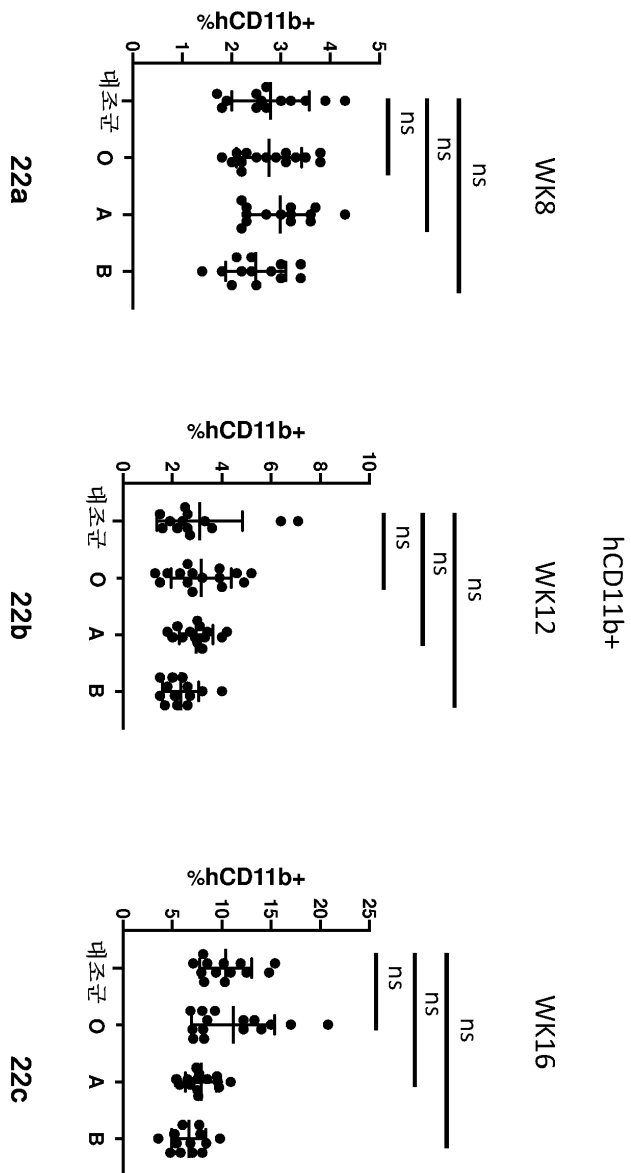
도면20



도면21

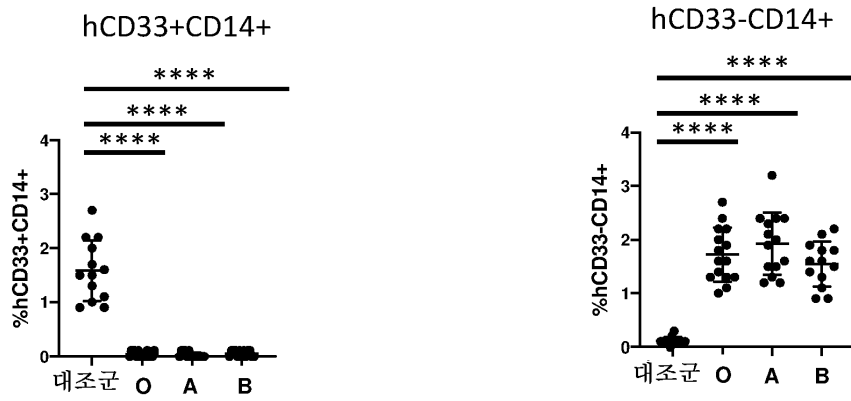


도면22



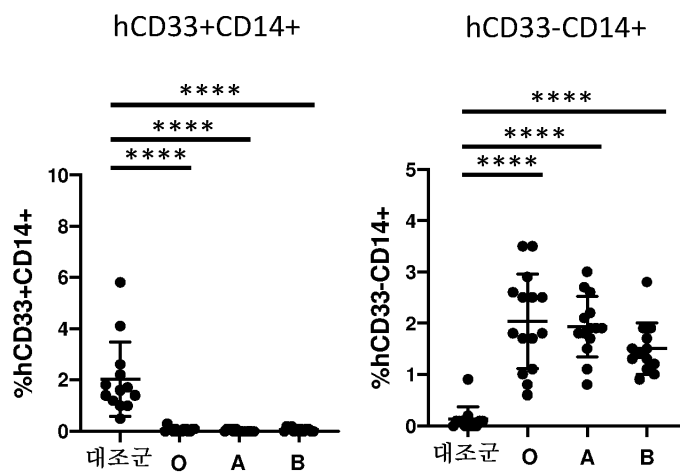
도면23a

WK8 혈액

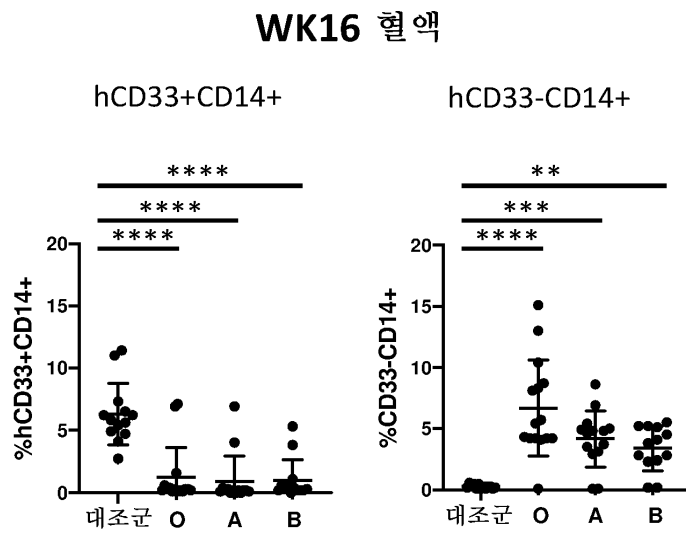


도면23b

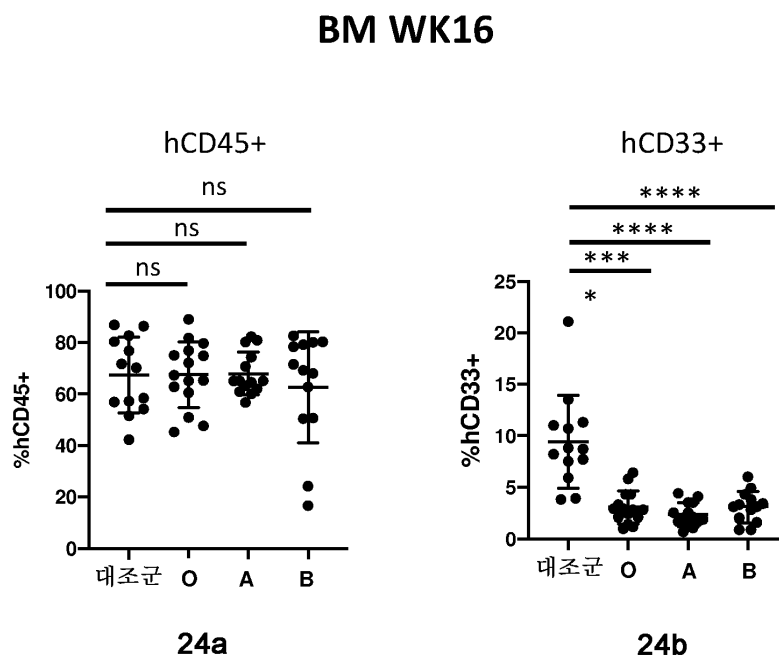
WK12 혈액



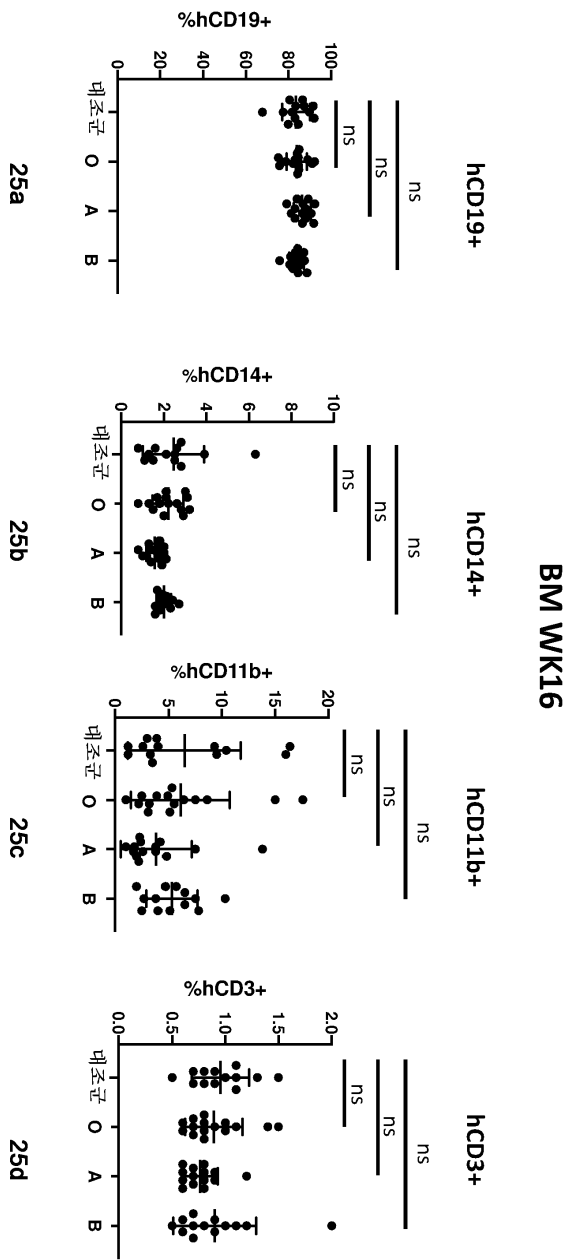
도면23c



도면24

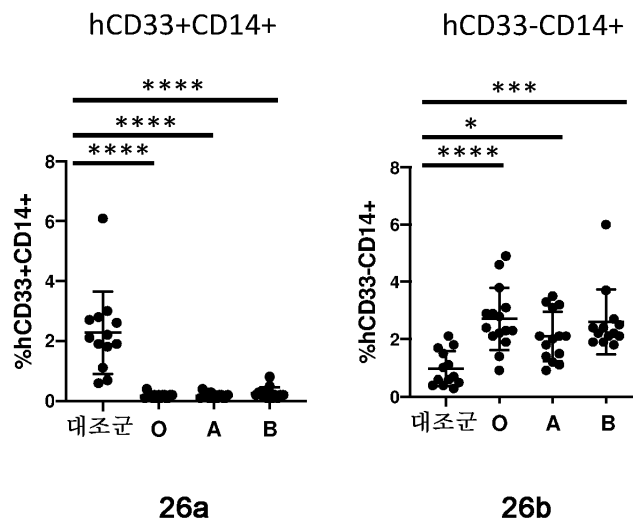


도면25

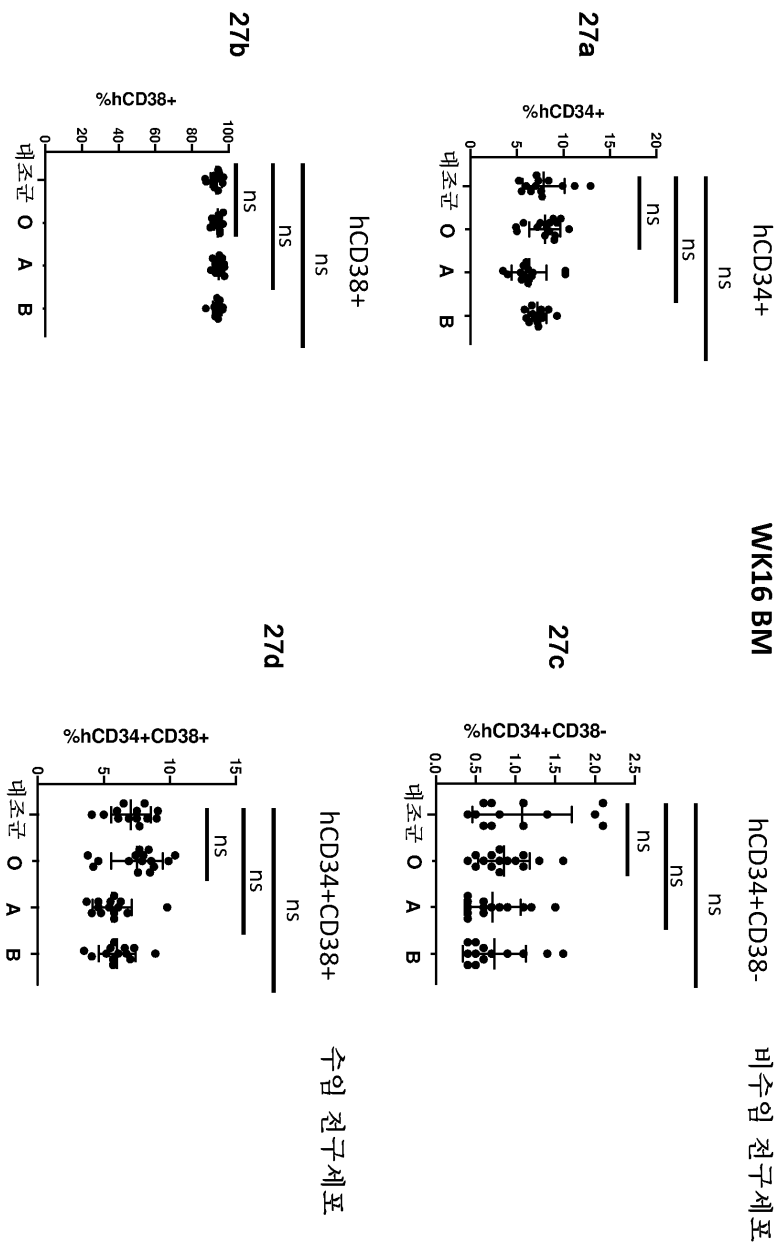


도면26

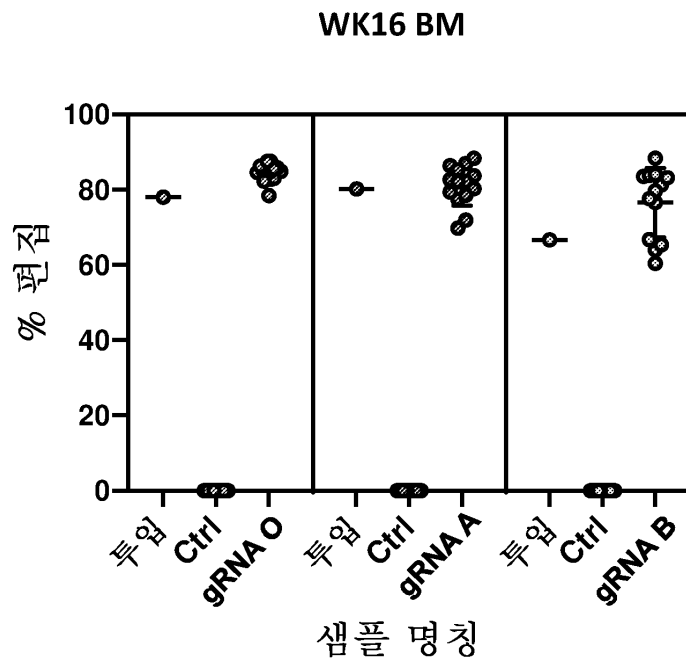
WK16 BM



도면27

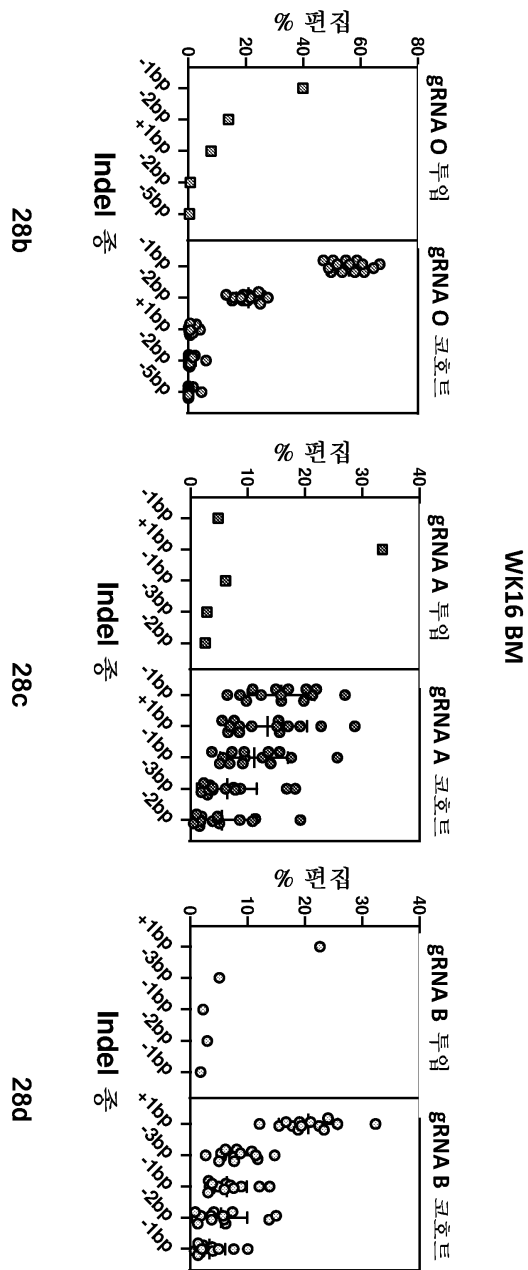


도면28i



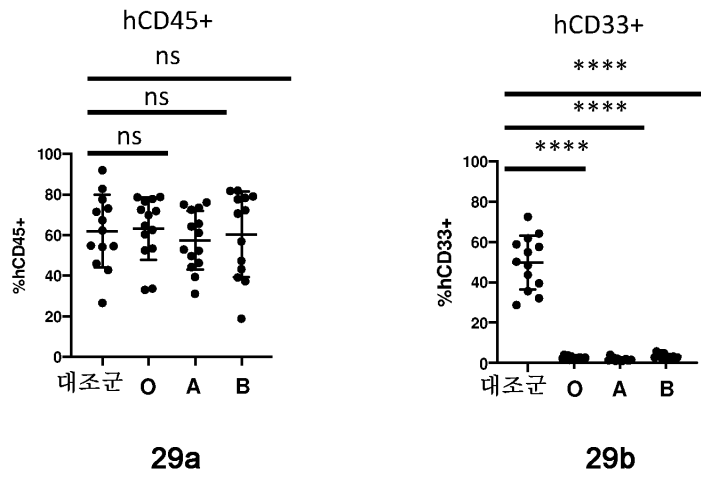
28a

도면28ii

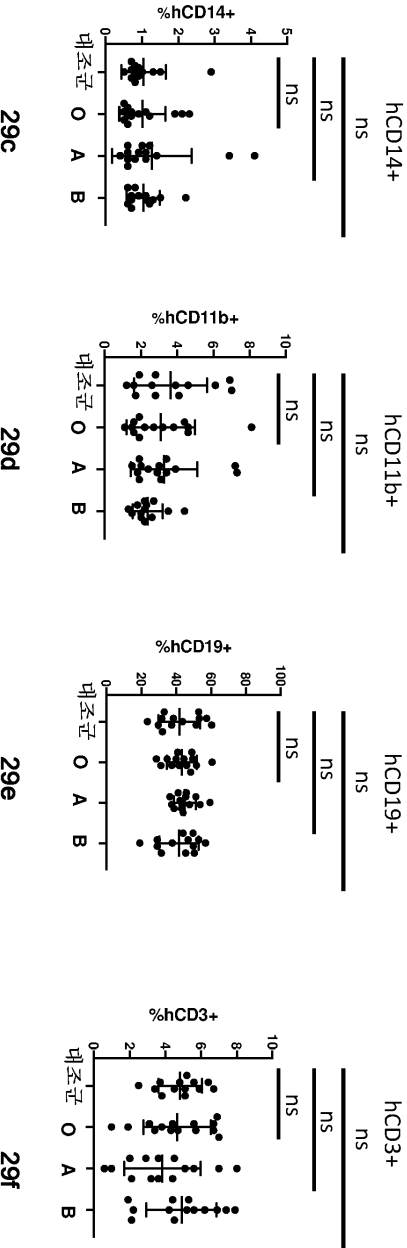


도면29i

WK16 비장

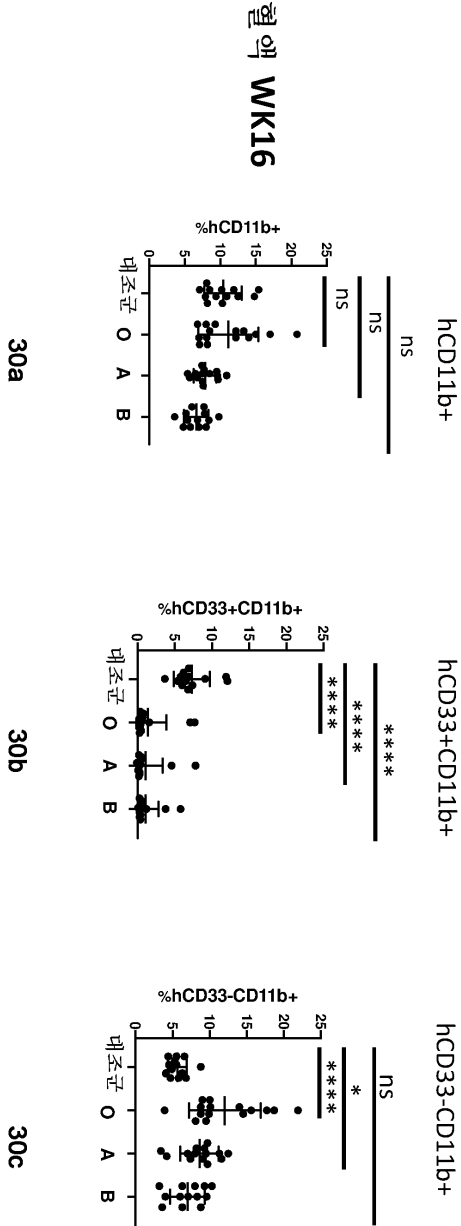


도면29ii

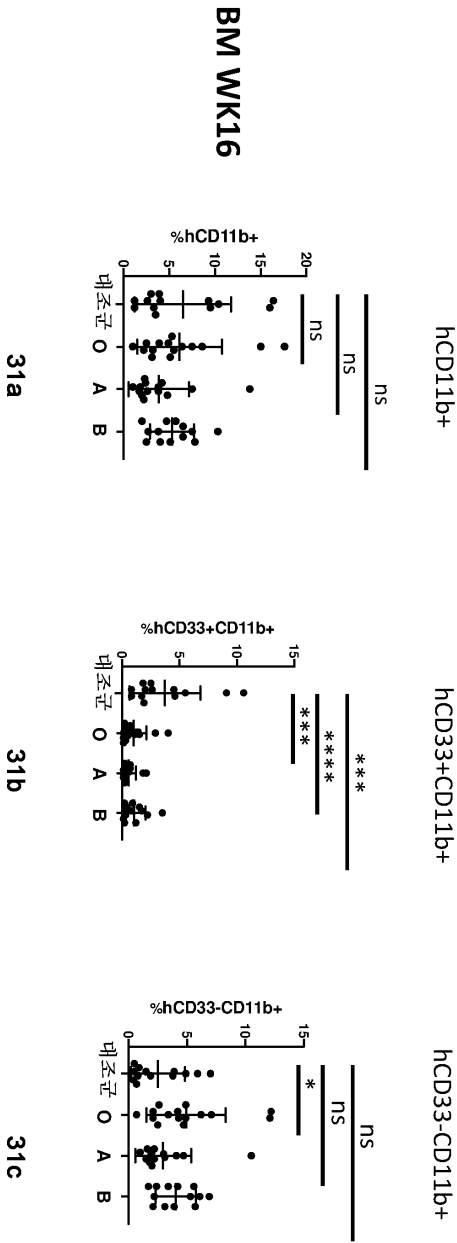


WK16 비장

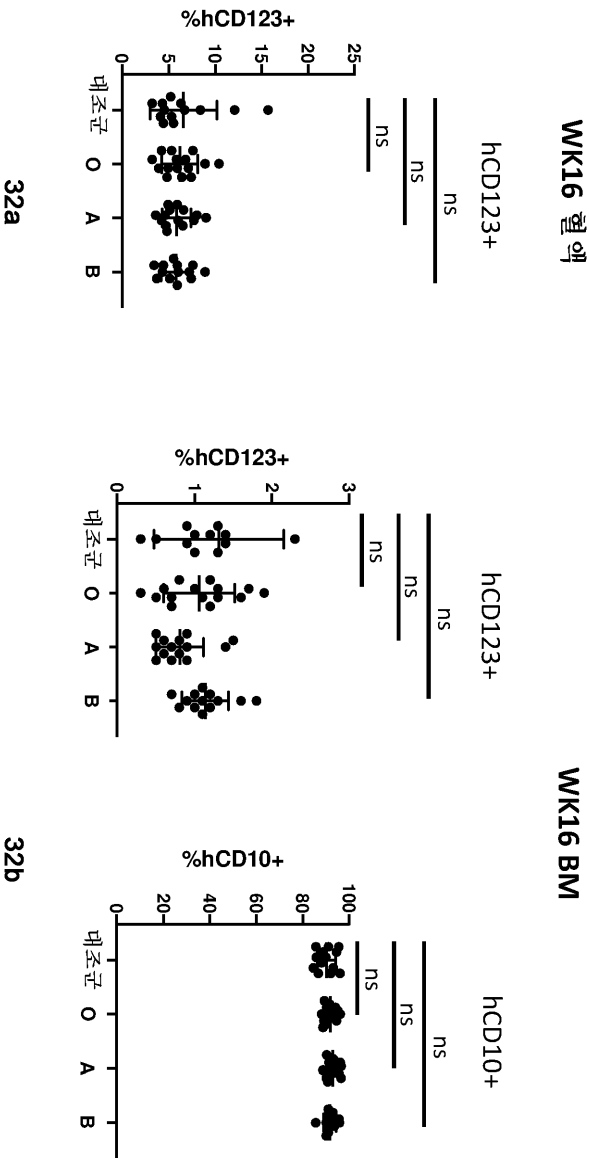
도면30



도면31



도면32



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> VOR BIOPHARMA INC.

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR CD33 MODIFICATION

<130> V0291.70004W000

<140>×<141>×<150> 62/962,127

<151> 2020-01-16

<150> 62/852,238

<151> 2019-05-23

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 1

ccccaggact actcactcct 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 2

accgaggagt gagtagtcct 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 3

ggtgggggca gctgacaacc 20

<210>

4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 4

cgggtgctcat aatcacccca 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 5

aggagtgagt agtcctgggg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 6

aggactactc actcctcggt 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 7

ggttgtcagc tgccccacc 20

<210> 8

<211>

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 8

tggggtgatt atgagcaccg

20

<210> 9

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 9

ccccaggacu acucacuccu

20

<210> 10

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 10

accgaggagu gaguaguccu

20

<210> 11

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 11

ggugggggca gcugacaacc 20

<210> 12

<211> 20

<

212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 12

cggugcucau aaucacccca 20

<210> 13

<211> 1095

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

atgccgctgc tgctactgct gcccctgctg tgggcagggg ccctggctat ggatccaaat 60

ttcttgctgc aagtgcagga gtcagtgcg gtacaggagg gtttgtgcgt cctcgtgccc 120

tgcaatttct tccatcccat accctactac gacaagaact ccccagttca tggttactgg 180

ttccgggaag gagccattat atccaggac tctccagtgg ccacaaaca gctagatcaa 240

gaagtacagg aggagactca gggcagattc cgcctccttg gggatcccag taggaacaac 300

tgctccctga gcatcgtaga cgccaggagg agggataatg gttcatactt ctttcggatg 360

gagagaggaa gtaccaaata cagttacaaa tctccccagc tctctgtgca tgtgacagac 420

ttgaccaca ggcccaaat cctcatccct ggcaacttag aaccggcca ctccaaaaac 480

ctgacctgct ctgtgtcctg ggccctgtgag cagggaacac ccccgatctt ctctgggttg 540

tcagctgccc ccacctccct gggccccagg actactcact cctcgggtgct cataatcacc 600

ccacggcccc aggaccacgg caccaacctg acctgtcagg tgaagttcgc tggagctggt 660

gtgactacgg agagaacctt ccagctcaac gtcacctatg ttccacagaa cccaacaact 720

ggtatctttc caggagatgg ctacaggaaa caagagacca gagcaggagt ggttcattggg 780

gccattggag gagctggtgt tacagccctg ctgcgtcttt gtctctgcct catcttcttc 840

atagtgaaga cccacaggag gaaagcagcc aggacagcag tgggcaggaa tgacaccac 900

cctaccacag ggtcagcctc ccgaaacac cagaagaagt ccaagttaca tggccccact 960

gaaacctcaa gctgttcagg tgccgccct actgtggaga tggatgagga gctgcattat 1020

gcttcctca actttcatgg gatgaatcct tccaaggaca cctccaccga atactcagag 1080

gtcaggaccc agtga 1095

<210> 14

<211> 279

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 14

acttgaccca caggcccaaa atcctcatcc ctggcactct agaaccggc cactccaaaa 60

acctgacctg ctctgtgtcc tgggcctgtg agcaggaac acccccgatc ttctcctggt 120

tgtcagctgc cccacatcc ctgggccccca ggactactca ctctcgtgtg ctcataatca 180

ccccacggcc ccaggaccac ggcaccaacc tgacctgtca ggtgaagttc gctggagctg 240

gtgtgactac ggagagaacc atccagctca acgtcacct 279

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 15

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 16

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide"

<400> 16

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser

20 25 30

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln

85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic peptide"

<400> 17

Gly Ser Thr Ser Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser

1 5 10 15

Thr Lys Gly

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide"

<400> 18

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 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn

65 70 75 80

Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr

85 90 95

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

100 105

<210> 19

<211> 89

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 19

Leu Ser Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly

1 5 10 15

Tyr Leu His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp

20 25 30

Leu Pro Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys

35 40 45

Ile Leu Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His

50 55 60

Asp Pro Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys

65 70 75 80

Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu

85

<210> 20

<211> 38

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 20

Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro Asn

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Thr Asp Val Thr Leu

35

<210> 21

<211> 97

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 21

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 Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Phe

65 70 75 80
Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser Arg Leu Thr Asp Val Thr

85 90 95
Leu

<210> 22

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
polypeptide"

<400> 22

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 Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln
 50 55 60
 Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu
 65 70 75 80

Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr
 85 90 95
 Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro
 100 105 110

Arg

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 23

ggtggctatt gttgcagtg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 24

tttcttgagc tgcagctggg

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 25

agttcccaca tcctggtgcg 20

<

210> 26

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 26

acctgtcagg tgaagttcgc tgg 23

<210> 27

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 27

tggccgggtt ctagagtgcc agg 23

<210

> 28

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 28
ggccgggttc tagagtgcc ggg 23

<210> 29
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 29
caccgaggag tgagtagtcc tgg 23

<210>
30
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 30
tccagcgaac ttcacctgac agg 23

<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 31
gctgtgggga gaggggttgt 20

<210> 32

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 32

ctgtggggag aggggtgtgc 20

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 33

tggggaacg agggtcagct 20

<210> 34

<

211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 34

gggccctgt ggggaaacga 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 35

agggccctg tgggaaacg 20

<210> 36

<211

> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 36

gctgaccctc gtttcccac 20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 37

ctgaccctcg tttcccaca 20

<210> 38

<211>

20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 38

tgaccctcgt ttcccacag 20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 39

ccatagccag ggcccctgtg 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 40

gcatgtgaca ggtgaggcac 20

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 41

tgaggcacag gcttcagaag 20

<210> 42

<211> 20

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 42

aggcttcaga agtggccgca 20

<210> 43

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 43

ggcttcagaa gtggccgcaa 20

<210> 44

<211> 20

<212

> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 44

gtacccatga acttccttg 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 45

gtggccgcaa gggaagttca 20

<210> 46

<211> 20

<212>

DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 46

tggccgcaag ggaagttcat 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 47

ggaagttcat ggtactgca 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 48

tcatgggta ctgcaggga 20

<210> 49

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 49

ctaaaccct cccagtacca 20

<210> 50

<211> 20

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 50

cactcacctg cccacagcag 20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 51

ccctgctgtg ggcaggtgag 20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 52

tgggcaggtg agtggctgtg 20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 53

ggtgagtggc tgtggggaga 20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213>

Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 54

gtgagtggct gtggggagag 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 55

atccatagcc agggcccctg 20

<210> 56

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 56

tccatagcca gggcccctgt 20

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 57

tcgtttcccc acaggggccc 20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<

220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 58

tggtatgga tccaaatttc 20

<210> 59

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 59

agaaatttgg atccatagcc agg 23

<210> 60

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 60

atccctggca ctctagaacc cgg 23

<210> 61

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 61

cctcactaga cttgaccac agg 23

<210> 62
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 62
 cacagcgta tctccctctg 20
 <210> 63
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 63
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 1 5 10
 <210> 64
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 64
 cctcactaga cttgaccac 20