



등록특허 10-2709603



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년09월27일

(11) 등록번호 10-2709603

(24) 등록일자 2024년09월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/28 (2015.01) A61K 35/15 (2015.01)
A61K 35/17 (2015.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01) C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) C12N 5/078 (2010.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)
A61K 35/15 (2023.05)

(21) 출원번호 10-2019-7028404

(22) 출원일자(국제) 2018년02월28일

심사청구일자 2021년02월26일

(85) 번역문제출일자 2019년09월27일

(65) 공개번호 10-2019-0141657

(43) 공개일자 2019년12월24일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/020327

(87) 국제공개번호 WO 2018/160768

국제공개일자 2018년09월07일

(30) 우선권주장

62/464,975 2017년02월28일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

Molecular Therapy, 제24권, Supplement 1, S10
8면 (2016. 5.)*
EP03025719 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

보르 바이오파마 인크.

미국 02140 매사추세츠주 케임브리지 케임브리지
파크 드라이브 100 스위트 400

(72) 발명자

보렌, 조셉

미국 02116 매사추세츠주 보스턴 보일스턴 스트리트
501 스위트 6102

라도비치-모레노, 알렉산다르, 필립

미국 02116 매사추세츠주 보스턴 보일스턴 스트리트
501 스위트 6102

라이디어드, 존

미국 02116 매사추세츠주 보스턴 보일스턴 스트리트
501 스위트 6102

(74) 대리인

양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 21 항

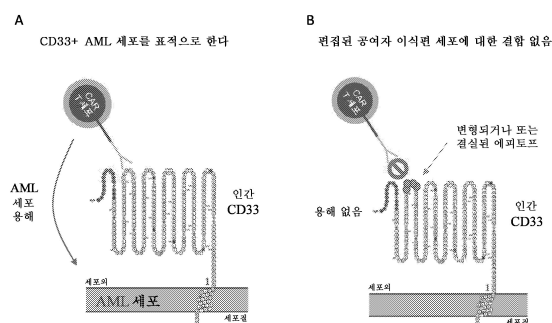
심사관 : 최승희

(54) 발명의 명칭 계통 특이적 단백질의 억제제를 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

본원에는 조혈 악성종양을 치료하는 데 사용하기 위한 조성물, 방법, 및 키트가 개시되며, 이러한 조성물, 방법, 및 키트는 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 세포를 표적으로 하는 세포독성제; 및 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 조혈 세포 집단을 포함하고, 이러한 조혈 세포는 세포독성제와 결합하지 않도록 조작된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 35/17 (2023.05)
A61K 38/177 (2013.01)
A61K 39/001102 (2023.05)
A61K 39/39558 (2013.01)
A61K 47/6817 (2017.08)
A61K 47/6867 (2017.08)
A61P 35/02 (2018.01)
C12N 5/0634 (2023.05)
C12N 5/0647 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

CD33 (서열식별번호: 1) 내의 하나 이상의 비-필수 에피토프가 결여되어 있는 CD33 변이체를 발현하는 유전자 조작된 조혈 세포이며, 여기서 하나 이상의 비-필수 에피토프는

(i) 아미노산 47-51 (서열식별번호: 9) 또는 48-52 (서열식별번호: 12), 및/또는

(ii) 아미노산 248-252 (서열식별번호: 8), 249-253 (서열식별번호: 10), 250-254 (서열식별번호: 11), 또는 251-255 (서열식별번호: 13)

를 포함하는 것인 유전자 조작된 조혈 세포.

청구항 2

제1항에 있어서, 조혈 세포가 조혈 줄기 세포 또는 조혈 전구 세포인 유전자 조작된 조혈 세포.

청구항 3

제2항에 있어서, 조혈 줄기 세포가 골수 세포, 제대혈 세포, 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터의 것인 유전자 조작된 조혈 세포.

청구항 4

제1항에 있어서, 유전자 조작된 조혈 세포가 CD33을 코딩하는 조혈 세포의 내인성 유전자의 유전적 변형에 의해 제조되는 것인 유전자 조작된 조혈 세포.

청구항 5

제1항에 있어서, 조혈 세포에서 발현된 CD33 변이체가 항원 결합 단편을 포함하는 세포독성제가 결합하는 비-필수 에피토프의 결실 또는 비-필수 에피토프 내의 하나 이상의 아미노산 잔기의 변경을 포함하는 것인 유전자 조작된 조혈 세포.

청구항 6

제1항에 있어서, CD33 변이체가 서열식별번호: 1의 아미노산 47-51을 포함하는 에피토프 및/또는 서열식별번호: 1의 아미노산 248-252를 포함하는 에피토프에서 결실을 갖는 것인 유전자 조작된 조혈 세포.

청구항 7

제1항에 있어서, CD33 변이체가 서열식별번호: 2 내지 7 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 것인 유전자 조작된 조혈 세포.

청구항 8

제1항에 있어서, 조혈 세포 또는 그의 자손이 비-필수 에피토프를 포함하는 CD33을 발현하는 대응 세포와 비교하여 정상적으로 분화하는 능력을 유지하는 것인 유전자 조작된 조혈 세포.

청구항 9

제1항에 있어서, 비-필수 에피토프가 결여된 CD33 변이체가 CD33의 생체 활성화에 영향을 미치지 않는 것인 유전자 조작된 조혈 세포.

청구항 10

제1항에 있어서, CD33 변이체를 발현하는 조혈 세포가 CD33의 비-필수 에피토프에 특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 세포독성제에 대한 결합이 감소되거나 결합하지 않는 것인 유전자 조작된 조혈 세포.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항의 유전자 조작된 조혈 세포를 포함하는, 대상체에서 조혈 악성종양을 치료하는 데 사용하기 위한 제약 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 대상체에서 조혈 악성종양을 치료하기 위한 유효량의 세포독성제와 조합하여 사용하기 위한 제약 조성물로서, 여기서 세포독성제는 CD33의 비-필수 에피토프와 특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서, 항원 결합 단편이 CD33의 비-필수 에피토프와 특이적으로 결합하는 단일쇄 항체 단편 (scFV)인 제약 조성물.

청구항 14

제12항에 있어서, 세포독성제가 항체 또는 항체-약물 접합체 (ADC)이거나, 또는 항원 결합 단편을 포함하는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포인 제약 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서, 키메라 수용체가 추가로

- (a) 힌지 도메인,
- (b) 막횡단 도메인,
- (c) 적어도 하나의 공동 자극성 도메인,
- (d) 세포질 신호전달 도메인, 또는
- (e) 그의 조합

을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서,

- (i) 키메라 수용체가 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, GITR, HVEM, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동 자극성 수용체로부터 유래된 적어도 하나의 공동 자극성 신호전달 도메인을 포함하고/거나;
- (ii) 키메라 수용체가 CD3 ζ 로부터의 것인 세포질 신호전달 도메인을 포함하고/거나;
- (iii) 키메라 수용체가 CD8 α 또는 CD28로부터의 것인 힌지 도메인을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서, 면역 세포, 조혈 세포, 또는 둘 다가 동종이계 또는 자가인 제약 조성물.

청구항 18

제11항에 있어서, 조혈 세포가 대상체의 HLA 일배체형과 일치되는 HLA 일배체형을 갖는 공여자로부터 수득된 것인 제약 조성물.

청구항 19

제11항에 있어서, 대상체가 세포독성제 및/또는 조혈 세포를 투여하기 전에 사전 컨디셔닝되고, 임의로는 여기서 사전 컨디셔닝이 하나 이상의 화학요법제를 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 것인 제약 조성물.

청구항 20

제11항에 있어서, 대상체에게 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병, 또는 다발성 골수종이 있는 것인 제약 조성물.

청구항 21

제20항에 있어서, 백혈병이 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성림프모구성 백혈병, 또는 만성 림프모구성 백혈병인 제약 조성물.

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e) 하에, 2017년 2월 28일에 출원된 미국 가출원 번호 62/464,975를 우선권 주장한다. 언급된 출원의 전체 내용이 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003] 표적화된 요법을 설계하는데 있어서 주요한 도전 과제는, 제거하는 것이 치료상 관련될 수 있는 세포 (예를 들어, 비정상, 악성, 또는 다른 표적 세포) 상에서는 독특하게 발현되지만, 제거하고 싶지 않은 세포 (예를 들어, 정상, 건강한, 또는 다른 비-표적 세포) 상에서는 존재하지 않는 단백질을 성공적으로 확인하는 것이다. 예를 들어, 많은 암 치료제는 정상 세포를 손상시키지 않으면서 암 세포를 효과적으로 표적으로 하는 데 어려움을 겪는다.

[0004] 대두된 대안적인 전략은 정상 세포, 암 세포 및 전암성 세포를 표적으로 하는 것을 포함하여, 전체 세포 계통을 표적으로 하는 것을 포함한다. 예를 들어, CD19-표적화된 키메라 항원 수용체 T 세포 (CAR T 세포) 및 항-CD20 모노클로날 항체 [예를 들어, 리투시맙(Rituximab)]은 각각, B 세포 계통 단백질 (각각 CD19 및 CD20)을 표적으로 한다. B 세포 악성종양을 치료하는데 잠재적으로 유효하지만, 이러한 요법의 사용은 B 세포의 제거가 유해하기 때문에 제한된다. 유사하게, 다른 세포 집단, 예를 들어, 골수성 계통 세포의 계통 특이적 단백질 (예를 들어, 골수성 모세포, 단핵구, 거핵구 등으로부터 발생하는 암)을 표적화하는 것은 실현 가능하지 않은데, 이는

이들 세포 집단이 생존에 필요하기 때문이다.

발명의 내용

- [0005] 본 개시내용은 적어도 부분적으로, 세포독성제에 의해 표적화될 수 있는 계통 특이적 세포 표면 단백질 내의 에피토프 (예를 들어, 비-필수 에피토프)의 확인에 근거하며, 이러한 세포독성제는 그러한 에피토프를 함유하는 단백질을 발현하는 세포의 세포 사멸을 유발시키지만, 세포독성제에 대한 감소된 결합을 가지므로 결과적으로 세포 사멸을 회피하도록 에피토프를 (예를 들어, 유전자) 조작시킨 단백질을 발현하는 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 세포)의 세포 사멸을 유발시키지 않는다. 이러한 방법은 조혈 악성종양에 대해 안전하고 효과적인 치료를 제공할 것으로 예상된다.
- [0006] 따라서, 본 개시내용의 한 측면은 조혈 악성종양을 치료하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 상기 치료를 필요로 하는 대상체에게 (i) 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 세포를 표적으로 하는 세포독성제의 유효량, 및 (ii) 조혈 세포 또는 그의 자손이 세포독성제와 결합하지 않도록 또는 세포독성제에 대한 감소된 결합을 갖도록 조작된 조혈 세포의 집단을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포독성제는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프와 특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포 또는 그의 자손은 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하고, 이러한 계통 특이적 세포 표면 단백질에 세포독성제와 결합하는 에피토프가 결합되도록 유전자 조작된다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포는 이러한 조혈 세포 또는 그의 자손 상에 발현된 계통 특이적 세포 표면 단백질이, 세포독성제에 대한 감소된 결합 활성을 갖거나 또는 세포독성제와 결합할 수 없는 돌연변이된 또는 변이체 에피토프를 갖도록 유전자 조작된다. 본원에 기재된 실시양태 중 임의의 것에서, 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프는 비-필수일 수 있다.
- [0007] 임의로, 본원에 제공된 방법 중 임의의 것은, 예를 들어 하나 이상의 화학요법제 또는 다른 암 요법(들)을 대상체에게 투여함으로써, 세포독성제 및/또는 조혈 세포를 투여하기 전에 대상체를 사전 컨디셔닝시키는 것을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 세포독성제 및/또는 조혈 세포를 투여하기 전에 사전 컨디셔닝되었다. 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 방법 중 임의의 것은 세포독성제 및/또는 조혈 세포를 투여하는 것과 연계하여 하나 이상의 화학요법제 또는 다른 암 요법(들)을 대상체에게 투여하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 화학요법제 또는 다른 암 요법은 세포독성제 및/또는 조혈 세포의 투여 전에, 투여와 공동으로, 또는 투여 후에 투여될 수 있다.
- [0008] 또 다른 한편으로 또는 또한, 본원에 기재된 방법 중 임의의 것은, 예를 들어, 유전자 변형을 통해, 세포독성제와 결합하는 에피토프가 결합된 조혈 세포를 제조하는 것을 추가로 포함할 수 있다.
- [0009] 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 사용하기 위한 세포독성제는 계통 특이적 세포 표면 단백질 내의 에피토프와 특이적으로 결합하는 항원 결합 단편 (예를 들어, 단일쇄 항체 단편 또는 scFv)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포독성제는 항체 또는 항체-약물 접합체 (ADC)이다. 일부 실시양태에서, 세포독성제는 항원 결합 단편을 포함하는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포 (예를 들어, T 세포)일 수 있다. 면역 세포는 동종이계 또는 자가일 수 있다.
- [0010] 키메라 수용체는 (a) 힌지 도메인, (b) 막횡단 도메인, (c) 적어도 하나의 공동 자극성 도메인, (d) 세포질 신호전달 도메인, 또는 (e) 그의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 적어도 하나의 공동 자극성 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 공동 자극성 신호전달 도메인은 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, GITR, HVEM, 및 그의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 공동 자극성 수용체로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 적어도 하나의 세포질 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포질 신호전달 도메인은 CD3, 예를 들어 CD3 제타 (CD3 ζ)로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 적어도 하나의 힌지 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 또는 CD28로부터의 것이다.
- [0011] 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 조혈 세포 (예를 들어, 동종이계 또는 자가)는, 예를 들어 골수 세포, 제대혈 세포, 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 유래될 수 있는 조혈 줄기 세포일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포는 대상체의 HLA 일배체형과 일치되는 HLA 일배체형을 갖는 공여자로부터 수득된 동종이계 조혈 줄기 세포이다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체의 HLA 일배체형과 일치되는 HLA를 갖는 공여자로부터 조혈 세포를 수득하는 것을 추가로 포함한다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용되는 조혈 세포는 세포독성제에 의해 결합된 에피토프를 붕괴시키도록 유전자 변형에 의해 조작될 수 있다. 또 다른 한편으로, 조혈 세포는 이러한 세포 또는 그의 자손 상의

계통 특이적 세포 표면 단백질과 결합하므로, 상기 세포에 대한 세포독성제의 결합을 차단시키는 차단제와 조혈 세포가 접촉하게 됨으로써 조작될 수 있다. 이는 조혈 세포를 생체 외에서 상기 차단제와 함께 인큐베이션하거나, 또는 조혈 세포를 투여하기 전에, 투여와 공동으로, 또는 투여 후에 대상체에게 차단제를 투여함으로써 달성될 수 있다.

[0013] 일부 실시양태에서, 조혈 세포는 변이체 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하도록 유전자 변형되며, 여기서 변이체 계통 특이적 세포 표면 단백질은 세포독성제와 연합되지 않는다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포는 변이체 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하도록 유전자 변형되며, 여기서 변이체 계통 특이적 세포 표면 단백질은 세포독성제에 대한 감소된 결합 (예를 들어, 감소된 결합 친화도)을 갖는다. 세포독성제 결합에 필수적인 에피토프는 선형의 연속되는 아미노산 서열 내에 함유될 수 있거나 (예를 들어, 선형 에피토프) 또는 계통 특이적 세포 표면 단백질 입체 형태에 의존적일 수 있으므로, 세포독성제 결합 에피토프는 비-연속되는 아미노산 서열에 의존적일 수 있다 (예를 들어, 입체 형태적 에피토프). 따라서, 예를 들어, 조혈 세포는 세포독성제 결합 에피토프를 함유하는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 영역 또는 도메인이 결실되거나 또는 돌연변이될 수 있도록 유전자 변형될 수 있다. 또 다른 한편으로, 세포독성제 결합을 배제하도록 전체 에피토프를 결실시킬 수 있거나 (예를 들어, 3 내지 15개의 아미노산) 또는 아미노산 중 하나 이상을 돌연변이시킬 수 있다. 또 다른 한편으로, 계통 특이적 세포 표면 입체 형태-의존적 에피토프의 입체 형태에 필수적인 아미노산은, 이러한 에피토프의 입체 형태가 붕괴되도록 함으로써, 세포독성제에 의한 결합을 감소시키거나 또는 배제시키도록 결실되거나 또는 돌연변이될 수 있다.

[0014] 일부 실시양태에서, 에피토프 아미노산 서열은 계통 특이적 세포 표면 단백질의 필수 구조 요소는 보존하면서도, 세포독성제의 결합을 배제하거나 또는 감소시키도록 변경될 수 있다. 이러한 변경은 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프 내의 단일 또는 다수의 아미노산의 돌연변이일 수 있다.

[0015] 일부 실시양태에서, 별개의 세포독성제에 의해 인식된 다수의 별개의 에피토프가 변경될 수 있으며, 이로써 세포독성제가 조합하여 치료적으로 사용될 수 있게 되거나 또는 순차적으로 사용될 수 있게 된다.

[0016] 일부 실시양태에서, 조혈 세포 집단 또는 그의 자손 상에 발현된 계통 특이적 세포 표면 단백질은 계통 특이적 세포 표면 단백질의 유전자의 엑손에 의해 코딩되는 단편의 결실을 가지며, 여기서 상기 단편은 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프를 포함한다.

[0017] 일부 실시양태에서, 계통 특이적 세포 표면 항원은 유형 2 계통 특이적 세포 표면 단백질이다. 일부 실시양태에서, 유형 2 계통 특이적 세포 표면 단백질은 CD33이다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포의 표면 상에 발현된 단백질은 CD33의 변이체이며, 이에 는 세포독성제와 결합하는 에피토프 (예를 들어, 비-필수 에피토프)가 결합될 수 있다. 일부 예에서, 상기 에피토프는 CD33 유전자의 엑손 2에 의해 코딩된 영역 내에 위치된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조혈 세포 상에 발현된 CD33의 변이체에는 CD33의 엑손 2 또는 그의 일부분이 결합된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조혈 세포 상에 발현된 CD33의 변이체에는 서열식별번호 (SEQ ID NO): 1의 아미노산 W11 내지 T139가 결합된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조혈 세포 상에 발현된 CD33의 변이체에는 서열식별번호: 1의 아미노산 47-51 또는 248-252를 포함하는 에피토프가 결합된다. 예시적인 CD33 변이체는 서열식별번호: 2-7 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포독성제와 결합하는 에피토프가 결합된 변이체 CD33 단백질을 발현하도록 유전자 변형된 조혈 세포를 제공한다. 일부 구체적 실시양태에서, 유전자 변형된 조혈 세포는 엑손 2, 또는 그의 일부분이 결실된 변이체 CD33을 발현한다. 일부 구체적 실시양태에서, 유전자 변형된 조혈 세포는 서열식별번호: 1의 아미노산 47-51 또는 248-252를 포함하는 에피토프가 결합된 변이체 CD33을 발현한다. 일부 구체적 실시양태에서, 유전자 변형된 조혈 세포는 서열식별번호: 2-7 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 변이체 CD33을 발현한다.

[0018] 일부 실시양태에서, 계통 특이적 세포 표면 단백질은 유형 1 계통 특이적 세포 표면 단백질이다. 일부 실시양태에서, 유형 1 계통 특이적 세포 표면은 CD19이다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포의 표면 상에 발현된 단백질은, 세포독성제와 결합하는 에피토프 (예를 들어, 비-필수 에피토프)가 결합될 수 있는 CD19의 변이체이다. 일부 예에서, 상기 에피토프는 CD19 유전자의 엑손 2에 의해 코딩된 영역 내에 위치한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조혈 세포 상에 발현된 CD19의 변이체에는 CD19의 엑손 2 또는 그의 일부분이 결합된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 세포독성제와 결합하는 에피토프가 결합되는 변이체 CD19 단백질을 발현하도록 유전자 변형된 조혈 세포를 제공한다. 일부 구체적 실시양태에서, 유전자 변형된 조혈 세포는 엑손 2, 또는 그의 일부분이 결실된 변이체 CD19를 발현한다.

[0019] 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에서, 대상체에게 호지킨(Hodgkin) 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병, 또는

다발성 골수종이 있을 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 백혈병, 예를 들어, 급성 골수성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병, 또는 만성 림프모구성 백혈병이 있다.

[0020] 본원에 기재된 유전자 변형된 조혈 세포 중 임의의 것 및 조혈 악성종양을 치료하는 데 있어서의 그의 용도가 또한, 본 개시내용의 범위 내에 있다.

[0021] 본 개시내용의 다른 측면은 계통 특이적 세포 표면 단백질 내의 하나 이상의 세포독성제 결합 에피토프가 결합된 유전자 조작된 조혈 세포를 제조하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 (i) 인간 대상체로부터 수득된 조혈 세포 집단을 제공하는 단계이며, 여기서 조혈 세포 집단은 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 것인 단계; (ii) 계통 특이적 세포 표면 단백질 내의 후보 에피토프 내로 돌연변이를 도입하기 위해 조혈 세포 집단을 유전자 조작하는 단계; 및 (iii) 후보 에피토프 변경이 계통 특이적 단백질 기능을 유지시켜 준다는 것을 검증하기 위해 유전자 조작된 조혈 세포의 기능성을 결정하는 단계를 포함한다.

[0022] 본 개시내용의 또 다른 측면은 계통 특이적 세포 표면 단백질 내의 비-필수 에피토프를 확인하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 (i) 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 조혈 세포 집단을 제공하는 단계; (ii) 계통 특이적 세포 표면 단백질 내의 후보 에피토프 내로 돌연변이를 도입하기 위해 조혈 세포 집단을 유전자 조작하는 단계; (iii) 유전자 조작된 조혈 세포의 기능성을 결정하는 단계; 및 (iv) 돌연변이를 수반하는 후보 에피토프가 (iii)에서 결정된 바와 같은 계통 특이적 단백질 기능을 유지하는지의 여부를 평가하는 단계이며, 여기서 계통 특이적 단백질 기능의 유지는 후보 에피토프가 비-필수 에피토프임을 나타내는 것인 단계를 포함한다.

[0023] 또한 본 개시내용의 범위 내에는, (i) 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 세포를 표적으로 하는 하나 이상의 세포독성제 (여기서 이러한 세포독성제는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프와 특이적으로 결합하는 단백질-결합 단편을 포함함); 및 (ii) 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 조혈 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 세포) 집단 (여기서 조혈 세포는 그들이 세포독성제와 결합하지 않도록 또는 세포독성제에 대한 감소된 결합을 갖도록 조작됨)을 포함하는, 조혈 악성종양을 치료하는 데 사용하기 위한 키트가 있다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포는 계통 특이적 세포 표면 단백질에 세포독성제와 결합하는 에피토프가 결합되도록 조작된다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포는 계통 특이적 세포 표면 단백질이, 세포독성제와 결합하지 않거나 또는 감소된 결합을 갖는 변이체 에피토프를 갖도록 조작된다.

[0024] 추가로, 본 개시내용은 조혈 악성종양을 치료하는 데 사용하기 위한, 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 세포를 표적으로 하는 임의의 세포독성제 및/또는 세포독성제와 결합하지 않도록 조작되는, 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 조혈 세포 중 임의의 것을 포함하는 제약 조성물; 뿐만 아니라 조혈 악성종양을 치료하는 데 사용하기 위한 의약을 제조하기 위한, 상기 세포독성제 및 조혈 세포의 용도를 제공한다.

[0025] 본 개시내용의 하나 이상의 실시양태의 세부 사항은 하기 설명에 제시되어 있다. 본 개시내용의 다른 특색 또는 이점은 몇 가지 실시양태의 상세한 설명 및 또한 첨부된 청구범위로부터 명백할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0026] 하기 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 개시내용의 특정 측면을 추가로 입증하기 위해 포함되며, 이는 본원에 제시된 구체적 실시양태의 상세한 설명과 조합하여 이들 도면 중 하나 이상을 참조함으로써 더 잘 이해될 수 있다.

도 1은 본원에 기재된 방법을 포함하는 예시적인 치료 프로세스를 나타내는 개략도이다. A: 본 프로세스는 CD34+ 세포 (공여자로부터 또는 자가로 수득됨)를 수득하는 단계, CD34+ 세포를 유전자 조작하는 단계, 조작된 세포를 환자 내로 생착시키는 단계, 환자에게 CAR T 세포 요법을 수행하여 암 부담을 없애거나 또는 감소시키고 조혈을 유지시키는 단계를 포함한다. B: 계통 특이적 세포 표면 단백질의 비-필수 에피토프가 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프에 특이적인 CAR T 세포와 결합하지 않도록 변형되는 조작된 공여자 CD34+ 세포.

도 2는 계통 특이적 세포 표면 단백질 인간 CD33의 세포외 및 막횡단 부분의 개략도이다. 변형될 때 덜 해로운 것으로 예상되는 CD33의 영역이 박스로 표시된다. 그 서열은 서열식별번호: 51에 상응한다.

도 3은 CAR T 세포가 인간 CD33을 발현하는 세포와 결합하지만, CD33의 에피토프를 변형 또는 결실시킨, 인간 CD33을 발현하는 세포와는 결합하지 않는다는 것을 보여준다. A: 세포 용해를 초래하는 CD33+ 급성 골수성 백혈병 세포를 표적으로 하는 CAR T 세포. B: CAR T 세포는 CD33의 에피토프를 변형 또는 결실시킨, 유전자 조작된 공여자 생착 세포와 결합할 수 없다. 결과적으로, 이들 세포는 용해되지 않는다.

도 4는 CD19 엑손 2의 CRISPR/Cas9-매개된 게놈 결실의 개략도이며, 이로써 엑손 2가 결실된 CD19 변이체의 발현이 초래된다.

도 5는 인간 백혈병 세포주 (K562 세포)에서 CD19를 표적으로 하는 다양한 변형된 단일 가이드 RNA (ms-sgRNA)의 조사를 보여주는 다이어그램을 포함한다. A: T7E1 검정에 의해 결정된 바와 같이 CD19 유전자의 인트론 1 및 2 전역에 걸쳐 있는 영역으로부터 유래된 PCR 앰플리콘을 보여주는 사진. 샘플은 T7E1로 처리되거나 (+) 또는 비-처리된 (-) 것이다. 절단 효율 백분율이 각각의 레인 아래에 표시되어 있다. C = 뉴 잉글랜드 바이오랩스 (NEB) 샘플 대조군, WT = 형질감염되지 않은 야생형 세포, Cas9 = Cas9 단독. B: T7E1 검정 및 TIDE 분석에 의해 결정된 INDEL 퍼센트를 나타내는 차트.

도 6은 K562 세포에서 CD19의 엑손 2의 이중 ms-sgRNA-매개된 결실을 보여주는 다이어그램을 포함한다. A: 이중 ms-sgRNA-매개된 CRISPR/Cas9를 통해 CD19의 엑손 2의 CRISPR/Cas9-매개된 게놈 결실을 검출하기 위한 PCR-기반 검정을 보여주는 개략도. B: 게놈 DNA의 종말점 PCR 검정에 의해 K562 세포를 지시된 쌍의 ms-sgRNA로 처리한 후 엑손 1과 엑손 3 사이의 영역의 결실을 보여주는 사진. C: 종말점 PCR에 의해 정량화된 결실 백분율을 나타내는 차트.

도 7은 T7E1 검정 및 TIDE 분석에 의해 CD34+ HSC에서 인트론 1 또는 2를 표적으로 하는 CD19 ms-sgRNA의 스크리닝을 보여주는 다이어그램을 포함한다. A: T7E1 검정에 의해 결정된 바와 같이 CD19 유전자의 인트론 1 및 2 전역에 걸쳐 있는 영역으로부터 유래된 PCR 앰플리콘을 보여주는 사진. 샘플은 T7E1로 처리되거나 (+) 또는 비-처리된 (-) 것이다. 삽입/결실 (INDEL) 및 절단 효율 퍼센트가 각각의 레인 아래에 표시된다. C = NEB 샘플 대조군, Cas9 = Cas9 단독. B: CD19 유전자의 인트론 1 및 2 전역에 걸쳐 있는 영역으로부터 유래된 PCR 앰플리콘을 T7E1 검정 또는 TIDE 분석에 의해 분석하고, INDEL 퍼센트를 결정하였다. Cas9 = cas9 단독 대조군.

도 8은 CD34+ HSC에서 CD19 엑손 2의 이중 ms-sgRNA-매개된 결실을 보여주는 다이어그램을 포함한다. A: 게놈 결실 영역 전체에 걸친 PCR에 의해 결정된 바와 같이 더 큰 모 밴드와 비교하여 더 작은 결실 PCR 산물을 보여주는 사진. B: 종말점 PCR에 의해 정량화된 결실 퍼센트를 나타내는 차트.

도 9는 CD34+ HSC에서 CD19의 인트론 1 또는 2를 표적으로 하는 ms-sgRNA의 조사를 보여주는 다이어그램을 포함한다. A: T7E1 검정에 의해 결정된 바와 같이 CD19 유전자의 인트론 1 및 2 전역에 걸쳐 있는 영역으로부터 유래된 PCR 앰플리콘을 보여주는 사진. 절단 효율 퍼센트가 각각의 레인 아래에 표시되어 있다. B: T7E1 검정에 의해 분석된 바와 같이 CD19 유전자의 인트론 1 및 2 전역에 걸쳐 있는 영역으로부터 유래된 PCR 앰플리콘, 및 INDEL 퍼센트를 나타내는 차트. Cas9 = cas9 단독 대조군.

도 10은 CD34+ HSC에서 CD19의 엑손 2의 효율적인 이중 ms-sgRNA-매개된 결실을 보여주는 다이어그램을 포함한다. A: 게놈 결실 영역 전체에 걸친 PCR에 의해 결정된 바와 같이 더 큰 모 밴드와 비교하여 더 작은 결실 PCR 산물을 보여주는 사진. 결실 퍼센트가 각각의 레인 아래에 표시되어 있다. B: 종말점 PCR에 의해 정량화된 결실 퍼센트를 나타내는 차트.

도 11은 편집된 CD34+ HSC의 분화 잠재력을 평가하기 위한 개략적인 작업 흐름이다. d = 일, w = 주, w/o = 주령, RNP = 리보핵단백질.

도 12는 라지(Raji) 버킷(Burkitt) 림프종 중앙 모델에서 CART19 요법의 생체 내 선택성 및 효능을 평가하기 위한 개략적인 작업 흐름이다. d = 일, w = 주, w/o = 주령.

도 13은 CD19의 엑손 2를 결실시킨 라지-플렉-GFP 세포의 생성을 보여주는 다이어그램을 포함한다. A: FACS에 의해 결정된 바와 같이 ms-sgRNA의 표시된 조합으로 형질감염된 라지-플렉-GFP 세포주에서 CD19의 발현을 보여주는 다이어그램. 모 라지 세포 및 Cas9 단독으로 뉴클레오펙션된 라지-플렉-GFP가 대조군으로서 포함된다. B: 각각의 세포 집단 (CD19 "hi", CD19 "int" 및 CD19 "lo")에서 살아있는 세포의 백분율을 나타내는 차트이다. C: 게놈 결실 영역 전체에 걸친 PCR에 의해 결정된 바와 같이 더 큰 모 밴드와 비교하여 엑손 2 결실에 대한 더 작은 PCR 산물을 보여주는 사진이다. D: 종말점 PCR에 의해 결정된 바와 같이 대량의 세포 집단에서 CD19의 결실된 엑손 2를 갖는 세포의 백분율을 나타내는 차트이다.

도 14는 CD19 엑손 2를 결실시킨 라지 세포에 대한 CART19 세포독성의 수준을 나타내는 다이어그램을 포함한다. A: CD19의 엑손 2를 결실시킨 세포가 CART19 세포독성에 대해 내성이라는 것을 나타내는 선 그래프. B: CD19의 엑손 2를 결실시킨 세포가 CART19 세포독성에 대해 내성이라는 것을 나타내는 막대 그래프.

도 15는 본원에 기재된 방법을 포함하는 편집된 HSC와 쌍을 이루는 CART 치료제의 효능 및 선택성을 평가하는

예시적인 생체 내 모델을 나타내는 개략도이다.

도 16은 CD33m 변이체의 발현을 초래하는 CD33 엑손 2 편집을 나타내는 개략도이다.

도 17은 TIDE 분석에 의해 CD34+ HSC에서 CD33의 인트론 1 또는 2를 표적으로 하는 다양한 ms-sgRNA의 조사를 보여주는 차트이다. CD33 유전자의 인트론 1 및 2 전역에 걸쳐 있는 영역으로부터 유래된 PCR 앰플리콘을 TIDE 분석에 의해 분석하고 INDEL 퍼센트를 결정하였다.

도 18은 CD33-편집된 1차 CD34+ HSC의 특징 규명을 나타내는 다이어그램을 포함한다. A: TIDE 분석에 의해 CD34+ HSC에서 조사된 CD33의 인트론 1 또는 2를 표적으로 하는 선택된 ms-sgRNA 및 INDEL 퍼센트를 보여주는 차트. "Sg" 및 "811"은 각각 엑손 2 및 3을 표적으로 하는 대조군 sgRNA를 나타낸다. B: 게놈 결실 영역 전체에 걸친 PCR에 의해 결정된 바와 같이 더 큰 모 밴드와 비교하여 더 작은 결실 PCR 산물을 보여주는 사진. C: 유동 세포계수법 분석에 의해 평가된 바와 같이 엑손 2에 의해 코딩된 CD33 V 도메인의 손실을 나타내는 다이어그램.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 표적화된 암 요법에 적합한 단백질을 성공적으로 확인하는 것은 중요한 도전 과제를 제시한다. 다수의 잠재적 표적 단백질이 암 세포의 세포 표면과 정상적인 비-암 세포의 세포 표면 둘 다에 존재하며, 이는 대상체의 발달 및/또는 생존에 필요하거나 또는 결정적으로 관여할 수 있다. 다수의 표적 단백질은 이러한 필수 세포의 기능성에 기여한다. 따라서, 이들 단백질을 표적으로 하는 요법은 대상체에서 유해한 효과, 예컨대 심각한 독성 및/또는 다른 부작용을 초래할 수 있다.

[0028] 본 개시내용은 적어도 상기 언급된 문제를 해결하기 위한 방법, 세포, 조성물 및 키트를 제공한다. 본원에 기재된 방법, 세포, 조성물 및 키트는 혈액 악성종양에 대한 안전하고 유효한 치료를 제공하여, 암 세포뿐만 아니라 대상체의 발달 및/또는 생존에 매우 중요한 세포 상에 존재하는 계통 특이적 세포 표면 단백질 (예를 들어, 유형 0, 유형 1, 또는 유형 2 단백질)의 표적화를 허용한다. 본원에 기재된 방법은 치료를 필요로 하는 대상체에게, 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프와 특이적으로 결합하는 세포독성제를 투여함으로써 표적 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 세포를 제거하는 단계; 및 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 조혈 세포, 또는 그의 자손을 대상체에게 제공하는 단계를 포함하며, 여기서 조혈 세포는 세포독성제에 의해 표적화될 수 없거나, 또는 감소된 표적화를 나타낼 수 있도록 (예를 들어, 유전자) 조작된다. 예를 들어, 계통 특이적 세포 표면 단백질 내의 결합 에피토프는 결실되거나, 돌연변이되거나, 또는 세포독성제와의 결합이 차단된다. "계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 것"은 계통 특이적 세포 표면 단백질의 적어도 일부분이 조혈 세포 또는 그의 자손의 표면 상에서 검출될 수 있다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 상기 조작된 조혈 세포는 생물학적으로 기능적인 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 상기 조작된 조혈 세포는 생물학적으로 기능적인 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현할 수 없지만; 그로부터 분화된 세포 (예를 들어, 그의 자손)는 그러한 기능적인 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현한다.

[0029] 따라서, 본원에는 계통 특이적 세포 표면 단백질, 예컨대 본원에 기재되거나 또는 관련 기술분야에 달리 공지된 계통 특이적 세포 표면 단백질 중 임의의 것, 예를 들어 CD33 또는 CD19를 표적으로 하는 세포독성제; 및 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하고, 세포독성제와 결합하지 않도록 또는 세포독성제에 대한 감소된 결합을 갖도록 조작되는 조혈 세포, 예컨대 조혈 줄기 세포 (HSC), 또는 그의 자손의 사용을 포함하는 조성물 및 방법이 기재되며, 이러한 조성물 및 방법은 조혈 악성종양의 치료에 사용될 수 있다. 본원에는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프가 결여되는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 변이체를 발현하는 유전자 조작된 조혈 세포뿐만 아니라 이러한 세포를 제조하는 방법이 제공된다. 또한 본원에는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 비-필수 에피토프를 확인하는 방법이 기재되어 있다.

[0030] 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 세포를 표적으로 하는 세포독성제

[0031] 본 개시내용의 측면은 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 세포 (예를 들어, 암 세포)를 표적으로 하는 세포독성제를 제공한다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "세포독성제"는 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 표적 세포 (예를 들어, 표적 암 세포)의 세포독성을 직접적으로 또는 간접적으로 유도시킬 수 있는 임의의 작용제를 지칭한다. 이러한 세포독성제는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프와 결합하고 이를 표적으로 하는 단백질-결합 단편을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 세포독성제는 항체를 포함할 수 있으며, 이는 약물

(예를 들어, 항암 약물)과 접합되어 항체-약물 접합체 (ADC)를 형성할 수 있다.

[0032] 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 세포독성제는 표적 세포의 세포 사멸을 직접적으로 유발시킬 수 있다. 예를 들어, 세포독성제는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포 (예를 들어, 세포독성 T 세포)일 수 있다. 키메라 수용체의 단백질 결합 도메인이 계통 특이적 세포 표면 단백질 내의 상응하는 에피토프와 맞물리게 되면, 신호 (예를 들어, 활성화 신호)가 면역 세포로 전달되어, 세포독성 분자, 예컨대 페로포린 및 그랜자임의 방출뿐만 아니라 이펙터 기능의 활성화가 초래되어, 표적 세포의 사멸이 유발된다. 또 다른 예에서, 세포독성제는 ADC 분자일 수 있다. 표적 세포와의 결합시, ADC 내의 약물 모이어티는 세포독성 활성을 발휘하여, 표적 세포 사멸을 초래할 것이다.

[0033] 다른 실시양태에서, 세포독성제는 표적 세포의 세포 사멸을 간접적으로 유도시킬 수 있다. 예를 들어, 세포독성제는 표적 세포와의 결합 시, 이펙터 활성 (예를 들어, ADCC)을 촉발시키고/시키거나 다른 인자 (예를 들어, 보체)를 동원하여 표적 세포 사멸을 초래할 것인 항체일 수 있다.

[0034] A. 계통 특이적 세포 표면 단백질

[0035] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "단백질", "펩티드" 및 "폴리펩티드"는 상호 교환적으로 사용될 수 있고 펩티드 결합에 의해 함께 연결된 아미노산 잔기의 중합체를 지칭한다. 일반적으로, 단백질은 자연적으로 발생하는, 재조합, 합성, 또는 그들의 임의의 조합일 수 있다. 또한 상기 용어의 범위 내에는 야생형 대응물과 비교하여 하나 이상의 아미노산 잔기의 돌연변이 (예를 들어, 치환, 삽입 또는 결실)를 포함하는 변이체 단백질이 있다.

[0036] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "계통 특이적 세포 표면 단백질" 및 "세포 표면 계통 특이적 단백질"은 상호 교환적으로 사용될 수 있고, 세포의 표면 상에 충분히 존재하고 세포 계통(들)의 하나 이상의 집단과 연합되는 임의의 단백질을 지칭한다. 예를 들어, 상기 단백질은 세포 계통(들)의 하나 이상의 집단 상에는 존재하고 다른 세포 집단의 세포 표면 상에는 부재할 수 있다 (또는 감소된 수준으로 존재할 수 있다).

[0037] 일반적으로, 계통 특이적 세포 표면 단백질은 단백질 및/또는 그러한 단백질을 제시하는 세포 집단이 숙주 유기체의 생존 및/또는 발달에 필요한 지의 여부와 같은 수많은 요인에 근거하여 분류될 수 있다. 계통 특이적 단백질의 예시적인 유형의 요약은 하기 표 1에 제공된다.

[0038] <표 1>

[0039] 계통 특이적 단백질의 분류

| 계통 특이적 단백질의 유형 | 계통 특이적 단백질의 특징 |
|----------------|--|
| 유형 0 | a) 단백질은 유기체의 생존을 위해 필요하고, b) 유형 0 단백질을 수반하는 세포 유형은 유기체의 생존을 위해 필요하며, 종양, 또는 종양 관련 바이러스에 대해 독특하지 않다 |
| 유형 1 | a) 단백질은 유기체의 생존을 위해 필요하지 않고, b) 유형 1 단백질을 수반하는 세포 유형은 유기체의 생존을 위해 필요하지 않다 |
| 유형 2 | a) 단백질은 유기체의 생존을 위해 필요하지 않고, b) 유형 2 단백질을 수반하는 세포 유형은 유기체의 생존을 위해 필요하다 |
| 유형 3 | a) 단백질은 유기체의 생존을 위해 필요하지 않고; b) 유형 3 단백질을 수반하는 세포 유형은 유기체의 생존을 위해 필요하지 않으며; c) 상기 단백질은 종양, 또는 종양 관련 바이러스에 대해 독특하다 한 예는 EBV 감염된 종양 세포 (비인두 암종 및 버킷 림프종)를 포함한 EBV 감염된 세포 내의 LMP-2 단백질이다 |

[0040]

[0041]

표 1에 제시된 바와 같이, 유형 0 계통 특이적 세포 표면 단백질은 조직 생체 항상성 및 생존에 필요하고, 유형 0 계통 특이적 세포 표면 단백질을 수반하는 세포 유형은 또한, 대상체의 생존에 필요할 수 있다. 따라서, 생체 항상성 및 생존에 있어서, 유형 0 계통 특이적 세포 표면 단백질, 또는 유형 0 계통 특이적 세포 표면 단백질을 수반하는 세포의 중요성을 고려해 볼 때, 통상적인 CAR T 세포 면역요법을 사용하여 이러한 카테고리의 단백질을 표적화하는 것은 문제가 될 수 있는데, 이는 이러한 단백질 및 이러한 단백질을 수반하는 세포의 억제 또는 제거가 대상체의 생존에 해로울 수 있기 때문이다. 결과적으로, 계통 특이적 세포 표면 단백질 (예컨대 유형 0 계통 특이적 단백질) 및/또는 이러한 단백질을 수반하는 세포 유형은 생존에 필요할 수 있는데, 이는 예를 들어, 그것이 대상체에서 절대 필요한 비-중복 기능을 수행하기 때문이며, 이러한 유형의 계통 특이적 단백질은 통상적인 CAR T 세포 기반 면역요법에 대한 불량한 표적일 수 있다.

[0042]

유형 0 단백질과는 달리, 유형 1 세포 표면 계통 특이적 단백질 및 유형 1 세포 표면 계통 특이적 단백질을 수반하는 세포는 대상체의 조직 생체 항상성 또는 생존에 필요하지 않다. 유형 1 세포 표면 계통 특이적 단백질을 표적으로 하는 것은 대상체의 급성 독성 및/또는 사멸을 유발시키는 것으로 예상되지 않는다. 예를 들어, 문헌 [Elkins et al. (*Mol. Cancer Ther.* (2012) 10:2222-32)]에 기재된 바와 같이, 정상 혈장 세포와 다발성 골수종 (MM) 세포 둘 다에서 독특하게 발현된 유형 1 단백질인 CD307을 표적으로 하도록 조작된 CAR T 세포가 양 세포 유형의 제거를 초래할 것이다. 그러나, 혈장 세포 계통이 유기체의 생존에 소모적일 수 있기 때문에, CD307 및 다른 유형 1 계통 특이적 단백질은 CAR T 세포 기반 면역요법에 적합한 단백질이다. 유형 1 부류의 계통 특이적 단백질은 난소, 고환, 전립선, 유방, 자궁 내막 및 췌장을 포함한 광범위하게 상이한 조직에서 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 작용제는 유형 1 단백질인 세포 표면 계통 특이적 단백질을 표적으로 한다. 이러한 방법은 환자의 더 장기간 생존 및 삶의 질을 개선시키도록 설계될 수 있다. 예를 들어, 급성 독성 및/또는 사망을 초래할 것으로 예상되지는 않지만 모든 혈장 세포를 표적으로 하는 것은 체액 면역 체계의 기능 저하와 같은 장기적인 결과를 가져와 감염 위험을 증가시킬 수 있었다.

[0043]

유형 2 단백질을 표적으로 하는 것은 유형 1 단백질과 비교 시 상당한 어려움을 제시한다. 유형 2 단백질은 (1) 이러한 단백질이 유기체의 생존을 위해 불필요하고 (즉, 생존을 위해 필요하지 않음), (2) 상기 단백질을 수반하는 세포 계통이 유기체의 생존을 위해 필수적인 (즉, 특별한 세포 계통이 생존을 위해 필요하다) 것을 특징으로 하는 것이다. 예를 들어, CD33은 정상 골수성 세포뿐만 아니라 급성 골수성 백혈병 (AML) 세포 둘 다에서 발현된 유형 2 단백질이다 (Dohner et al., *NEJM* 373:1136 (2015)). 결과적으로, CD33 단백질을 표적으로

하도록 조작된 CAR T 세포는 대상체의 생존과 양립할 수 없는 AML 세포뿐만 아니라 정상 골수성 세포 둘 다의 사멸을 초래할 수 있었다. 일부 실시양태에서, 작용제는 유형 2 단백질인 계통 특이적 세포 표면 단백질을 표적으로 한다.

[0044] 광범위한 단백질이 본 개시내용의 방법 및 조성물에 의해 표적화될 수 있다. 이들 단백질에 대한 모노클로날 항체는 상업적으로 구입하거나 또는 관심 단백질로 동물을 면역시킨 다음 통상적인 모노클로날 항체 방법론을 포함한 표준 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 항체 또는 항체를 코딩하는 핵산은 임의의 표준 DNA 또는 단백질 서열 분석 기술을 사용하여 서열 분석될 수 있다.

[0045] 일부 실시양태에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질은 BCMA, CD19, CD20, CD30, ROR1, B7H6, B7H3, CD23, CD38, C-유형 렉틴 유사 분자-1, CS1, IL-5, L1-CAM, PSCA, PSMA, CD138, CD133, CD70, CD7, NKG2D, NKG2D 리간드, CLEC12A, CD11, CD123, CD56, CD34, CD14, CD33, CD66b, CD41, CD61, CD62, CD235a, CD146, CD326, LMP2, CD22, CD52, CD10, CD3/TCR, CD79/BCR, 및 CD26이다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질은 CD33 또는 CD19이다.

[0046] 또 다른 한편으로 또는 또한, 세포 표면 계통 특이적 단백질은 암 단백질일 수 있으며, 예를 들어 암 세포 상에 차별적으로 존재하는 세포 표면 계통 특이적 단백질이다. 일부 실시양태에서, 암 단백질은 조직 또는 세포 계통에 특이적인 단백질이다. 특이적 유형의 암과 연관되는 세포 표면 계통 특이적 단백질의 예는 CD20, CD22 (비-호지킨 림프종, B-세포 림프종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL)), CD52 (B-세포 CLL), CD33 (급성 골수성 백혈병 (AML)), CD10 (gp100) (공통의 (프리-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 림프성 악성 종양), 인간 백혈구 항원 (HLA)-DR, HLA-DP, 및 HLA-DQ (림프성 악성종양), RCAS1 (부인과 암종, 담도 선암종 및 췌장의 도관 선암종)뿐만 아니라 전립선 특이적 막 항원을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 단백질 CD33은 AML 세포와 연관된다.

[0047] 본원에 기재된 세포독성제 중 임의의 것은, 예를 들어, 계통 특이적 단백질 내의 에피토프와 특이적으로 결합하는 단백질-결합 단편을 포함하는 계통 특이적 세포 표면 단백질을 표적으로 한다.

[0048] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "에피토프"는 항체의 CDR에 의해 결합되는 단백질, 예컨대 계통 특이적 세포 표면 단백질의 아미노산 서열 (선형 또는 입체 형태적)을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 세포독성제는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 하나 이상 (예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)의 에피토프와 결합한다. 일부 실시양태에서, 세포독성제는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 1개 초과에 에피토프와 결합하고, 조혈 세포는 각각의 에피토프가 부재하고/하거나 세포독성제에 의한 결합에 이용 가능하지 않도록 조작된다.

[0049] 일부 실시양태에서, 계통 특이적 세포 표면 단백질은 CD33이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되는 바와 같이, CD33은 또 다른 한편으로 스플라이스된 엑손 7A 및 7B를 포함한, 7개의 엑손에 의해 코딩된다 (Brinkman-Van der Linden et al. *Mol Cell. Biol.* (2003) 23: 4199-4206).

[0050] 일부 실시양태에서, 계통 특이적 세포 표면 단백질은 CD19이다. 일부 실시양태에서, 계통 특이적 세포 표면 단백질은 CD33이다.

[0051] 1. 계통 특이적 세포 표면 단백질의 비-필수 에피토프

[0052] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 세포독성제는 계통 특이적 세포 표면 단백질 내의 비-필수 에피토프를 표적으로 한다. 비-필수 에피토프 (또는 그를 포함하는 단편)는 계통 특이적 단백질 내에서의 도메인을 지칭하며, 그 내에서의 돌연변이 (예를 들어, 결실)는 계통 특이적 단백질의 생체 활성화에 실질적으로 영향을 덜 미치므로, 그를 발현하는 세포의 생체 활성화에 실질적으로 영향을 덜 미치는 것으로 예상된다. 예를 들어, 조혈 세포가 계통 특이적 세포 표면 단백질의 비-필수 에피토프의 결실 또는 돌연변이를 포함하는 경우, 그러한 조혈 세포는 야생형 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 조혈 세포와 유사한 수준으로 증식할 수 있고/있거나 적혈구 분화를 겪을 수 있다.

[0053] 계통 특이적 세포 표면 단백질의 비-필수 에피토프는 본원에 기재된 방법에 의해 또는 단백질 구조-기능 예측에 관한 통상적인 방법에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 단백질의 비-필수 에피토프는 하나의 종으로부터의 단백질의 아미노산 서열을 다른 종으로부터의 단백질의 서열과 비교하는 것에 근거하여 예측될 수 있다. 비-보존된 도메인은 통상적으로, 단백질의 기능성에 필수적이지 않다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 단백질의 비-필수 에피토프는 관심 계통 특이적 단백질의 잠재적 비-필수 에피토프 ("후보 비-필수 에피토프")를 예측하기 위한 알고리즘 또는 소프트웨어, 예컨대 PROVEAN 소프트웨어 (예를 들어,

provean.jcvi.org; 문헌 [Choi et al. *PLoS ONE* (2012) 7(10): e46688] 참조)를 사용하여 예측된다. 치환 및/또는 결실을 포함한 돌연변이는 통상적인 핵산 변형 기술을 사용하여 후보 비-필수 에피토프의 임의의 하나 이상의 아미노산 잔기에서 만들어질 수 있다. 이와 같이 제조된 단백질 변이체는 적합한 유형의 세포, 예컨대 조혈 세포 내로 도입될 수 있으며, 후보 비-필수 에피토프가 실제로 비-필수 에피토프인지를 입증하기 위해 단백질 변이체의 기능성을 조사할 수 있다.

[0054] 또 다른 한편으로, 계통 특이적 세포 표면 단백질의 비-필수 에피토프는 적합한 유형의 숙주 세포 (예를 들어, 조혈 세포)에서 관심 계통 특이적 단백질 내의 후보 영역 내로 돌연변이를 도입하고, 숙주 세포에서 상기와 같이 돌연변이된 계통 특이적 단백질의 기능성을 조사함으로써 확인될 수 있다. 돌연변이된 계통 특이적 단백질이 천연 대응물의 생물학적 활성을 실질적으로 유지하는 경우, 이는 돌연변이가 도입된 영역이 계통 특이적 단백질의 기능에 필수적이지 않다는 것을 표시한다.

[0055] 계통 특이적 세포 표면 단백질 및 조혈 세포 또는 그의 자손의 기능성을 평가하는 방법은 관련 기술분야에 공지될 것이며, 이는 예를 들어, 증식 검정, 분화 검정, 콜로니 형성, 발현 분석 (예를 들어, 유전자 및/또는 단백질), 단백질 국제화, 세포내 신호전달, 기능적 검정, 및 생체 내 인간화 마우스 모델을 포함한다.

[0056] 계통 특이적 세포 표면 단백질 내의 비-필수 에피토프를 확인 및/또는 검증하는 방법 중 임의의 것이 또한, 본 개시내용의 범위 내에 있다.

[0057] 2. 계통 특이적 세포 표면 단백질의 변이체

[0058] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 조혈 세포는 관심 계통 특이적 세포 표면 단백질의 변이체를 발현하며, 이는 본원에 기재된 바와 같은 세포독성제에 대한 감소된 결합을 갖는다. 상기 변이체에는 세포독성제와 결합하는 에피토프가 결여될 수 있다. 또 다른 한편으로, 상기 변이체는 세포독성제와 결합하는 에피토프의 하나 이상의 돌연변이를 수반할 수 있으므로, 세포독성제에 대한 결합이 자연 또는 야생형 계통 특이적 세포 표면 단백질 대응물과 비교 시 감소되거나 또는 없어진다. 이러한 변이체는 야생형 대응물과 실질적으로 유사한 생물학적 활성을 유지하는 것이 바람직하다.

[0059] 상기 변이체는 야생형 대응물과의 적어도 80% (예를 들어, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 그 초과)의 서열 상동성을 공유할 수 있고, 일부 실시양태에서, 관심 에피토프를 돌연변이시키거나 또는 결실시키기 위한 것 이외의 다른 돌연변이를 함유하지 않을 수 있다. 2개의 아미노산 서열의 "동일성 퍼센트"는 문헌 [Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-77, 1993]에서와 같이 변형된, 문헌 [Karlin and Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-68, 1990]의 알고리즘을 사용하여 결정된다. 이러한 알고리즘은 문헌 [Altschul, et al. *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램 (버전 2.0) 내로 혼입된다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램, 스코어 = 50, 단어 길이 = 3으로 수행되어 본 발명의 단백질 분자와 상동인 아미노산 서열을 수득할 수 있다. 두 서열 사이에 갭이 존재하는 경우, 문헌 [Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402, 1997]에 기재된 바와 같이 갭이 있는 BLAST를 활용할 수 있다. BLAST 및 갭이 있는 BLAST 프로그램을 활용할 때, 각각의 프로그램 (예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터를 사용할 수 있다.

[0060] 일부 경우에, 변이체는 관심 에피토프 내에 하나 이상의 아미노산 잔기 치환 (예를 들어, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과)을 함유하여, 세포독성제가 상기 돌연변이된 에피토프와 결합하지 않도록 또는 그러한 에피토프에 대한 감소된 결합을 갖도록 한다. 이러한 변이체는 세포독성제에 대한 실질적으로 감소된 결합 친화도를 가질 수 있다 (예를 들어, 그의 야생형 대응물보다 적어도 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 또는 90% 더 낮은 결합 친화도를 갖는다). 일부 예에서, 이러한 변이체는 세포독성제에 대한 폐지된 결합 활성을 가질 수 있다. 다른 경우에, 변이체는 관심 에피토프를 포함하는 영역의 결실을 함유한다. 이러한 영역은 엑손에 의해 코딩될 수 있다. 일부 실시양태에서, 상기 영역은 에피토프를 코딩하는 관심 계통 특이적 세포 표면 단백질의 도메인이다. 한 예에서, 변이체는 단지 에피토프가 결실되었다. 이와 같이 결실된 영역의 길이는 3 내지 60개의 아미노산, 예를 들어 5 내지 50개, 5 내지 40개, 10 내지 30개, 10 내지 20개 등의 범위일 수 있다.

[0061] 계통 특이적 세포 표면 단백질의 변이체에서의 돌연변이(들) 또는 결실은 이러한 돌연변이(들) 또는 결실(들)이 단백질의 생체 활성에 실질적으로 영향을 미치지 않도록 비-필수 에피토프 내에 있거나 또는 이를 둘러쌀 수 있다.

[0062] 일부 예에서, 본원에는 CD33의 변이체가 제공되며, 이는 CD33의 엑손 중 어느 하나에 의해 코딩되는 단백질의 단편의 결실 또는 돌연변이, 또는 비-필수 에피토프에서의 결실 또는 돌연변이를 포함할 수 있다. CD33의 예측

된 구조는 2개의 이뮤노글로불린 도메인, 즉 IgV 도메인 및 IgC2 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, CD33의 이뮤노글로불린 V 도메인의 일부분이 결실되거나 또는 돌연변이된다. 일부 실시양태에서, CD33의 이뮤노글로불린 C 도메인의 일부분이 결실되거나 또는 돌연변이된다. 일부 실시양태에서, CD33의 엑손 2가 결실되거나 또는 돌연변이된다. 일부 실시양태에서, CD33 변이체에는 서열식별번호: 1의 아미노산 잔기 W11 내지 T139가 결여된다. 일부 실시양태에서, 이와 같이 결실되거나 또는 돌연변이된 단편은 세포독성제와 결합하는 에피토프와 중복되거나 또는 이를 포괄한다. 실시예 1에 기재된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 에피토프는 CD33 (서열식별번호: 1)의 세포외 부분의 아미노산 47-51 또는 248-252를 포함한다. 일부 실시양태에서, 에피토프는 CD33 (서열식별번호: 1)의 세포외 부분의 아미노산 248-252 (서열식별번호: 8), 47-51 (서열식별번호: 9), 249-253 (서열식별번호: 10), 250-254 (서열식별번호: 11), 48-52 (서열식별번호: 12), 또는 251-255 (서열식별번호: 13)를 포함한다.

[0063] 일부 예에서, 본원에는 CD19의 변이체가 제공되며, 이는 CD19의 엑손 중 어느 하나에 의해 코딩되는 단백질의 단편의 결실 또는 돌연변이, 또는 CD19의 비-필수 에피토프에서의 결실 또는 돌연변이를 포함할 수 있다. 15개의 엑손을 함유하는 CD19 유전자의 전체 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다 [예를 들어, 진뱅크(GenBank) 수탁 번호 NC_000016 참조]. 예를 들어, CD19 유전자의 엑손 2에 의해 코딩된 영역 내에 위치한 하나 이상의 에피토프가 결실되거나 또는 돌연변이될 수 있다. 엑손 2를 코딩하는 CD19 유전자의 영역에 대한 특정의 변형은 성공적인 CD19 단백질 발현, 막 국재화, 및 단백질 기능의 부분 유지를 초래하는 것으로 나타났다 (Sotillo et al. *Cancer Discovery*. (2015) 5: 1282-1295). 예를 들어, CD19 유전자의 엑손 2에서의 미스센스 또는 프레임시프트 돌연변이, 또는 또 다른 한편으로, CD19 엑손 2의 보유와 관련된 스플라이싱 인자 SRSF3의 발현을 영구적으로 또는 일시적으로 감소시키는 변형은 생체 내에서 CD19 발현을 감소시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, CD19 유전자의 엑손 2에 의해 코딩된 영역 내에 위치한 하나 이상의 에피토프는 돌연변이되거나 또는 결실된다. 예를 들어, CD19-표적화된 CAR 요법의 공지된 표적인 CD19의 FMC63 에피토프가 돌연변이되거나 또는 결실될 수 있다 (Sotillo et al. *Cancer Discovery*. (2015) 5: 1282-129; Nicholson et al. *Mol Immunol*. (1997) 34:1157-1165; Zola et al. *Immunol Cell Biol*. (1991) 69:411-422). 일부 실시양태에서, CD19의 엑손 2가 돌연변이되거나 또는 결실된다.

[0064] B. 세포독성제

[0065] 1. 항체 및 항원 결합 단편

[0066] 임의의 항체 또는 그의 항원 결합 단편은, 본원에 기재된 바와 같은 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프를 표적으로 하는 세포독성제로서 사용되거나 또는 세포독성제를 구축하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 항체 또는 항원 결합 단편은 통상적인 방법, 예를 들어, 하이브리도마 기술 또는 재조합 기술에 의해 제조될 수 있다.

[0067] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "항체"는 디설피드 결합에 의해 상호 연결된 적어도 2개의 중쇄 (H) 및 2개의 경쇄 (L)를 포함하는 당단백질, 즉 상이한 유전자에 의해 코딩되는 2개의 동일한 Ig H 쇄 및 2개의 동일한 L 쇄로 구성된 공유 이중 사량체를 지칭한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역 (본원에서 HCVR 또는 VH로서 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 CH1, CH2 및 CH3의 3개의 도메인으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역 (본원에서 LCVR 또는 VL로서 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역 (FR)으로 불리는, 보다 보존되는 영역과 산재된 상보성 결정 영역 (CDR)으로 지칭되는 추가변 영역으로 추가로 세분될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되며, 아미노-말단에서부터 카르복시-말단까지 하기 순서: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4로 배열된다. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호 작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역 체계의 다양한 세포 (예를 들어, 이펙터 세포) 및 고전적 보체 시스템의 제1 성분 (C1q)을 포함하여, 숙주 조직 또는 인자에 대한 이뮤노글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 성숙한 기능적 항체 분자의 형성은 2개의 단백질이 화학량론적 양으로 발현되고 적절한 입체 배치로 자기 어셈블리될 때 달성될 수 있다.

[0068] 일부 실시양태에서, 항원 결합 단편은 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프와 특이적으로 결합하는 단일 쇄 항체 단편 (scFv)이다. 다른 실시양태에서, 항원 결합 단편은 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프와 특이적으로 결합하는 완전한 길이의 항체이다.

[0069] 본원에 기재되고 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 항체의 CDR은 표적 단백질 (계통 특이적 세포 표면 단백질)의 에피토프와 특이적으로 결합한다.

- [0070] 일부 실시양태에서, 항체는 완전한 길이의 항체이며, 이는 항체가 단편 결정화 가능한 (Fc) 부분 및 단편 항원-결합 (Fab) 부분을 포함한다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 항체는 이소형 IgG, IgA, IgM, IgA, 또는 IgD의 것이다. 일부 실시양태에서, 항체 집단은 항체의 하나의 이소형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgM 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체 집단은 항체의 1개 초과 이소형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 집단은 대부분 항체의 하나의 이소형으로 구성되지만, 항체의 하나 이상의 다른 이소형도 함유한다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgAsec, IgD, IgE로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0071] 본원에 기재된 항체는 표적 단백질과 특이적으로 결합할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, "특이적 결합"은 미리 결정된 단백질, 예컨대 암 항원에 대한 항체 결합을 지칭한다. "특이적 결합"은 대안적 단백질과 비교하여 표적 단백질에 대한 보다 빈번하고, 더 신속하며, 더 큰 상호 작용 지속 기간, 및/또는 더 큰 친화도를 수반한다. 일부 실시양태에서, 항체 집단은 표적 단백질의 특별한 에피토프와 특이적으로 결합하며, 이는 항체가 동일한 표적 단백질의 대안적 에피토프 또는 또 다른 단백질의 에피토프와 비교하여 보다 빈번하게, 더 신속하게, 더 큰 상호 작용 지속 기간 동안, 및/또는 상기 에피토프에 대한 더 큰 친화도로 특별한 단백질과 결합한다는 것을 의미한다. 일부 실시양태에서, 표적 단백질의 특별한 에피토프와 특이적으로 결합하는 항체는 동일한 단백질의 다른 에피토프와 결합하지 않을 수 있다.
- [0072] 항체 또는 그의 단편은 표적 단백질 또는 에피토프에 대한 항체의 결합 친화도에 근거하여 선택될 수 있다. 또 다른 한편으로 또는 또한, 항체는 표적 단백질 또는 에피토프에 대한 항체의 결합 친화도를 변형 (예를 들어, 증강 또는 감소)시키기 위해 하나 이상의 돌연변이를 도입하도록 돌연변이될 수 있다.
- [0073] 본 발명의 항체 또는 항원-결합 부분은 약 10^{-7} M 미만, 약 10^{-8} M 미만, 약 10^{-9} M 미만, 약 10^{-10} M 미만, 약 10^{-11} M 미만, 또는 약 10^{-12} M 미만의 해리 상수 (K_D)로 특이적으로 결합할 수 있다. 본 개시내용에 따른 항체의 친화도는 통상적인 기술을 사용하여 용이하게 결정될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Scatchard et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* (1949) 51:660]; 및 미국 특허 번호 5,283,173, 5,468,614, 또는 등가물] 참조).
- [0074] 에피토프 또는 단백질에 대한 결합 친화도 또는 결합 특이성은 평형 투석, 평형 결합, 겔 여과, ELISA, 표면 플라즈몬 공명, 또는 분광법을 포함한 각종 방법에 의해 결정될 수 있다.
- [0075] 예를 들어, 관심 계통 특이적 단백질의 에피토프에 특이적인 항체 (또는 그의 항원 결합 단편)는 통상적인 하이브리도마 기술에 의해 제조될 수 있다. 운반체 단백질, 예컨대 KLH와 커플링될 수 있는 계통 특이적 단백질은 그 복합체와 결합하는 항체를 생성하기 위해 숙주 동물을 면역시키는 데 사용될 수 있다. 숙주 동물의 면역 경로 및 스케줄은 일반적으로, 본원에 추가로 기재된 바와 같이 항체 자극 및 생산을 위해 확립되고 통상적인 기술을 유지한다. 마우스, 인간화, 및 인간 항체의 생산을 위한 일반적인 기술은 관련 기술분야에 공지되어 있고 본원에 기재되어 있다. 인간을 포함한 임의의 포유 동물 대상체 또는 그로부터의 항체 생산 세포는 인간 하이브리도마 세포주를 포함한 포유 동물의 생산을 위한 기초로서 제공되도록 조작될 수 있는 것으로 고려된다. 전형적으로, 숙주 동물에게 본원에 기재된 바와 같은 것을 포함한 양의 면역원을 복강내로, 근육내로, 경구로, 피하로, 발바닥 내, 및/또는 피내로 접종한다.
- [0076] 하이브리도마는 문헌 [Kohler, B. and Milstein, C. (1975) *Nature* 256:495-497]의 일반적 체세포 혼성화 기술을 사용하거나 또는 문헌 [Buck, D. W., et al., *In Vitro*, 18:377-381 (1982)]에 의해 변형된 바와 같이, 림프구 및 불멸화 골수종 세포로부터 제조할 수 있다. X63-Ag8.653 및 솔크 인스티튜트, 셀 디스트리뷰션 센터 (Salk Institute, Cell Distribution Center; 미국 캘리포니아주 샌디에이고)로부터의 것을 포함하나, 이에 제한되지는 않는 입수 가능한 골수종 세포주를 상기 혼성화에 사용할 수 있다. 일반적으로, 이러한 기술은 폴리에틸렌 글리콜과 같은 융합 유도제를 이용하거나, 또는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지된 전기적 수단에 의해 골수종 세포와 림프계 세포를 융합시키는 것을 포함한다. 이러한 융합 후, 상기 세포를 융합 배지로부터 분리시키고, 선택적 성장 배지, 예컨대 히포크산틴-아미노프테린-티미딘 (HAT) 배지에서 성장시켜 혼성화되지 않은 모 세포를 제거한다. 혈청으로 보충시켰거나 보충시키지 않은, 본원에 기재된 배지 중 임의의 것이, 모노클로날 항체를 분리하는 하이브리도마를 배양하기 위해 사용될 수 있다. 세포 융합 기술에 대한 또 다른 대안으로서, EBV 불멸화 B 세포를 사용하여 본원에 기재된 TCR-유사 모노클로날 항체를 생산할 수 있다. 하이브리도마를 원하는 경우, 확장하고 서브클로닝하며, 상등액을 대상으로 통상적인 면역검정 절차 (예를 들어, 방사성 면역검정, 효소 면역검정, 또는 형광 면역검정)에 의해 항-면역원 활성화에 관하여 검정한다.
- [0077] 항체의 공급원으로서 사용될 수 있는 하이브리도마는 모든 유도체, 계통 특이적 단백질과 결합할 수 있는 모노

클로날 항체를 생산하는 모 하이브리도마의 자손 세포를 포괄한다. 이러한 항체를 생산하는 하이브리도마는 공지된 절차를 사용하여 시험관 내에서 또는 생체 내에서 성장시킬 수 있다. 모노클로날 항체는 원하는 경우, 통상적인 이뮤노글로불린 정제 절차, 예컨대 황산암모늄 침전, 겔 전기영동, 투석, 크로마토그래피, 및 한외여과에 의해 배양 배지 또는 체액으로부터 분리될 수 있다. 존재하는 경우, 원하지 않는 활성은, 예를 들어, 고체상에 부착된 면역원으로 제조된 흡착제 상에서 제조를 실행하고, 이러한 면역원으로부터 원하는 항체를 용출 또는 방출시킴으로써 제거될 수 있다. 이관능성 또는 유도체화 작용제, 예를 들어 말레이미도벤조일 술포숙신이미드 에스테르 (시스테인 잔기를 통한 접합), N-히드록시숙신이미드 (리신 잔기를 통한), 글루타르알데히드, 숙신산 무수물, SOCl₂, 또는 R₁N=C=NR (여기서, R 및 R₁은 상이한 알킬 기이다)을 사용하여, 면역시키고자 하는 종에서 면역원성인 단백질, 예를 들어, 키톨 림프 헤모시아닌, 혈청 알부민, 소 티로글로불린, 또는 대두 트립신 억제제와 접합된 표적 아미노산 서열을 함유하는 표적 단백질 또는 단편으로 숙주 동물을 면역시키면, 항체 (예를 들어, 모노클로날 항체) 집단이 산출될 수 있다.

[0078] 원하는 경우, 관심 항체 (예를 들어, 하이브리도마에 의해 생산됨)를 서열 분석할 수 있고, 그 다음 폴리뉴클레오타이드 서열을 발현 또는 변식을 위해 벡터 내로 클로닝할 수 있다. 관심 항체를 코딩하는 서열을 숙주 세포 내의 벡터에 유지시킨 다음, 이러한 숙주 세포를 나중의 사용을 위해 확장 및 동결시킬 수 있다. 대안에서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 항체를 "인간화"시키거나 또는 항체의 친화도 (친화성 성숙) 또는 다른 특징을 개선시키기 위한 유전자 조작을 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 항체가 인간의 임상 시험 및 치료에 사용되는 경우, 불변 영역은 면역 반응을 피하기 위해 인간 불변 영역과 더 유사하도록 조작될 수 있다. 계통 특이적 단백질에 대한 더 큰 친화도를 획득하기 위해 항체 서열을 유전자 조작하는 것이 바람직할 수 있다. 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 변화가 항체에 대해 이루어질 수 있고 표적 단백질에 대한 그의 결합 특이성을 여전히 유지할 수 있다는 것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0079] 다른 실시양태에서, 완전한 인간 항체는 특이적 인간 이뮤노글로불린 단백질을 발현하도록 조작시킨 상업적으로 이용 가능한 마우스를 사용함으로써 획득될 수 있다. 보다 바람직한 항체 (예를 들어, 완전한 인간 항체) 또는 보다 강한 면역 반응을 생산하도록 설계되는 트랜스제닉(transgenic) 동물이 또한, 인간화 또는 인간 항체의 생성을 위해 사용될 수 있다. 이러한 기술의 예는 제노마우스(XenomouseTM) [암젠, 인크. (Amgen, Inc.; 미국 캘리포니아주 프리몬트)로부터 입수됨] 및 HuMAb-마우스(HuMAb-MouseTM) 및 TC 마우스(TC MouseTM) [메다렉스, 인크. (Medarex, Inc.; 미국 뉴저지주 프린스턴)로부터 입수됨]이다. 또 다른 대안에서, 항체는 파지 디스플레이 또는 효모 기술에 의해 재조합적으로 제조될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 및 6,265,150; 및 문헌 [Winter et al., (1994) *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455] 참조). 또 다른 한편, 파지 디스플레이 기술 (문헌 [McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-553])을 사용하여, 면역시키지 않은 공여자로부터의 이뮤노글로불린 가변 (V) 도메인 유전자 레퍼토리로부터 인간 항체 및 항체 단편을 시험관 내에서 생산할 수 있다.

[0080] 무손상 항체 (완전한 길이의 항체)의 항원 결합 단편은 일상적인 방법을 통해 제조될 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 단편은 항체 분자의 펩신 소화로 인해 생산될 수 있고, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 디술퍼드 브릿지를 환원시킴으로써 생성될 수 있다.

[0081] 유전자 조작된 항체, 예컨대 인간화 항체, 키메라 항체, 단일 체 항체, 및 이중특이적 항체는, 예를 들어, 통상적인 재조합 기술을 통해 생산될 수 있다. 한 예에서, 표적 단백질에 특이적인 모노클로날 항체를 코딩하는 DNA는 통상적인 절차를 사용하여 (예를 들어, 이러한 모노클로날 항체의 중쇄 및 경쇄를 코딩하는 유전자와 특이적으로 결합할 수 있는 올리고뉴클레오타이드 프로브를 사용함으로써) 용이하게 분리 및 서열 분석될 수 있다. 하이브리도마 세포는 이러한 DNA의 바람직한 공급원으로서 제공된다. 일단 분리되면, 그 DNA를 하나 이상의 발현 벡터 내에 놓아둘 수 있고, 이어서 달리 이뮤노글로불린 단백질을 생산하지 않는 숙주 세포, 예컨대 이. 콜라이(*E. coli*) 세포, 원숭이 COS 세포, 차이나이즈 햄스터 난소 (CHO) 세포 또는 골수종 세포 내로 형질감염시켜 재조합 숙주 세포에서 모노클로날 항체의 합성을 획득한다 (예를 들어, PCT 공개 번호 WO 87/04462 참조). 이어서, 상기 DNA는, 예를 들어 코딩 서열을 상동 유린 서열 대신 인간 중쇄 및 경쇄 불변 도메인으로 치환시키거나 (문헌 [Morrison et al., (1984) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851]), 또는 이뮤노글로불린 코딩 서열에 비-이뮤노글로불린 폴리펩티드에 대한 코딩 서열의 전부 또는 일부를 공유적으로 연결시킴으로써 변형시킬 수 있다. 그러한 방식으로, 표적 단백질의 결합 특이성을 갖는 유전자 조작된 항체, 예컨대 "키메라" 또는 "하이브리드" 항체를 제조할 수 있다.

[0082] "키메라 항체"의 생산을 위해 개발된 기술은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Morrison

et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851; Neuberger et al. (1984) *Nature* 312, 604; 및 Takeda et al. (1984) *Nature* 314:452] 참조).

[0083] 인간화 항체를 구축하는 방법이 또한, 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:10029-10033 (1989)] 참조). 한 예에서, 모 비-인간 항체의 VH 및 VL의 가변 영역은 관련 기술분야에 공지된 방법에 따라 3차원 분자 모델링 분석에 적용된다. 그 다음, 정확한 CDR 구조의 형성에 중요한 것으로 예상되는 프레임워크 아미노산 잔기는 동일한 분자 모델링 분석을 사용하여 확인된다. 이와 병행하여, 모 비-인간 항체와 상동인 아미노산 서열을 갖는 인간 VH 및 VL쇄는 모 VH 및 VL 서열을 검색 질의로서 사용하여 임의의 항체 유전자 데이터베이스로부터 확인된다. 이어서, 인간 VH 및 VL 수용체 유전자가 선택된다.

[0084] 선택된 인간 수용체 유전자 내의 CDR 영역은 모 비-인간 항체 또는 그의 기능적 변이체로부터의 CDR 영역으로 대체될 수 있다. 필요한 경우, CDR 영역과 상호 작용하는 데 중요할 것으로 예상되는 모쇄의 프레임워크 영역 내의 잔기 (상기 설명 참조)는 인간 수용체 유전자에서 상응하는 잔기를 대체하기 위해 사용될 수 있다.

[0085] 단일쇄 항체는 중쇄 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열과 경쇄 가변 영역을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 연결함으로써 제조할 기술을 통해 제조될 수 있다. 바람직하게, 가요성 링커가 두 가변 영역 사이에 혼입된다. 또 다른 한편으로, 단일쇄 항체의 생산에 대해 기재된 기술 (미국 특허 번호 4,946,778 및 4,704,692)은 과지 또는 효모 scFv 라이브러리를 생산하도록 적용될 수 있고 계통 특이적 단백질에 특이적인 scFv 클론은 일상적인 절차에 따라 상기 라이브러리로부터 확인될 수 있다. 계통 특이적 단백질과 결합하는 것을 확인하기 위해 양성 클론을 추가 스크리닝할 수 있다.

[0086] 일부 경우에, 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 세포독성제는 계통 특이적 단백질 CD33을 표적으로 하는 항원 결합 단편을 포함한다. 다른 예에서, 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 세포독성제는 계통 특이적 단백질 CD19를 표적으로 하는 항원 결합 단편을 포함한다. CD33 또는 CD19를 표적으로 하는 항체 및 항원 결합 단편은 일상적인 실시예에 의해 제조될 수 있다. CD19를 표적으로 하는 항원 결합 단편의 비-제한된 예는 문헌 [Porter DL et al. *NEJM* (2011) 365:725-33 및 Kalos M et al. *Sci Transl Med.* (2011) 3:95ra73]에서 찾을 수 있다 (또한 본원의 설명 참조). 이러한 CD19-표적화 항원 결합 단편은 본원에 기재된 CAR 구축물을 제조하기 위해 사용될 수 있다.

[0087] 2. 키메라 항원 수용체를 발현하는 면역 세포

[0088] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프를 표적으로 하는 세포독성제는 계통 특이적 단백질 (예를 들어, CD33 또는 CD19)의 에피토프와 결합할 수 있는 항원 결합 단편 (예를 들어, 단일쇄 항체)을 포함하는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포이다. 키메라 수용체의 항원 결합 단편에 의해 그의 세포 표면 상에 계통 특이적 단백질의 에피토프를 갖는 표적 세포 (예를 들어, 암 세포)의 인식은 활성화 신호를 키메라 수용체의 신호전달 도메인(들) (예를 들어, 공동 자극성 신호전달 도메인 및/또는 세포질 신호전달 도메인)으로 변환시키며, 이는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포에서 이펙터 기능을 활성화시킬 수 있다.

[0089] 본원에 사용된 바와 같은, 키메라 수용체는 숙주 세포의 표면 상에서 발현될 수 있고 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프와 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 비-자연적으로 발생하는 분자를 지칭한다. 일반적으로, 키메라 수용체는 상이한 분자로부터 유래되는 적어도 2개의 도메인을 포함한다. 본원에 기재된 에피토프-결합 단편 외에도, 키메라 수용체는 힌지 도메인, 막횡단 도메인, 공동 자극성 도메인, 세포질 신호전달 도메인, 및 그의 조합 중 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 N-말단에 서부터 C-말단까지, 세포 표면 계통 특이적 단백질과 결합하는 항원 결합 단편, 힌지 도메인, 막횡단 도메인 및 세포질 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 적어도 하나의 공동 자극성 도메인을 추가로 포함한다.

[0090] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 수용체는 하나 이상의 힌지 도메인(들)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 항원 결합 단편과 막횡단 도메인 사이에 위치될 수 있다. 힌지 도메인은 일반적으로 단백질의 두 도메인 사이에서 발견되는 아미노산 절편이며, 단백질의 가요성 및 서로에 대하여 도메인 중 하나 또는 둘 다의 이동을 허용할 수 있다. 키메라 수용체의 또 다른 도메인에 대하여 항원 결합 단편의 그러한 가요성 및 이동을 제공하는 임의의 아미노산 서열이 사용될 수 있다.

[0091] 힌지 도메인은 약 10 내지 200개의 아미노산, 예를 들어, 15 내지 150개의 아미노산, 20 내지 100개의

아미노산, 또는 30 내지 60개의 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 약 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 또는 200개의 아미노산 길이일 수 있다.

[0092] 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 자연적으로 발생하는 단백질의 힌지 도메인이다. 힌지 도메인을 포함하는 것으로 관련 기술분야에 공지된 임의의 단백질의 힌지 도메인은 본원에 기재된 키메라 수용체에 사용하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 자연적으로 발생하는 단백질의 힌지 도메인의 적어도 일부분이고, 키메라 수용체에 가요성을 부여해 준다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 또는 CD28의 것이다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 CD8 α 의 힌지 도메인의 일부분, 예를 들어, CD8 α 또는 CD28의 힌지 도메인의 적어도 15개 (예를 들어, 20, 25, 30, 35, 또는 40개)의 연속되는 아미노산을 함유하는 단편이다.

[0093] 항체, 예컨대 IgG, IgA, IgM, IgE 또는 IgD 항체의 힌지 도메인은 또한, 본원에 기재된 키메라 수용체에 사용하기에 적합하다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 항체의 불변 도메인 CH1과 CH2를 연결하는 힌지 도메인이다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 항체의 것이고 항체의 힌지 도메인 및 항체의 하나 이상의 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 항체의 힌지 도메인 및 항체의 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 도메인은 항체의 힌지 도메인 및 항체의 CH2 및 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG, IgA, IgM, IgE 또는 IgD 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 IgG1, IgG2, IgG3, 또는 IgG4 항체이다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 IgG1 항체의 힌지 영역 및 CH2 및 CH3 불변 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 힌지 영역은 IgG1 항체의 힌지 영역 및 CH3 불변 영역을 포함한다.

[0094] 또한 본 개시내용의 범위 내에는, 비-자연적으로 발생하는 펩티드인 힌지 도메인을 포함하는 키메라 수용체가 있다. 일부 실시양태에서, Fc 수용체의 세포의 리간드-결합 도메인의 C-말단과 막횡단 도메인의 N-말단 사이의 힌지 도메인은 펩티드 링커, 예컨대 (Gly_xSer)_n 링커이며, 여기서 x 및 n은 독립적으로, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 또는 그 초과를 포함한 3 내지 12의 정수일 수 있다.

[0095] 본원에 기재된 키메라 수용체의 힌지 도메인에 사용될 수 있는 부가의 펩티드 링커는 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Wriggers et al. *Current Trends in Peptide Science* (2005) 80(6): 736-746] 및 PCT 공보 WO 2012/088461 참조).

[0096] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 수용체는 하나 이상의 막횡단 도메인(들)을 포함할 수 있다. 키메라 수용체에 사용하기 위한 막횡단 도메인은 관련 기술분야에 공지된 임의의 형태일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, "막횡단 도메인"은 세포막, 바람직하게 진핵 세포막에서 열역학적으로 안정한 임의의 단백질 구조를 지칭한다. 본원에 사용된 키메라 수용체에 사용하기 적합한 막횡단 도메인은 자연적으로 발생하는 단백질로부터 취득될 수 있다. 또 다른 한편으로, 막횡단 도메인은 합성의 비-자연적으로 발생하는 단백질 절편, 예를 들어, 세포막에서 열역학적으로 안정한 소수성 단백질 절편일 수 있다.

[0097] 막횡단 도메인은 막횡단 도메인이 막을 가로 지르는 패스 횟수 및 단백질의 배향을 포함한, 막횡단 도메인 토폴로지에 근거하여 분류된다. 예를 들어, 단일 패스 막 단백질은 세포막을 한번 가로 지르고, 다중 패스 막 단백질은 세포막을 적어도 2회 (예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7회 또는 그 초과) 가로 지른다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 단일 패스 막횡단 도메인이다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 키메라 수용체의 N 말단을 세포의 세포외 측면으로 배향시키고 키메라 수용체의 C 말단을 세포의 세포내 측면으로 배향시키는 단일 패스 막횡단 도메인이다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 단일 패스 막횡단 단백질로부터 취득된다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD8 α 의 것이다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 CD28의 것이다. 일부 실시양태에서, 막횡단 도메인은 ICOS의 것이다.

[0098] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 수용체는 하나 이상의 공동 자극성 신호전달 도메인을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "공동 자극성 신호전달 도메인"은 이펙터 기능과 같은 면역 반응을 유도하기 위해 세포 내에서 신호 변환을 매개하는 단백질의 적어도 일부분을 지칭한다. 본원에 기재된 키메라 수용체의 공동 자극성 신호전달 도메인은 신호를 변환시키고 면역 세포, 예컨대 T 세포, NK 세포, 대식세포, 호중구, 또는 호산구에 의해 매개된 반응을 조정하는 공동 자극성 단백질로부터의 세포질 신호전달 도메인일 수 있다.

[0099] 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 1개 초과 (적어도 2, 3, 4개, 또는 그 초과)의 공동 자극성 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 상이한 공동 자극성 단백질로부터 취득된 1개 초과

동 자극성 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 공동 자극성 신호전달 도메인을 포함하지 않는다.

[0100] 일반적으로, 많은 면역 세포는 항원 특이적 신호의 자극에 더하여, 세포 증식, 분화 및 생존을 촉진시키고 세포의 이펙터 기능을 활성화시키기 위해 공동-자극을 필요로 한다. 숙주 세포 (예를 들어, 면역 세포)에서 공동 자극성 신호전달 도메인의 활성화는 시토카인의 생산과 분비, 식세포 특성, 증식, 분화, 생존, 및/또는 세포독성을 증가 또는 감소시키도록 세포를 유도할 수 있다. 임의의 공동 자극성 단백질의 공동 자극성 신호전달 도메인이 본원에 기재된 키메라 수용체에 사용하기 적합할 수 있다. 공동 자극성 신호전달 도메인의 유형(들)은 키메라 수용체가 발현될 것인 면역 세포의 유형 (예를 들어, 1차 T 세포, T 세포주, NK 세포주) 및 원하는 면역 이펙터 기능 (예를 들어, 세포독성)과 같은 요인에 근거하여 선택된다. 키메라 수용체에 사용하기 위한 공동 자극성 신호전달 도메인의 예는 CD27, CD28, 4-1BB, OX40, CD30, ICOS, CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3을 포함하나, 이에 제한되지 않는 공동 자극성 단백질의 세포질 신호전달 도메인일 수 있다. 일부 실시양태에서, 공동 자극성 도메인은 4-1BB, CD28, 또는 ICOS로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 공동 자극성 도메인은 CD28로부터 유래되고, 키메라 수용체는 4-1BB 또는 ICOS로부터의 제2 공동 자극성 도메인을 포함한다.

[0101] 일부 실시양태에서, 공동 자극성 도메인은 1개 초과와 공동 자극성 도메인 또는 1개 초과와 공동 자극성 도메인의 일부분을 포함하는 융합 도메인이다. 일부 실시양태에서, 공동 자극성 도메인은 CD28 및 ICOS로부터의 공동 자극성 도메인의 융합물이다.

[0102] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 수용체는 하나 이상의 세포질 신호전달 도메인(들)을 포함한다. 임의의 세포질 신호전달 도메인이 본원에 기재된 키메라 수용체에 사용될 수 있다. 일반적으로, 세포질 신호전달 도메인은 세포의 이펙터 기능 (예를 들어, 세포독성)을 유도하는 것과 같은 세포 반응을 자극하기 위해 세포의 리간드-결합 도메인과 그의 리간드의 상호 작용과 같은 신호를 중계한다.

[0103] 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, T 세포 활성화에 관여하는 인자는 세포질 신호전달 도메인의 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 (ITAM)의 인산화이다. 관련 기술분야에 공지된 임의의 ITAM-함유 도메인이 본원에 기재된 키메라 수용체를 구축하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, ITAM 모티프는 6 내지 8개의 아미노산에 의해 분리된 아미노산 서열 YxxL/I의 2개의 반복 서열을 포함할 수 있으며, 여기서 각각의 x는 독립적으로 임의의 아미노산이며, 보존된 모티프 YxxL/Ix(6-8)YxxL/I를 생산한다. 일부 실시양태에서, 세포질 신호전달 도메인은 CD3 ζ로부터의 것이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 수용체는 유형 2 단백질을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 CD33을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 수용체는 유형 1 단백질을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체는 CD19를 표적으로 한다. 이러한 키메라 수용체는 CD19와 결합하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 단편 (예를 들어, scFv)을 포함할 수 있다. 또 다른 한편으로, 키메라 수용체는 CD33과 결합하는 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항원 결합 단편 (예를 들어, scFv)을 포함할 수 있다.

[0105] CD33 또는 CD19를 표적으로 하는 키메라 수용체 구축물은 적어도 한 지 도메인 (예를 들어, CD28, CD8 α 또는 항체로부터), 막횡단 도메인 (예를 들어, CD8 α, CD28 또는 ICOS로부터), 하나 이상의 공동 자극성 도메인 (CD28, ICOS 또는 4-1BB 중 하나 이상으로부터) 및 세포질 신호전달 도메인 (예를 들어, CD3 ζ로부터), 또는 그의 조합을 추가로 포함할 수 있다.

[0106] 본원에 기재된 키메라 수용체 중 임의의 것은 일상적인 방법, 예컨대 재조합 기술에 의해 제조될 수 있다. 본원의 키메라 수용체를 제조하는 방법은 항원 결합 단편 및 임의로, 한 지 도메인, 막횡단 도메인, 적어도 하나의 공동 자극성 신호전달 도메인, 및 세포질 신호전달 도메인을 포함한, 키메라 수용체의 각각의 도메인을 포함하는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산의 생성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 성분을 코딩하는 핵산은 재조합 기술을 사용하여 함께 결합된다.

[0107] 키메라 수용체의 각각의 성분의 서열은 일상적인 기술, 예를 들어, 관련 기술분야에 공지된 각종 공급원 중 어느 하나로부터의 PCR 증폭을 통해 획득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 성분 중 하나 이상의 서열은 인간 세포로부터 획득된다. 또 다른 한편으로, 키메라 수용체의 하나 이상의 성분의 서열은 합성될 수 있다. 각각의 성분 (예를 들어, 도메인)의 서열은 PCR 증폭 또는 라이게이션과 같은 방법을 사용하여, 키메라 수용체를 코딩하는 핵산 서열을 형성하기 위해 직접 또는 간접적으로 (예를 들어, 펩티드 링커를 코딩하는 핵산 서열을 사용하여) 연결될 수 있다. 또 다른 한편으로, 키메라 수용체를 코딩하는 핵산이 합성될 수 있다. 일

부 실시양태에서, 핵산은 DNA이다. 다른 실시양태에서, 핵산은 RNA이다.

- [0108] 키메라 수용체의 성분 중 하나 이상 (예를 들어, 항원 결합 단편 등) 내의 하나 이상의 잔기의 돌연변이는 각각의 성분의 서열을 연결하기 전 또는 후에 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 성분 내의 하나 이상의 돌연변이는 에피토프에 대한 성분 (예를 들어, 표적 단백질에 대한 항원 결합 단편)의 친화성을 조정 (증가 또는 감소)하고/하거나 그 성분의 활성을 조정하도록 이루어질 수 있다.
- [0109] 본원에 기재된 키메라 수용체 중 임의의 것은 통상적인 기술을 통해 발현에 적합한 면역 세포 내로 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 T 세포, 예컨대 1차 T 세포 또는 T 세포주이다. 또 다른 한편으로, 면역 세포는 NK 세포, 예컨대 확립된 NK 세포주 (예를 들어, NK-92 세포)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 CD8 (CD8⁺) 또는 CD8 및 CD4 (CD8⁺/CD4⁺)를 발현하는 T 세포이다. 일부 실시양태에서, T 세포는 확립된 T 세포주의 T 세포, 예를 들어, 293T 세포 또는 저캣(Jurkat) 세포이다.
- [0110] 1차 T 세포는 임의의 공급원, 예컨대 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 골수, 조직, 예컨대 비장, 림프절, 흉선, 또는 종양 조직으로부터 획득될 수 있다. 원하는 면역 세포 유형을 획득하기에 적합한 공급원은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 집단은, 예컨대 골수로부터 또는 환자로부터 획득된 PBMC로부터의 조절 악성종양을 갖는 인간 환자로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포 집단은 건강한 공여자로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 면역 세포는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포가 후속적으로 투여될 대상체로부터 획득된다. 그로부터 세포를 획득한 동일한 대상체에게 투여되는 면역 세포는 자가 세포로서 지칭되는 반면, 세포가 투여될 대상체가 아닌 대상체로부터 획득되는 면역 세포는 동종이계 세포로서 지칭된다.
- [0111] 원하는 숙주 세포의 유형은 세포를 자극성 분자와 함께 공동 인큐베이션함으로써 획득된 세포 집단 내에서 확장될 수 있으며, 예를 들어, 항-CD3 및 항-CD28 항체가 T 세포의 확장을 위해 사용될 수 있다.
- [0112] 본원에 기재된 키메라 수용체 구축물 중 임의의 것을 발현하는 면역 세포를 구축하기 위해, 키메라 수용체 구축물의 안정적 또는 일시적 발현을 위한 발현 벡터가 본원에 기재된 바와 같은 통상적인 방법을 통해 구축될 수 있고 면역 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, 키메라 수용체를 코딩하는 핵산은 적합한 발현 벡터, 예컨대 적합한 프로모터에 작동 가능하게 연결된 바이러스 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 핵산 및 벡터는 적합한 조건 하에 제한 효소와 접촉하여, 서로 쌍을 형성하여 라이가제와 연결될 수 있는 각각의 분자 상에 상보적인 말단을 창출시킬 수 있다. 또 다른 한편으로, 합성 핵산 링커는 키메라 수용체를 코딩하는 핵산의 말단에 라이게이션될 수 있다. 합성 링커는 벡터 내의 특별한 제한 부위에 상응하는 핵산 서열을 함유할 수 있다. 발현 벡터/플라스미드/바이러스 벡터의 선택은 키메라 수용체의 발현을 위한 숙주 세포의 유형에 의존하지만, 진핵 세포에서의 통합 및 복제에 적합해야 한다.
- [0113] 시토메갈로바이러스 (CMV) 중간 초기 프로모터, 바이러스 LTR, 예컨대 라우스(Rous) 육종 바이러스 LTR, HIV-LTR, HTLV-1 LTR, 말로니 뮤린 백혈병 바이러스 (MMLV) LTR, 골수종식성 육종 바이러스 (MPSV) LTR, 비장 초점 형성 바이러스 (SFFV) LTR, 원숭이 바이러스 40 (SV40) 초기 프로모터, 단순 포진 tk 바이러스 프로모터, EF1- α 인트론을 수반하거나 또는 수반하지 않는 신장 인자 1-알파 (EF1- α) 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는 각종 프로모터가 본원에 기재된 키메라 수용체의 발현을 위해 사용될 수 있다. 키메라 수용체의 발현을 위한 부가의 프로모터는 면역 세포에서 임의의 구성적으로 활성인 프로모터를 포함한다. 또 다른 한편으로, 그의 발현이 면역 세포 내에서 조정될 수 있도록 임의의 조절 가능한 프로모터가 사용될 수 있다.
- [0114] 부가적으로, 벡터는, 예를 들어, 하기 중 일부 또는 전부를 함유할 수 있다: 선별성 마커 유전자, 예컨대 숙주 세포에서 안정적 또는 일시적 형질감염체의 선별을 위한 네오마이신 유전자; 높은 수준의 전사를 위한 인간 CMV의 즉발형 유전자로부터의 인핸서/프로모터 서열; mRNA 안정성을 위한 SV40으로부터의 전사 종결 및 RNA 프로세싱 신호; α -글로빈 또는 β -글로빈과 같은 고도로 발현된 유전자로부터의 mRNA 안정성 및 번역 효율을 위한 5'- 및 3'-비번역 영역; 적절한 에피솜 복제를 위한 SV40 폴리오마 복제 기점 및 CoIE1; 내부 리보솜 결합 부위 (IRESes), 다양한 다중 클로닝 부위; 센스 및 안티센스 RNA의 시험관내 전사를 위한 T7 및 SP6 RNA 프로모터; 축발될 때 벡터를 수반하는 세포를 사멸시키는 "자살 스위치" 또는 "자살 유전자" (예를 들어, HSV 티미딘 키나제, 유도성 카스파제, 예컨대 iCasp9), 및 키메라 수용체의 발현을 평가하기 위한 리포터 유전자 (하기 섹션 VI 참조). 트랜스진을 함유하는 벡터를 생산하는 데 적합한 벡터 및 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고 이용 가능하다. 키메라 수용체의 발현을 위한 벡터의 제조의 예는, 예를 들어, US2014/0106449 (그 전문이 본원에 참조로 포함된다)에서 찾을 수 있다.

- [0115] 일부 실시양태에서, 키메라 수용체 구축물 또는 상기 키메라 수용체를 코딩하는 핵산은 DNA 분자이다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체 구축물 또는 상기 키메라 수용체를 코딩하는 핵산은 DNA 벡터이며 면역 세포에 전기전공될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Till, et al. *Blood* (2012) 119(17): 3940-3950] 참조). 일부 실시양태에서, 키메라 수용체를 코딩하는 핵산은 RNA 분자이며, 이는 면역 세포에 전기전공될 수 있다.
- [0116] 본원에 기재된 키메라 수용체 구축물을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 중 임의의 것이 또한 본 개시내용의 범위 내에 있다. 이러한 벡터는 적합한 방법에 의해 숙주 세포, 예컨대 숙주 면역 세포 내로 전달될 수 있다. 면역 세포에 벡터를 전달하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며 DNA, RNA 또는 트랜스포손 전기전공, DNA, RNA 또는 트랜스포손을 전달하기 위한 형질감염 시약, 예컨대 리포솜 또는 나노 입자; 기계적 변형에 의한 DNA, RNA 또는 트랜스포손 또는 단백질의 전달 (예를 들어, 문헌 [Sharei et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2013) 110(6): 2082-2087] 참조); 또는 바이러스 형질도입을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 발현을 위한 벡터는 바이러스 형질도입에 의해 숙주 세포로 전달된다. 전달을 위한 예시적인 바이러스 방법은 재조합 레트로바이러스 (예를 들어, PCT 공개 번호 WO 90/07936; WO 94/03622; WO 93/25698; WO 93/25234; WO 93/11230; WO 93/10218; WO 91/02805; 미국 특허 번호 5,219,740 및 4,777,127; GB 특허 번호 2,200,651; 및 EP 특허 번호 0 345 242 참조), 알파바이러스 기반 벡터, 및 아데노 관련 바이러스 (AAV) 벡터 (예를 들어, PCT 공개 번호 WO 94/12649, WO 93/03769; WO 93/19191; WO 94/28938; WO 95/11984 및 WO 95/00655 참조)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 발현을 위한 벡터는 레트로바이러스이다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 발현을 위한 벡터는 렌티바이러스이다. 일부 실시양태에서, 키메라 수용체의 발현을 위한 벡터는 아데노 관련 바이러스이다.
- [0117] 키메라 수용체를 코딩하는 벡터가 바이러스 벡터를 사용하여 숙주 세포 내로 도입되는 예에서, 면역 세포를 감염시킬 수 있고 벡터를 수반하는 바이러스 입자는 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 생산될 수 있으며, 예를 들어, PCT 출원 번호 WO 1991/002805A2, WO 1998/009271 A1 및 미국 특허 6,194,191에서 찾을 수 있다. 바이러스 입자는 세포 배양 상등액으로부터 수거되고, 바이러스 입자를 면역 세포와 접촉시키기 전에 분리 및/또는 정제될 수 있다.
- [0118] 본원에 기재된 키메라 수용체 중 임의의 것을 발현하는 숙주 세포를 제조하는 방법은 생체 외에서 면역 세포를 활성화 및/또는 확장시키는 것을 포함할 수 있다. 숙주 세포를 활성화시키는 것은 세포가 이펙터 기능 (예를 들어, 세포독성)을 수행할 수 있는 활성화 상태가 되도록 숙주 세포를 자극하는 것을 의미한다. 숙주 세포를 활성화시키는 방법은 키메라 수용체의 발현에 사용되는 숙주 세포의 유형에 의존할 것이다. 숙주 세포를 확장하는 것은 키메라 수용체를 발현하는 세포의 수를 증가시켜 주는 임의의 방법을 포함할 수 있으며, 예를 들어 숙주 세포가 증식할 수 있게 하거나 또는 숙주 세포가 증식하도록 자극할 수 있다. 숙주 세포의 확장을 자극하는 방법은 키메라 수용체의 발현에 사용되는 숙주 세포의 유형에 의존할 것이며, 이는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 수용체 중 임의의 것을 발현하는 숙주 세포는 대상체에게 투여하기 전에 생체 외에서 활성화 및/또는 확장된다.
- [0119] 3. 항체-약물 접합체
- [0120] 일부 실시양태에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프를 표적으로 하는 세포독성제는 항체-약물 접합체 (ADC)이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 용어 "항체-약물 접합체"는 "면역독소"와 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 독소 또는 약물 분자와 결합된 항체 (또는 그의 항원 결합 단편)를 포함하는 융합 분자를 지칭한다. 표적 단백질의 상응하는 에피토프에 대한 항체의 결합은 독소 또는 약물 분자를, 세포 표면 (예를 들어, 표적 세포) 상에 단백질 (및 그의 에피토프)을 제시하는 세포에 전달할 수 있게 함으로써, 표적 세포의 사멸을 초래한다. 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체 (또는 그의 항원 결합 단편)는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 상응하는 에피토프와 결합하지만, 에피토프가 결합되거나 또는 에피토프를 돌연변이시킨 계통 특이적 세포 표면 단백질과는 결합하지 않는다.
- [0121] 일부 실시양태에서, 상기 작용제는 항체-약물 접합체이다. 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체는 항원 결합 단편 및 표적 세포에서 세포독성을 유도하는 독소 또는 약물을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체는 유형 2 단백질을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체는 CD33을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체는 유형 1 단백질을 표적으로 한다. 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체는 CD19를 표적으로 한다.
- [0122] 항체-약물 접합체에 사용하기 적합한 독소 또는 약물은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다 (예를 들어, 문헌 [Peters et al. *Biosci. Rep.*(2015) 35(4): e00225] 참

조). 일부 실시양태에서, 항체-약물 접합체는 항체와 약물 분자를 부착시키는 링커 (예를 들어, 펩티드 링커, 에컨대 절단 가능한 링커)를 추가로 포함할 수 있다.

[0123] 일부 실시양태에서, 계통 특이적 세포 표면 단백질의 2개 이상의 에피토프를 변형시켜, 2개의 상이한 세포독성제 (예를 들어, 2개의 ADC)가 2개의 에피토프를 표적으로 할 수 있게 한다. 일부 실시양태에서, ADC에 의해 운반되는 독소는 상승적으로 작동하여 효능 (예를 들어, 표적 세포의 사멸)을 증강시킬 수 있었다.

[0124] 본원에 기재된 ADC는 본원에 기재된 바와 같이 조합 요법을 받은 대상체에 대한 후속 치료로서 사용될 수 있다.

[0125] 조혈 세포

[0126] 본 개시내용은 또한, 본원에 기재된 치료 방법에 사용하기 위한 계통 특이적 세포 표면 단백질 또는 그의 변이체를 발현하는 조혈 세포 또는 그의 자손을 제공한다. 조혈 세포 또는 그의 자손은 이들이 세포독성제와 결합하지 않도록 또는 세포독성제에 대한 감소된 결합을 갖도록 조작된다. 본원에 사용된 바와 같은, 조혈 세포의 "자손"은 조혈 세포로부터 발생하는 임의의 세포 유형 또는 세포 계통을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포의 자손은 조혈 세포로부터 분화된 세포 유형 또는 세포 계통이다.

[0127] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "감소된 결합"은 적어도 25% 만큼 감소되는 결합을 지칭한다. 결합 수준은 조혈 세포 또는 그의 자손에 대한 세포독성제의 결합 양 또는 계통 특이적 세포 표면 단백질에 대한 세포독성제의 결합 양을 지칭할 수 있다. 조작된 조혈 세포 또는 그의 자손의 세포독성제에 대한 결합 수준은 동일한 조건 하에 동일한 검정에 의해 결정된 바와 같이, 조작시키지 않은 조혈 세포 또는 그의 자손에 대한 세포독성제의 결합 수준에 상대적일 수 있다. 또 다른 한편으로, 에피토프가 결합된 계통 특이적 세포 표면 단백질의 세포독성제에 대한 결합 수준은 동일한 조건 하에 동일한 검정에 의해 결정된 바와 같이, 에피토프를 함유하는 계통 특이적 세포 표면 단백질 (예를 들어, 야생형 단백질)에 대한 세포독성제의 결합 수준에 상대적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 그 결합은 적어도 25%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 만큼 감소된다. 일부 실시양태에서, 결합은 통상적인 검정에서 검출 가능한 결합이 실질적으로 없도록 감소된다.

[0128] 본원에 사용된 바와 같은, "결합 없음"은 실질적으로 결합하지 않는 것, 예를 들어, 통상적인 결합 검정에서 결정된 바와 같이 검출 가능한 결합이 없거나 또는 기준선 결합만을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 조작된 조혈 세포 또는 그의 자손과 세포독성제 간에는 결합이 없다. 일부 실시양태에서, 조작된 조혈 세포 또는 그의 자손과 세포독성제 간에는 검출 가능한 결합이 없다. 일부 실시양태에서, 세포독성제에 대한 조혈 세포 또는 그의 자손의 결합이 없다는 것은 관련 기술분야에 공지된 임의의 통상적인 결합 검정을 사용하여 나타난 바와 같이, 결합의 기준선 수준을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 조작된 조혈 세포 또는 그의 자손과 세포독성제의 결합 수준은 생물학적으로 유의미하지 않다. 용어 "결합 없음"은 절대적인 결합 부재를 요구하지 않는다.

[0129] 일부 실시양태에서, 조혈 세포는 조혈 줄기 세포이다. 조혈 줄기 세포 (HSC)는 골수성 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 추가로 발생시키는 골수성 전구 세포와 림프성 전구 세포 둘 다를 발생시킬 수 있다. HSC는 세포 표면 마커 CD34 (예를 들어, CD34⁺)의 발현을 특징으로 하며, 이는 HSC의 확인 및/또는 단리, 및 세포 계통에 대한 투입과 연관된 세포 표면 마커의 부재를 위해 사용될 수 있다.

[0130] 일부 실시양태에서, HSC는 대상체, 예컨대 포유 동물 대상체로부터 획득된다. 일부 실시양태에서, 포유 동물 대상체는 비-인간 영장류, 설치류 (예를 들어, 마우스 또는 래트), 소, 돼지, 말, 또는 가축이다. 일부 실시양태에서, HSC는 인간 환자, 예컨대 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자로부터 획득된다. 일부 실시양태에서, HSC는 건강한 공여자로부터 획득된다. 일부 실시양태에서, HSC는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포가 후속적으로 투여될 대상체로부터 획득된다. 그로부터 세포가 획득된 동일한 대상체에게 투여되는 HSC는 자가 세포로서 지칭되는 반면, 세포가 투여될 대상체가 아닌 대상체로부터 획득되는 HSC는 동종이계 세포로서 지칭된다.

[0131] 일부 실시양태에서, 대상체에게 투여되는 HSC는 동종이계 세포이다. 일부 실시양태에서, HSC는 대상체의 HLA 일배체형과 일치되는 HLA 일배체형을 갖는 공여자로부터 획득된다. 인간 백혈구 항원 (HLA)은 인간에서 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 단백질을 코딩한다. MHC 분자는 많은 다른 세포 유형뿐만 아니라 항원-제시 세포의 표면 상에 존재하며 면역감시를 위한 자기 및 비-자기 (예를 들어, 외래) 항원의 펩티드를 제시한다. 그러나, HLA는 고도로 다형성으로, 많은 별개의 대립유전자를 초래한다. 상이한 (외부, 비-자기) 대립유전자는 항원성일 수 있고, 특히 기관 및 세포 이식에서 강력한 불리한 면역 반응을 자극할 수 있다. 외래 (비-자기)로서 인식되는 HLA 분자는 이식 거부를 유발할 수 있다. 일부 실시양태에서, 거부 발생률을 감소시키기 위해 환자와

동일한 HLA 유형을 갖는 공여자로부터의 HSC를 투여하는 것이 바람직하다.

- [0132] 공여자 대상체의 HLA 유전자좌는 대상체에 대한 HLA-일치된 공여자로서 특정 개체를 확인하기 위해 유형 분류될 수 있다. HLA 유전자좌를 유형 분류하는 방법은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이며, 이는, 예를 들어, 혈청학 (혈청형 분류), 세포 유형 분류, 유전자 서열 분석, 표현형 분류, 및 PCR 방법을 포함한다. 공여자로부터의 HLA는 공여자 및 대상체의 HLA 유전자좌가 동일하거나 또는 충분히 유사하여 불리한 면역 반응이 예상되지 않도록 하는 경우에 대상체의 HLA와 "일치하는" 것으로 간주된다.
- [0133] 일부 실시양태에서, 공여자로부터의 HLA가 대상체의 HLA와 일치하지 않는다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 이러한 대상체의 HLA와 HLA 일치하지 않는 HSC를 투여한다. 일부 실시양태에서, 대상체에게 공여자 HSC 세포의 거부를 감소시키거나 또는 방지하기 위해 하나 이상의 면역억제제를 추가로 투여한다.
- [0134] HSC는 관련 기술분야에 공지된 통상적인 수단을 사용하여 임의의 적합한 공급원으로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, HSC는 대상체 (또는 공여자)로부터의 샘플, 예컨대 골수 샘플 또는 혈액 샘플로부터 수득된다. 또 다른 한편으로 또는 또한, HSC는 제대로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, HSC는 골수, 제대혈 세포 또는 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터의 것이다. 일반적으로, 골수 세포는 장골 크레스트, 대퇴골, 경골, 척추, 갈비뼈 또는 대상체 (또는 공여자)의 다른 골수 공간으로부터 수득될 수 있다. 골수는 환자로부터 꺼내어 관련 기술분야에 공지된 다양한 분리 및 세척 절차를 통해 단리될 수 있다. 골수 세포의 단리를 위한 예시적인 절차는 하기 단계: a) 골수 샘플의 추출 단계; b) 3개의 분획으로 골수 현탁액을 원심 분리하고 중간 분획 또는 연막을 수집하는 단계; c) 단계 (b)로부터의 연막 분획을 분리 유체, 통상적으로 피콜(Ficoll™)에서 한번 더 원심분리하고, 골수 세포를 함유하는 중간 분획을 수집하는 단계; 및 d) 재수혈 가능한 골수 세포의 회수를 위해 단계 (c)로부터의 수집된 분획을 세척하는 단계를 포함한다.
- [0135] HSC는 전형적으로 골수에 상주하지만, 말초 혈액으로부터 HSC를 수거하기 위해 동원 작용제를 투여함으로써 순환성 혈액 내로 동원될 수 있다. 일부 실시양태에서, 그로부터 HSC가 수득되는 대상체 (또는 공여자)에게 동원 작용제, 예컨대 과립구 콜로니 자극 인자 (G-CSF)를 투여한다. 동원 작용제를 사용한 동원 후에 수집된 HSC의 수는 전형적으로, 동원 작용제를 사용하지 않고 수득된 세포의 수보다 더 많다.
- [0136] 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 HSC는 관심 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현할 수 있다. 본원에 기재된 변형 (예를 들어, 유전자 변형 또는 차단제와의 인큐베이션) 중 임의의 것에서, HSC는 또한 본원에 기재된 세포독성제에 의해 표적화되지 않을 것이다. 또 다른 한편으로, 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 HSC는 관심 계통 특이적 세포 표면 단백질 (예를 들어, CD19)을 발현하지 않을 수 있지만; HSC로부터 분화된 자손 세포 (예를 들어, B 세포)는 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현한다. 유전자 변형 시, 계통 특이적 세포 표면 단백질을 코딩하는 HSC의 내인성 유전자는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 비-필수 에피토프를 코딩하는 영역에서 붕괴될 수 있다. 이러한 변형된 HSC (예를 들어, 생체 내)로부터 분화된 자손 세포는 비-필수 에피토프가 돌연변이되어, 비-필수 에피토프와 결합할 수 있는 세포독성제에 의해 표적화되지 않도록 변형된 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현할 것이다.
- [0137] 일부 실시양태에서, 샘플은 대상체 (또는 공여자)로부터 수득된 다음, 원하는 세포 유형에 대해 강화시킨다 (예를 들어 CD34⁺/CD33⁻ 세포). 예를 들어, PBMC 및/또는 CD34⁺ 조혈 세포는 본원에 기재된 바와 같이 혈액으로부터 단리될 수 있다. 세포는 또한, 예를 들어 원하는 세포 유형의 세포 표면 상의 에피토프와 결합하는 항체로 단리 및/또는 활성화시킴으로써 다른 세포로부터 단리될 수 있다. 사용될 수 있는 또 다른 방법은 수용체 맞춤형에 의해 세포를 활성화시키지 않고서도 특이적 세포 유형을 선택적으로 강화시키기 위해 세포 표면 마커에 대한 항체를 사용하는 음성 선택을 포함한다.
- [0138] HSC 집단은 HSC를 조작하기 전 또는 후에 확장되어, 세포독성제와 결합하지 않도록 또는 세포독성제에 대한 감소된 결합을 갖도록 할 수 있다. 세포는 하나 이상의 시토카인, 예컨대 줄기 세포 인자 (SCF), Flt-3 리간드 (Flt3L), 트롬보포이에틴 (TPO), 인터류킨 3 (IL-3), 또는 인터류킨 6 (IL-6)을 포함하는 확장 배지를 포함하는 조건 하에서 배양될 수 있다. 세포는 약 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25일 또는 필요한 임의의 범위 동안 확장될 수 있다. 일부 실시양태에서, HSC는 대상체 (또는 공여자)로부터 수득된 샘플로부터 원하는 세포 집단 (예를 들어, CD34⁺/CD33⁻)의 단리 후 및 조작 (예를 들어, 유전자 조작, 차단제와의 접촉) 전에 확장된다. 일부 실시양태에서, HSC는 유전자 조작 후에 확장됨으로써, 유전자 변형이 진행되었고, 세포독성제와 결합하는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프가 결여되는 (예를 들어, 에피토프의 적어도 일부분의 결실 또는 치환을 갖는) 세포를 선택적으로 확장시킨다. 일부 실

시양태에서, 유전자 변형 후 원하는 특징 (예를 들어, 표현형 또는 유전자형)을 갖는 세포 ("클론") 또는 몇 가지 세포가 선택되고 독립적으로 확장될 수 있다. 일부 실시양태에서, HSC는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프와 결합하는 차단제와 HSC를 접촉시키기 전에 확장됨으로써, 차단제에 의한 상응하는 에피토프의 차단으로 인해 세포독성제에 의해 결합될 수 없는 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 HSC 집단이 제공된다.

[0139] 본원에 기재된 바와 같이, 조혈 세포 또는 그의 자손은 세포독성제에 의해 표적화된 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하지만, 세포독성제가 계통 특이적 세포 표면 단백질과 결합하지 않도록 또는 감소된 결합을 갖도록 조작된다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "조작된"은 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프가 부재하고/하거나, 돌연변이되고/되거나, 세포독성제에 의한 결합을 위해 이용 가능하지 않게 하는 유전자 조작 (즉, 유전적 조작) 또는 임의의 다른 형태의 조작 또는 변형을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포는 이러한 조혈 세포를 항원 결합 단편을 포함하는 차단제와 접촉시킴으로써 조작되며, 이는 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프가 세포독성제에 의해 결합되는 것을 차단한다. 조혈 세포는, 예를 들어 조직 배양에서 차단제와 세포를 함께 인큐베이션함으로써 생체 외에서 차단제와 접촉될 수 있다. 또 다른 한편으로 또는 또한, 조혈 세포는 생체 내에서 차단제와 접촉될 수 있으며, 예를 들어, 차단제는 조혈 세포와 동반하여 대상체에게 공동 투여된다.

[0140] 일부 실시양태에서, 조혈 세포는 세포독성제 (그의 항원 결합 단편)와 결합하는 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프가 결여되도록 유전자 조작된다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포는 본원에 기재된 세포 표면 계통 특이적 단백질 변이체 중 임의의 것을 발현하도록 유전자 조작되며, 여기서 세포독성제 결합을 위한 에피토프는 돌연변이되거나 결실된다. 또 다른 실시양태에서, 2개 이상의 에피토프는, 2개 이상의 세포독성제 또는 면역조정제가 세포 사멸이 요망되는 세포를 표적으로 할 수 있도록 유전자 조작된다. 본원에 사용된 바와 같이, 조혈 세포 상에 존재하는 계통 특이적 세포 표면 단백질을 포함한 조작된 조혈 세포는, 세포독성제가 조혈 세포와 접촉할 때 유의미한 반응이 유도되지 않도록 조작된 계통 특이적 세포 표면 단백질에 대한 세포독성제의 결합 (예측된 결합 포함)의 실질적인 감소 (또는 부재)가 존재하는 경우에 세포독성제와 결합하지 않는 것으로 간주된다. 일부 예에서, 세포독성제는 조혈 세포 상에 발현된 계통 특이적 단백질 변이체와 전혀 결합하지 않는데, 즉 관련 기술분야에서 공지된 바와 같이 블랭크 또는 음성 대조군과 비교 시 통상적인 검정 방법에 의해 기본 수준 결합 만이 검출될 수 있다.

[0141] 일부 실시양태에서, 세포독성제와 결합하는 에피토프는 계통 특이적 세포 표면 단백질에 존재하지 않는다 (즉, 에피토프 또는 에피토프의 적어도 일부분이 결실되었다). 일부 실시양태에서, 세포독성제와 결합하는 에피토프는, 이러한 에피토프가 더 이상 존재하지 않고/않거나 에피토프가 세포독성제에 의해 더 이상 인식되지 않도록 돌연변이시켰다 (예를 들어, 에피토프의 적어도 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과와 잔기). 단백질의 에피토프에 대한 세포독성제의 결합은 관련 기술분야에 공지된 임의의 수단에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프의 존재는 이러한 에피토프를 항원 특이적 항체로 검출함으로써 평가될 수 있다 (예를 들어, 유동 세포계수법 방법, 웨스턴 블롯팅).

[0142] 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프가 결여된, 유전자 조작되는 조혈 세포, 예컨대 HSC 중 임의의 것은 일상적인 방법 또는 본원에 기재된 방법에 의해 제조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 조작은 게놈 편집을 사용하여 수행된다. 본원에 사용된 바와 같은, "게놈 편집"은 표적 유전자의 발현을 녹아웃시키기 위해 유기체의 임의의 단백질-코딩 또는 비-코딩 뉴클레오타이드 서열을 포함한 게놈을 변형시키는 방법을 지칭한다. 일반적으로, 게놈 편집 방법은 게놈의 핵산을, 예를 들어 표적화된 뉴클레오타이드 서열에서 절단할 수 있는 엔도뉴클레아제의 사용을 포함한다. 게놈 내의 이중 가닥 절단물의 복구는 돌연변이를 도입하여 복구될 수 있고/있거나 외인성 핵산이 표적화된 부위 내로 삽입될 수 있다.

[0143] 게놈 편집 방법은 일반적으로, 표적 핵산 내의 이중 가닥 절단물을 생성하는 것에 관여하는 엔도뉴클레아제의 유형에 근거하여 분류된다. 이들 방법은 징크 핑거 뉴클레아제 (ZFN), 전사 활성화제-유사 이펙터-기반 뉴클레아제 (TALEN), 메가뉴클레아제 및 CRISPR/Cas 시스템의 사용을 포함한다.

[0144] 본 개시내용의 한 측면에서, 세포가 세포독성제와 결합하지 않도록 조작시킨 정상 세포를 사용하여, 암 세포를 변형된 정상 세포 집단으로 대체하는 것이 수행된다. 이러한 변형은 CRISPR-Cas9 시스템을 사용하는 계통 특이적 단백질의 에피토프의 결실 또는 돌연변이를 포함할 수 있으며, 여기서 클러스터링된 규칙적으로 공간을 둔 짧은 팔린드롬성 반복 서열 (CRISPR)-Cas9 시스템은 조작된 비-자연적으로 발생하는 CRISPR-Cas9 시스템이다.

[0145] 본 개시내용은 계통 특이적 단백질 폴리뉴클레오타이드 내의 표적 서열과 혼성화하는 CRISPR/Cas9 시스템을 활용하며, 여기서 CRISPR/Cas9 시스템은 Cas9 뉴클레아제 및 조작된 crRNA/tracrRNA (또는 단일 가이드 RNA)를 포함한다. CRISPR/Cas9 복합체는 계통 특이적 단백질 폴리뉴클레오타이드와 결합하여 단백질 폴리뉴클레오타이드의

절단을 허용함으로써, 폴리뉴클레오티드를 변형시킬 수 있다.

- [0146] 본 개시내용의 CRISPR/Cas 시스템은 유전자 내에서 또는 그 근처에 있는 코딩 또는 비-코딩 영역, 예컨대, 예를 들어, 리더 서열, 트레일러 서열 또는 인트론, 또는 코딩 영역의 상류 또는 하류의 비-전사된 영역 내에서 세포 표면 계통 특이적 단백질 내의 관심 영역과 결합하고/하거나 이를 절단할 수 있다. 본 개시내용에 사용된 가이드 RNA (gRNA)는 gRNA가 게놈 내의 미리 결정된 절단 부위 (표적 부위)에 대한 Cas9-gRNA 복합체의 결합을 지시하도록 설계될 수 있다. 절단 부위는 공지되지 않은 서열의 영역, 또는 SNP, 뉴클레오티드 삽입, 뉴클레오티드 결실, 재배열 등을 함유하는 영역을 함유하는 단편을 방출하도록 선택될 수 있다.
- [0147] 유전자 영역의 절단은 Cas 효소에 의해 표적 서열의 위치에서 1개 또는 2개의 가닥을 절단하는 것을 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 이러한 절단은 표적 유전자의 전사를 감소시킬 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 절단은 외인성 주형 폴리뉴클레오티드와의 상동 재조합에 의해 절단된 표적 폴리뉴클레오티드를 복구하는 것을 추가로 포함할 수 있으며, 여기서 복구는 표적 폴리뉴클레오티드의 하나 이상의 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환을 초래한다.
- [0148] 용어 "gRNA", "가이드 RNA" 및 "CRISPR 가이드 서열"은 전체에 걸쳐 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, CRISPR/Cas 시스템의 Cas DNA 결합 단백질의 특이성을 결정하는 서열을 포함하는 핵산을 지칭한다. gRNA는 숙주 세포의 게놈에서 표적 핵산 서열과 (부분적으로 또는 완전히 상보적으로) 혼성화한다. 표적 핵산과 혼성화하는 gRNA 또는 그의 일부분은 15 내지 25개의 뉴클레오티드, 18 내지 22개의 뉴클레오티드, 또는 19 내지 21개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산과 혼성화하는 gRNA 서열은 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개의 뉴클레오티드 길이이다. 일부 실시양태에서, 표적 핵산과 혼성화하는 gRNA 서열은 10 내지 30개 또는 15 내지 25개의 뉴클레오티드 길이이다.
- [0149] 일부 실시양태에서, 표적 핵산과 결합하는 서열 외에, gRNA는 또한 스캐폴드 서열을 포함한다. 표적 핵산에 상보적인 서열과 스캐폴드 서열 둘 다를 코딩하는 gRNA의 발현은 표적 핵산과 결합하는 것 (혼성화)과 표적 핵산에 엔도뉴클레아제를 동원하는 이중 기능을 가지며, 이는 부위 특이적 CRISPR 활성을 초래할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 키메라 gRNA는 단일 가이드 RNA (sgRNA)로서 지칭될 수 있다.
- [0150] 본원에 사용된 바와 같은, tracrRNA로서 지칭되기도 하는 "스캐폴드 서열"은 상보적 gRNA 서열과 결합된 (혼성화된) 표적 핵산에 Cas 엔도뉴클레아제를 동원하는 핵산 서열을 지칭한다. 적어도 하나의 줄기 루프 구조를 포함하고 엔도뉴클레아제를 동원하는 임의의 스캐폴드 서열이 본원에 기재된 유전자 요소 및 벡터에 사용될 수 있다. 예시적인 스캐폴드 서열은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이고, 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 찾을 수 있다.
- [0151] 일부 실시양태에서, gRNA 서열은 스캐폴드 서열을 포함하지 않으며 스캐폴드 서열은 별도의 전사체로서 발현된다. 이러한 실시양태에서, gRNA 서열은 스캐폴드 서열의 일부분에 상보적이고, 스캐폴드 서열과 결합 (혼성화)하고 엔도뉴클레아제를 표적 핵산으로 동원하는 기능을 하는 부가의 서열을 추가로 포함한다.
- [0152] 일부 실시양태에서, gRNA 서열은 표적 핵산에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 적어도 100% 상보적이다 (또한, 표적 폴리뉴클레오티드 서열과 gRNA 서열의 상보성을 교시하기 위해 참조로 포함된 미국 특허 8,697,359 참조). CRISPR 가이드 서열과 표적 핵산의 3' 말단 근처의 표적 핵산 간의 불일치는 뉴클레아제 절단 활성을 폐지시킬 수 있는 것으로 입증되었다 (Upadhyay, et al. *Genes Genome Genetics* (2013) 3(12):2233-2238). 일부 실시양태에서, gRNA 서열은 표적 핵산의 3' 말단 (예를 들어, 표적 핵산의 3' 말단의 마지막 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 뉴클레오티드)에 대해 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 적어도 100% 상보적이다.
- [0153] CD19의 인트론 1 및 2를 표적으로 하는 예시적인 sgRNA 서열이 표 3에 제공된다. CD33의 인트론 1 및 2를 표적으로 하는 예시적인 sgRNA 서열이 표 4에 제공된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, sgRNA 서열의 선택은 예측된 온 타겟(on-target) 및/또는 오프 타겟(off-target) 결합 부위의 수와 같은 요인에 좌우될 수 있다. 일부 실시양태에서, sgRNA 서열은 잠재적인 온 타겟 부위를 최대화하고 잠재적인 오프 타겟 부위를 최소화하도록 선택된다.
- [0154] 표적 핵산은 엔도뉴클레아제와 상호 작용할 수 있고 엔도뉴클레아제 활성이 표적 핵산을 표적으로 하는데 추가로 관여할 수 있는 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM)에 의해 3' 측면 상에 플랭킹된다. 표적 핵산을 플랭킹하는 PAM 서열은 엔도뉴클레아제, 및 이러한 엔도뉴클레아제가 유래되는 공급원에 의존하는 것으로 일반적으로 생

각된다. 예를 들어, 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터 유래되는 Cas9 엔도뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 NGG이다. 스탕필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)로부터 유래된 Cas9 엔도뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 NNGRRT이다. 네이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)로부터 유래되는 Cas9 엔도뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 NNNNGATT이다. 스트렙토코쿠스 써모필루스(*Streptococcus thermophilus*)로부터 유래된 Cas9 엔도뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 NNAGAA이다. 트레포네마 덴티콜라(*Treponema denticola*)로부터 유래된 Cas9 엔도뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 NAAAAC이다. Cpf1 뉴클레아제의 경우, PAM 서열은 TTN이다.

[0155] 일부 실시양태에서, 세포를 유전자 조작하는 것은 또한, Cas 엔도뉴클레아제를 세포 내로 도입하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, Cas 엔도뉴클레아제 및 gRNA를 코딩하는 핵산은 동일한 핵산 (예를 들어, 벡터) 상에 제공된다. 일부 실시양태에서, Cas 엔도뉴클레아제 및 gRNA를 코딩하는 핵산은 상이한 핵산 (예를 들어, 상이한 벡터) 상에 제공된다. 또 다른 한편으로 또는 또한, Cas 엔도뉴클레아제는 단백질 형태로 세포 내로 제공되거나 또는 도입될 수 있다.

[0156] 일부 실시양태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 Cas9 효소 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, Cas9 엔도뉴클레아제는 스트렙토코쿠스 피오게네스, 스탕필로코쿠스 아우레우스, 네이세리아 메닝기티디스, 스트렙토코쿠스 써모필루스, 또는 트레포네마 덴티콜라로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, Cas 엔도뉴클레아제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 숙주 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제는 Cas9 상동체 또는 오르소로그(ortholog)이다.

[0157] 일부 실시양태에서, Cas9 엔도뉴클레아제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 단백질의 활성을 변경시키기 위해 추가로 변형된다. 일부 실시양태에서, Cas9 엔도뉴클레아제는 촉매적으로 불활성인 Cas9이다. 예를 들어, dCas9는 촉매적으로 활성인 잔기 (D10 및 H840)의 돌연변이를 함유하고 뉴클레아제 활성을 갖지 않는다. 또 다른 한편으로 또는 또한, Cas9 엔도뉴클레아제는 또 다른 단백질 또는 그의 일부분에 융합될 수 있다. 일부 실시양태에서, dCas9는 억제인자 도메인, 예컨대 KRAB 도메인에 융합된다. 일부 실시양태에서, 이러한 dCas9 융합 단백질은 다중화된 유전자 억제 (예를 들어, CRISPR 간섭 (CRISPRi))를 위해 본원에 기재된 구축물과 함께 사용된다. 일부 실시양태에서, dCas9는 활성인자 도메인, 예컨대 VP64 또는 VPR에 융합된다. 일부 실시양태에서, 이러한 dCas9 융합 단백질은 유전자 활성화 (예를 들어, CRISPR 활성화 (CRISPRa))를 위해 본원에 기재된 구축물과 함께 사용된다. 일부 실시양태에서, dCas9는 후성적 조정 도메인, 예컨대 히스톤 데메틸라제 도메인 또는 히스톤 아세틸트랜스퍼라제 도메인에 융합된다. 일부 실시양태에서, dCas9는 LSD1 또는 p300, 또는 그의 일부분에 융합된다. 일부 실시양태에서, dCas9 융합은 CRISPR-기반 후성적 조정을 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, dCas9 또는 Cas9는 FokI 뉴클레아제 도메인에 융합된다. 일부 실시양태에서, FokI 뉴클레아제 도메인에 융합된 Cas9 또는 dCas9는 게놈 편집을 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, Cas9 또는 dCas9는 형광 단백질 (예를 들어, GFP, RFP, mCherry 등)에 융합된다. 일부 실시양태에서, 형광 단백질에 융합된 Cas9/dCas9 단백질은 게놈 유전자좌의 표지화 및/또는 시각화를 위해, 또는 Cas 엔도뉴클레아제를 발현하는 세포를 확인하기 위해 사용된다.

[0158] 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제는 염기 편집기이다. 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제는 우라실 글리코실라제 억제제 (UGI) 도메인에 융합된 dCas9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 엔도뉴클레아제는 아데닌 염기 편집기 (ABE), 예를 들어 RNA 아데닌 데아미나제 TadA로부터 진화된 ABE에 융합된 dCas9를 포함한다.

[0159] 또 다른 한편으로 또는 또한, Cas 엔도뉴클레아제는 Cpf1 뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 프로베텔라 종(*Provetella spp.*) 또는 프란시셀라 종(*Francisella spp.*)으로부터 유래된 Cpf1 뉴클레아제를 발현한다. 일부 실시양태에서, Cpf1 뉴클레아제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 숙주 세포에서 발현하기 위해 코돈 최적화될 수 있다.

[0160] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 조혈 세포에서 세포 표면 계통 특이적 단백질을 억제하기 위한 조성물 및 방법을 제공하며, 여기서 가이드 RNA 서열이 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프를 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 혼성화한다. 일부 실시양태에서, 가이드 RNA 서열은 계통 특이적 세포 표면 단백질의 엑손을 코딩하는 뉴클레오티드 서열과 혼성화한다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질은 CD33 또는 CD19이고, gRNA는 CD33 또는 CD19의 에피토프를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 일부분과 혼성화한다.

[0161] 일부 실시양태에서, 이식편 대 숙주 효과를 감소시키기 위해 HSC, 특히 동종이계 HSC를 추가로 유전자 조작하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 재발된 AML에 대한 표준 요법은 조혈 줄기 세포 이식 (HSCT)이다.

그러나, 성공적인 HSCT에 대한 제한 요인 중 적어도 하나는 세포 표면 분자 CD45의 발현과 관련된 이식편 대 숙주 질환 (GVHD)이다 (예를 들어, 문헌 [Van Besie, *Hematology Am. Soc. Hematol Educ Program* (2013)56; Mawad *Curr. Hematol. Malig. Rep.* (2013) 8(2):132] 참조). CD45RA 및 CD45RO는 CD45의 이소형이다 (적혈구를 제외한 모든 조혈 세포에서 발견됨). T 림프구에서, CD45RA는 나이브(naive) 세포 상에서 발현되는 반면, CD45RO는 기억 세포 상에서 발현된다. CD45RA T 세포는 HSCT 후 수여자 특이적 단백질에 대한 높은 반응성에 대한 높은 잠재력을 가지므로, GVHD를 초래한다. CD45-보유 세포가 생존을 위해 요구되기 때문에, CD45는 유형 1 계통 단백질이지만, CD45의 항원성 부분은 GvHD의 발생률 또는 정도를 방지 및/또는 감소시키기 위해 CRISPR을 사용하여 줄기 세포로부터 결실될 수 있다.

[0162] 세포를 제공하는 단계; 및 계능 편집을 위해 CRISPR Cas 시스템의 성분을 상기 세포 내로 도입하는 단계를 포함하는, 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프가 결여된 세포를 생산하는 방법이 또한 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 계통 특이적 세포 표면 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 일부분에 혼성화되거나 또는 혼성화될 것으로 예상되는 CRISPR-Cas 가이드 RNA (gRNA)를 포함하는 핵산이 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, gRNA는 벡터 상에서 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, Cas 엔도뉴클레아제가 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 Cas 엔도뉴클레아제를 코딩하는 핵산으로서 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, gRNA; 및 Cas 엔도뉴클레아제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 동일한 핵산 (예를 들어, 동일한 벡터) 상에서 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, Cas 엔도뉴클레아제는 단백질의 형태로 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, Cas 엔도뉴클레아제 및 gRNA는 시험관 내에서 미리 형성되고 리보핵 단백질 복합체로서 세포에 도입된다.

[0163] 본 개시내용의 벡터는 포유 동물 발현 벡터를 사용하여 포유 동물 세포에서 하나 이상의 서열의 발현을 구동시킬 수 있다. 포유 동물 발현 벡터의 예는 pCDM8 (문헌 [Seed, *Nature* (1987) 329: 840]) 및 pMT2PC (문헌 [Kaufman, et al., *EMBO J.* (1987) 6: 187])를 포함한다. 포유 동물 세포에서 사용될 때, 발현 벡터의 제어 기능은 전형적으로, 하나 이상의 조절 요소에 의해 제공된다. 예를 들어, 통상적으로 사용되는 프로모터는 폴리오마, 아데노바이러스 2, 시토크로마 바이러스, 원숭이 바이러스 40, 및 본원에 개시되고 관련 기술분야에 공지된 다른 것으로부터 유래된다. 원핵 세포와 진핵 세포 둘 다에 대한 다른 적합한 발현 시스템에 관하여, 예를 들어, 문헌 [Chapters 16 and 17 of Sambrook, et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*. 2nd eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989]을 참조할 수 있다.

[0164] 본 개시내용의 벡터는 특별한 세포 유형에서 핵산의 발현을 우선적으로 지시할 수 있다 (예를 들어, 조직 특이적 조절 요소가 핵산을 발현시키기 위해 사용된다). 이러한 조절 요소는 조직 특이적이거나 또는 세포 특이적일 수 있는 프로모터를 포함한다. 프로모터에 적용되는 바와 같은 용어 "조직 특이적"은 상이한 유형의 조직에서 동일한 관심 뉴클레오티드 서열의 발현의 상대적 부재 하에 특이적 유형의 조직 (예를 들어, 종자)에 관심 뉴클레오티드 서열의 선택적 발현을 지시할 수 있는 프로모터를 지칭한다. 프로모터에 적용되는 바와 같은 용어 "세포 유형 특이적"은 동일한 조직 내의 상이한 유형의 세포에서 동일한 관심 뉴클레오티드 서열의 발현의 상대적 부재 하에 특이적 유형의 세포 내에서 관심 뉴클레오티드 서열의 선택적 발현을 지시할 수 있는 프로모터를 지칭한다. 프로모터에 적용될 때 용어 "세포 유형 특이적"은 또한, 단일 조직 내의 영역에서 관심 뉴클레오티드 서열의 선택적 발현을 촉진할 수 있는 프로모터를 의미한다. 프로모터의 세포 유형 특이성은 관련 기술분야에 널리 공지된 방법, 예를 들어, 면역조직화학 염색을 사용하여 평가될 수 있다.

[0165] 포유 동물 세포 또는 표적 조직에서 CRISPR/Cas9를 코딩하는 핵산을 도입하기 위해 통상적인 바이러스 및 비-바이러스 기반 유전자 전달 방법이 사용될 수 있다. 이러한 방법은 CRISPR-Cas 시스템의 성분을 코딩하는 핵산을 배양 중인 세포 또는 숙주 유기체 내의 세포에 투여하는데 사용될 수 있다. 비-바이러스 벡터 전달 시스템은 DNA 플라스미드, RNA (예를 들어, 본원에 기재된 벡터의 전사체), 있는 그대로의 핵산, 및 전달 비히클과 복합체를 형성한 핵산을 포함한다. 바이러스 벡터 전달 시스템은 세포로 전달된 후 에피솜 또는 통합된 계능을 갖는 DNA 및 RNA 바이러스를 포함한다.

[0166] 바이러스 벡터는 환자에게 직접 투여될 수 있거나 (생체 내) 또는 시험관 내 또는 생체 외에서 세포를 조작하는데 사용될 수 있으며, 여기서 변형된 세포가 환자에게 투여될 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 유전자 전이를 위해 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노 관련 및 단순 포진 바이러스 벡터를 포함하나 이에 제한되지는 않는 바이러스 기반 시스템을 활용한다. 더욱이, 본 개시내용은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스와 같은 숙주 계능에 통합될 수 있는 벡터를 제공한다. 바람직하게, 본 개시내용의 CRISPR-Cas 시

시스템의 발현을 위해 사용된 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

- [0167] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 CRISPR-Cas를 코딩하는 하나 이상의 벡터를 진핵 세포 내로 도입하는 것을 제공한다. 세포는 암 세포일 수 있다. 또 다른 한편으로, 세포는 조혈 세포, 예컨대 조혈 줄기 세포이다. 줄기 세포의 예는 다능성, 다분화능 및 단분화능 줄기 세포를 포함한다. 다능성 줄기 세포의 예는 배아 줄기 세포, 배아 생식 세포, 배아 암종 세포 및 유도 다능성 줄기 세포 (iPSC)를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 본 개시내용은 CRISPR-Cas9를 조혈 줄기 세포 내로 도입하는 것을 제공한다.
- [0168] 본 개시내용의 벡터는 대상체에서 진핵 세포로 전달된다. CRISPR/Cas9 시스템을 통한 진핵 세포의 변형은 세포 배양에서 일어날 수 있으며, 이러한 방법은 변형 전에 진핵 세포를 대상체로부터 분리하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 상기 진핵 세포 및/또는 그로부터 유래된 세포를 대상체로 돌려 보내는 것을 추가로 포함한다.
- [0169] **치료 방법 및 조합 요법**
- [0170] 본원에 기재된 바와 같이, 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프와 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 세포독성제는, 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하지만 세포가 상기 세포독성제와 결합하지 않도록 조작된 조혈 세포와 조합하여 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0171] 따라서, 본 개시내용은 조혈 악성종양을 치료하는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 상기 치료를 필요로 하는 대상체에게, (i) 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 세포를 표적으로 하는 세포독성제의 유효량; 및 (ii) 조혈 세포 또는 그의 자손이 상기 세포독성제와 결합하지 않도록 또는 세포독성제에 대한 감소된 결합을 갖도록 조혈 세포를 조작시킨, 조혈 세포 집단을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조혈 악성종양을 치료하는 방법은 이러한 치료를 필요로 하는 대상체에게, (i) 계통 특이적 세포 표면 단백질을 발현하는 세포를 표적으로 하는 세포독성제의 유효량으로, 여기서 세포독성제가 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프와 특이적으로 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 것; 및 (ii) 조혈 세포 또는 그의 자손이 상기 세포독성제와 결합하지 않도록 또는 세포독성제에 대한 감소된 결합을 갖도록 조혈 세포를 조작시킨, 조혈 세포 집단을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포 또는 그의 자손 상에 발현된 계통 특이적 세포 표면 단백질에, 세포독성제와 결합하는 에피토프가 결합되도록 조혈 세포는 유전자 조작된다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포 또는 그의 자손 상에 발현된 계통 특이적 세포 표면 단백질이, 세포독성제와 결합할 수 없는 (또는 세포독성제에 대한 감소된 결합을 갖는) 돌연변이된 또는 변이체 에피토프를 갖도록 조혈 세포는 유전자 조작된다. 일부 실시양태에서, 계통 특이적 세포 표면의 에피토프는 비-필수이다.
- [0172] 본원에 사용된 바와 같은, "대상체", "개체" 및 "환자"는 상호 교환적으로 사용되며, 척추 동물, 바람직하게 포유 동물, 예컨대 인간을 지칭한다. 포유 동물은 인간 영장류, 비-인간 영장류, 또는 무린, 소, 말, 개 또는 고양이 종을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자이다.
- [0173] 일부 실시양태에서, 세포독성제 및/또는 조혈 세포는 제약상 허용되는 담체와 혼합되어 제약 조성물을 형성할 수 있으며, 이는 또한 본 개시내용의 범위 내에 있다.
- [0174] 본원에 기재된 방법을 수행하기 위해, 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프와 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 세포독성제의 유효량 및 조혈 세포의 유효량을, 치료를 필요로 하는 대상체에게 공동 투여할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "유효량"은 용어 "치료상 유효량"과 상호 교환적으로 사용될 수 있으며, 이를 필요로 하는 대상체에게 투여 시 원하는 활성을 초래하기에 충분한 세포독성제, 세포 집단 또는 제약 조성물 (예를 들어, 세포독성제 및/또는 조혈 세포를 포함하는 조성물)의 양을 지칭한다. 본 개시내용의 맥락에서, 용어 "유효량"은 본 개시내용의 방법에 의해 치료되는 장애의 적어도 하나의 증상의 징후를 지연시키거나, 그의 진행을 정지시키거나, 구제하거나 또는 경감시키기에 충분한 화합물, 세포 집단, 또는 제약 조성물의 양을 지칭한다. 활성 성분의 조합물이 투여될 때, 그 조합물의 유효량은 개별적으로 투여되는 경우에 유효하였던 각각의 성분의 양을 포함하거나 또는 포함하지 않을 수 있다는 것에 유의해야 한다.
- [0175] 유효량은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인식된 바와 같이, 치료되는 특별한 병태; 병태의 중증도; 연령, 신체 상태, 크기, 성별 및 체중을 포함한 개별 환자 파라미터; 치료 지속 기간; 공동 요법 (존재하는 경우)의 성질; 구체적 투여 경로; 및 보건 종사자의 지식 및 전문 지식 내의 유사 요인에 따라서 다양하다. 일부 실시양태에서, 유효량은 대상체에서 임의의 질환 또는 장애를 경감시키거나, 구제하거나, 완화시키거나, 개선시키거나, 증상을 감소시키거나, 또는 그의 진행을 지연시킨다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부

실시양태에서, 대상체는 조혈 악성종양을 갖는 인간 환자이다.

- [0176] 본원에 기재된 바와 같이, 조혈 세포 및/또는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포는 대상체에 대해 자가일 수 있으며, 즉 세포는 치료를 필요로 하는 대상체로부터 획득되고, 세포독성제와 결합하지 않도록 조작된 다음, 동일한 대상체에게 투여된다. 자가 세포를 대상체에게 투여하면, 비-자가 세포의 투여와 비교 시 숙주 세포의 거부를 감소시킬 수 있다. 또 다른 한편으로, 숙주 세포는 동종이계 세포, 즉 세포는 제1 대상체로부터 획득되고, 세포독성제와 결합하지 않도록 조작된 다음, 제1 대상체와는 상이하지만 동일한 종의 제2 대상체에게 투여된다. 예를 들어, 동종이계 면역 세포는 인간 공여자로부터 유래될 수 있고, 이러한 공여자와 상이한 인간 수용자에게 투여될 수 있다.
- [0177] 일부 실시양태에서, 면역 세포 및/또는 조혈 세포는 동종이계 세포이고, 이식편 대 숙주 질환을 저하시키도록 추가로 유전자 조작시켰다. 예를 들어, 본원에 기재된 바와 같이, 조혈 줄기 세포는 CD45RA의 발현을 감소시키도록 유전자 조작될 수 있다 (예를 들어, 게놈 편집을 사용함).
- [0178] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 키메라 수용체 중 임의의 것을 발현하는 면역 세포는 표적 세포 (예를 들어, 암 세포)의 수를 적어도 20%, 예를 들어, 50%, 80%, 100%, 2배, 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 또는 그 초과만큼 감소시키는 데 유효한 양으로 대상체에게 투여된다.
- [0179] 포유 동물 (예를 들어, 인간)에게 투여되는 세포, 즉 면역 세포 또는 조혈 세포의 전형적인 양은, 예를 들어, 약 10^6 내지 10^{11} 개 세포의 범위일 수 있다. 일부 실시양태에서 10^6 개 미만 세포를 대상체에게 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시양태에서, 10^{11} 개 초과 세포를 대상체에게 투여하는 것이 바람직할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포의 하나 이상의 용량은 약 10^6 개 세포 내지 약 10^{11} 개 세포, 약 10^7 개 세포 내지 약 10^{10} 개 세포, 약 10^8 개 세포 내지 약 10^9 개 세포, 약 10^6 개 세포 내지 약 10^8 개 세포, 약 10^7 개 세포 내지 약 10^9 개 세포, 약 10^7 개 세포 내지 약 10^{10} 개 세포, 약 10^7 개 세포 내지 약 10^{11} 개 세포, 약 10^8 개 세포 내지 약 10^{10} 개 세포, 약 10^8 개 세포 내지 약 10^{11} 개 세포, 약 10^9 개 세포 내지 약 10^{10} 개 세포, 약 10^9 개 세포 내지 약 10^{11} 개 세포, 또는 약 10^{10} 개 세포 내지 약 10^{11} 개 세포를 포함한다.
- [0180] 일부 실시양태에서, 대상체는 세포독성제 및/또는 조혈 세포의 투여 전에 사전 컨디셔닝된다. 일부 실시양태에서, 상기 방법은 대상체를 사전 컨디셔닝시키는 것을 추가로 포함한다. 일반적으로, 대상체를 사전 컨디셔닝시키는 것은 환자가 하나 이상의 요법, 예컨대 화학요법 또는 다른 유형의 요법, 예컨대 방사선 조사를 받는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 사전 컨디셔닝은 하나 이상의 후속 요법 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 표적화된 요법)의 환자의 내성을 유도하거나 또는 증강시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 사전 컨디셔닝은 하나 이상의 화학요법제를 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 화학요법제의 비-제한적 예는 악티노마이신, 아자티딘, 아자티오프린, 블레오마이신, 보르테조미, 카르보플라틴, 카페시타빈, 시스플라틴, 클로람부실, 시클로포스파미드, 시타라빈, 다우노루비신, 도세탁셀, 독시플루리딘, 독소루비신, 에피루비신, 에포틸론, 에토포시드, 플루다라빈, 플루오로우라실, 젬시타빈, 히드록시우레아, 이다루비신, 이마티닙, 이리노테칸, 메클로르에타민, 메르캅토프린, 메토트렉세이트, 미톡산트론, 옥살리플라틴, 파클리탁셀, 페메트렉세드, 테니포시드, 티오구아닌, 토포테칸, 발루비신, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 및 비노렐빈을 포함한다.
- [0181] 일부 실시양태에서, 대상체는 세포독성제 및/또는 조혈 세포를 투여하기 전 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월 또는 적어도 6개월에 사전 컨디셔닝된다.
- [0182] 다른 실시양태에서, 화학요법(들) 또는 다른 요법(들)은 세포독성제 및 조작된 조혈 세포와 공동으로 투여된다. 다른 실시양태에서, 화학요법(들) 또는 다른 요법(들)은 세포독성제 및 조작된 조혈 세포의 투여 후에 투여된다.
- [0183] 한 실시양태에서, 키메라 수용체 (예를 들어, 키메라 수용체를 코딩하는 핵산)는 면역 세포 내로 도입되고, 대상체 (예를 들어, 인간 환자)는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포의 초기 투여 또는 용량을 받는다. 세포독성제 (예를 들어, 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포)의 하나 이상의 후속 투여는 이전의 투여 후 15일, 14일, 13일, 12일, 11일, 10일, 9일, 8일, 7일, 6일, 5일, 4일, 3일 또는 2일의 간격으로 환자에게 제공될 수 있다. 세포독성제의 1회 초과 용량이 매주 대상체에게 투여될 수 있으며, 예를 들어, 상기 작용제를 2회, 3회, 4회 또는 그 초과로 투여할 수 있다. 대상체에는 1주에 1회 초과의 용량의 세포독성제 (예를 들어, 키메라

수용체를 발현하는 면역 세포)가 투여될 수 있고, 그 다음 1주 동안에는 상기 작용제가 투여되지 않으며, 최종적으로 1회 이상의 부가 용량의 세포독성제가 투여될 수 있다 (예를 들어, 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포가 1주에 1회 초과 투여된다). 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포는 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주 또는 그 초과 동안 1주에 3회 격일로 투여될 수 있다.

[0184] 본원에 기재된 방법 중 임의의 것은 대상체에서 혈액 악성종양의 치료를 위한 것일 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "치료하다", "치료하는" 및 "치료"는 질환 또는 장애와 연관된 적어도 하나의 증상을 구제 또는 경감시키거나, 또는 질환 또는 장애의 진행을 느리게 하거나 또는 역전시키는 것을 의미한다. 본 개시내용의 의미 내에서, 용어 "치료하다"는 또한, 질환을 저지하고/하거나, 그의 발병 (즉, 질환의 임상 징후 이전의 기간)을 지연시키고/시키거나 질환이 발생하거나 또는 악화될 위험을 감소시키는 것을 의미한다. 예를 들어, 암과 관련하여, 용어 "치료하다"는 암 세포의 수 또는 복제를 제거 또는 감소시키고/시키거나 전이를 예방, 지연 또는 억제하는 것 등을 의미할 수 있다.

[0185] 일부 실시양태에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프와 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 세포독성제; 및 세포 표면 계통 특이적 단백질을 발현하지만 이들이 세포독성제와 결합하지 않도록 조작시킨 결핍성 조혈 세포 집단이 대상체에게 투여된다. 따라서, 이러한 치료 방법에서, 세포독성제는 표적화된 사멸을 위해 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프를 발현하는 표적 세포를 인식 (결합)한다. 상기 단백질을 발현하지만 세포독성제와 결합하지 않는 (예를 들어, 상기 단백질의 에피토프가 결여되기 때문이다) 조혈 세포는 상기 세포독성제에 의해 표적화되는 세포 유형의 재증식을 허용한다. 일부 실시양태에서, 환자의 치료는 하기 단계: (1) 치료상 유효량의 세포독성제를 환자에게 투여하는 단계; 및 (2) 자가 또는 동종이계인 조혈 줄기 세포를 환자에게 주입 또는 재주입하는 단계이며, 여기서 조혈 세포는 그들이 세포독성제와 결합하지 않도록 조작된 것인 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 환자의 치료는 하기 단계: (1) 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포의 치료상 유효량을 환자에게 투여하는 단계이며, 여기서 면역 세포는 세포 표면 계통 특이적, 질환 관련 단백질의 에피토프와 결합하는 키메라 수용체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것인 단계; 및 (2) 자가 또는 동종이계인 조혈 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 세포)를 환자에게 주입 또는 재주입하는 단계이며, 여기서 조혈 세포는 그들이 세포독성제와 결합하지 않도록 조작된 것인 단계를 포함할 수 있다.

[0186] 세포 표면 계통 특이적 단백질과 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 작용제; 및 세포 표면 계통 특이적 단백질에 있어서 결핍성인 조혈 세포 집단을 사용하는 치료 방법의 효능은 관련 기술분야에 공지된 임의의 방법에 의해 평가될 수 있고, 숙련된 의료 전문가에게 명백할 것이다. 예를 들어, 요법의 효능은 대상체의 생존 또는 대상체 또는 그의 조직 또는 샘플에서의 암 부담에 의해 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 요법의 효능은 세포의 특별한 집단 또는 계통에 속하는 세포의 수를 정량화함으로써 평가된다. 일부 실시양태에서, 요법의 효능은 세포 표면 계통 특이적 단백질을 제시하는 세포의 수를 정량화함으로써 평가된다.

[0187] 일부 실시양태에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프와 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 세포독성제 및 조혈 세포 집단은 동반하여 투여된다.

[0188] 일부 실시양태에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프와 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 세포독성제 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포)는 조혈 세포의 투여 전에 투여된다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프와 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 세포독성제 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포)는 조혈 세포의 투여 전 적어도 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 또는 그 초과에 투여된다.

[0189] 일부 실시양태에서, 조혈 세포는 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프와 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 세포독성제 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포)의 투여 전에 투여된다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포 집단은 세포 표면 계통 특이적 단백질의 에피토프와 결합하는 항원 결합 단편을 포함하는 세포독성제의 투여 전 적어도 약 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 11주, 12주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월 또는 그 초과에 투여된다.

[0190] 일부 실시양태에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질을 표적으로 하는 세포독성제 및 조혈 세포 집단은 실질적으로 동시에 투여된다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 계통 특이적 단백질을 표적으로 하는 세포독성제를 투여하고, 환자를 일정 기간 동안 평가한 후, 조혈 세포 집단을 투여한다. 일부 실시양태에서, 조혈 세포 집단을 투여하고, 환자를 일정 기간 동안 평가한 후, 세포 표면 계통 특이적 단백질을 표적으로 하는 세포독성제를 투여한다.

- [0191] 또한 본 개시내용의 범위에는 세포독성제 및/또는 조혈 세포 집단의 다수의 투여 (예를 들어, 용량)가 있다. 일부 실시양태에서, 세포독성제 및/또는 조혈 세포 집단은 대상체에게 1회 투여된다. 일부 실시양태에서, 세포독성제 및/또는 조혈 세포 집단은 대상체에게 1회 초과 (예를 들어, 적어도 2회, 3회, 4회, 5회 또는 그 초과) 투여된다. 일부 실시양태에서, 세포독성제 및/또는 조혈 세포 집단은 규칙적인 간격으로, 예를 들어, 6개월마다 대상체에게 투여된다.
- [0192] 일부 실시양태에서, 대상체는 조혈 악성종양을 갖는 인간 대상체이다. 본원에 사용된 바와 같은 조혈 악성종양은 조혈 세포 (예를 들어, 전구 세포 및 줄기 세포를 포함한 혈액 세포)와 관련된 악성 비정상을 지칭한다. 조혈 악성종양의 예는 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 백혈병, 또는 다발성 골수종을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 백혈병은 급성 골수성 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 만성 골수성 백혈병, 급성 림프모구성 백혈병 또는 만성 림프모구성 백혈병, 및 만성 림프성 백혈병을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0193] 일부 실시양태에서, 조혈 악성종양에 관여하는 세포는 악성종양을 치료하는데 사용되는 통상적인 또는 표준 치료제에 대해 내성이다. 예를 들어, 세포 (예를 들어, 암 세포)는 악성종양을 치료하는데 사용되는 화학요법제 및/또는 CAR T 세포에 대해 내성일 수 있다.
- [0194] 일부 실시양태에서, 조혈 악성종양은 CD19⁺ 세포와 연관된다. 그 예는 B 세포 악성종양, 예컨대 비-호지킨 림프종, 호지킨 림프종, 백혈병, 다발성 골수종, 급성 림프모구성 백혈병, 급성 림프성 백혈병, 급성 림프구성 백혈병, 만성 림프모구성 백혈병, 만성 림프성 백혈병, 및 만성 림프구성 백혈병을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0195] 일부 실시양태에서, 백혈병은 급성 골수성 백혈병 (AML)이다. AML은 주요 분화 및 성장 조절 경로를 방해하는 점진적으로 획득한 중요한 유전자 변화를 갖는 형질전환된 세포로부터 유래되는 이종의 클로날 신생물 질환으로서 특징지워진다. (Dohner et al., *NEJM*, (2015) 373:1136). CD33 당단백질은 대부분의 골수성 백혈병 세포 상에서 발현될 뿐만 아니라 정상 골수성 및 단핵구성 전구체 상에서 발현되며 AML 요법에 대한 매력적인 표적인 것으로 간주되어 왔다 (Laszlo et al., *Blood Rev.* (2014) 28(4):143-53). 항-CD33 모노클로날 항체 기반 요법을 사용한 임상 시험은 표준 화학요법과 조합될 때 AML 환자의 서브세트에서 개선된 생존을 보여주었지만, 이러한 효과는 또한 안전성과 효능 상의 우려를 동반하였다.
- [0196] 본원에 기재된 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포 중 임의의 것이 제약 조성물로서 제약상 허용되는 담체 또는 부형제 중에서 투여될 수 있다.
- [0197] 본 개시내용의 조성물 및/또는 세포와 연계하여 사용된 바와 같은 어구 "제약상 허용되는"은 생리학적으로 허용되고 포유 동물 (예를 들어, 인간)에게 투여될 때 전형적으로 불쾌한 반응을 일으키지 않는 상기 조성물의 분자 실체 및 다른 성분을 지칭한다. 바람직하게, 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "제약상 허용되는"은 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나, 또는 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에서 포유 동물, 및 보다 특히 인간에서 사용하기 위해 열거된 것을 의미한다. "허용되는"은 담체가 조성물의 활성 성분 (예를 들어, 핵산, 벡터, 세포 또는 치료용 항체)과 화학성이고 조성물(들)이 투여되는 대상체에 부정적인 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 본 발명의 방법에 사용될 제약 조성물 및/또는 세포 중 임의의 것은 동결 건조된 제형 또는 수용액의 형태로 제약상 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제를 포함할 수 있다.
- [0198] 완충제를 포함한 제약상 허용되는 담체는 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 인산염, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제; 저 분자량 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 이뮤노글로불린; 아미노산; 소수성 중합체; 모노사카라이드; 디사카라이드; 및 다른 탄수화물; 금속 착물; 및/또는 비-이온성 계면활성제를 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* 20th Ed. (2000) Lippincott Williams and Wilkins, Ed. K. E. Hoover] 참조).
- [0199] **치료 용도를 위한 키트**
- [0200] 또한, 본 개시내용의 범위 내에는 세포 표면 계통 특이적 단백질을 발현하지만 그들이 세포독성제와 결합하지 않도록 또는 세포독성제에 대한 감소된 결합을 갖도록 조작된 조혈 세포 집단과 조합하여, 계통 특이적 세포 표면 단백질을 표적으로 하는 세포독성제의 사용을 위한 키트가 있다. 이러한 키트는 세포 표면 계통 특이적 단백질과 결합하는 항원 결합 단백을 포함하는 임의의 세포독성제 (예를 들어, 본원에 기재된 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포) 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제1 제약 조성물; 및 세포 표면 계통 특이적 단백질을 발현하지만 그들이 세포독성제와 결합하지 않도록 또는 세포독성제에 대한 감소된 결합을 갖도록 조작된 조혈 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 세포) 집단 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 제2 제약 조성물을 포함하는 하나

이상의 용기를 포함할 수 있다.

[0201] 일부 실시양태에서, 키트는 본원에 기재된 방법 중 임의의 것에 사용하기 위한 설명서를 포함할 수 있다. 이와 같이 포함된 설명서는 대상체에서 의도된 활성을 달성하기 위해 대상체에게 제1 및 제2 제약 조성물의 투여에 대한 설명을 포함할 수 있다. 키트는 대상체가 치료를 필요로 하는지의 여부를 확인하는 것에 근거하여 치료에 적합한 대상체를 선별하는 것에 관한 설명을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 설명서는 제1 및 제2 제약 조성물을, 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것에 관한 설명을 포함한다.

[0202] 세포 표면 계통 특이적 단백질을 표적으로 하는 세포독성제, 및 본원에 기재된 제1 및 제2 제약 조성물의 사용에 관한 설명서는 일반적으로, 의도된 치료를 위한 투여량, 투여 스케줄 및 투여 경로에 관한 정보를 포함한다. 용기는 단위 용량, 벌크 패키지 (예를 들어, 다중-용량 패키지) 또는 서브-단위 용량일 수 있다. 본 개시내용의 키트에 공급된 설명서는 전형적으로, 표지 또는 패키지 삽입물 위에 표기된 설명서이다. 표지 또는 패키지 삽입물은 제약 조성물이 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하고/하거나, 그의 발병을 지연시키고/시키거나 경감시키기 위해 사용된다는 것을 표시한다.

[0203] 본원에 제공된 키트는 적합한 패키징 상태로 있다. 적합한 패키징은 바이알, 병, 자르, 가요성 패키징 등을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 특이적 장치, 예컨대 흡입기, 비내 투여 장치, 또는 주입 장치와 조합하여 사용하기 위한 패키지가 또한 고려된다. 키트는 멸균 접근 포트를 가질 수 있다 (예를 들어, 용기는 정맥내 용액 봉지이거나, 또는 피하 주사 바늘에 의해 뚫을 수 있는 막개를 갖는 바이알일 수 있다). 용기는 또한 멸균 접근 포트를 가질 수 있다. 제약 조성물 내의 적어도 하나의 활성제는 본원에 기재된 바와 같은 키메라 수용체 변이체이다.

[0204] 키트는 임의로, 부가의 성분, 예컨대 완충제 및 해석 정보를 제공할 수 있다. 정상적으로, 키트는 용기; 및 이러한 용기 위에 있거나 또는 이와 연합된 표지 또는 패키지 삽입물(들)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 상기 기재된 키트의 내용물을 포함하는 제조품을 제공한다.

[0205] 일반적인 기술

[0206] 본 개시내용의 실시는 달리 표시되지 않는 한, 관련 기술분야의 기술 수준 내에 있는 분자 생물학 (재조합 기술 포함), 미생물학, 세포 생물학, 생화학 및 면역학의 통상적인 기술을 이용할 것이다. 이러한 기술은 문헌, 예컨대 하기 문헌에 완전히 설명되어 있다 [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, second edition (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed. 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1989) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney, ed. 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds. 1993-8) J. Wiley and Sons; *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.): *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *Current Protocols in Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds. 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis, et al., eds.1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practice approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach* (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); *Using antibodies: a laboratory manual* (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); *The Antibodies* (M. Zanetti and J. D. Capra, eds. Harwood Academic Publishers, 1995); *DNA Cloning: A practical Approach*, Volumes I and II (D.N. Glover ed. 1985); *Nucleic Acid Hybridization* (B.D. Hames & S.J. Higgins eds.(1985»; *Transcription and Translation* (B.D. Hames & S.J. Higgins, eds. (1984»; *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed. (1986»; *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, (1986»; 및 B. Perbal, *A practical Guide To Molecular Cloning* (1984); F.M. Ausubel et al. (eds.)).

[0207] 추가의 설명 없이, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상기 설명에 근거하여, 본 개시내용을 최대한 활용할 수 있다고 생각된다. 따라서, 하기 구체적 실시양태는 단지 예시적인 것으로서 해석되어야 하며, 어떠한 방식으로든 본 개시내용의 나머지를 제한하지 않는다. 본원에 인용된 모든 공보는 본원에 참조된 목적 또는 대상을 위해 참조로 포함된다.

[0208] 실시예

[0209] 실시예 1: 조혈 세포에서 발현된 CD33 내의 에피토프의 확인 및 돌연변이

[0210] 예시적인 계통 특이적 세포 표면 항원으로서 인간 CD33을 사용하여, 아미노산의 돌연변이 및/또는 결실이 해로운 효과 (예를 들어, 기능의 감소 또는 폐기)를 야기할 가능성이 적은 단백질의 영역을, PROVEAN 소프트웨어 (provean.jcvi.org; 문헌 [Choi et al. PLoS ONE (2012) 7(10): e46688] 참조)를 사용하여 예측하였다. 이와 같이 예측된 영역의 예가 도 2의 박스 내에 도시되어 있고, 예측된 영역에서의 예시적인 결실이 표 2에 제시되어 있다. 아미노산 잔기의 넘버링은 서열식별번호: 1에 의해 제공된 인간 CD33의 아미노산 서열에 근거한다.

[0211] <표 2>

[0212] CD33에서의 예시적인 결실

| 결실 | PROVEAN 스코어 | 세포독성제에 의해 표적화된 에피토프 |
|-----------|-------------|-----------------------|
| S248-E252 | -5.508 | SGKQE (SEQ ID NO: 8) |
| I47-D51 | -5.661 | IPYYD (SEQ ID NO: 9) |
| G249-T253 | -7.078 | GKQET (SEQ ID NO: 10) |
| K250-R254 | -7.184 | KQETR (SEQ ID NO: 11) |
| P48-K52 | -7.239 | PYYDK (SEQ ID NO: 12) |
| Q251-A255 | -7.888 | QETRA (SEQ ID NO: 13) |

[0213]

[0214] CD33을 코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 통상적인 핵산 조작 방법을 사용하여, 단백질 (CD33의 세포의 부분)의 임의의 에피토프, 또는 이를 함유하는 단편을 결실시키도록 유전자 조작시킨다. 하기 제공된 아미노산 서열은 표 2에서의 각각의 에피토프가 결여되도록 조작시킨 CD33 돌연변이체의 예시적인 서열이다.

[0215] CD33의 세포의 부분의 아미노산 서열은 서열식별번호: 1에 의해 제공된다. 신호 펩티드는 이탤릭체로 제시되고 조작 부위는 밑줄과 볼드체로 제시된다. 막횡단 도메인은 밑줄과 함께 이탤릭체로 제시된다.

*MPLLLLLLPLL WAGALAMDPN FWLQVQESVT VQEGLCVLVP CTFF**FHP****IPYY** **DKNS**SPVHGYW*
FREGAIISRD SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDPSRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM
ERGSTKYSYK SPQLSVHVD LTHRPKILIP GTLEPGHSGN LTCSVSWACE QGTPPIFSWL
SAAPTSLGPR TTHSSVLIIT PRPQDHGTNL TCQVKFAGAG VTTERTIQLN VTYVPQNPTT
*GIF**P****GDGSGK** **QETRAG**VVHG *AIGGAGVTAL LALCLCLIFF IVKTHRRKAA RTAVGRNDTH*
PTTGSASPKH QKSKLHGPT ETSSCSGAAP TVEMDEELHY ASLNFHGMNP SKDTSTEYSE
*VRTQ (SEQ ID NO: 1)**

[0216]

[0217] 잔기 S248 내지 E252의 결실을 포함하는 CD33의 세포의 부분의 아미노산 서열은 서열식별번호: 2에 의해 제공된다. 신호 펩티드는 이탤릭체로 제시되고 막횡단 도메인은 밑줄과 함께 이탤릭체로 제시된다.

[0218] S248_E252insdelTARND; PROVEAN 스코어 = -1.916

*MPLLLLLLPLL WAGALAMDPN FWLQVQESVT VQEGLCVLVP CTFFH**PI****PYY** **DKNS**SPVHGYW*
FREGAIISRD SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDPSRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM
ERGSTKYSYK SPQLSVHVD LTHRPKILIP GTLEPGHSGN LTCSVSWACE QGTPPIFSWL
SAAPTSLGPR TTHSSVLIIT PRPQDHGTNL TCQVKFAGAG VTTERTIQLN VTYVPQNPTT
*GIFPGDGTAR NDTRAGVVHG *AIGGAGVTAL LALCLCLIFF IVKTHRRKAA RTAVGRNDTH**
PTTGSASPKH QKSKLHGPT ETSSCSGAAP TVEMDEELHY ASLNFHGMNP SKDTSTEYSE VRTQ
(SEQ ID NO: 2)

[0219]

[0220] 잔기 I47 내지 D51의 결실을 포함하는 CD33의 세포의 부분의 아미노산 서열은 서열식별번호: 3에 의해 제공된다. 신호 펩티드는 이탤릭체로 제시되고 막횡단 도메인은 밑줄과 함께 이탤릭체로 제시된다.

[0221] I47_D51insdelVPFFE; PROVEAN 스코어 = -1.672

MPLLLLLLPLL WAGALAMDPN FWLQVQESVT VQEGLCVLVP CTFFHPVPFF EKNSPVHGYW
FREGAIISRD SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDPSRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM
ERGSTKYSYK SPQLSVHVTDL THRPKILIP GTLEPGHSGN LTCSVSWACE QGTPPIFSWL
SAAPTSLGPR TTHSSVLIIT PRPQDHGTNL TCQVKFAGAG VTERTIQLN VTYVPQNPTT
GIFPGDGTAR NDRAGVVHG AIGGAGVTAL LALCLCLIFF IVKTHRRKAA RTAVGRNDTH
PTTGSASPKH QKKSKLHGPT ETSSCSGAAP TVEMDEELHY ASLNFHGMNP SKDTSTEYSE
VRTQ (SEQ ID NO: 3)

[0222]

[0223] 잔기 G249 내지 T253의 결실을 포함하는 CD33의 세포외 부분의 아미노산 서열은 서열식별번호: 4에 의해 제공된다. 신호 펩티드는 이탤릭체로 제시되고 막횡단 도메인은 밑줄과 함께 이탤릭체로 제시된다.

MPLLLLLLPLL WAGALAMDPN FWLQVQESVT VQEGLCVLVP CTFFHPIPY DKNSPVHGYW
FREGAIISRD SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDPSRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM
ERGSTKYSYK SPQLSVHVTDL THRPKILIP GTLEPGHSGN LTCSVSWACE QGTPPIFSWL
SAAPTSLGPR TTHSSVLIIT PRPQDHGTNL TCQVKFAGAG VTERTIQLN VTYVPQNPTT
GIFPGDGSRA GVVHGAIGGA GVTALLALCL CLIFFIVKTH RRKAARTAVG RNDTHPTTGS
ASPKHQKSK LHGPTETSSC SGAAPTVE MD EELHYASLNF HGMNPSKDTS TEYSEVRTQ (SEQ ID NO: 4)

[0224]

[0225] 잔기 K250 내지 R254의 결실을 포함하는 CD33의 세포외 부분의 아미노산 서열은 서열식별번호: 5에 의해 제공된다. 신호 펩티드는 이탤릭체로 제시되고 막횡단 도메인은 밑줄과 함께 이탤릭체로 제시된다.

MPLLLLLLPLL WAGALAMDPN FWLQVQESVT VQEGLCVLVP CTFFHPIPY DKNSPVHGYW
FREGAIISRD SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDPSRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM
ERGSTKYSYK SPQLSVHVTDL THRPKILIP GTLEPGHSGN LTCSVSWACE QGTPPIFSWL
SAAPTSLGPR TTHSSVLIIT PRPQDHGTNL TCQVKFAGAG VTERTIQLN VTYVPQNPTT
GIFPGDGSRA GVVHGAIGGA GVTALLALCL CLIFFIVKTH RRKAARTAVG RNDTHPTTGS
ASPKHQKSK LHGPTETSSC SGAAPTVE MD EELHYASLNF HGMNPSKDTS TEYSEVRTQ (SEQ ID NO: 5)

[0226]

[0227] 잔기 P48 내지 K52의 결실을 포함하는 CD33의 세포외 부분의 아미노산 서열은 서열식별번호: 6에 의해 제공된다. 신호 펩티드는 이탤릭체로 제시되고 막횡단 도메인은 밑줄과 함께 이탤릭체로 제시된다.

MPLLLLLLPLL WAGALAMDPN FWLQVQESVT VQEGLCVLVP CTFFHPINSP VHGYWFREGA
IISRDSPVAT NKLDQEVQEE TQGRFRLGD PSRNNCSLSI VDARRRDNGS YFFRMERGST
KYSYKSPQLS VHTDLTHRP KILIPGTLEP GHSKNLTCV SWACEQGTTP IFSWLSAAPT
SLGPRITTHSS VLIITPRPD HGTNLTCQVK FAGAGVTER TIQLNVITYVP QNPTTGIFPG
DGSQKQETRA GVVHGAIGGA GVTALLALCL CLIFFIVKTH RRKAARTAVG RNDTHPTTGS
ASPKHQKSK LHGPTETSSC SGAAPTVE MD EELHYASLNF HGMNPSKDTS TEYSEVRTQ (SEQ ID NO: 6)

[0228]

[0229] 잔기 Q251 내지 A255의 결실을 포함하는 CD33의 세포외 부분의 아미노산 서열은 서열식별번호: 7에 의해 제공된다. 신호 펩티드는 이탤릭체로 제시되고 막횡단 도메인은 밑줄과 함께 이탤릭체로 제시된다.

MPLLLLLLPLL WAGALAMDPN FWLQVQESVT VQEGLCVLVP CTFFHPIPY DKNSPVHGYW
FREGAIISRD SPVATNKLDQ EVQEETQGRF RLLGDPSRNN CSLSIVDARR RDNGSYFFRM
ERGSTKYSYK SPQLSVHVTDL THRPKILIP GTLEPGHSGN LTCSVSWACE QGTPPIFSWL
SAAPTSLGPR TTHSSVLIIT PRPQDHGTNL TCQVKFAGAG VTERTIQLN VTYVPQNPTT
GIFPGDGSRA GVVHGAIGGA GVTALLALCL CLIFFIVKTH RRKAARTAVG RNDTHPTTGS
ASPKHQKSK LHGPTETSSC SGAAPTVE MD EELHYASLNF HGMNPSKDTS TEYSEVRTQ (SEQ ID NO: 7)

[0230]

[0231] **실시예 2: 세포의 생성 및 특징 규명**

[0232] 1차 인간 CD8⁺ T 세포는 면역자기 분리 [밀테니 바이오텍(Miltenyi Biotec)]에 의해 환자의 말초 혈액으로부터 분리된다. T 세포는 이전에 기재된 바와 같이 항-CD3 및 항-CD28 mAb-코팅된 비드 [인비트로젠(Invitrogen)]과 함께 배양되고 이로 자극된다 (Levine et al., J. Immunol. (1997) 159(12):5921).

[0233] CD33의 에피토프와 결합하는 키메라 수용체는 통상적인 재조합 DNA 기술을 사용하여 생성되고 렌티바이러스 벡터 내로 삽입된다. 키메라 수용체를 함유하는 벡터는 1차 CD8⁺ T 세포를 형질도입하는데 사용되는 렌티바이러스

입자를 생성하기 위해 사용된다. 인간 재조합 IL-2를 격일로 부가할 수 있다 (50 IU/mL). T 세포를 자극 후 약 14일 동안 배양한다. 키메라 수용체의 발현은 웨스턴 블롯팅 및 유동 세포계수법과 같은 방법을 사용하여 확증할 수 있다.

[0234] 키메라 수용체를 발현하는 T 세포를 선택하고, 이를 대상으로 CD33과 결합할 수 있고 CD33을 발현하는 세포의 세포독성을 유도할 수 있는 능력에 관하여 평가한다. 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포를 또한, 키메라 수용체와 결합하는 에피토프가 결합되도록 조작시킨 CD33을 발현하는 세포의 세포독성을 유도할 수 있는 그의 능력에 관하여 평가한다. 바람직하게, CD33과 결합하지만 에피토프가 결합된 CD33과는 결합하지 않는 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포가 선택된다 (도 3).

[0235] CD33을 발현하지만 CD33의 에피토프가 결합된 세포 (예를 들어, 조혈 줄기 세포)를 또한, 증식, 적혈구 분화 및 콜로니 형성을 포함한 다양한 특징에 관하여 평가하여, 에피토프의 조작이 CD33의 기능에 상당한 영향을 미치지 않았다는 것을 확증한다.

[0236] 실시예 3: 혈액 질환의 치료

[0237] 급성 골수성 백혈병에 대해 본원에 기재된 방법, 세포 및 작용제를 사용하는 예시적인 치료 요법이 하기에 제공된다.

[0238] 1) 조혈 세포 이식 (HCT)을 받기 위한 후보인 AML 환자를 확인하는 단계;

[0239] 2) 표준 방법 및 기술을 사용하여, 일치하는 HLA 일배체형을 갖는 HCT 공여자를 확인하는 단계;

[0240] 3) 공여자로부터 골수를 추출하는 단계;

[0241] 4) 생체 외에서 공여자 골수 세포를 유전자 조작하는 단계. 간단히 언급하면, 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프의 표적화된 변형 (결실, 치환)을 도입한다. 일반적으로, 에피토프는 일반적으로 적어도 3개의 아미노산 (예를 들어, 약 6 내지 10개의 아미노산)이어야 한다. 공여자 골수 세포 상에 표적화된 계통 특이적 세포 표면 단백질의 상기 에피토프의 유전자 변형은 상기 단백질의 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않아야 하며, 결과적으로 환자에게 성공적으로 생착시킬 수 있고 이식편 대 종양 (GVT) 효과를 매개할 수 있는 그의 능력을 포함하여, 골수 세포의 기능에 실질적으로 영향을 미치지 않아야 한다;

[0242] 임의적 단계 5-7:

[0243] 일부 실시양태에서, 하기 제공된 단계 5-7은 본원에 기재된 바와 같은 예시적인 치료 방법에서 (한 번 또는 여러 번) 수행될 수 있다:

[0244] 5) 표준 기술, 예컨대 화학요법제 (예를 들어, 에토포시드, 시클로포스파미드)의 주입 및/또는 방사선 조사를 사용하여 AML 환자를 사전 컨디셔닝시키는 단계;

[0245] 6) 상기 조작된 공여자 골수를 AML 환자에게 투여하여, 성공적인 생착을 허용하는 단계;

[0246] 7) 세포독성제, 예컨대 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포 (예를 들어, CAR T 세포) 또는 항체-약물 접합체를 이용한 추적 관찰 단계이며, 여기서 세포독성제와 결합하는 에피토프는 변형된 것과 동일한 에피토프이고, 공여자 조작된 골수 이식편 상에 더 이상 존재하지 않는 것인 단계. 따라서, 이러한 표적화된 요법은 에피토프가 존재하지 않는 골수 이식편을 동시에 제거하지 않으면서도 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프를 특이적으로 표적으로 해야 한다;

[0247] 임의적 단계 8-10:

[0248] 일부 실시양태에서, 단계 8-10은 본원에 기재된 바와 같은 예시적인 치료 방법에서 (한 번 또는 여러 번) 수행될 수 있다:

[0249] 8) 계통 특이적 세포 표면 단백질의 에피토프를 표적으로 하는 세포독성제, 예컨대 키메라 수용체를 발현하는 면역 세포 (예를 들어, CAR T 세포) 또는 항체-약물 접합체를 투여하는 단계. 이러한 표적화된 요법은 암성 세포뿐만 아니라 환자의 비-암성 세포 둘 다를 제거할 것으로 예상된다;

[0250] 9) 표준 기술, 예컨대 화학요법제의 주입을 사용하여 AML 환자를 사전 컨디셔닝시키는 단계;

[0251] 10) 상기 조작된 공여자 골수를 AML 환자에게 투여하여, 성공적인 생착을 허용하는 단계.

[0252] 단계 8-10은 표적화된 단백질을 발현하는 환자의 암성 세포와 정상 세포를 제거하는 한편, 표적화된 요법에 대

해 내성인 공여자 세포로 정상 세포 집단을 보충한다.

[0253] **실시예 4: CRISPR/Cas9-매개된 유전자 편집을 통해 CD19 또는 CD33의 엑손 2를 결실시킨다**

[0254] **재료 및 방법**

[0255] sgRNA 구축물의 설계

[0256] 모든 sgRNA는 표적 영역에 근접한 SpCas9 PAM (5'-NGG-3')에 대한 수동 검사에 의해 설계되었으며, 온라인 검색 알고리즘으로 인간 게놈에서 잠재적인 오프 타겟 부위를 최소화함으로써 예측된 특이성에 따라 우선 순위가 결정되었다 (Benchling, Doench et al. 2016, Hsu et al. 2013). 설계된 모든 합성 sgRNA는 5' 말단과 3' 말단 둘 다에서 3개의 말단 위치에서 화학적으로 변형된 뉴클레오타이드를 수반하여 신테고(Synthego)로부터 구입하였다. 변형된 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸-3'-포스포로티오에이트 ("ms"로서 약칭됨)를 함유하였고, ms-sgRNA를 HPLC로 정제하였다. Cas9 단백질은 신테고 (도 5-8) 및 알데르본(Aldervon) (도 9, 10, 14, 17, 18)으로부터 구입하였다.

[0257] 불멸화된 인간 세포주의 세포 유지 및 전기천공

[0258] K562 인간 백혈병 세포주는 아메리칸 타입 컬처 콜렉션 (ATCC)으로부터 획득되었고, DMEM + 10% FBS에서 유지시키고 5% CO2에서 37°C 하에 유지시켰다. K562 세포는 론자 뉴클레오펙터(Lonza Nucleofector) (프로그램 SF-220) 및 인간 P3 세포 뉴클레오펙션 키트 (VPA-1002, 론자)를 사용하여 Cas9 리보핵단백질 (RNP)의 전기천공에 의해 편집되었다. 라지-플렉-GFP 세포는 캐피탈 바이오사이언시스(Capital Biosciences)로부터 구입하였고, 5% CO2에서 37°C 하에 RPMI + 10% FBS + 1% 글루타민에서 유지시켰다. 라지-플렉-GFP 세포는 론자 뉴클레오펙터 (프로그램 DS-104) 및 SG 세포주 4D-뉴클레오펙터 X 키트 S (V4XC-3032, 론자)를 사용하여 RNP의 전기천공에 의해 편집되었다. Cas9 RNP는 전기천공 직전에 25°C 하에 10분 동안 1:9 (20:180 pmol)의 물 비로 ms-sgRNA와 단백질을 함께 인큐베이션함으로써 만들어졌다. 전기천공 후, 세포를 큐벳에서 10분 동안 인큐베이션하고, 상기 배지 1 mL로 옮기고, 하류 분석을 위해 24 내지 72시간 동안 배양하였다.

[0259] 1차 인간 CD34 + HSC에서의 편집

[0260] 동원된 말초 혈액으로부터 유래된 동결된 CD34+ HSC는 올셀스(AllCells)로부터 구입하고 제조업체의 지시에 따라 해동시켰다. 제대혈로부터 유래된 동결된 CD34+ HSC는 올셀스 또는 스템셀(Stemcell)로부터 냉동 구입하고, 제조업체의 지시에 따라 해동 및 유지시켰다. HSC를 편집하기 위해, 약 1e6 HSC를 해동하고 스템스판(StemSpan) CC110 각테일이 보충된 스템스판 SFEM 배지 [스템셀 테크놀로지스(StemCell Technologies)]에서 24 시간 동안 배양한 후에, RNP로 전기천공시켰다. HSC를 전기천공하기 위해, 1.5e5를 펠릿화하고 20 µL 론자 P3 용액에 재현탁시키며, 상기 기재된 바와 같이 10 µL Cas9 RNP와 혼합하였다. CD34+ HSC는 론자 뉴클레오펙터 2 (프로그램 DU-100) 및 인간 P3 세포 뉴클레오펙션 키트 (VPA-1002, 론자)를 사용하여 전기천공시켰다.

[0261] 게놈 DNA 분석

[0262] 모든 게놈 분석을 위해, 퀴아젠(Qiagen) DNeasy 키트를 사용하여 세포로부터 DNA를 수거하였다. T7E1 검정의 경우, CRISPR 커트 부위를 플랭킹하는 프라이머로 PCR을 수행하였다. 산물을 PCR 정제 (퀴아젠)에 의해 정제하고 200 ng를 변성시키며, 열순환기에서 재어닐링시키고, 제조업체의 프로토콜에 따라 T7 엔도뉴클레아제 I (뉴잉글랜드 바이오랩스)로 소화시켰다. 소화된 DNA를 1% 아가로스 겔에서 전기영동하고 바이오래드 케미독(BioRad ChemiDoc) 영상기 상에서 관찰하였다. 밴드 강도를, 이미지 랩(Image Lab) 소프트웨어 (바이오-래드)를 사용하여 분석하였고 대립유전자 변형 빈도 (INDEL)를 하기 공식으로 계산하였다: $100 \times (1 - (1 - \text{절단된 분획})^0.5)$. TIDE (분해에 의한 In/dels의 추적)를 사용하여 대립유전자 변형 빈도를 분석하기 위해, 정제된 PCR 산물을 PCR 프라이머 둘 다를 사용하여 생어(Sanger)-서열 분석하고 [이튼(Eton)], 각각의 서열 크로마토그램을 온라인 TIDE 소프트웨어 [데스크젠(Deskgen)]로 분석하였다. 모의-형질감염된 (Cas9 단백질 단독) 샘플로부터의 참조 서열을 사용하여 분석을 수행하였다. 파라미터는 10개 뉴클레오타이드의 디폴트 최대 삽입-결실(indel) 크기, 및 고품질 트레이스를 수반한 가능한 가장 큰 윈도우를 커버하는 분해 윈도우로 설정하였다. 3.5%의 검출 감도 아래의 모든 TIDE 분석을 0%로 설정하였다.

[0263] 이중 ms-sgRNA에 의한 게놈 결실 정도를 결정하기 위해, 804 bp 영역을 증폭시키는 CRISPR 커트 부위를 플랭킹하는 프라이머로 종말점 PCR을 수행하였다. PCR 산물을 1% 아가로스 겔에서 전기영동하고 바이오래드 케미독 영상기 상에서 관찰하여 무손상 모 밴드 및 예상되는 더 작은 (ms-sgRNA 조합에 따라 400-600 bp) 결실 산물을 관찰하였다. 밴드 강도는 이미지 랩 소프트웨어 (바이오-래드)를 사용하여 분석하였고, 결실 퍼센트는 공식:

100 x 절단된 분획으로 계산되었다. 겔 밴드를 겔 추출 키트 (퀴아젠)로 추출하고 생어 서열 분석 [이튼 바이오사이언스(Eton Bioscience)]을 위해 PCR 정제 (퀴아젠)에 의해 추가로 정제하였다.

[0264] 유동 세포계수법 및 FACS 분석

[0265] 상기 언급된 바와 같이 RNP로 뉴클레오펙션된 라지-플렉-GFP 세포를 48시간 동안 세포 배양물에서 유지시켰다. 살아있는 세포를 PE-접합된 CD19 항체 [IM1285U; 베크만 쿨터(Beckman Coulter)]로 염색하고 CD19의 발현에 의해 BD FACS 아리아(Aria) 상에서 분류하여 분석하였다. CD34+ HSC를 항-CD33 항체 (P67.7)를 사용하여 CD33에 대해 염색하고 어튜ن(Attune) NxT 유동 세포측정기 [라이프 테크놀로지스(Life Technologies)] 상에서 유동 세포계수법으로 분석하였다.

[0266] CAR-T 세포 세포독성 검정

[0267] 건강한 인간 공여자로부터의 CD4+ 및 CD8+ T 세포 내로 CART19-발현 렌티바이러스를 형질도입함으로써 CD19-유도된 CAR-T 세포 (CART19)를 생성하였다. CART19 구축물은 CD19-인식 도메인 (FMC63 모노클로날 항체로부터 유래된 단일쇄 가변 단편), CD28로부터 유래된 공동 자극성 도메인, 및 CD3 제타 도메인을 함유한다. CART19의 세포독성을 유동 세포계수법-기반 검정에 의해 평가하였다. 셀트레이스 바이올렛(CellTrace Violet) 염료로 염색된 라지-플렉-GFP 세포가 표적 세포로서 제공되었다. CART19 구축물로 형질도입되지 않은 T 세포를, 세포독성 검정을 위한 음성 대조군으로서 사용하였다. 이펙터 (E) 및 종양 표적 (T) 세포를 표시된 E/T 비 (10:1, 3:1, 0:1) 하에, CTS 옵트마이저(OpTmizer)-기반 무혈청 배지에서 웰당 200 μ l의 총 용적으로 1×10^4 개의 표적 세포와 공동 배양하였다. 인큐베이션 20시간 후, 세포를 프로피듐 아이오다이드에 대해 염색하고 어튜ن NxT 유동 세포측정기 (라이프 테크놀로지스)에 의해 분석하였다. 살아있는 표적 세포를 프로피듐 아이오다이드-음성 및 셀트레이스 바이올렛-양성으로서 게이팅하였다. 세포독성은 $(1 - (\text{CART19 군 내의 살아있는 표적 세포 분획}) / (\text{음성 대조군 내의 살아있는 표적 세포 분획})) \times 100\%$ 로서 계산되었다.

[0268] 생체 내 생착 실험

[0269] CD19 생체 내 생착 실험을 위해, 세포를 NOD *scid* 감마 마우스 [NSGTM 마우스; 잭슨 라보라토리(Jackson Laboratory)] 내로 생착시켰다. CD33 생체 내 생착 실험을 위해, 세포를 NSG-SGM3 마우스 (잭슨 라보라토리) 내로 생착시켰다.

[0270] CD19의 엑손 2를 표적으로 한다

[0271] gRNA의 선택

[0272] CD19의 엑손 2는 도 4에 예시된 바와 같이 CRISPR/Cas9-매개된 게놈 결실에 대해 표적화되었다. 하나의 sgRNA는 인트론 1을 표적으로 하고, 하나의 sgRNA는 인트론 2를 표적으로 하는 한 쌍의 sgRNA는 Cas9에 의한 DNA 이중 가닥 절단물 (DSB)의 동시 생성과, CD19의 엑손 2의 완전한 손실을 포함한 영역의 절제를 야기시킨다. 커트 부위에서 원위 말단은 비-상동 말단 결합 (NHEJ)을 통해 인트론 1 및 2의 라이게이션을 통하여 복구된다. 변형된 CD19 유전자의 전사는 RNA 스플라이싱 동안 엑손 2 스킵핑을 통해 엑손 2가 결여된 CD19 변이체 ("CD19엑손2 결실")의 발현을 초래한다.

[0273] 인트론 1 및 2를 표적으로 하는 sgRNA 패널은 CD19 엑손 2에 근접한 SpCas9 PAM (5'-NGG-3')에 대한 수동 검사에 의해 설계되었으며, 온라인 검색 알고리즘으로 인간 게놈에서 온 타겟 부위를 최대화하고 잠재적인 오프 타겟 부위를 최소화함으로써 예측된 특이성에 따라 우선 순위가 결정되었다 (Benchling, Doench et al. (2016); Hsu et al. (2013)) (표 3). 예시적인 CD19 sgRNA 각각에 대해, 서열은 CD19를 표적으로 하고 Cas 유형은 SpCas9이다.

[0274] <표 3>

[0275] CD19 sgRNA 패널

| 명칭 | sgRNA 서열 | 위치 | 가닥 | PAM | 온 타겟 (Doench et al 2016) ¹ | 오프 타겟 (Hsu et al 2013) ¹ |
|-------------------|---|-------|----|-----|--|--|
| CD19_sgRNA -1 | GAGGCTGGAACTTGAGTTG (SEQ ID NO: 14) | 인트론 1 | 1 | TGG | 57 | 67 |
| CD19_sgRNA -3 | GAGGGTAAGTTACTCAGCCA (SEQ ID NO: 15) | 인트론 1 | -1 | AGG | 68 | 60 |
| CD19_sgRNA -4 | AAATTCAGGAAAGGTTGGA (SEQ ID NO: 16) | 인트론 1 | 1 | AGG | 53 | 62 |
| CD19_sgRNA -5 | AAGGGTTGGAAGGACTCTGC (SEQ ID NO: 17) | 인트론 1 | 1 | CGG | 60 | 64 |
| CD19_sgRNA -6 | AGCAGAGGACTCCAAAAGCT (SEQ ID NO: 18) | 인트론 1 | -1 | GGG | 62 | 59 |
| CD19_sgRNA -7 | CACACAGGTTATAGAGCAG (SEQ ID NO: 19) | 인트론 1 | -1 | AGG | 63 | 67 |
| CD19_sgRNA -8 | CTGCTCTATAACCTGGTGTG (SEQ ID NO: 20) | 인트론 1 | 1 | AGG | 71 | 63 |
| CD19_sgRNA -9 | ACCTGGTGTGAGGAGTCGGG (SEQ ID NO: 21) | 인트론 1 | 1 | GGG | 58 | 69 |
| CD19_sgRNA -10 | CACAGCGTTATCTCCCTCTG (SEQ ID NO: 22) | 엑손 2 | -1 | TGG | 68 | 69 |
| CD19_sgRNA -13 | CGGACCTCTTCTGTCCATGG (SEQ ID NO: 23) | 인트론 2 | -1 | TGG | 65 | 65 |
| CD19_sgRNA -14 | CCATGGACAGAAGAGGTCCG (SEQ ID NO: 24) | 인트론 2 | 1 | CGG | 72 | 65 |
| CD19_sgRNA -15 | GGGCGAACTCGGAGCTAGG (SEQ ID NO: 25) | 인트론 2 | 1 | TGG | 80 | 65 |
| CD19_sgRNA -16 | GCTAGGTGGGCAGACTCCTG (SEQ ID NO: 26) | 인트론 2 | 1 | GGG | 59 | 60 |
| CD19_sgRNA -1 | GAGGCTGGAACTTGAGTTG (SEQ ID NO: 14) | 인트론 1 | 1 | TGG | 57 | 67 |
| CD19_sgRNA -3 | GAGGGTAAGTTACTCAGCCA (SEQ ID NO: 15) | 인트론 1 | -1 | AGG | 68 | 60 |
| CD19_sgRNA -4 | AAATTCAGGAAAGGTTGGA (SEQ ID NO: 16) | 인트론 1 | 1 | AGG | 53 | 62 |

[0276]

[0277] ¹ 표시된 공개된 알고리즘에 근거한 온 타겟 및 오프 타겟 예측. 스코어는 100점 만점이며 성공을 예측한다.

[0278] 유전자 편집을 위해, 재료 및 방법에 기재된 바와 같이 sgRNA를 변형시켰다. 변형된 sgRNA는 "ms" 접두사로 표시된다.

[0279] 인트론 1 또는 2를 표적으로 하는 CD19 sgRNA를 인간 백혈병 세포주인 K562 세포에서 스크리닝하고 T7E1 검정 및 TIDE 분석에 의해 분석하였다 (도 5). 평가된 12개의 ms-sgRNA 중에서, ms-sgRNA 1, 3-9는 인트론 1을 표적으로 하고, ms-sgRNA 10은 엑손 2를 표적으로 하며, ms-sgRNA 14-16은 인트론 2를 표적으로 한다.

[0280] 편집된 밴드와 편집되지 않은 밴드 간의 크기 변화를 현재의 PCR 프라이머 세트를 사용하여 정확하게 구별할 수 없었기 때문에, ms-sgRNA-1에 대한 INDEL 퍼센트는 상기 샘플에 대해 계산되지 않았다.

[0281] ms-sgRNA 쌍을 사용하여 K562 세포에서 CD19의 엑손 2를 결실시키고, PCR-기반 검정을 사용하여 CD19 엑손 2의 CRISPR/Cas9-매개된 게놈 결실을 검출하였다 (도 6). 인트론 1을 표적으로 하는 ms-sgRNA (ms-sgRNA 3, 4, 5, 6, 9)의 조합된 활성을, 게놈 결실을 생성하기 위해 인트론 2를 표적으로 하는 ms-sgRNA (ms-sgRNA 14, 15, 16)와 조합하여 스크리닝하였다. 게놈 결실 영역 전체에 걸친 PCR은 더 큰 모 밴드 (801 bp)와 비교하여 더 작은 결실 PCR 산물 (400-560 bp)을 보여준다. 편집 효율은 종말점 PCR에 의한 결실 퍼센트로서 정량화되었다 (도 6, 패널 C).

[0282] 인트론 1 또는 2를 표적으로 하는 CD19 sgRNA를 또한 CD34+ HSC에서 스크리닝하였다 (도 7 및 9).

[0283] ms-sgRNA 쌍을 사용하여 CD34+ HSC에서 CD19의 엑손 2를 결실시켰다. 인트론 1을 표적으로 하는 ms-sgRNA (ms-sgRNA 4, 6, 9)의 조합된 활성을, 게놈 결실을 생성하기 위해 인트론 2를 표적으로 하는 ms-sgRNA (ms-sgRNA 14, 15, 16)와 조합하여 스크리닝하였다 (도 8). 게놈 결실 영역 전체에 걸친 PCR은 더 큰 모 밴드와 비교하여 더 작은 결실 PCR 산물을 보여준다. 편집 효율은 종말점 PCR에 의한 결실 퍼센트로서 정량화되었다.

[0284] 부가 쌍의 ms-sgRNA를 사용하여 CD34+ HSC에서 CD19의 엑손 2를 결실시켰다. 인트론 1을 표적으로 하는 ms-sgRNA (ms-sgRNAs 1, 6, 7)를, 인트론 2를 표적으로 하는 ms-sgRNA (ms-sgRNA 14, 15, 16)와 조합한 조합된 활성이, 엑손 2의 게놈 결실을 효율적으로 생성하는 것으로 밝혀졌다 (도 10).

[0285] 편집된 CD34+ HSC의 분화 잠재력

[0286] 본원에 기재된 방법을 사용하여 생산된 상기 편집된 세포 중 임의의 것의 분화 잠재력을 평가할 수 있다.

[0287] 엑손 2가 결핍된 편집된 CD34+ HSC를 생체 외에서 생성하고 재료 및 방법에 기재된 바와 같이 검정한다. 편집된 CD34+ HSC를 재료 및 방법에 기재된 바와 같이 생체 외에서 생성한다. 간단히 언급하면, CD34+ HSC를 해동시키고, 이를 미리 형성된 리보핵단백질 (RNP)과 접촉시킨다. 샘플을 2개의 분획으로 분할한다: 세포의 2%는 시험관 내에서 특징 규명하고, 나머지 분획은 6 내지 8주령 NOD *scid* 감마 마우스 (NOD.Cg-Prkdc^{scid} *Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ (NSGTM 마우스); 잭슨 라보라토리) 내로 생착시킨다 (도 11). 시험관 내 분획은 콜로니 형성 단위 (CFU) 검정 및 유전자형 분석에 의해 그 특징이 규명된다.

[0288] 생체 내 분획을 방사선 조사된 NSGTM 마우스에게 투여한다. 이러한 마우스 군이 표 4에 제시된다. 혈액 샘플을 다양한 시점 (예를 들어, 4주, 8주, 12주)에서 마우스로부터 수득하고, 유전자형 분석에 의해 분석하며 인간 CD45+ 세포의 백분율을 평가한다. 16주에, 마우스를 희생시키고 분석을 위해 말초 혈액, 골수 및 비장을 수거한다. 1차 종말점은 생착 퍼센트이며, 이는 유전자형 분석 및 유동 세포계수 분석 (예를 들어, 마우스 대 인간 CD45, CD20/CD19, 엑손 2가 결핍된 CD19, Cd34, CD33, CD3)에 의해 평가된다. 2차 종말점은 엑손 2가 결핍된 CD19의 발현이며, 이는 웨스턴 블롯팅 및/또는 qRT-PCR에 의해 평가된다.

[0289] <표 4>

[0290] 생체 내 특징 규명 군

| 군 | 군 명칭 | 코멘트 | # 마우스 |
|---|-------|----------|-------|
| 1 | 비-처리된 | 공여자 풀 #1 | 5 |
| 2 | 모의 | | 10 |
| 3 | 시험 | | 10 |
| 4 | 비-처리된 | 공여자 풀 #2 | 5 |
| 5 | 모의 | | 10 |
| 6 | 시험 | | 10 |

[0291]

[0292] 생체 내 라지 종양 모델

[0293] 생체 내 라지 종양 모델을 사용하여 본원에 기재된 치료 방법 중 임의의 것의 효능을 검정할 수 있다.

[0294] 엑손 2가 결핍된 내인성 CD19를 발현하는 라지-플렉-GFP 세포 (CD19엑손2 결실)는 재료 및 방법에 기재된 바와 같이 생체 외에서 생성시켰다. 편집된 세포의 강화 후, 샘플을 2개의 분획으로 분할한다: 하나의 분획은 시험관 내에서 특징 규명되고, 나머지 분획은 6 내지 8주령 NSG 마우스 내로 이종 이식된다 (도 12).

[0295] 시험관 내 분획은 재료 및 방법에 기재된 바와 같은 세포독성 및 분자 검정에 의해 그 특징이 규명된다.

[0296] 생체 내 분획은 버킷 림프종 마우스 모델에서 CART19의 효능 및 선택성에 관하여 평가되고, 표시된 검정에 의해 그리고 재료 및 방법에 기재된 바와 같이 검정된다. 마우스 군이 표 5에 제시되어 있다. 간단히 언급하면, 엑손 2가 결핍된 내인성 CD19를 발현하는 라지-플렉-GFP 세포의 주사 후 1주일, 마우스에게 CART19 세포를 주입하였다. 마우스를 생체 내 영상화 시스템 (IVIS)에 의해 다양한 시점 (예를 들어, 6일, 12일, 18일, 35일)에서 평가하여 라지 세포의 존재비 (CD19/CD19ex2)를 결정한다. CART19 세포의 수를 정량화하기 위해 마우스로부터 혈액 샘플을 또한 수득한다.

[0297] <표 5>

[0298] 생체 내 특징 규명 군

| 군 | 조건 | CART19 | #마우스 |
|----|--------------------------|--------|------|
| 1 | 비-처리된 대조군 | - | 4 |
| 2 | 비-처리된 대조군 | + | 10 |
| 43 | 라지 플렉 GFP; CD19+/+ | - | 10 |
| 4 | 라지 플렉 GFP; CD19+/+ | + | 10 |
| 5 | 라지 플렉 GFP; CD19엑손2DEL | - | 10 |
| 6 | 라지 플렉 GFP; CD19엑손2DEL | + | 10 |

[0299]

[0300] 치료 효능의 1차 종말점은, 예를 들어, 생존, 종양 부담 용적, 및 IVIS 영상화에 의한 종양 부담에 의해 평가된다. 치료 선택성의 1차 종말점은, 예를 들어, 라지-GFP 세포의 지속성을 결정함으로써 평가된다.

[0301] CART19 요법에 대한 2차 종말점은 약동학 및 종양 침윤을 포함하고, CD19에 대한 2차 종말점은 엑손 2가 결핍된 CD19의 발현을 포함한다.

[0302] CD19의 엑손 2를 발현하는 라지 세포는 CART19 세포에 의해 사멸될 것으로 예상되는 반면, CD19의 엑손 2를 결실하도록 조작된 라지 세포는 생존하여 CART 사멸을 회피할 것으로 예상된다.

[0303] CD19 엑손 2가 결핍된 라지-플렉-GFP 세포주의 생성

[0304] 라지-플렉-GFP 세포주를 ms-sgRNA 쌍으로 형질감염시키고 형광-활성화 세포 분류 (FACS)에 의해 CD19 발현에 관하여 검정하였다. 세포는 상대적 CD19 발현에 근거하여 3가지 집단: "hi" (높음), "int" (중간) 및 "lo" (낮음)로 게이팅하였다 (도 13). 모 라지 세포 및 Cas9 단독으로 뉴클레오택션된 라지-플렉-GFP가 대조군으로서 포함되었다. 각각의 조건에서 살아있는 세포의 백분율을 정량화하였다 (도 13, 패널 B). PCR은 또한, 더 큰 모 밴드와 비교하여 더 작은 결실 PCR 산물을 나타내는 각각의 조건에서 세포의 게놈 결실 영역 전체에 걸쳐 수행되었다 (도 13, 패널 C). 벌크 집단에서 CD19 엑손 2의 백분율은 또한, 각각의 조건에서 종말점 PCR에 의해 검정되었고 (도 13, 패널 D), 이는 CD19 "int" 및 CD19 "lo" 세포 집단에서 CD19 엑손 2 결실을 갖는 세포의 백분율이 더 높았다는 것을 표시한다.

[0305] CART 세포독성

[0306] CD19-유도된 CAR-T 세포 (CART19)를 재료 및 방법에 기재된 바와 같이 생성하고 라지-플렉-GFP 세포와 함께 인큐베이션하였다. 인큐베이션 20시간 후, 유동 세포계수법에 의해 세포독성을 평가하였다. 도 14는 CD19 "hi" 집단과 비교 시 CD19 "low" 라지 세포의 특이적 용해가 감소되었다는 것을 보여준다.

[0307] 도 13에 도시된 바와 같이, 라지 "hi" 집단은 유전자형적으로 혼합된 세포 집단이다. 단일 세포는 클로날 집단 뿐만 아니라 편집되지 않은 모 집단을 분석하기 위해 강화될 수 있다. 대조군 CD19-hi 집단은 혼합된 유전자형 (20-40% CD19엑손2 결실)이며, 야생형 대조군 집단에서는 증강된 사멸이 예상된다.

[0308] 생체 내 효능 및 선택성

[0309] 도 15는 편집된 HSC와 쌍을 이루는 CART 요법의 효능 및 선택성을 평가하는 포괄적인 생체 내 모델을 요약한 것이다. 간단히 언급하면, CD19의 엑손 2가 결핍된 HSC (CD19ex2결실)를 준비한다. 마우스 군에게 대조군 (편집되지 않은) HSC 또는 CD19의 엑손 2가 결핍된 HSC를 투여한다. 4주 후, 마우스에게 라지 버킷 림프종 세포를 투여한 다음, 1주 후에 CART19 세포를 투여한다. 마우스를 IVIS 영상화에 의해 매주 평가하고, 4주마다 혈액 샘플을 수득한다. 12주 후, 마우스를 희생시키고 분석을 위해 말초 혈액, 골수 및 비장을 수거한다.

[0310] CD33의 엑손 2를 표적으로 한다

[0311] *gRNA의 선택*

[0312] CD33 유전자는 2개의 주요 이소형을 코딩하는데, 그 중 하나는 엑손 2를 보유하고 CD33M으로서 지칭되고, 다른 하나는 엑손 2를 배제하며 CD33m으로서 지칭된다 (도 16). CD33의 엑손 2 내의 에피토프를 표적으로 하는 치료제, 예컨대 켐투주맵 오조가미신 [밀로타르그(Mylotarg)]은 CD33의 엑손 2가 결핍된 (예를 들어, CD33m) HSC와

쌍을 이룰 수 있다.

[0313] 도 14에 도시된 바와 같이, Cas9 뉴클레아제는 2개의 sgRNA에 의해 CD33의 인트론 1 및 2를 표적으로 한다. Cas9에 의한 DNA 이중 가닥 절단물 (DSB)의 동시 생성은 엑손 2의 완전한 손실을 포함한 영역의 절제를 야기시킨다. 커트 부위에 대한 원위 말단은 비-상동 말단 결합 (NHEJ)을 통해 인트론 1 및 2의 라이게이션을 통하여 복구되며, 이와 같이 복구된 접합부가 삼각형으로 표시된다. 변형된 게놈의 전사는 CD33m 이소형의 발현을 초래한다.

[0314] ms-sgRNA의 패널은 CD33 엑손 2에 근접한 SpCas9 PAM (5'-NGG-3')에 대한 수동 검사에 의해 설계되었고, 온라인 검색 알고리즘으로 인간 게놈에서 잠재적인 오프 타겟 부위를 최소화함으로써 예측된 특이성에 따라 우선 순위가 결정되었다 (Benchling, Doench et al. (2016); Hsu et al. (2013)) (표 6). 이어서, 인트론 1 또는 2를 표적으로 하는 ms-sgRNA의 서브세트를, 시험관 내 유전자 편집 효율에 근거하여 선택하였다. 각각의 sgRNA는 인간 CD33을 표적으로 하고 Cas9 유형 SpCas9를 사용한다.

[0315] <표 6>

[0316] CD33 sgRNA 패널

| 명칭 | sgRNA 서열 | PAM | 위치 | 온 타겟 (Doench et al 2016) ¹ | 오프 타겟 (Hsu et al 2013) ¹ |
|-------------------|---|-----|-------|---|---|
| CD33_sgRNA -1 | GCTGTGGGGAGAGGGGTTGT (SEQ ID NO: 27) | CGG | 인트론 1 | 39 | 29 |
| CD33_sgRNA -2 | CTGTGGGGAGAGGGGTTGTC (SEQ ID NO: 28) | GGG | 인트론 1 | 46 | 35 |
| CD33_sgRNA -3 | TGGGGAAACGAGGGTCAGCT (SEQ ID NO: 29) | CGG | 인트론 1 | 60 | 29 |
| CD33_sgRNA -4 | GGGCCCTGTGGGGAAACGA (SEQ ID NO: 30) | GGG | 인트론 1 | 65 | 40 |
| CD33_sgRNA -5 | AGGGCCCTGTGGGGAAACG (SEQ ID NO: 31) | AGG | 인트론 1 | 50 | 36 |
| CD33_sgRNA -6 | GCTGACCCTCGTTTCCCCAC (SEQ ID NO: 32) | AGG | 인트론 1 | 47 | 31 |
| CD33_sgRNA -7 | CTGACCCTCGTTTCCCCACA (SEQ ID NO: 33) | GGG | 인트론 1 | 52 | 27 |
| CD33_sgRNA -8 | TGACCCTCGTTTCCCCACAG (SEQ ID NO: 34) | GGG | 인트론 1 | 71 | 29 |
| CD33_sgRNA -9 | CCATAGCCAGGGCCCTGTG (SEQ ID NO: 35) | GGG | 인트론 1 | 61 | 24 |
| CD33_sgRNA -10 | GCATGTGACAGGTGAGGCAC (SEQ ID NO: 36) | AGG | 인트론 2 | 56 | 36 |
| CD33_sgRNA -11 | TGAGGCACAGGCTTCAGAAG (SEQ ID NO: 37) | TGG | 인트론 2 | 55 | 32 |
| CD33_sgRNA -12 | AGGCTTCAGAAGTGGCCGCA (SEQ ID NO: 38) | AGG | 인트론 2 | 54 | 39 |
| CD33_sgRNA -13 | GGCTTCAGAAGTGGCCGCAA (SEQ ID NO: 39) | GGG | 인트론 2 | 58 | 44 |
| CD33_sgRNA -14 | GTACCCATGAACTTCCCTTG (SEQ ID NO: 40) | CGG | 인트론 2 | 75 | 40 |
| CD33_sgRNA -15 | GTGGCCGCAAGGGAAGTTCA (SEQ ID NO: 41) | TGG | 인트론 2 | 63 | 42 |
| CD33_sgRNA -16 | TGGCCGCAAGGGAAGTTCAT (SEQ ID NO: 42) | GGG | 인트론 2 | 53 | 43 |
| CD33_sgRNA -17 | GGAAGTTCATGGGTACTGCA (SEQ ID NO: 43) | GGG | 인트론 2 | 66 | 42 |
| CD33_sgRNA -18 | TTCATGGGTACTGCAGGGCA (SEQ ID NO: 44) | GGG | 인트론 2 | 59 | 32 |
| CD33_sgRNA -19 | CTAAACCCTCCAGTACCA (SEQ ID NO: 45) | GGG | 인트론 2 | 61 | 40 |
| CD33_sgRNA -20 | CACTCACCTGCCACAGCAG (SEQ ID NO: 46) | GGG | 인트론 1 | 56 | 23 |
| CD33_sgRNA -21 | CCCTGCTGTGGGCAGGTGAG (SEQ ID NO: 47) | TGG | 인트론 1 | 44 | 20 |

[0317]

| | | | | | |
|-------------------|---|-----|-------|----|----|
| CD33_sgRNA -22 | TGGGCAGGTGAGTGGCTGTG (SEQ ID NO: 48) | GGG | 인트론 1 | 61 | 26 |
| CD33_sgRNA -23 | GGTGAGTGGCTGTGGGGAGA (SEQ ID NO: 49) | GGG | 인트론 1 | 42 | 24 |
| CD33_sgRNA -24 | GTGAGTGGCTGTGGGGAGAG (SEQ ID NO: 50) | GGG | 인트론 1 | 49 | 20 |

[0318]

[0319] ¹ 표시된 공개된 알고리즘에 근거한 온 타겟 및 오프 타겟 예측. 스코어는 100점 만점이며 성공을 예측한다.

[0320] 인트론 1 또는 2를 표적으로 하는 CD33 ms-sgRNA를 TIDE 검정에 의해 1차 CD34+ HSC에서 스크리닝하였다 (도 17 및 18).

[0321] ms-sgRNA 쌍을 CD34+ HSC에서 시험하여 사용하였다 (도 18, 패널 B 및 C). 엑손 2 및 3의 효율적인 결실이, 엑손 2 및 3을 표적으로 하는 대조군 sgRNA를 사용하여 관찰되었다 (각각 Sg 및 811). 엑손 2를 함유하는 CD33에 있어서의 감소가, 인트론 1 및 2를 표적으로 하는 sgRNA 쌍 (예를 들어, sgRNA 17과 23; sgRNA 17과 24)으로 관찰되었다.

[0322] CD33의 엑손 2를 결실시키기 위한 추가의 sgRNA 쌍을 스크리닝하여 엑손 2의 효율적인 손실을 달성하는 쌍을 확인할 수 있다.

[0323] 다른 실시양태

[0324] 본 명세서에 개시된 모든 특색들은 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 본 명세서에 개시된 각각의 특색은 동일하거나, 동등하거나 또는 유사한 목적을 제공하는 대안적인 특색으로 대체될 수 있다. 따라서, 달리 명백하게 언급되지 않는 한, 개시된 각각의 특색은 동등하거나 또는 유사한 특색의 포괄적 시리즈의 예일 뿐이다.

[0325] 상기 설명으로부터, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 개시내용의 본질적인 특징을 용이하게 확인할 수 있고, 본 개시내용의 취지 및 범위를 벗어나지 않고서도 본 개시내용의 다양한 변화 및 변형을 행하여 다양한 활용 및 조건에 적응시킬 수 있다. 따라서, 다른 실시양태 또한, 청구범위 내에 있다.

[0326] 등가물

[0327] 본 발명의 몇 가지 실시양태가 본원에 기재되고 예시되었지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 기능을 수행하고/하거나 본원에 기재된 결과 및/또는 이점 중 하나 이상을 수득하기 위한 각종 다른 수단 및/또는 구조를 용이하게 구상할 것이며, 이러한 변이 및/또는 변형 각각은 본원에 기재된 본 발명의 실시양태의 범위 내에 있는 것으로 간주된다. 보다 일반적으로, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 모든 파라미터, 치수, 재료 및 입체 배치가 예시적이며, 실제 파라미터, 치수, 재료 및/또는 입체 배치가, 본 발명의 교시가 사용되는 특이적 적용(들)에 의존할 것이란 사실을 용이하게 인지할 것이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 구체적인 본 발명의 실시양태와 대한 많은 등가물들, 단지 일상적인 실험을 사용하여 인식하거나 또는 확인할 수 있을 것이다. 따라서, 상기 기재된 실시양태는 단지 예로서 제시되고 첨부된 청구범위 및 그 등가의 범위 내에서, 본 발명의 실시양태는 구체적으로 기재되고 청구된 것과 달리 실시될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 본 개시내용의 발명의 실시양태는 본원에 기재된 각각의 개별적인 특색, 시스템, 제품, 재료, 키트 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 그러한 특색, 시스템, 제품, 재료, 키트 및/또는 방법이 서로 일치하지 않는 경우, 그러한 특색, 시스템, 물품, 재료, 키트 및/또는 방법 중 둘 이상의 임의의 조합이 본 개시내용의 발명의 범위 내에 포함된다.

[0328] 본원에 정의되고 사용된 바와 같은 모든 정의는 사전적 정의, 참조로 포함된 문서 내에서의 정의, 및/또는 상기 정의된 용어의 보통의 의미보다 우선하는 것으로 이해되어야 한다.

[0329] 본원에 개시된 모든 참고 문헌, 특허 및 특허 출원은 각각이 인용되는 대상과 관련하여 참조로 포함되며, 일부 경우에 문서의 전체를 포괄할 수 있다.

[0330] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 바와 같은 단수 형태는, 달리 명백하게 표시되지 않는 한, "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.

[0331] 본 명세서 및 청구범위에서 사용된 바와 같은 어구 "및/또는"은, 이와 같이 결합된 요소, 즉 일부 경우에는 결합적으로 존재하고 다른 경우에는 분리하여 존재하는 요소 중 "하나 또는 둘 다"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. "및/또는"으로 열거된 다수의 요소는 동일한 방식, 즉 이와 같이 결합된 요소 중 "하나 이상"으로 해석되어야 한다. "및/또는" 구절에 의해 구체적으로 확인된 요소와 관련이 있든지 아니면 관련이 없든지 간에, 상

기 구체적으로 확인된 요소 이외의 다른 요소가 임의로 존재할 수 있다. 따라서, 비-제한적인 예로서, "포함하는"과 같은 개방형 언어와 연계하여 사용될 때, "A 및/또는 B"에 대한 언급은, 한 실시양태에서 A 단독 (임의로 B 이외의 요소를 포함함)을 지칭할 수 있고; 다른 실시양태에서, B 단독 (임의로 A 이외의 요소를 포함함)을 지칭할 수 있으며; 또 다른 실시양태에서, A와 B 둘 다 (임의로 다른 요소를 포함함)를 지칭할 수 있다.

[0332] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 바와 같은 "또는"은 상기 정의된 바와 같은 "및/또는"과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 목록에서 항목을 분리할 때, "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적인 것으로서, 즉 요소, 및 임의로 부가의 미열거된 항목의 수 또는 목록 중 적어도 하나뿐만 아니라 1개 초과를 포함하는 것으로 해석되어야 한다. "~ 중 단지 하나" 또는 "~ 중 정확하게 하나", 또는 청구범위에서 사용될 때, "~로 이루어지는" 것과 같이, 반대로 명확하게 표시된 "단지" 용어는, 요소의 수 또는 목록 중 정확히 하나의 요소를 포함하는 것을 지칭할 것이다. 일반적으로, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "또는"은 단지, 배타적인 용어, 예컨대 "둘 중 하나", "~ 중 하나" "~ 중 하나 만이" 또는 "~ 중 정확하게 하나"가 선행될 때 배타적인 대안 (즉, "하나 또는 다른 하나이지만 둘 다는 아님")을 표시하는 것으로서 해석되어야 한다. 청구범위에서 사용될 때 "~로 본질적으로 이루어지는"은 특허법 분야에서 사용되는 바와 같은 그의 일반적인 의미를 가질 것이다.

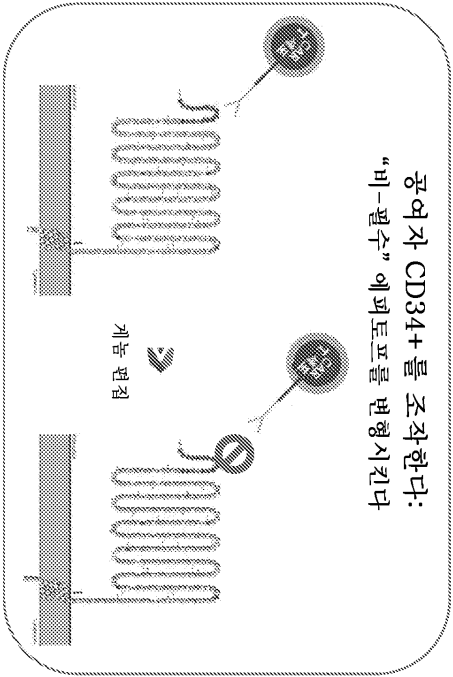
[0333] 본 명세서 및 청구범위에 사용된 바와 같이, 하나 이상의 요소의 목록과 관련하여 "적어도 하나"라는 어구는 요소 목록 내의 요소 중 임의의 하나 이상으로부터 선택된 적어도 하나의 요소를 의미하는 것으로 이해되어야 하나, 요소의 목록 내에 구체적으로 열거된 각각의 및 모든 요소 중 적어도 하나를 반드시 포함할 필요는 없으며, 요소 목록에서 요소의 임의의 조합을 배제하지는 않는다. 이러한 정의는 또한, 구체적으로 확인된 요소와 관련되든지 아니면 관련되지 않든지 간에, 문구 "적어도 하나"가 지칭하는 요소 목록 내에서 구체적으로 확인된 요소 이외의 요소가 임의로 존재할 수 있게 한다. 따라서, 비-제한적인 예로서, "A 및 B 중 적어도 하나" (또는, 동등하게 "A 또는 B 중 적어도 하나", 또는 동등하게 "A 및/또는 B 중 적어도 하나")는 한 실시양태에서, B가 존재하지 않고, 임의로 1개 초과를 포함한 적어도 하나의 A (및 임의로 B 이외의 요소를 포함함)를 지칭할 수 있고; 또 다른 실시양태에서, A가 존재하지 않고, 임의로 1개 초과를 포함한 적어도 하나의 B (및 임의로 A 이외의 요소를 포함함)를 지칭할 수 있으며; 또한 또 다른 실시양태에서, 임의로 1개 초과를 포함한 적어도 하나의 A, 및 임의로 1개 초과를 포함한 적어도 하나의 B (및 임의로 다른 요소를 포함함)를 지칭할 수 있다.

[0334] 또한, 달리 명백하게 표시되지 않는 한, 1개 초과인 단계 또는 작용을 포함하는 본원에 청구된 임의의 방법에서, 이러한 방법의 단계 또는 작용의 순서가, 그 방법의 단계 또는 작용이 나열된 순서로 반드시 제한되는 않는다는 것을 이해해야 한다.

A. 프로세스



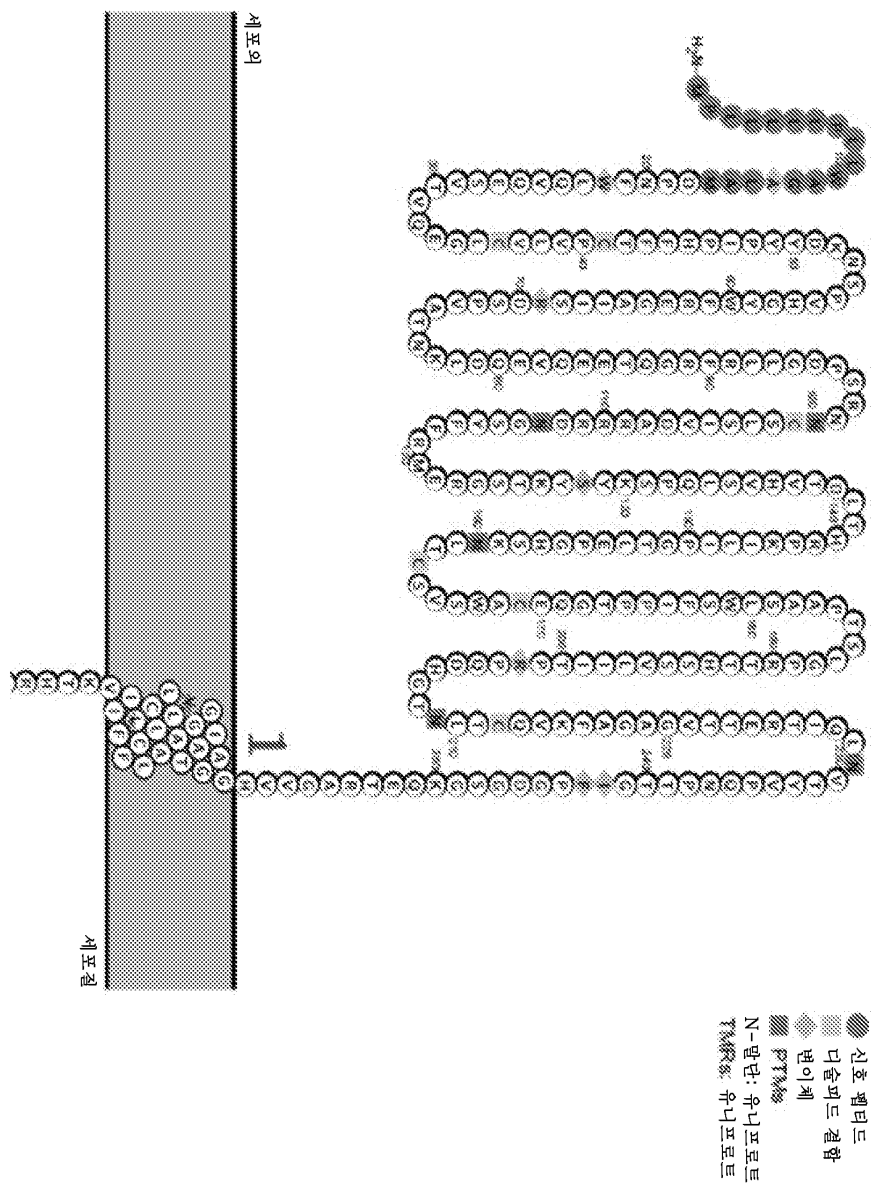
B.



도면

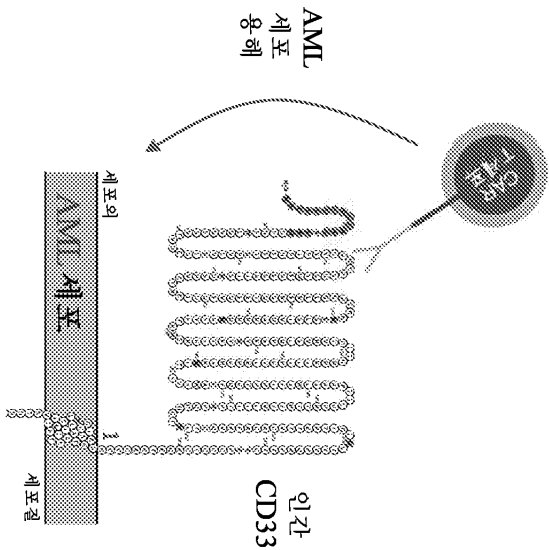
도면1

도면2



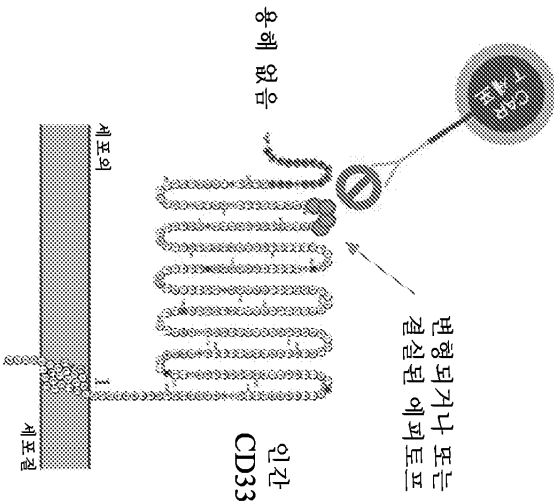
A

CD33+ AML 세포를 표적으로 한다

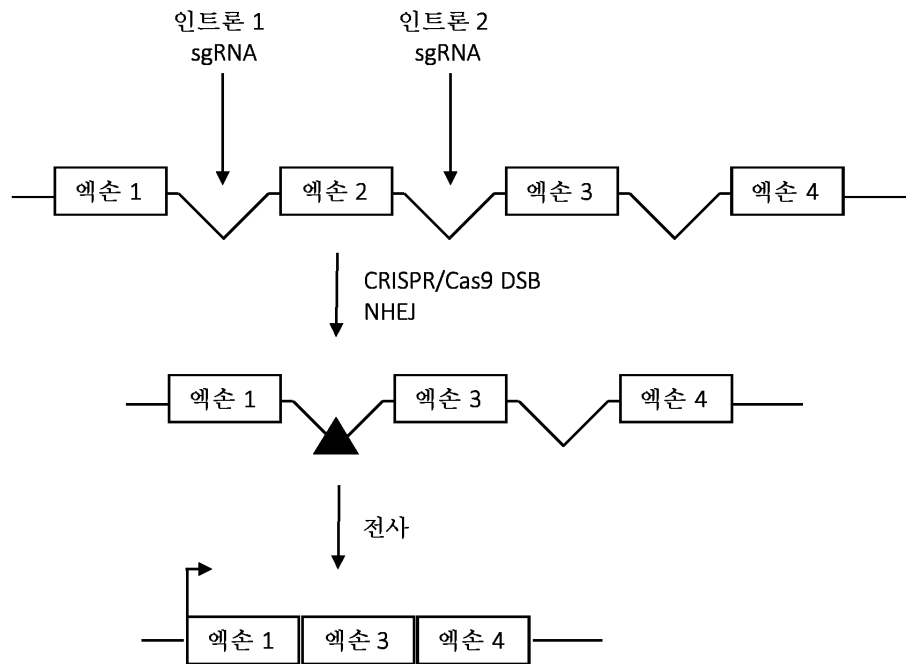


B

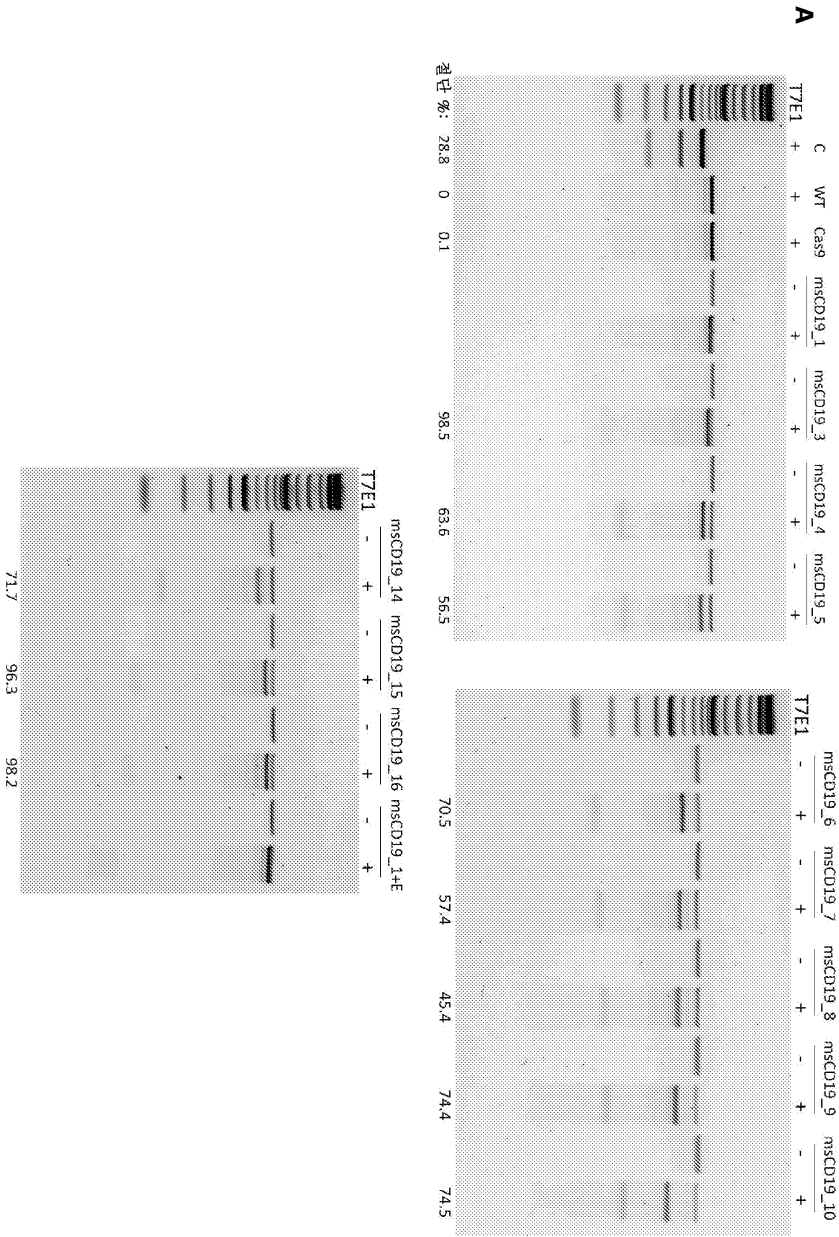
변형된 공여자 이식편 세포에 대한 결핍 없음



도면4

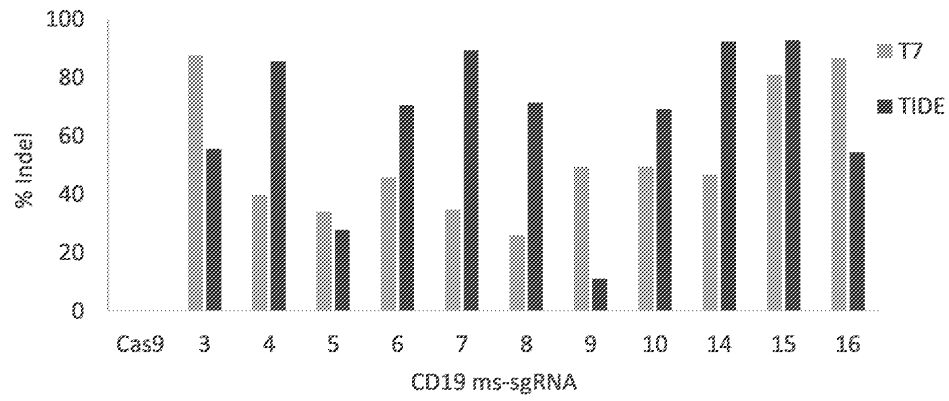


도면5i



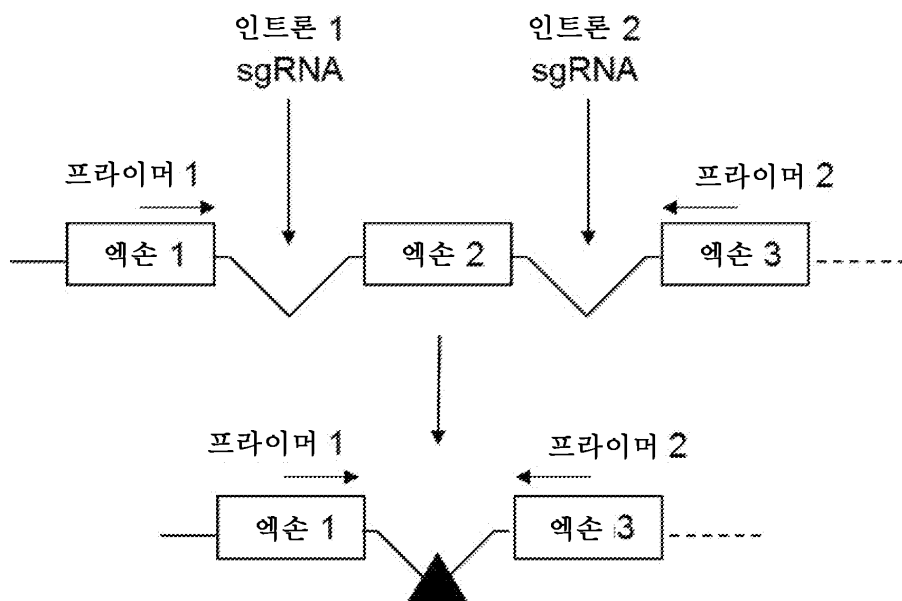
도면5i

B

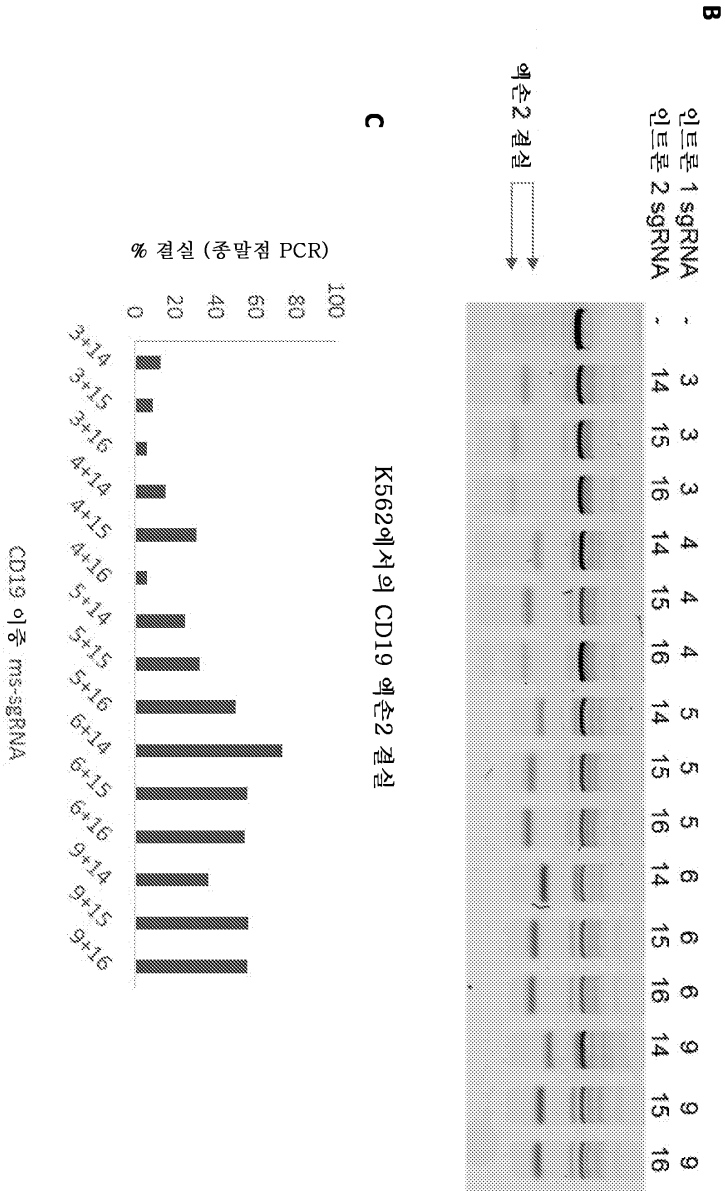


도면6i

A

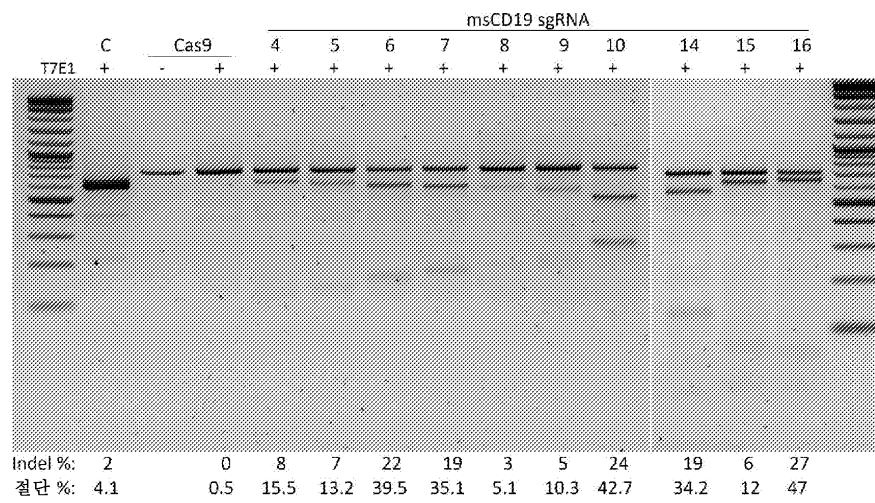


도면6ii



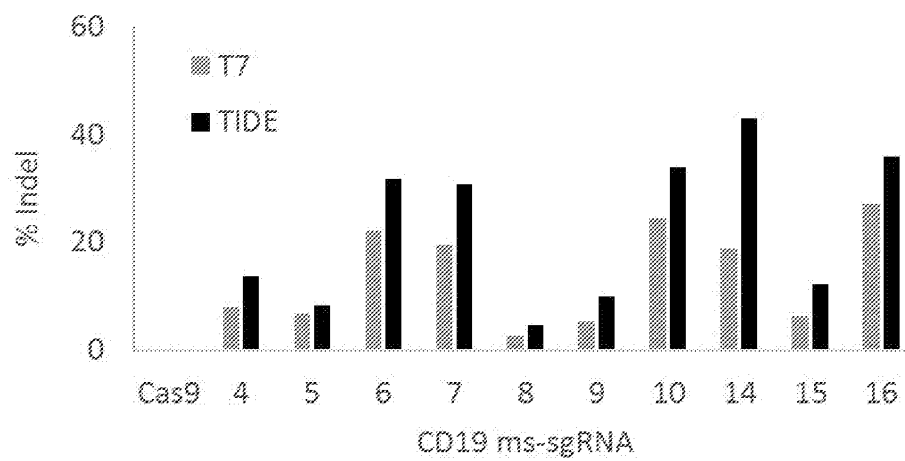
도면7i

A



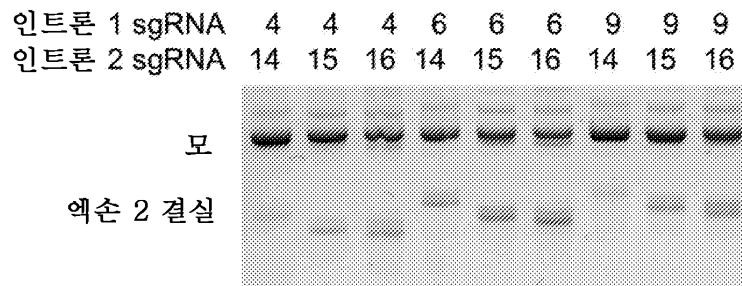
도면7ii

B

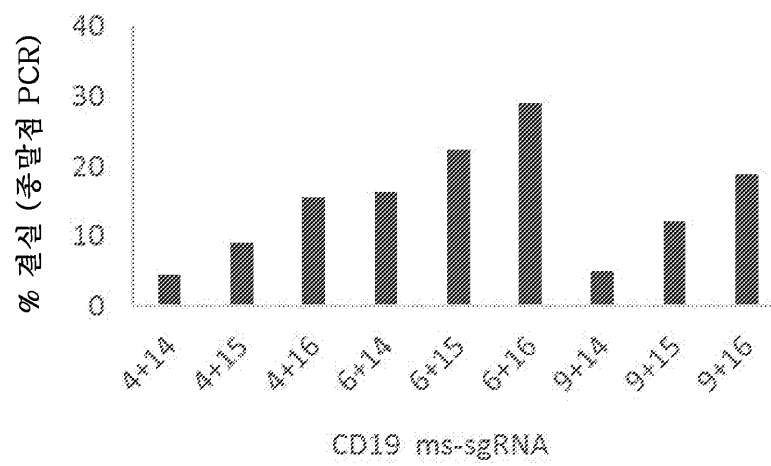


도면8

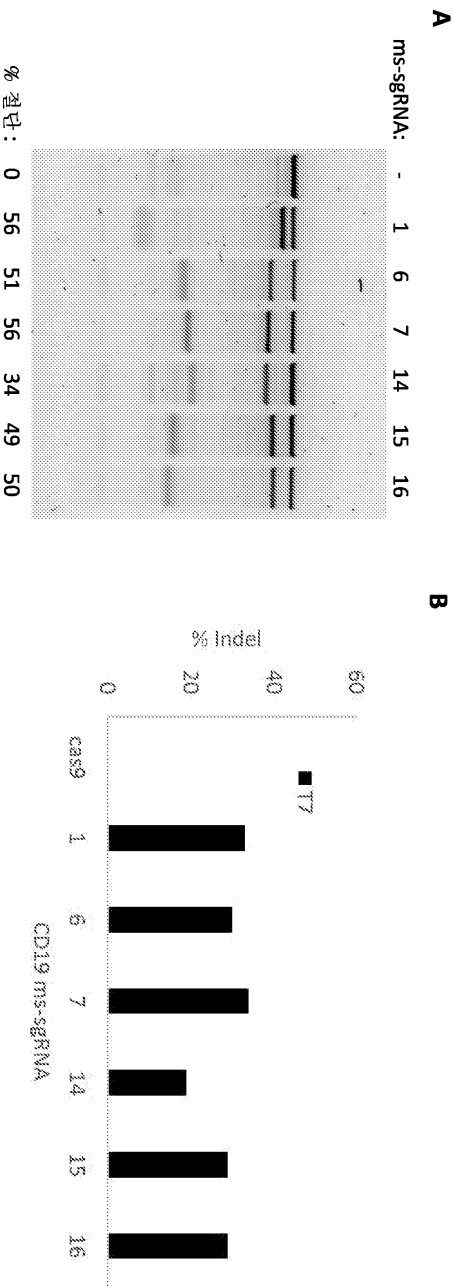
A



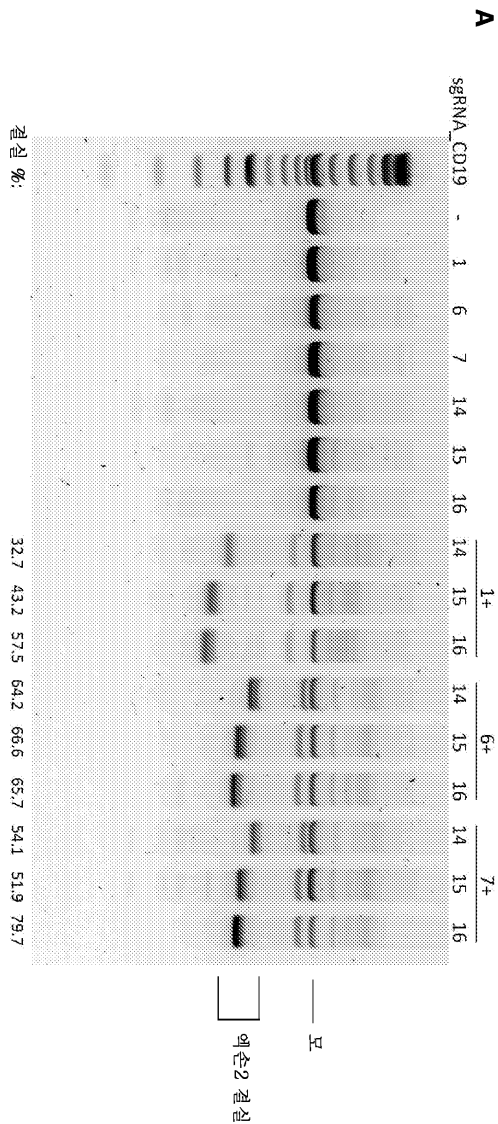
B



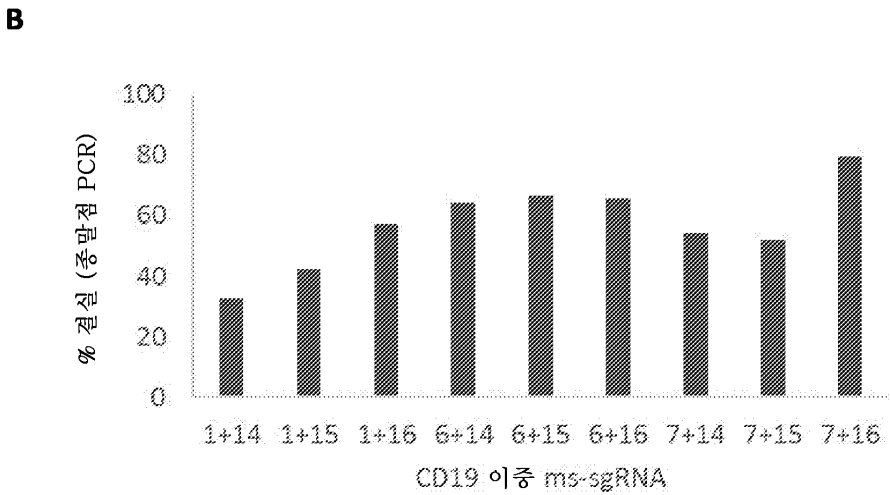
도면9



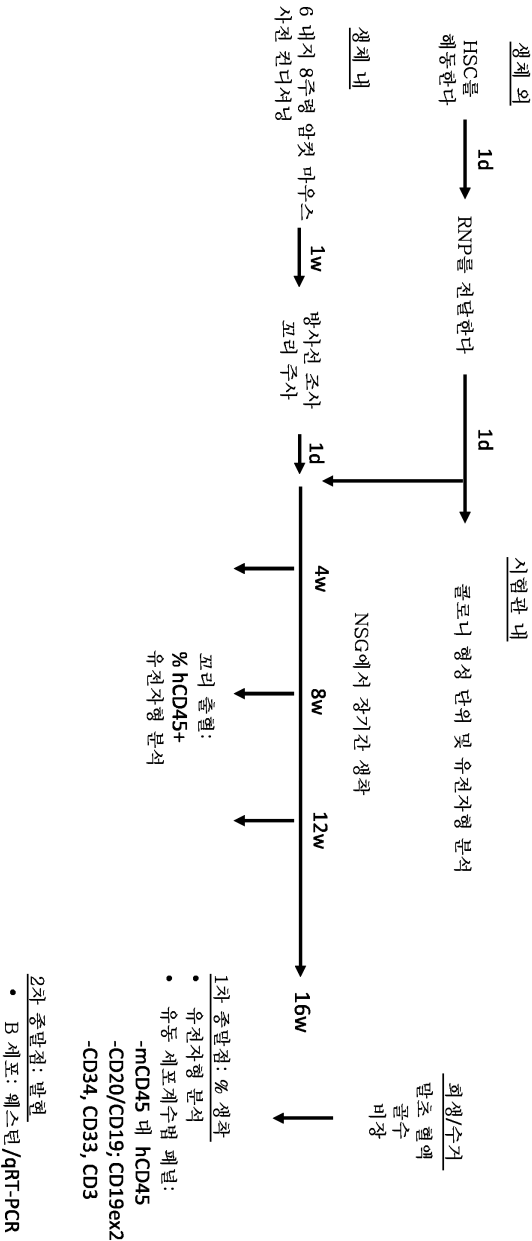
도면10i



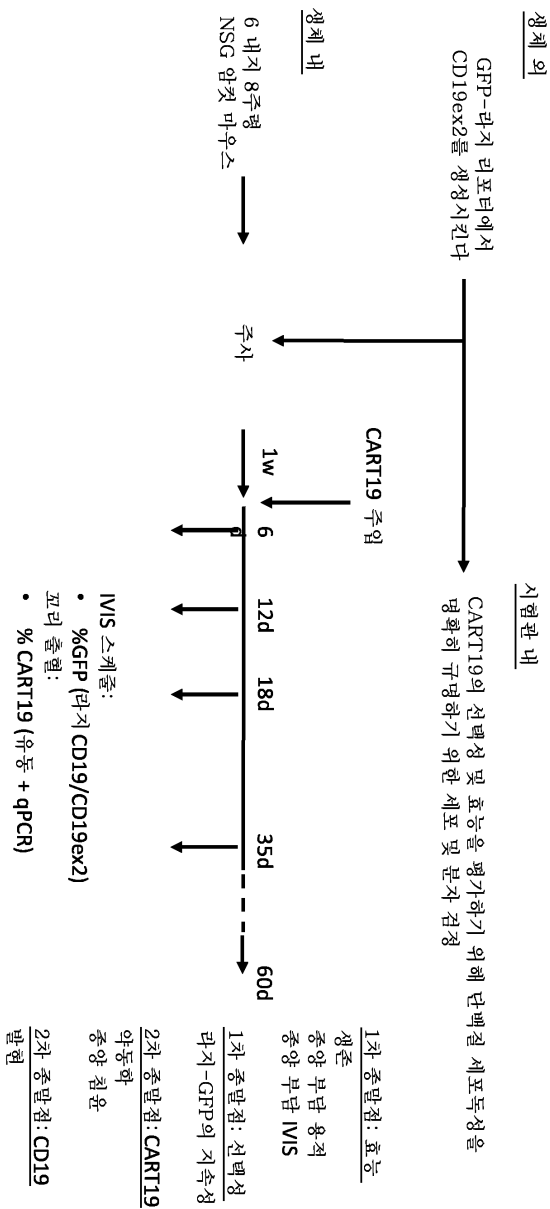
도면10ii



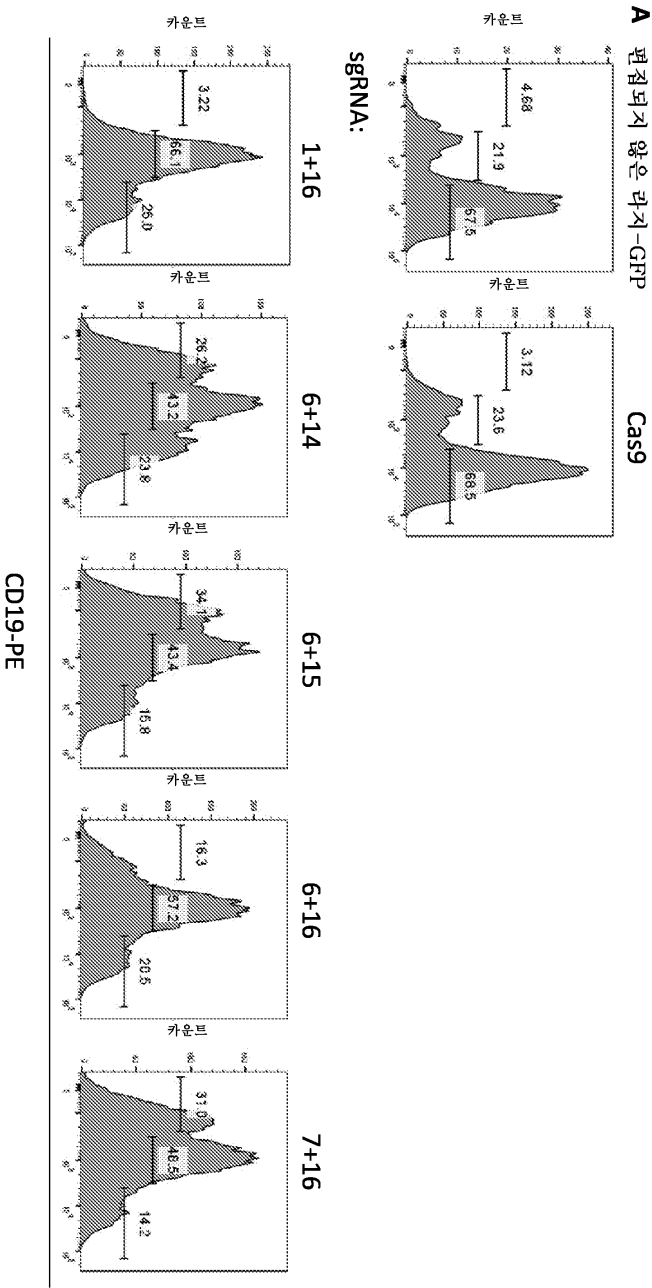
도면11



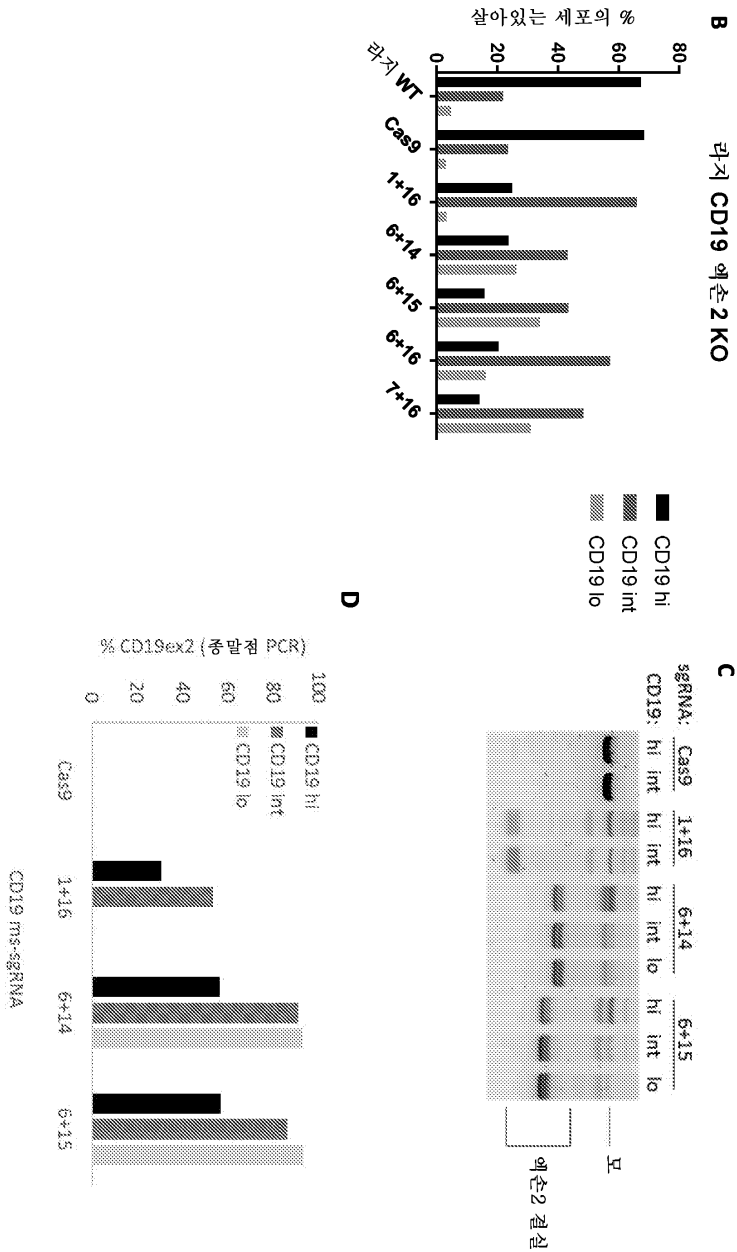
도면12



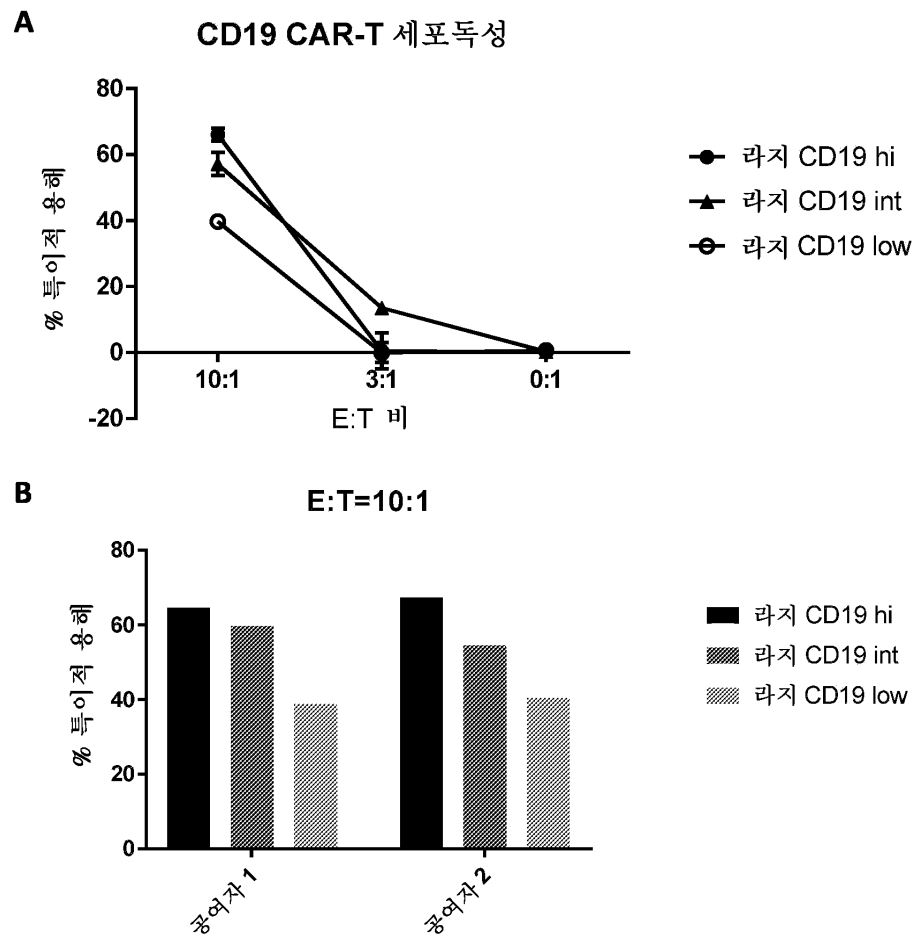
도면13i



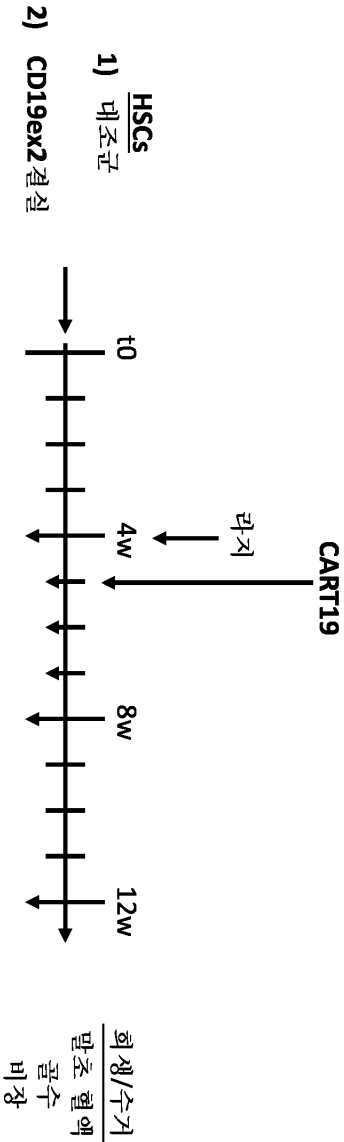
도면13ii



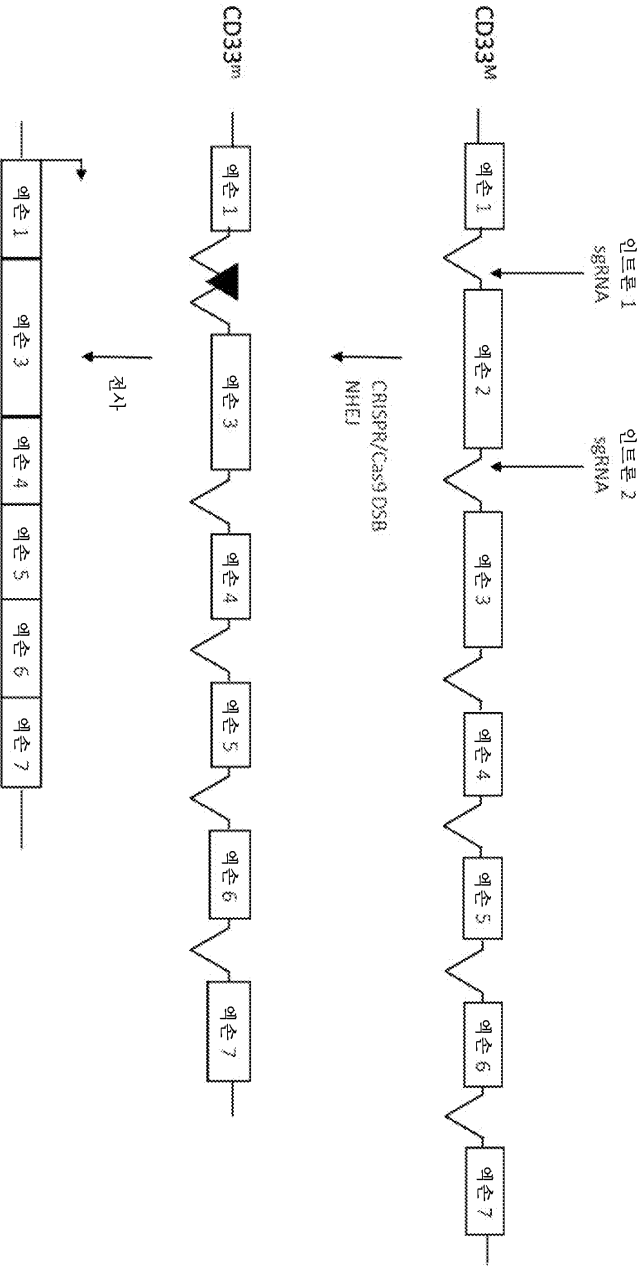
도면14



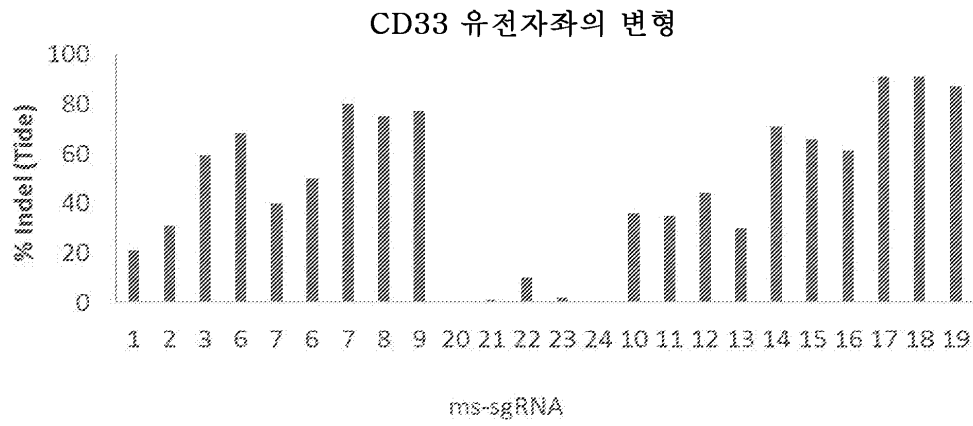
도면15



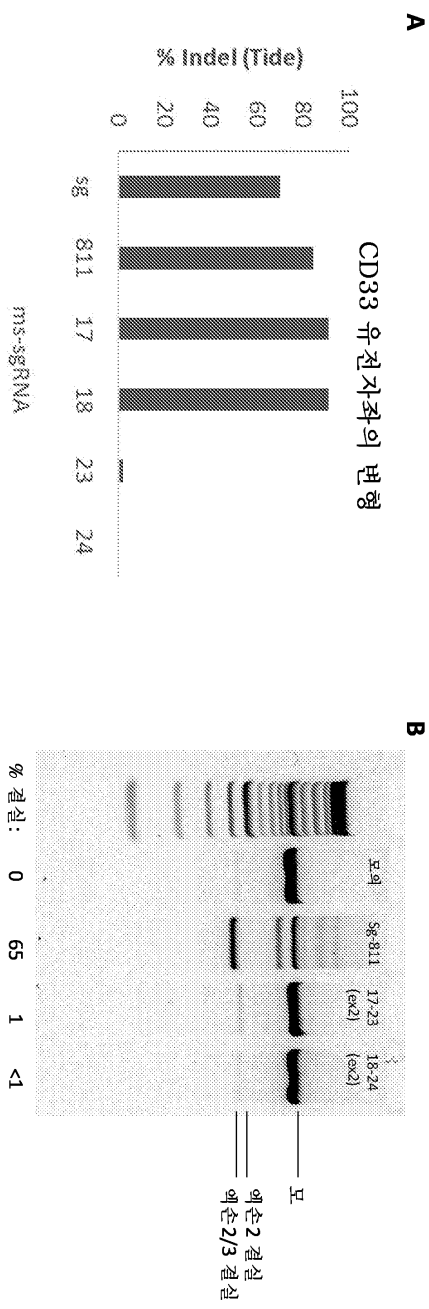
도면16



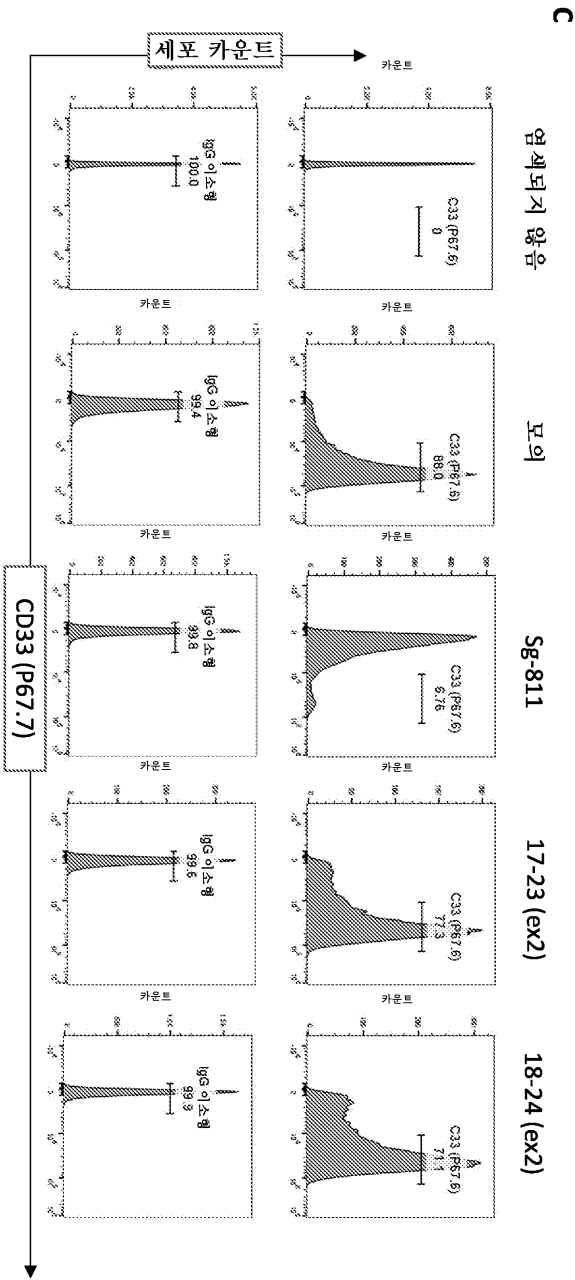
도면17



도면18i



도면18ii



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Vor Biopharma, Inc.
- <120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR INHIBITION OF LINEAGE SPECIFIC PROTEINS
- <130> V0291.70001W000
- <140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/464,975

<151> 2017-02-28

<160> 51

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 363

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 1

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

1 5 10 15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln

20 25 30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro

35 40 45

Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly

50 55 60

Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg

130 135 140

Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn

145 150 155 160

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

165 170 175
 Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr
 180 185 190
 His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr
 195 200 205

 Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu
 210 215 220
 Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr
 225 230 235 240
 Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly
 245 250 255
 Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala
 260 265 270

 Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys
 275 280 285
 Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly
 290 295 300
 Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr
 305 310 315 320
 Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu
 325 330 335

 Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys
 340 345 350
 Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr
 355 360

 <210> 2
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 2
 Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala

1 5 10 15
 Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln

 20 25 30
 Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro
 35 40 45
 Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly
 50 55 60
 Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln
 65 70 75 80
 Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro

 85 90 95
 Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp
 100 105 110
 Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser
 115 120 125
 Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg
 130 135 140
 Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn

 145 150 155 160
 Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile
 165 170 175
 Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr
 180 185 190
 His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr
 195 200 205
 Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu

 210 215 220
 Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr
 225 230 235 240
 Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Thr Ala Arg Asn Asp Thr Arg Ala Gly
 245 250 255

Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala
260 265 270

Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys
275 280 285

Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly
290 295 300

Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr
305 310 315 320

Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu
325 330 335

Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys
340 345 350

Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln
355 360

<210> 3
<211> 364
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 3

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala
1 5 10 15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln
20 25 30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Val Pro
35 40 45

Phe Phe Glu Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly
50 55 60

Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln
65 70 75 80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg

130

135

140

Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn

145

150

155

160

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

165

170

175

Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr

180

185

190

His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr

195

200

205

Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu

210

215

220

Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr

225

230

235

240

Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Thr Ala Arg Asn Asp Thr Arg Ala Gly

245

250

255

Val Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala

260

265

270

Leu Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys

275

280

285

Ala Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly

290

295

300

Ser Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr

305

310

315

320

Glu Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu

325

330

335

Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys

340

345

350

Asp Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln

355

360

<210> 4

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 4

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

1

5

10

15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln

20

25

30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro

35

40

45

Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly

50

55

60

Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

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

115

120

125

Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg

130

135

140

Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn

145

150

155

160

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

165 170 175
 Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr
 180 185 190
 His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr
 195 200 205
 Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu
 210 215 220
 Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr

 225 230 235 240
 Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Arg Ala Gly Val Val His Gly Ala
 245 250 255
 Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala Leu Cys Leu Cys Leu
 260 265 270
 Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys Ala Ala Arg Thr Ala
 275 280 285
 Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly Ser Ala Ser Pro Lys

 290 295 300
 His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr Glu Thr Ser Ser Cys
 305 310 315 320
 Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu Glu Leu His Tyr Ala
 325 330 335
 Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys Asp Thr Ser Thr Glu
 340 345 350
 Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln
 355

<210> 5

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 5

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

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

 50 55 60
 Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln
 65 70 75 80
 Glu Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro
 85 90 95
 Ser Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp
 100 105 110
 Asn Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser

 115 120 125
 Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg
 130 135 140
 Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn
 145 150 155 160
 Leu Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile
 165 170 175
 Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr

 180 185 190
 His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr
 195 200 205
 Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu
 210 215 220
 Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr
 225 230 235 240
 Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Ala Gly Val Val His Gly Ala

 245 250 255

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

305 310 315 320
Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu Glu Leu His Tyr Ala
325 330 335
Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys Asp Thr Ser Thr Glu
340 345 350
Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln
355

<210> 6

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 6

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

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

65 70 75 80
Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro Ser Arg Asn Asn Cys
85 90 95

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

340 345 350

Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln

355

<210> 7

<211> 359

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 7

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

1 5 10 15

Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln

20 25 30

Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro

35 40 45

Tyr Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly

50 55 60

Ala Ile Ile Ser Arg Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Tyr Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg

130 135 140

Pro Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn

145 150 155 160

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

165 170 175

Phe Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr

180 185 190
His Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr
195 200 205
Asn Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu

210 215 220
Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr
225 230 235 240
Gly Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gly Val Val His Gly Ala
245 250 255
Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala Leu Cys Leu Cys Leu
260 265 270
Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys Ala Ala Arg Thr Ala

275 280 285
Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly Ser Ala Ser Pro Lys
290 295 300
His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr Glu Thr Ser Ser Cys
305 310 315 320
Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu Glu Leu His Tyr Ala
325 330 335
Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys Asp Thr Ser Thr Glu

340 345 350
Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln

355
<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic polypeptide
<400> 8
Ser Gly Lys Gln Glu
1 5
<210> 9

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 9
 Ile Pro Tyr Tyr Asp
 1 5
 <210> 10
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > Synthetic polypeptide
 <400> 10
 Gly Lys Gln Glu Thr
 1 5
 <210> 11
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 11
 Lys Gln Glu Thr Arg
 1 5
 <210> 12
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 12
 Pro Tyr Tyr Asp Lys
 1 5
 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 13

Gln Glu Thr Arg Ala

1 5

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 14

gaggctggaa acttgagttg 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 15

gagggttaagt tactcagcca 20

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 16

aaattcagga aagggttgga 20

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 17

aagggttgga aggactctgc 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 18
 agcagaggac tccaaaagct 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA

 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 19
 cacaccaggt tatagagcag 20
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 20
 ctgctctata acctggtgtg 20
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 21
 acctggtgtg aggagtcggg 20

 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide

| | |
|-------------------------------------|----|
| <400> 22 | |
| cacagcgtaa tctccctctg | 20 |
| <210> 23 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Synthetic polynucleotide | |
| <400> 23 | |
| cggacctctt ctgtccatgg | 20 |
| <210> 24 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Synthetic polynucleotide | |
| <400> 24 | |
| ccatggacag aagaggtccg | 20 |
| <210> 25 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Synthetic polynucleotide | |
| <400> 25 | |
| gggcgaaact cggagctagg | 20 |
| <210> 26 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Synthetic polynucleotide | |
| <400> 26 | |
| gctaggtggg cagactcctg | 20 |
| <210> 27 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 27

gctgtgggga gaggggttgt

20

<210> 28

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 28

ctgtggggag aggggttgct

20

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 29

tggggaacg agggtcagct

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 30

gggccctgt ggggaaacga

20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polynucleotide

<400> 31

agggccctg tgggaaacg

20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 32
 gctgaccctc gttcccccac 20
 <210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 33
 ctgaccctcg ttcccccaca 20
 <210> 34
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 34
 tgaccctcgt ttcccccacag 20
 <210> 35
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 35
 ccatagccag ggcccctgtg 20
 <210> 36
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 36
 gcatgtgaca ggtgaggcac 20

<210> 37
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 37
 tgaggcacag gcttcagaag 20
 <210> 38
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 38
 aggcttcaga agtggccgca 20
 <210> 39
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 39
 ggcttcagaa gtggccgcaa 20
 <210> 40
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 40
 gtacccatga acttccttg 20
 <210> 41
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 41

| | |
|-------------------------------------|----|
| gtggccgcaa ggaagtcca | 20 |
| <210> 42 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Synthetic polynucleotide | |
| <400> 42 | |
| tggccgaag ggaagttcat | 20 |
| <210> 43 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Synthetic polynucleotide | |
| <400> 43 | |
| ggaagttcat ggtactgca | 20 |
| <210> 44 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Synthetic polynucleotide | |
| <400> 44 | |
| ttcatgggta ctgcaggcca | 20 |
| <210> 45 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> Synthetic polynucleotide | |
| <400> 45 | |
| ctaaaccct cccagtaacca | 20 |
| <210> 46 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |

<220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 46
 cactcacctg cccacagcag 20
 <210> 47
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 47
 ccctgctgtg ggcaggtgag 20
 <210> 48
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 48
 tgggcaggtg agtggctgtg 20
 <210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 49
 ggtgagtggc tgtggggaga 20
 <210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polynucleotide
 <400> 50
 gtgagtggct gtggggagag 20
 <210> 51
 <211> 281
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 51

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

1 5 10 15
Met Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln

20 25 30
Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Asn

35 40 45
Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala Ile Ile Ser Arg

50 55 60
Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln Glu Val Gln Glu Glu

65 70 75 80
Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro Ser Arg Asn Asn Cys

85 90 95
Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn Gly Ser Tyr Phe

100 105 110
Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Tyr Lys Ser Pro Gln

115 120 125
Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg Pro Lys Ile Leu Ile

130 135 140
Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn Leu Thr Cys Ser Val

145 150 155 160
Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile Phe Ser Trp Leu Ser

165 170 175
Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr His Ser Ser Val Leu

180 185 190
Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr Asn Leu Thr Cys Gln

195 200 205
Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg Thr Ile Gln Leu

210 215 220

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asn | Val | Thr | Tyr | Val | Pro | Gln | Asn | Pro | Thr | Thr | Gly | Ile | Phe | Pro | Gly |
| 225 | | | | | 230 | | | | | 235 | | | | | 240 |
| Asp | Gly | Ser | Gly | Lys | Gln | Glu | Thr | Arg | Ala | Gly | Val | Val | His | Gly | Ala |
| | | | | 245 | | | | 250 | | | | | 255 | | |
| Ile | Gly | Gly | Ala | Gly | Val | Thr | Ala | Leu | Leu | Ala | Leu | Cys | Leu | Cys | Leu |
| | | | | 260 | | | | 265 | | | | | 270 | | |
| Ile | Phe | Phe | Ile | Val | Lys | Thr | His | Arg | | | | | | | |
| | | | | 275 | | | | 280 | | | | | | | |