(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0093337
(43) 공개일자 2022년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/17 (2014.01) *A61K 45/06* (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7018144
(22) 출원일자(국제) 2020년11월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년05월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/058565
(87) 국제공개번호 WO 2021/087466
국제공개일자 2021년05월06일
(30) 우선권주장
62/928,524 2019년10월31일 미국(US)

(71) 출원인
더 리서치 인스티튜트 앳 네이션와이드 칠드런스 하스피탈
미국 43205 오하이오주 콜럼버스 칠드런스 드라이브 700 룸 더블유172
더 존스 홉킨스 유니버시티
미국 메릴랜드주 21218 볼티모어 노쓰 찰스 스트리트 3400
(72) 발명자
리 딘 앤소니
미국, 오하이오 43110, 카날 윈체스터, 2561 시털리 로드
카라로우디 메이삼 나에이미
미국, 오하이오 43240, 콜럼버스, 아파트먼트 10110, 8372 시애틀 애비뉴
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

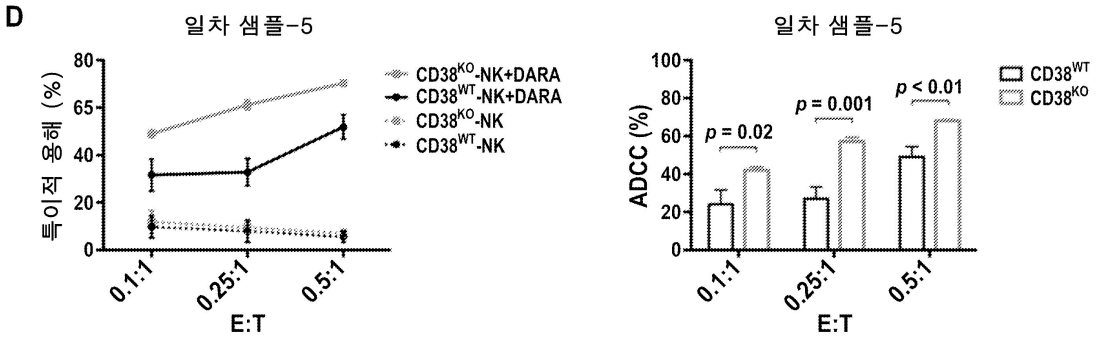
전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **CD38 녹아웃 일차 및 확장된 인간 NK 세포의 생성**

(57) 요 약

분화 클러스터 38(CD38) 유전자의 녹아웃을 포함하는 유전적으로 변형된 NK 세포 및 이를 사용하여 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하나, 이에 제한되지 않는 암을 치료하는 방법이 개시된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/02 (2018.01)
C12N 5/0646 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)
(72) 발명자
기아우어 가브리엘
미국, 메릴랜드 21209, 발티모어, 7520 스트림 크로싱 로드
나가이 유야
미국, 메릴랜드 21209, 발티모어, 아파트먼트 102, 6600 카퍼 릿지 드라이브

명 세 서

청구범위

청구항 1

CD38 유전자의 녹아웃을 포함하도록 변형된 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 대상체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 암은 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상 세포 종양(BPDCN)을 포함하는 것인, 암을 치료하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, CD38을 표적화하는 소분자, 항체, 펩티드, 단백질, 또는 siRNA를 포함하는 항암제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 암을 치료하는 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항암제는 다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 또는 MOR202를 포함하는 것인, 암을 치료하는 방법.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 대상체에게 혈관신생 억제제 및 스테로이드를 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 암을 치료하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 혈관신생 억제제는 포말리도마이드, 레날리도마이드, 또는 아프레밀라스트를 포함하는 것인, 암을 치료하는 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 스테로이드는 글루코코르티코이드를 포함하는 것인, 암을 치료하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 글루코코르티코이드는 덱사메타손, 베타메타손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 트리암시놀론, 또는 플루드로코르티손 아세테이트를 포함하는 것인, 암을 치료하는 방법.

청구항 9

조작된 NK 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 입양 전달하는 방법으로서, 상기 방법은

a) 변형될 표적 NK 세포를 수득하는 단계;

b) 상기 표적 DNA 서열에 대해 특이적인 gRNA를 수득하는 단계;

c) 전기천공을 통해 상기 표적 NK 세포 내로, 조작된 NK 세포를 생성하는 상기 표적 NK 세포의 게놈 DNA 내의 표적 서열에 혼성화되는 상응하는 CRISPR/Cas 가이드 RNA와 복합체화된 클래스 2 CRISPR/Cas 엔도뉴클레아제(Cas9)를 포함하는 RNP 복합체를 도입하는 단계; 및

d) 상기 조작된 NK 세포를 대상체 내로 전달하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 대상체는 암에 걸린 것인, 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 NK 세포는 생체외에서 변형되고 변형 후에 대상체로 전달된 일차 NK 세포인 것인, 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 NK 세포는 자가 NK 세포인 것인, 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 NK 세포는 동종이계 공여자 공급원 유래의 것인, 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 NK 세포는 대상체로 투여되기 전에 조사된 mbIL-21 발현 피더 세포로 확장되는 것인, 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 NK 세포는 IL-21 또는 조사된 mbIL-21 발현 피더세포의 투여를 통해 대상체로 NK 세포의 전달 후에 상기 대상체에서 확장되는 것인, 방법.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 RNP 복합체는 CD38 유전자를 표적화하는 것인, 방법.

청구항 17

제9항 내지 제16항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 분화 클러스터 38(CD38)을 암호화하는 유전자의 녹아웃을 포함하는, 유전적으로 변형된 NK 세포.

청구항 18

제17항의 유전적으로 변형된 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, CD38을 표적화하는 소분자, 항체, 펩티드, 단백질, 또는 siRNA를 포함하는 항암제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 항암제는 항-CD38 항체를 포함하는 것인, 암을 치료하는 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 항-CD38 항체는 다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 또는 MOR202를 포함하는 것인, 암을 치료하는 방법.

청구항 22

제18항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암은 다발성 골수종, 급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하는 것인, 암을 치료하는 방법.

청구항 23

제17항의 유전적으로 변형된 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 항-CD38 면역요법을 받는 대상체에서 NK 세포 동족살해를 감소시키는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **I. 관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 1. 본 출원은 2019년 10월 31일자로 출원된 미국 가출원 번호 제62/928,524호에 대해 이익을 주장하며, 이는 본원에 참조로 명시적으로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] **II. 배경**

[0004] 2. 암 면역요법은 최근에 발전되었다. 유전적으로-변형된 키메라 항원 수용체(CAR) T 세포는 암 면역요법에서 성공적으로 활용되는 조작된 면역 세포의 탁월한 예이다. 이들 세포는 $CD19^+$ B 세포 악성종양에 대한 치료를 위해 FDA에 의해 최근에 승인되었지만, 성공은 지금까지 몇 가지 표적화가능한 항원을 보유하는 질환으로 제한되었으며, 이러한 제한된 항원성 레퍼토리의 표적화는 면역회피에 의해 실패하기 쉽다. 또한, CAR T 세포는 동종이계 T 세포에 의해 야기된 이식편대숙주병의 위험 때문에 자가 T 세포의 사용에 중점을 두었다. 대조적으로, NK 세포는 항원-독립적인 방식으로 종양 표적을 사멸시킬 수 있고 GvHD를 야기하지 않아, 이는 암 면역요법에 양호한 후보가 된다. 항체와 결합되는 경우, NK 세포 및 항체의 표적화 및 이펙터 기전은 CAR T 세포의 것과 유사하다. 불행히도, 일부 암의 경우, 현재 치료법이 암을 표적으로 할 뿐만 아니라, 환자의 NK 세포 집단을 고갈시킬 수도 있다. 다라투무맙은, 예를 들어, 다발성 골수종 세포 및 백혈병에서 높은 수준으로 발견되는 CD38을 표적으로 한다. 다라투무맙의 항종양 활성은 NK 세포에 의존적이다. 그러나, CD38은 NK 세포의 표면 상에서도 높은 수준으로 발현되며, 다라투무맙의 투여는 NK 세포 동족살해(fratricide)를 초래하여 다라투무맙의 효과를 제한한다. 따라서, NK 세포 동족살해의 문제점을 극복할 수 있는 새로운 면역요법 및/또는 치료 방법이 필요하다.

발명의 내용

[0005] **III.요약**

[0006] 3. CD38 유전자의 녹아웃을 포함하는 유전적으로 변형된 NK 세포와 관련된 방법 및 조성물이 개시된다.

[0007] 4. 일 측면에서, CD38 유전자의 녹아웃을 포함하도록 변형된 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 (예를 들어, 다발성 골수종, (급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하나, 이에 제한되지 않는) 백혈병과 같은) 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 측면에서, 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하는 방법은 (예를 들어, 다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 및/또는 MOR202를 포함하나, 이에 제한되지 않는 항-CD38 항체와 같은) CD38을 표적화하는 소분자, 항체, 펩티드, 단백질, 또는 siRNA를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0008] 5. 또한, 대상체에게 (예를 들어, 포말리도마이드, 레날리도마이드, 또는 아프레밀라스트와 같은) 혈관신생 억제제 및 (예를 들어, 덱사메타손, 베타메타손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 트리암시놀론, 또는 플루드로코르티손 아세테이트를 포함하나, 이에 제한되지 않는 글루코코르티코이드와 같은) 스테로이드를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 임의의 선행하는 측면의 (예를 들어, 다발성 골수종, (급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하나, 이에 제한되지 않는) 백혈병과 같은) 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하는 방법이 본원에 개시된다.

[0009] 6. 일 측면에서, CD38 유전자의 녹아웃을 포함하도록 변형된 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, CD38을 직접적으로 발현하지 않지만, 암 미세환경의 다른 세포 (골수성-유래 억제 세포(MDSC)를 포함하나, 이에 제한되지 않음)가 표적화될 수 있는 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하는 방법이 본원에 개시된다.

[0010] 7. 일 측면에서, (예를 들어, CD38과 같은) NK 세포의 표적 DNA 서열에 대해 특이적인 가이드 RNA(gRNA)를 수득하는 단계; 및 b) 전기천공을 통해 상기 표적 NK 세포 내로, CD38 녹아웃 일차 또는 확장된 NK 세포를 생성하는 상기 NK 세포의 게놈 DNA 내의 표적 서열에 혼성화되는 상응하는 CRISPR/Cas 가이드 RNA와 복합체화된 클래스 2 CRISPR/Cas 엔도뉴클레아제(Cas9)를 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체를 도입하는 단계를 포함하는, (예를 들어, 일차 또는 확장된 NK 세포와 같은) NK 세포를 유전적으로 변형시키는 방법이 본원에 개시된다.

[0011] 8. 또한, NK 세포의 게놈은 하나 이상의 염기쌍의 삽입 또는 결실에 의해, 이종성 DNA 단편 (예를 들어, 공여자 폴리뉴클레오티드)의 삽입에 의해, 내인성 DNA 단편의 결실에 의해, 내인성 DNA 단편의 역전 또는 전좌에 의해,

또는 이들의 조합에 의해 변형되는 임의의 선행하는 측면의 방법이 본원에 개시된다.

[0012] 9. 일 측면에서, 임의의 선행하는 측면의 NK 세포를 유전적으로 변형시키는 방법이 본원에 개시되며, 상기 NK 세포 (예를 들어, 일차 또는 확장된 NK 세포)는 형질도입 (예컨대, 전기천공) 전에 4, 5, 6, 또는 7일 동안 IL-2 및/또는 조사된(irradiated) 피더세포의 존재하에서 인큐베이션된다.

[0013] 10. 또한, 전기천공 후 조사된 막 결합 인터류킨-21 (mbIL-21)을 발현하는 피더세포로 변형된 NK 세포를 확장하는 단계를 추가로 포함하는, 임의의 선행하는 측면의 NK 세포를 유전적으로 변형시키는 방법이 본원에 개시된다.

[0014] 11. 일 측면에서, 임의의 선행하는 측면의 방법으로 제조된 변형된 NK 세포가 본원에 개시된다. 일 측면에서, 변형된 NK 세포는 CD38을 암호화하는 유전자의 녹아웃을 포함할 수 있다. 예를 들어, 또 다른 측면에서, 의약으로서 사용하기 위한, 바람직하게는 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하기 위한, 본원에 개시된 바와 같은 분화 클러스터 38(CD38)을 암호화하는 유전자의 녹아웃을 포함하는 유전적으로 변형된 NK 세포가 본원에 개시된다. 또 다른 측면에서, (i) 이를 필요로 하는 대상체에서 산화적 호흡 용량을 증가시키는 방법, 또는 (ii) 세포외 NAD 가수분해를 제한하고 이를 필요로 하는 대상체에서 산화환원 호흡 용량을 개선시키는 방법에 사용하기 위한 본원에 개시된 바와 같은 분화 클러스터 38(CD38)을 암호화하는 유전자의 녹아웃을 포함하는 유전적으로 변형된 NK 세포가 본원에 개시된다. 동일한 방식으로, 의약의 제조에 있어서, 바람직하게는 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 개시된 바와 같은 분화 클러스터 38(CD38)을 암호화하는 유전자의 녹아웃을 포함하는 유전적으로 변형된 NK 세포의 용도가 또한 본원에 개시된다. 또 다른 측면에서, (i) 이를 필요로 하는 대상체에서 산화적 호흡 용량을 증가시키기 위한, 또는 (ii) 세포외 NAD 가수분해를 제한하고 이를 필요로 하는 대상체에서 산화환원 호흡 용량을 개선시키기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 개시된 바와 같은 분화 클러스터 38(CD38)을 암호화하는 유전자의 녹아웃을 포함하는 유전적으로 변형된 NK 세포의 용도가 본원에 개시된다.

[0015] 12. 임의의 선행하는 측면의 변형된 NK 세포 (예컨대, CD38 녹아웃 NK 세포)를 암에 걸린 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, (예를 들어, 다발성 골수종, (급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하나, 이에 제한되지 않는) 백혈병과 같은) 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하는 방법이 또한 본원에 개시된다. 일부 측면에서, 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하는 방법은 (예를 들어, 다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 및/또는 MOR202를 포함하나, 이에 제한되지 않는 항-CD38 항체와 같은) CD38을 표적화하는 소분자, 항체, 펩티드, 단백질, 또는 siRNA를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0016] 13. 일 측면에서, (예를 들어, CD38 녹아웃 NK 세포와 같은) 임의의 선행하는 측면의 변형된 NK 세포 및 (예를 들어, 다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 및 MOR202를 포함하나, 이에 제한되지 않는 항-CD38과 같은) CD38을 표적화하는 소분자, 항체, 펩티드, 단백질, 또는 siRNA를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, (예를 들어, 포말리도마이드, 레날리도마이드, 또는 아프레밀라스트와 같은) 혈관신생 억제제 및 (예를 들어, 덱사메타손, 베타메타손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 트리암시놀론, 또는 플루드로코르티손 아세테이트를 포함하나, 이에 제한되지 않는 글루코코르티코이드와 같은) 스테로이드를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, (예를 들어, 다발성 골수종, (급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하나, 이에 제한되지 않는) 백혈병과 같은) 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하는 방법이 본원에 개시된다.

[0017] 14. 임의의 선행하는 측면의 유전적으로 변형된 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 항-CD38 면역요법을 받는 대상체에서 NK 세포 동족살해를 감소시키는 방법이 또한 본원에 개시된다. 일 측면에서, 항-CD38 면역요법은 다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 및/또는 MOR202를 포함하나, 이에 제한되지 않는 항-CD38 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0018] 15. 일 측면에서, 조작된 NK 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 입양 전달하는 방법이 본원에 개시되며, 상기 방법은 a) 변형될 표적 NK 세포 (예컨대, 일차 NK 세포 또는 확장된 NK 세포)를 수득하는 단계; b) 표적 DNA 서열에 대해 특이적인 gRNA를 수득하는 단계; c) 전기천공을 통해 상기 표적 NK 세포 내로, (예를 들어, CD38 유전자가 녹아웃 되도록 변형된 NK 세포와 같은) 조작된 NK 세포를 생성하는 상기 표적 NK 세포의 게놈 DNA 내의 표적 서열에 혼성화되는 상응하는 CRISPR/Cas gRNA와 복합체화된 클래스 2 CRISPR/Cas 엔도뉴클레아제(Cas9)를 포함하는 RNP 복합체를 도입하는 단계; 및 d) 상기 조작된 NK 세포를 대상체 내로 전달하는 단계;를 포함한다.

[0019] 16. 또한, 조작된 NK 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 입양 전달 방법이 개시되며, (예를 들어, CD38 유전자가 녹아웃 되도록 변형된 NK 세포와 같은) 상기 NK 세포는 생체외에서 변형되고 변형 후에 대상체에게 전달되는 (예를 들어, 자가 NK 세포, 또는 동종이계 공여자 공급원으로부터의 NK 세포와 같은) 일차 NK 세포이다.

[0020] 17. 일 측면에서, 임의의 선행하는 측면의 조작된 NK 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 입양 전달하는 방법이 본원에 개시되어 있으며, 상기 NK 세포는 예컨대 조사된 mbIL-21 발현 피더세포와 함께, 시험관내에서, 또는 예컨대 대상체에게 IL-21의 투여 이전에, 변형된 NK 세포를 투여한 후 또는 투여함과 동시에, 생체내에서 확장된다.

[0021] 18. 일 측면에서, (예를 들어, CD38 녹아웃 NK 세포와 같은) 조작된 NK 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 입양 전달하는 방법이 본원에 개시되어 있으며, 상기 입양 전달된 변형된 NK 세포를 받는 대상체는 암을 가진다.

[0022] 19. 또한, (예를 들어, CD38 녹아웃 NK 세포와 같은) 임의의 선행하는 측면의 변형된 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, (예를 들어, 다발성 골수종, 백혈병(급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하나, 이에 제한되지 않음)과 같은) 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하기 위해 대상체에게 투여되는 (예를 들어, 소분자, 항체(다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 및/또는 MOR202를 포함하나, 이에 제한되지 않음), 펩티드, 단백질, 또는 CD38을 표적으로 하는 siRNA와 같은) 항-CD38 면역요법의 효능을 증가시키는 방법이 본원에 개시된다.

도면의 간단한 설명

[0023] **IV. 도면의 간단한 설명**

20. 본 명세서에 포함되고 그 일부를 구성하는 첨부 도면은 여러 구현예를 예시하고, 상기 설명과 함께 개시된 조성물 및 방법을 예시한다.

21. 도 1은 야생형 및 CD38-녹아웃 NK 세포에서의 CD38 발현을 보여준다.

22. 도 2는 야생형 및 CD38 녹아웃 NK 세포에서 다라투무맙-매개된 동족살해에 대한 내성의 비교를 보여준다.

23. 도 3은 도 4-6의 데이터를 기반으로, ADCC의 계산된 변화 (좌) 및 다발성 골수종 사멸에 대한 전반적인 효과 (우)를 보여준다.

24. 도 4는 다라투무맙의 존재 또는 부재 하에 야생형 및 CD38 녹아웃 NK 세포 둘 다에 대해 다양한 NK 세포 비율에서 RPMI 8226 인간 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 효과를 보여준다.

25. 도 5는 다라투무맙의 존재 또는 부재 하에 야생형 및 CD38 녹아웃 NK 세포 둘 다에 대해 다양한 NK 세포 비율에서 MM.1s 인간 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 효과를 보여준다.

26. 도 6은 다라투무맙의 존재 또는 부재 하에 야생형 및 CD38 녹아웃 NK 세포 둘 다에 대해 다양한 NK 세포 비율에서 H929 인간 다발성 골수종 세포를 사멸시키는 효과를 보여준다.

27. 도 7a-7b는 생체외 확장된 NK 세포의 면역표현형을 보여준다. 도 7a는 자극 14일 후 NK 세포의 순도를 나타낸다. 도 7b는 동일한 공여자의 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포에서 CD16 발현의 대표적인 FACS 분석을 보여준다. 각 도면은 CD16 발현 NK 세포의 백분율을 나타낸다. 동종형 대조군은 채워진 히스토그램으로 표시된다.

28. 도 8a-8d는 Cas9 리보핵단백질 복합체(Cas9/RNP)를 사용하여 생체외 확장된 말초 혈액 NK(PB-NK) 세포로부터 $CD38^{KO}$ NK 세포의 성공적인 생성을 보여준다.

29. 도 9는 Cas9/RNP에 의해 영향을 받는 유전자의 발현을 보여준다. 표 3에서 높게 영향을 받는 유전자의 RNA-seq에 따른 상대적인 mRNA 발현.

30. 도 10a-10f는 DARA-유도된 동족살해에 대한 $CD38^{KO}$ NK 세포의 내성을 보여준다. 도 10a는 접합 분석의 대표적인 FACS 분석을 보여준다. 도 10b는 접합 분석의 요약된 데이터를 나타냄을 보여준다 (n = 3, 평균 ± SD). 도 10c는 동족살해 분석의 대표적인 FACS 분석을 보여준다. 도 10d는 대조군 샘플과 비교하여 DARA로 처리된 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 생존력을 나타낸다 (n = 3, 평균 ± SD). 도 10e는 DARA 또는 식염수 처리 7일 후, NSG 마우스 말초 혈액(PB)의 대표적인 FACS 분석을 보여준다. 도 10f는 처리 동안 NSG 마우스에서 NK 세포 지속성의 요약된 데이터를 보여준다. 7일째에 PB에서 인간 NK 세포의 빈도와 9일째에 비장 및 골수에서의 그 절대

수를 나타낸다 (n = 5, 평균 ± SD).

31. 도 11a-11d는 DARA-유도된 동족살해에 대한 $CD16^{KO}$ NK 세포의 내성을 보여준다. 도 11a는 $CD16^{WT}$ 및 $CD16^{KO}$ NK 세포의 FACS 분석을 보여준다. 도 11b는 H929 세포주가 DARA (10㎍/ml)의 존재 또는 부재 하에 $CD16^{WT}$ 또는 $CD16^{KO}$ NK 세포와 4시간 동안 인큐베이션된 것을 나타낸다. 도 11c는 DARA의 존재 하에 H929 세포주에 대한 대응표본 $CD16^{WT}$ 및 $CD16^{KO}$ NK 세포의 ADCC 활성을 나타낸 것을 보여준다. 도 11d는 DARA (10㎍/ml)의 존재 하에 4시간 또는 24시간 동안 배양된 $CD16^{KO}$ NK 세포의 동족살해 증거를 나타낸 것을 보여준다.

32. 도 12a-12f는 MM 세포주 및 일차 MM 세포에 대한 $CD38^{KO}$ NK 세포의 향상된 DARA-매개 ADCC 활성을 보여준다. 도 12a는 NK 세포 및 골수종 세포주의 CD38 발현의 대표적인 FACS 분석을 보여준다. 각 도면은 평균 형광 강도 (MFI)를 보여준다. 동종형 대조군은 채워진 히스토그램으로 표시된다. 골수종 세포주 (도 12b-12c) 및 대표적인 일차 MM 샘플 (도 12d)에 대한 대응표본 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 세포독성 및 DARA-매개 ADCC 활성의 대표적인 데이터. 도 12e는 일차 MM 샘플에 대한 대응표본 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 ADCC 활성을 보여준다 (E:T 비율은 0.1:1임). 도 12f는 DARA의 존재 하에 일차 DARA-내성 MM 세포에 대한 대응표본 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 세포독성을 보여준다.

33. 도 13은 $CD38^{WT}$ NK 세포와 비교하여 $CD38^{KO}$ NK 세포의 ADCC 개선이 MM 세포 표적 상의 CD38 발현 수준과 상관관계가 있음을 보여준다. X축은 $CD38^{WT}$ NK 세포에 대한 표적 세포의 MFI (CD38)의 상대적 비율을 나타낸다. Y축은 $CD38^{WT}$ NK 세포와 비교하여 $CD38^{KO}$ NK 세포의 ADCC의 상대적인 증가를 나타낸다. ADCC의 값 (E/T = 5, 4시간-분석)은 MM.1S, H929, 및 OPM-2에 사용되며, ADCC의 값 (E/T = 0.1, 24시간-분석)은 RPMI8226 및 환자 샘플에 사용된다. 스피어만의 순위-상관계수 (r) 및 p 값이 표시된다.

34. 도 14는 ATRA와 인큐베이션 48시간 후 MM 세포주 상의 CD38 발현을 보여준다. 대조군 및 ATRA 처리된 샘플은 각각 검정색 및 회색 선으로 표시된다. 미염색된 대조군은 채워진 히스토그램으로 표시된다.

35. 도 15a-15g는 DARA-매개된 NK 세포성 세포독성에 대한 ATRA의 억제 효과를 나타낸다. 도 15a-15b는 48시간 동안 50 nM ATRA로 전처리된 골수종 세포주에 대한 대응표본 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 세포독성 및 DARA-매개된 ADCC 활성을 나타낸다 (평균 ± SD). 도 15c에서, 좌측 패널은 ATRA 치료 또는 치료하지 않는 동안 환자로부터의 NK 세포 ($CD3^{-}CD56^{+}$ 세포) 상의 CD38 발현의 대표적인 FACS 분석 데이터를 보여준다. 동결된 말초 혈액 단핵 세포를 해동하여 한번에 분석하였다. 우측 패널은 3명의 다른 환자에 대한 요법이 없는 경우와 비교하여 ATRA 요법 동안 NK 세포의 MFI (CD38)의 배수 증가를 보여준다. 도 15는 50 nM ATRA 또는 용매 대조군과 인큐베이션 48시간 후 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포 상의 CD38 발현의 대표적인 FACS 분석 데이터를 보여준다. 대조군 및 ATRA 처리된 샘플은 각각 검정색 및 회색 선으로 표시된다. 미염색된 대조군은 채워진 히스토그램으로 표시된다. 도 15e는 대조군 샘플과 비교하여 50 nM ATRA 또는 용매 대조군의 존재 하에 48시간 동안 DARA로 처리된 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 생존력을 보여준다 (평균 ± SD). 도 15f-15g는 50 nM ATRA 또는 용매 대조군의 존재 하에 48시간-세포독성 분석에서 골수종 세포주에 대한 대응표본 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 세포독성 및 DARA-매개 ADCC 활성을 나타낸다. E:T 비율은 MM.1S의 경우 0.25:1이고, KMS-11의 경우 0.5:1이다 (평균 ± SD).

36. 도 16a-16d는 $CD38^{KO}$ NK 세포의 유리한 대사 재프로그래밍을 나타낸다. 도 16a는 대응표본 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 정규화된 RNA-seq 데이터를 기반으로 한 독창성 경로 분석(Ingenuity Pathway Analysis, IPA)에 의해 결정된 바와 같이 현저하게 변경된 경로(콜레스테롤 생합성 및 OXPHOS)의 DEG 히트맵을 보여준다 (n = 6). 도 16b는 광범위한 공여자 간 변동성에도 불구하고, 각 공여자에 대한 CD38 결실의 일관된 효과를 나타내는, DEG의 주성분 분석을 보여준다. 도 16c는 대응표본 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 대사 분석의 요약된 데이터를 보여준다 (n = 3, 평균 ± SD). 도 16d는 도 16c에서 파생된 기본 OCR, ECAR, OCR/ECAR 및 SRC의 그래프 분석을 보여준다. 모든 실험은 5회 반복을 사용하여 달성되었다. 도 16e-16f는 OCR 및 SRC (도 16e), 및 ECAR 및 해당 과정 예비 (도 16f)를 포함하는, 추가 3명의 공여자의 분석을 보여준다. 도 16g는 6명의 공여자 모두의 OCR 및

SRC 분석을 보여준다.

37. 도 17은 6개의 상이한 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포 쌍의 정규화된 RNA-seq 데이터의 볼케이노 플롯(volcano plot)을 나타낸다. $CD38^{WT}$ NK 세포와 비교하여 $CD38^{KO}$ NK 세포에서 가장 현저하게 변경된 유전자가 표시된다.

38. 도 18은 DARA 처리 동안 재발된 사례로부터의 MM 세포의 CD38 발현을 나타낸다. DARA-내성 사례로부터의 NK 세포 및 BMSC를 FITC로 표지된 다중-에피토프 항-CD38 항체로 염색한 다음, APC로 표지된 항-FITC 항체로 염색하였다. MM 세포는 CD138+ 세포로 정의되었다. 염색된 샘플의 MFI(CD38) 및 형광 마이너스 원(FMO) (다중-에피토프 항-CD38 항체 없음) 대조군이 표시된다.

39. 도 19는 CD38의 결실이 NAD 재순환을 감소시켜, NAD/NADH 비율을 증가시킨다는 것을 보여준다.

40. 도 20은 증가된 미토콘드리아 활성을 암시하는 산화 대사로의 현저한 대사 이동에도 불구하고, CD38 녹아웃이 미토콘드리아 막 전위를 변경하지 않는다는 것을 나타낸다.

41. 도 21은 산화 대사로의 현저한 대사 이동에도 불구하고, CD38 녹아웃이 저-글루코스 설정에서 NK 세포 기능을 변경하지 않는다는 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] **V. 상세한 설명**

[0025] 42. 본 화합물, 조성물, 물품, 장치, 및/또는 방법이 개시되고 기술되기 전에, 이들은 달리 명시되지 않는 한 특정 합성 방법 또는 특정 재조합 생명공학 방법, 또는 달리 명시되지 않는 한 특정 시약에 제한되지 않으며, 물론 다양할 수 있음이 이해되어야 한다. 또한, 본원에 사용된 용어는 단지 특정 구현예를 기술하기 위한 것이며, 이를 제한하는 것으로 의도되지 않음이 이해되어야 한다.

[0026] **A.정의**

[0027] 43. 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 명백하게 달리 지시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "약제학적 담체"에 대한 언급은 둘 이상의 상기 담체의 혼합물 등을 포함한다.

[0028] 44. 범위는 본원에서 "약" 하나의 특정 값으로부터, 및/또는 "약" 또 다른 특정 값까지 표현될 수 있다. 이러한 범위가 표현될 때, 또 다른 구현예는 하나의 특정 값으로부터 및/또는 다른 특정 값까지를 포함한다. 유사하게, 값이 근사값으로 표현될 때, 선행사 "약"의 사용에 의해, 특정 값이 또 다른 구현예를 형성함을 이해할 것이다. 각각의 범위의 종점은 다른 종점과 관련하여, 그리고 다른 종점과는 독립적으로 모두 중요하다는 것이 추가로 이해될 것이다. 또한, 본원에 다수의 값이 개시되어 있으며, 각각의 값은 또한 값 자체에 추가하여 그 특정 값 "약"으로서 본원에 개시되어 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 값 "10"이 개시되는 경우, "약 10"이 또한 개시된다. 또한, 값이 개시되는 경우, 값 "이하", "값 이상" 및 값 사이의 가능한 범위가 당업자에 의해 적절하게 이해되는 바와 같이 또한 개시되는 것으로 이해된다. 예를 들어, 값 "10"이 개시되는 경우, "10 이하" 뿐만 아니라 "10 이상"이 또한 개시된다. 또한, 본 출원 전반에 걸쳐, 데이터는 다수의 상이한 포맷으로 제공되고, 이 데이터는 종점 및 시작점, 및 데이터 포인트의 임의의 조합에 대한 범위를 나타내는 것으로 이해된다. 예를 들어, 특정 데이터 포인트 "10" 및 특정 데이터 포인트 15가 개시되는 경우, 10 및 15 초과, 10 및 15 이상, 10 및 15 미만, 10 및 15 이하, 및 10 및 15가 개시될 뿐만 아니라 10 내지 15인 것으로 간주되는 것으로 이해된다. 또한, 2개의 특정 단위 사이의 각 단위가 또한 개시되는 것으로 이해된다. 예를 들어, 10 및 15가 개시되는 경우, 11, 12, 13, 및 14는 또한 개시된다.

[0029] 45. 본 명세서 및 하기 청구범위에서, 하기 의미를 갖는 것으로 정의되는 다수의 용어에 대한 참조가 이루어질 것이다:

[0030] 46. "임의의" 또는 "임의로"는 후속적으로 설명되는 이벤트 또는 상황이 발생할 수 있거나 발생하지 않을 수 있고, 상기 설명은 상기 이벤트 또는 상황이 발생하는 경우 및 발생하지 않는 경우를 포함함을 의미한다.

[0031] 47. "프라이머"는 일부 유형의 효소적 조작을 지지할 수 있고, 효소적 조작이 일어날 수 있도록 표적 핵산과 혼성화할 수 있는 프로브의 하위집합이다. 프라이머는 효소적 조작을 방해하지 않는, 당업계에서 이용가능한 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체 또는 유사체의 임의의 조합으로부터 제조될 수 있다.

[0032] 48. "프로브"는 예를 들어 혼성화를 통해, 전형적으로 서열 특이적 방식으로, 표적 핵산과 상호작용할 수 있는 분자이다. 핵산의 혼성화는 당업계에서 잘 이해되고 본원에서 논의된다. 전형적으로 프로브는 당업계에서 이용 가능한 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체 또는 유사체의 임의의 조합으로부터 제조될 수 있다.

[0033] 49. 특정 RNA를 "암호화하는" DNA 서열은 RNA로 전사되는 DNA 핵산 서열이다. DNA 폴리뉴클레오티드는 단백질로 번역되는 RNA (mRNA)를 암호화할 수 있고 (따라서 DNA 및 mRNA 둘 다는 단백질을 암호화함), 또는 DNA 폴리뉴클레오티드는 단백질로 번역되지 않는 RNA (예를 들어 tRNA, rRNA, 마이크로RNA (miRNA), "비-암호화" RNA (ncRNA), 가이드 RNA 등)를 암호화할 수 있다.

[0034] 50. "단백질 암호화 서열" 또는 특정 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 서열은, mRNA (DNA의 경우에)로 전사되고 적절한 조절 서열의 제어 하에 놓일 때 시험관내에서 또는 생체내에서 폴리펩티드로 (mRNA의 경우에) 번역되는 핵산 서열이다. 암호화 서열의 경계는 5' 말단 (N-말단)의 시작 코돈 및 3' 말단 (C-말단)의 번역 정지 넌센스 코돈에 의해 결정된다. 암호화 서열은 원핵생물 또는 진핵생물 mRNA로부터의 cDNA, 원핵생물 또는 진핵생물 DNA로부터의 게놈 DNA 서열, 및 합성 핵산을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 전사 종결 서열은 일반적으로 암호화 서열의 3'에 위치할 것이다.

[0035] 51. 핵산, 폴리펩티드, 세포, 또는 유기체에 적용되는 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "자연 발생" 또는 "비변형된" 또는 "야생형"은, 자연에서 발견되는 핵산, 폴리펩티드, 세포, 또는 유기체를 지칭한다. 예를 들어, 자연의 공급원으로부터 분리될 수 있고, 실험실에서 인간에 의해 의도적으로 변형되지 않은 유기체 (바이러스 포함)에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 야생형 (및 자연 발생)이다.

[0036] 52. "증가시키다"는 더 많은 양의 증상, 질환, 조성, 병태 또는 활성을 초래하는 임의의 변화를 지칭할 수 있다. 증가는 통계적으로 유의한 양의 병태, 증상, 활성, 조성에서의 임의의 개별값, 중앙값 또는 평균 증가일 수 있다. 따라서, 증가는 그 증가가 통계적으로 유의한 한, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 또는 100% 증가일 수 있다.

[0037] 53. "감소시키다"는 더 작은 양의 증상, 질환, 조성, 병태 또는 활성을 초래하는 임의의 변화를 지칭할 수 있다. 물질이 있는 유전자 산물의 유전적 결과물이 물질이 없는 유전자 산물의 결과물에 비해서 적은 경우 물질은 또한 유전자의 유전적 결과물을 감소시키는 것으로 이해된다. 또한 예를 들어, 감소는 이전에 관찰된 것보다 증상이 덜하도록 하는 장애 증상의 변화일 수 있다. 감소는 통계적으로 유의한 양의 병태, 증상, 활성, 조성에서의 임의의 개별값, 중앙값 또는 평균 감소일 수 있다. 따라서, 감소는 그 감소가 통계적으로 유의한 한, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 또는 100% 감소일 수 있다.

[0038] 54. 용어 "대상체"는 투여 또는 치료의 표적인 임의의 개체를 지칭한다. 대상체는 척추동물, 예를 들어, 포유동물일 수 있다. 일 측면에서, 대상체는 인간, 비-인간 영장류, 소, 말, 돼지, 개 또는 고양이일 수 있다. 대상체는 기니피그, 랫트, 햄스터, 토끼, 마우스 또는 두더지일 수도 있다. 따라서, 대상체는 인간 또는 수의학적 환자일 수 있다. 용어 "환자"는 임상의, 예를 들어, 의사의 치료 하에 있는 대상체를 지칭한다.

[0039] 55. 용어 "치료"는 질환, 병리학적 병태 또는 장애를 치유, 개선, 안정화 또는 예방할 의도를 가진 환자의 의학적 관리를 지칭한다. 이 용어는 적극적인 치료, 즉, 구체적으로 질환, 병리학적 병태 또는 장애의 개선에 대한 치료를 포함하며, 원인 치료, 즉, 관련 질환의 원인, 병리학적 병태 또는 장애의 제거에 대한 치료를 또한 포함한다. 또한 이 용어는 완화적 치료, 즉, 질환, 병리학적 병태 또는 장애의 치유가 아니라 증상의 완화를 위해 설계된 치료; 예방적 치료, 즉, 관련 질환, 병리학적 병태 또는 장애의 발생을 최소화하거나 부분적으로 또는 완전히 억제하는 치료; 및 지지적 치료, 즉, 관련 질환, 병리학적 병태 또는 장애의 개선에 대한 또 다른 특정 요법을 보완하기 위해 사용되는 치료를 포함한다.

[0040] 56. 대상체에 대한 "투여"는 대상체에게 약제를 도입하거나 전달하는 임의의 경로를 포함한다. 투여는 경구, 국소, 정맥내, 피하, 경피, 피부경유, 근육내, 관절내, 비경구, 세동맥내, 피부내, 뇌실내, 두개내, 복강내, 병변내, 비강내, 직장, 질내, 흡입에 의해, 이식된 저장소를 통해, 비경구(예를 들어, 피하, 정맥내, 근육내, 관절내, 활막내, 흉골내, 척추강내, 복강내, 간내, 병변내 및 두개내 주사 또는 주입 기술) 등을 비롯한 임의의 적합한 경로에 의해 수행될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "동반 투여", "조합 투여", "동시 투여" 또는 "동시에 투여되는"은 화합물이 동일한 시점에 투여되거나 본질적으로 서로 직후에 투여됨을 의미한다. 후자의 경우, 두 화합물은 관찰된 결과가 동일한 시점에 화합물을 투여할 때 달성된 결과와 구별할 수 없을 정도로 충분히 가까운 시간에 투여된다. "전신 투여"는 예를 들어, 순환계 또는 림프계로의 진입을 통해서, 대상체 신체

의 광범위한 영역 (예를 들어, 신체의 50% 초과)에 약제를 도입하거나 전달하는 경로를 통해 대상체에게 약제를 도입하거나 전달하는 것을 지칭한다. 대조적으로, "국소 투여"는 투여 지점에 바로 인접한 영역 또는 영역에 약제를 도입하거나 전달하는 경로를 통해 대상체에게 약제를 도입하거나 또는 전달하는 것을 지칭하며, 치료적으로 유의한 양의 약제를 전신으로 도입하지 않는다. 예를 들어, 국부적으로 투여된 약제는 투여 지점의 국부적 부근에서 쉽게 검출될 수 있지만, 대상체 신체의 원위 부분에서는 검출될 수 없거나 무시해도 될 정도의 양으로 검출될 수 있다. 투여는 자가 투여 및 타인에 의한 투여를 포함한다.

[0041] 57. 약제의 "유효량"은 원하는 효과를 제공하기에 충분한 약제의 양을 지칭한다. "유효한" 약제의 양은 많은 인자 예컨대 대상체의 연령 및 일반적인 병태, 특정 약제 또는 약제 등에 따라 대상체마다 다를 것이다. 따라서, 정량화된 "유효량"을 항상 지정할 수 있는 것은 아니다. 그러나, 임의의 대상체 경우에서 적절한 "유효량"은 정례적인 실험을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다. 또한, 본원에 사용된 바와 같이, 그리고 달리 구체적으로 언급되지 않는 한, 약제의 "유효량"은 또한 치료적 유효량 및 예방적 유효량 둘 다를 포괄하는 양을 지칭할 수 있다. 치료 효과를 달성하는데 필요한 약제의 "유효량"은 인자 예컨대 대상체의 연령, 성별, 및 체중에 따라 달라질 수 있다. 투약 요법은 최적의 치료적 반응을 제공하기 위해 조정될 수 있다. 예를 들어, 여러 분할 용량은 매일 투여될 수 있거나, 용량은 치료적 상황의 긴급성에 의해 지시된 바와 같이 비례하여 감소될 수 있다.

[0042] 58. "약제학적으로 허용가능한" 성분은 생물학적으로 또는 달리 원하지 않은 성분을 지칭할 수 있으며, 즉, 성분은 본 발명의 약제학적 제형에 혼입될 수 있고 유의한 원하지 않은 생물학적 효과 또는 이것이 함유된 제형의 다른 성분 중 임의의 것과 함께 해로운 방식으로 상호작용을 야기하지 않고 본원에 기재된 바와 같이 대상체에 투여될 수 있다. 인간에 대한 투여와 관련하여 사용될 때, 용어는 일반적으로 성분이 독성 및 제조 테스트의 필수 표준을 충족하였거나 미국 식품의약국에 의해 준비된 비활성 성분 가이드에 포함되어 있음을 시사한다.

[0043] 59. "약제학적으로 허용가능한 담체" (때때로 "담체"로서 지칭됨)는 일반적으로 안전하고 비-독성인 약학적 또는 치료적 조성물을 제조하는데 유용한 담체 또는 부형제를 의미하며, 수의학적으로 허용가능한 담체 및/또는 인간 약학적 또는 치료적 용도를 포함한다. 용어 "담체" 또는 "약제학적으로 허용가능한 담체"는 인산염 완충 식염수 용액, 물, 에멀젼 (예컨대, 오일/물 또는 물/오일 에멀젼) 및/또는 다양한 유형의 습윤제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "담체"는 임의의 부형제, 희석제, 충전제, 염, 완충제, 안정화제, 가용화제, 지질, 안정화제, 또는 약학 제형에 사용하기 위해 당업계에 널리 공지되어 있고, 본원에 추가로 기재된 바와 같은 기타 물질을 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0044] 60. "약리학적 활성" (또는 간단히 "활성")은 "약리학적 활성" 유도체 또는 유사체에서와 같이 모 화합물과 동일한 유형의 약리학적 활성을 가지며 정도가 대략적으로 동등한 유도체 또는 유사체 (예를 들어, 염, 에스테르, 아미드, 접합체, 대사산물, 이성질체, 단편 등)를 지칭할 수 있다.

[0045] 61. "치료제"는 유익한 생물학적 효과를 갖는 임의의 조성물을 지칭한다. 유익한 생물학적 효과는 치료적 효과, 예를 들어, 장애 또는 기타 바람직하지 않은 생리학적 병태의 치료, 및 예방적 효과, 예를 들어, 장애 또는 기타 바람직하지 않은 생리학적 병태 (예를 들어, 비-면역원성 암)의 예방 둘 다를 포함한다. 용어는 또한 염, 에스테르, 아미드, 전구약제, 활성 대사산물, 이성질체, 단편, 유사체 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 본원에 구체적으로 언급된 유익한 약제의 약제학적으로 허용가능한, 약리학적 활성 유도체를 포함한다. 용어 "치료제"가 사용되는 경우, 또는 특정 약제가 구체적으로 확인되는 경우, 용어는 약제 자체 뿐만 아니라 약제학적으로 허용가능한 약리학적 활성 염, 에스테르, 아미드, 전구약제, 접합체, 활성 대사산물, 이성질체, 단편, 유사체 등을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0046] 62. 조성물 (예를 들어, 약제를 포함하는 조성물)의 "치료적 유효량" 또는 "치료적 유효 용량"은 원하는 치료적 결과를 달성하는데 효과적인 양을 지칭한다. 일부 구현예에서, 원하는 치료적 결과는 I형 당뇨병의 제어이다. 일부 구현예에서, 원하는 치료적 결과는 비만의 제어이다. 주어진 치료제의 치료적 유효량은 전형적으로 인자, 예컨대, 치료되는 장애 또는 질환의 유형 및 중증도 및 대상체의 연령, 성별 및 체중에 따라 달라질 것이다. 이 용어는 또한 원하는 치료적 효과, 예컨대, 통증 완화를 촉진하는데 효과적인 치료제의 양, 또는 치료제의 전달 속도 (예를 들어, 시간 경과에 따른 양)를 지칭할 수 있다. 정확한 원하는 치료적 효과는 치료될 병태, 대상체의 내성, 투여될 약제 및/또는 약제 제형 (예를 들어, 치료제의 효능 및 제형 중 약제의 농도 등), 및 당업자에 의해 인식되는 다양한 기타 인자에 따라 달라질 것이다. 일부 경우에, 원하는 생물학적 또는 의학적 반응은 수일, 수주 또는 수년의 기간에 걸쳐 대상체에 조성물의 다중 투여량을 투여한 후에 달성된다.

[0047] 63. 본 출원 전반에 걸쳐, 다양한 간행물이 참조된다. 이들 간행물의 개시는 이에 관련된 최신 기술을 보다 완전하게 설명하기 위해 본 출원에 참조로 포함된다. 개시된 참고문헌은 또한 참고문헌에 의존하는 문장에서 논의

된 내용에 함유된 자료에 대해 개별적으로 그리고 구체적으로 참조로 포함된다.

[0048] **B. CD38 녹아웃 NK 세포를 투여하는 단계를 포함하는 암 치료 방법**

[0049] 64. 다발성 골수종은 가장 흔히 진단되는 혈액암 중 하나이다. 최근에, FDA는 다발성 골수종 치료를 위해 치료용 단클론성 항체인 다라투무맙을 승인하였다. 다라투무맙은 표적 암세포 상의 CD38 분자에 결합하고, 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC) 및 다른 기전을 통해 세포 사멸을 매개한다. 이사툭시맙, TAK-079, 및 MOR202를 포함한 다른 항-CD38 항체도 암 치료를 위해 개발 중이다. 상기 항체에 의해 유도된 ADCC는 NK 세포에 의해 매개된다. 그러나, CD38을 표적으로 하는 약제의 사용은 그 효과를 제한하는 부정적인 효과를 갖는다. NK 세포는 이들의 세포 표면 상에서 CD38을 발현하기 때문에, 이러한 항-CD38 항체의 사용은 이들의 효과에 대한 활성 성분인 NK 세포의 사멸(동족살해)을 야기한다.

[0050] 65. 상기 항-CD38 요법에 의한 NK 세포의 동족살해 문제를 극복하고 암을 치료하기 위해, CD38의 발현을 녹아웃시키도록 조작된 NK 세포의 투여는 상기 둘 다의 문제를 해결할 수 있는 것으로 인식되었다. 요컨대, 조작된 NK 세포는 항-CD38 면역요법에 의해 유발된 NK 세포 결핍에 내성이 있어 항-CD38 항체의 효능을 증가시킨다. 따라서, 일 측면에서, (예를 들어, CD38 녹아웃 NK 세포와 같은) 임의의 선행하는 측면의 변형된 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, (예를 들어, 다발성 골수종, (급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하나, 이에 제한되지 않는) 백혈병과 같은) 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하기 위해 대상체에게 투여된 (예를 들어, CD38을 표적화하는 소분자, (다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 및/또는 MOR202를 포함하나, 이에 제한되지 않는) 항체, 펩티드, 단백질, 또는 siRNA와 같은) 항-CD38 면역요법의 효능을 증가시키는 방법이 본원에 개시된다.

[0051] 66. 상기 증가된 효능이 암 환자에게 매우 유익한 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 따라서, 일 측면에서, 대상체에게 CD38 유전자의 녹아웃을 포함하도록 변형된 NK 세포를 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 (예를 들어, 다발성 골수종, (급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하나, 이에 제한되지 않는) 백혈병과 같은) 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 측면에서, 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하는 방법은 (예를 들어, 다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 및/또는 MOR202를 포함하나, 이에 제한되지 않는 항-CD38 항체와 같은) CD38을 표적화하는 소분자, 항체, 펩티드, 단백질, 또는 siRNA를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0052] 67. 본원에 사용된 바와 같은 "치료하다", "치료하는", "치료" 및 이들의 문법적 변형은 하나 이상의 질환 또는 병태, 질환의 강도 또는 빈도, 질환 또는 병태의 증상 또는 질환 또는 병태의 근본 원인을 부분적으로 또는 완전히 예방, 지연, 치료, 치유, 완화, 경감, 변경, 교정, 개선, 향상, 안정화, 진정 및/또는 감소시킬 의도 또는 목적으로 조성물을 투여하는 것을 포함한다. 본 발명에 따른 치료는 예방적으로, 예방학적으로, 완화적으로 또는 치료적으로 적용될 수 있다. 예방적 치료는 발병 전 (예를 들어, 암의 명백한 징후 전), 조기 발병 동안 (예를 들어, 암의 초기 징후 및 증상 시) 또는 확립된 암 발병 후에 대상체에게 투여된다. 예방적 투여는 감염의 증상이 나타나기 전 수 일(들)에서 수 년 동안 발생할 수 있다.

[0053] 68. "억제하다", "억제하는" 및 "억제"는 활성, 반응, 병태, 질환 또는 다른 생물학적 파라미터를 감소시키는 것을 의미한다. 이것은 활성, 반응, 병태 또는 질환의 완전한 절제를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 이것은 또한 예를 들어, 천연 또는 대조군 수준과 비교하여 활성, 반응, 병태 또는 질환의 10% 감소를 포함할 수 있다. 따라서, 감소는 천연 또는 대조군 수준과 비교하여 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100% 또는 그 사이의 임의의 양의 감소일 수 있다.

[0054] 69. "감소시키다" 또는 "감소시키는" 또는 "감소"와 같은 단어의 다른 형태는 이벤트 또는 특징 (예를 들어, 종양 성장)을 낮추는 것을 의미한다. 이것은 전형적으로 일부 표준 또는 예측 값과 관련이 있으며, 다시 말해서 이것은 상대적이지만, 참조될 표준 또는 상대 값이 항상 필요한 것은 아니라는 점을 이해해야 한다. 예를 들어, "종양 성장을 감소시키다"는 표준 또는 대조군에 비해 종양 성장 속도를 감소시키는 것을 의미한다.

[0055] 70. "예방하다" 또는 "예방하는" 또는 "예방"과 같은 단어의 다른 형태는 특정 이벤트 또는 특징을 중지시키거나, 특정 이벤트 또는 특징의 발달 또는 진행을 안정화시키거나 또는 지연시키거나, 또는 특정 이벤트 또는 특징이 발생할 가능성을 최소화하는 것을 의미한다. 예방하다는, 이것이 전형적으로 예를 들어, 감소시키는 것보다 더 절대적이므로, 대조군과 비교할 필요가 없다. 본원에 사용된 바와 같이, 무언가가 감소될 수 있지만, 예

방되지 않을 수 있고, 그러나 감소되는 무언가는 또한 예방될 수 있다. 마찬가지로, 무언가는 예방될 수 있지만, 감소되지 않을 수 있고, 그러나 예방되는 무언가는 또한 감소될 수 있다. 감소하다 또는 예방하다가 사용되는 경우, 달리 구체적으로 나타내지 않는 한, 다른 단어의 사용이 또한 명시적으로 개시되는 것으로 이해된다.

[0056] 71. 유전적으로 변형된 NK 세포 (예컨대, 본원에 개시된 CD38 녹아웃 NK 세포 중 임의의 것) 및 (예를 들어, 다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 및/또는 MOR202와 같은) 항-CD38 약제 및/또는 (예를 들어, 포말리도마이드, 레날리도마이드, 또는 아프레밀라스트와 같은) 혈관신생 억제제 및 (예를 들어, 덱사메타손, 베타메타손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 트리암시놀론, 또는 플루드로코르티손 아세테이트를 포함하나, 이에 제한되지 않는 글루코코르티코이드와 같은) 스테로이드, 및/또는 ATRA를 투여하는 단계를 포함하는, (예를 들어, 다발성 골수종, AML, T-ALL, 및/또는 BPDCN과 같은) 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하는 방법이 이해되고 본원에서 고려되며, 상기 유전적으로 변형된 NK 세포는 임의의 항-CD38 약제의 투여 전, 투여 중에 및/또는 투여 후에 투여될 수 있다. 일부 측면에서, 유전적으로 변형된 NK 세포 (예컨대, 본원에 개시된 CD38 녹아웃 NK 세포 중 임의의 것)는 임의의 항-CD38 약제의 투여 1분, 2분, 3분, 4분, 5분, 6분, 7분, 8분, 9분, 10분, 11분, 12분, 13분, 14분, 15분, 20분, 25분, 30분, 35분, 40분, 45분, 50분, 55분, 60분, 65분, 70분, 75분, 80분, 85분, 90분, 95분, 100분, 105분, 110분, 115분, 120분, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 9시간, 10시간, 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간, 16시간, 17시간, 18시간, 19시간, 20시간, 21시간, 22시간, 23시간, 24시간, 30시간, 36시간, 42시간, 48시간, 54시간, 60시간, 66시간, 72시간, 78시간, 84시간, 90시간, 96시간, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 30일, 31일, 35일, 42일, 49일, 54일, 또는 60일 전 또는 후에 대상체에게 투여될 수 있다.

[0057] 72. 또한, 대상체에게 (예를 들어, 포말리도마이드, 레날리도마이드, 또는 아프레밀라스트와 같은) 혈관신생 억제제 및 (예를 들어, 덱사메타손, 베타메타손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 트리암시놀론, 또는 플루드로코르티손 아세테이트를 포함하나, 이에 제한되지 않는 글루코코르티코이드와 같은) 스테로이드를 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 본원에 제시된 바와 같은 (예를 들어, 다발성 골수종, (급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하나, 이에 제한되지 않는) 백혈병과 같은) 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하는 방법이 본원에 개시된다.

[0058] 73. 개시된 변형된 NK 세포 및 변형된 NK 세포의 입양 전달 방법이 암에 대한 효과적인 면역요법일 수 있는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 개시된 방법 및 조성물은 암과 같이 조절되지 않는 세포 증식이 일어나는 임의의 질환을 치료하는데 사용될 수 있다. 다양한 유형의 암의 비제한적인 목록은 다음과 같다: 림프종(호지킨 및 비호지킨), 백혈병, 암종, 고형 조직의 암종, 편평 세포 암종, 선암종, 육종, 신경교종, 고급 신경교종, 모세포종, 신경모세포종, 형질세포종, 조직구종, 흑색종, 선종, 저산소성 종양, 골수종, AIDS-관련 림프종 또는 육종, 전이성 암, 또는 일반적인 암.

[0059] 74. 개시된 조성물이 치료에 사용될 수 있는 대표적이지만 암의 비제한적인 목록은 다음과 같다: 림프종, B 세포 림프종, T 세포 림프종, 균상식육종, 호지킨병, 골수성 백혈병 (AML을 포함하나, 이에 제한되지 않음), T-세포 급성 림프구성 백혈병 (T-ALL), 방광암, 모구 형질세포양 수지상세포 종양 (BPDCN), 뇌암, 신경계 암, 두경부암, 두경부의 편평 세포 암종, 폐암 예컨대 소세포 폐암 및 비-소세포 폐암, 신경모세포종/교모세포종, 난소암, 피부암, 다발성 골수종, 간암, 흑색종, 구강, 인후, 후두, 및 폐의 편평 세포 암종, 자궁경부암, 자궁경부암종, 유방암, 및 상피암, 신장암, 비뇨생식기암, 폐암(pulmonary cancer), 식도암종, 두경부암종, 대장암, 조혈암; 고환암; 결장암, 직장암, 전립선암, 또는 췌장암. 따라서, 일 측면에서, CD38 유전자의 녹아웃을 포함하도록 변형된 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 또는 예방하는 방법이 본원에 개시된다. 따라서, 일 측면에서, CD38 유전자의 녹아웃을 포함하도록 변형된 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 (예를 들어, 다발성 골수종, (급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하나, 이에 제한되지 않는) 백혈병과 같은) 암 및/또는 전이 또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 측면에서, 상기 방법은 (예를 들어, 다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 및 MOR202를 포함하나, 이에 제한되지 않는 항-CD38과 같은) CD38을 표적화하는 약제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 추가적으로, 상기 방법은 또한 대상체에게 (예를 들어, 포말리도마이드, 레날리도마이드, 또는 아프레밀라스트와 같은) 혈관신생 억제제 및 (예를 들어, 덱사메타손, 베타메타손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 트리암시놀론, 또는 플루드로코르티손 아세테이트와 같은) 글루코코르티코이드를 투여

하는 단계를 포함할 수 있다.

[0060] 75. 본원에 개시된 바와 같은 상기 NK 세포의 용도 또는 상기 용도를 위한 NK 세포의 일부 구현예에 있어서, 상기 NK 세포는 (i) (예를 들어, 다라투무맙, 이사툭시맙, MOR202, 및/또는 TAK-079를 포함하나, 이에 제한되지 않는 항-CD38 항체와 같은) CD38을 표적화하는 소분자, 항체, 펩티드, 또는 단백질 및/또는 (ii) (예를 들어, 포말리도마이드, 레날리도마이드, 또는 아프레밀라스트와 같은) 혈관신생 억제제 및 (예를 들어, 덱사메타손, 베타메타손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 트리암시놀론, 또는 플루드로코르티손 아세테이트를 포함하나, 이에 제한되지 않는 글루코코르티코이드와 같은) 스테로이드, 및/또는 (iii) ATRA로부터 선택되는 항암제와 조합하여 투여하기 위한 것이다.

[0061] 76. 일부 구현예에서, 항암제는 항-CD38 항체, 예컨대 이사툭시맙 또는 다라투무맙이다.

[0062] **C. NK 세포를 유전적으로 변형시키는 방법**

[0063] 77. CRISPR/CRISPR 연관된 (Cas) 단백질 9 (Cas9) 기술은 최근 면역 세포를 조작하는 데 사용되었으나, 플라스미드로 NK 세포를 유전적으로 재프로그래밍하는 것은 실질적인 절차-관련된 NK 세포 아폽토시스 및 유전적으로 조작된 NK 세포의 제한된 생성을 유발하는 렌티바이러스 및 레트로바이러스의 형질도입과 같은 DNA 의존적 방식으로 전이유전자 전달의 어려움 때문에 항상 도전적이었다. NK 세포를 재프로그래밍 (즉, 조작 또는 변형)하기 위해 (예를 들어, Cas9/RNP와 같은) 엔도뉴클레아제 리보핵단백질 복합체를 사용하여 일차 및 확장된 인간 NK 세포의 DNA가 없는 게놈 편집을 사용하는 방법이 본원에 기술된다.

[0064] 78. 엔도뉴클레아제/RNP (예를 들어, Cas9/RNP)는 CRISPR 유전자좌와 복합체화된 재조합 엔도뉴클레아제 단백질 (예를 들어, Cas9 엔도뉴클레아제)의 3가지 구성요소로 구성된다. CRISPR 유전자좌에 복합체화된 엔도뉴클레아제는 CRISPR/Cas 가이드 RNA로 지칭될 수 있다. CRISPR 유전자좌는 상보적 반복 RNA (crRNA) 및 트랜스 상보적 반복 RNA (tracrRNA)가 복합체화된 표적 서열에 혼성화할 수 있는 RNA로 구성된 합성 단일-가이드 RNA(gRNA)를 포함한다. 따라서, CRISPR/Cas 가이드 RNA는 세포의 게놈 DNA 내의 표적 서열에 혼성화한다. 일부 경우에, 클래스 2 CRISPR/Cas 엔도뉴클레아제가 II형 CRISPR/Cas 엔도뉴클레아제이다. 일부 경우에, 클래스 2 CRISPR/Cas 엔도뉴클레아제는 Cas9 폴리펩티드이고, 상응하는 CRISPR/Cas 가이드 RNA는 Cas9 가이드 RNA이다. 상기 Cas9/RNP는 이들의 기능적 복합체로서 전달되기 때문에 외래 DNA-의존적 접근 방식과 비교하여 더 높은 효율성으로 게놈 표적을 절단할 수 있다. 추가적으로, 세포에서 Cas9/RNP의 신속한 청소능은 아폽토시스 유도와 같은 표적외 효과를 감소시킬 수 있다. 따라서, 일 측면에서, NK 세포의 표적 DNA 서열에 대해 특이적인 가이드 RNA(gRNA)를 수득하는 단계; 및 b) 상기 표적 NK 세포 내로, 상기 NK 세포의 게놈 DNA 내의 표적 서열에 혼성화되는 상응하는 CRISPR/Cas 가이드 RNA와 복합체화된 클래스 2 CRISPR/Cas 엔도뉴클레아제(Cas9)를 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체를 형질도입 (예를 들어, 전기천공을 통해 도입)하는 단계를 포함하는, NK 세포를 유전적으로 변형시키는 방법이 본원에 개시된다.

[0065] 79. 본원에서 사용된 엔도뉴클레아제는 합성 Cas9에 전형적으로 사용되는 스트렙토코쿠스 피오게네스의 Cas9 (SpCas9)으로 제한되는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 일 측면에서, Cas9는 상이한 박테리아 공급원으로부터 유래할 수 있다. Cas9의 치환은 또한 표적화 특이성을 증가시키는데 사용될 수 있으므로, 더 적은 gRNA가 사용될 필요가 있다. 따라서, 예를 들어, Cas9는 스타필로코쿠스 아우레우스 (SaCas9), 악시다미노코쿠스 종 (AsCpf1), 라크노스피라카세 박테리움 (LbCpf1)으로부터 유래된 프리보텔라 및 프란시셀라 1 (Cpf1)의 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문식 반복부(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), 나이세리아 메닌기티디스 (NmCas9), 스트렙토코쿠스 써모필러스 (StCas9), 캄필로박터 제주니 (CjCas9), 향상된 SpCas9 (eSpCas9), SpCas9-HF1, FokI-융합된 dCas9, 확장된 Cas9 (xCas9), 및/또는 촉매적으로 사멸된 Cas9 (dCas9)로부터 유래될 수 있다. 추가적으로, 다른 Cas 엔도뉴클레아제는 예를 들어 CasX, CasY, Cas14, Cas4, Csn2, Cas13a, Cas13b, Cas13c, Cas13d, C2c1, 또는 C2c3과 같은 Cas9 시스템 대신에 사용하거나, 프라임 편집을 포함하는 임의의 다른 유형의 조작된 Cas 단백질을 사용할 수 있다.

[0066] 80. Cas9 뉴클레아제 활성을 표적 부위로 표적화하고 또한 공여자 플라스미드를 절단하여 공여자 전이유전자가 숙주 DNA로 재조합되도록 하기 위해, crispr RNA (crRNA)가 사용되는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 일부 경우에, crRNA는 tracrRNA와 조합되어 가이드 RNA (gRNA)를 형성한다. 개시된 플라스미드는 전이유전자의 통합을 위한 표적 부위로서 AAVS1로 지칭되는, 인간 염색체 19 상의 AAV 통합, 단백질 포스파타제 1의 인트론 1, 조절 서브유닛 12C (PPP1R12C) 유전자를 사용한다. 상기 유전자좌는 "세이프 하버 유전자(safe harbor gene)"이며, 많은 세포 유형에서 안정적이고, 장기간 전이유전자 발현을 허용한다. PPP1R12C의 파괴는 임의의 알려진 질환과 관련이 없기 때문에, AAVS1 유전자좌는 전이유전자 표적화를 위한 세이프-하버로 종종 간주된다.

AAVS1 부위는 표적 위치로서 사용되고 있기 때문에, CRSPR RNA (crRNA)는 상기 DNA를 표적으로 해야 한다. 여기서, 개시된 플라스미드에 사용되는 가이드 RNA는 GGGGCCACTAGGGACAGGAT (서열번호: 2) 또는 임의의 10개의 뉴클레오티드 센스 또는 이의 안티센스 인접 단편을 포함한다. AAVS1이 본원에서 예시적인 목적을 위해 사용되지만, 다른 "세이프 하버 유전자"는 동등한 결과로 사용될 수 있고, 형질감염되는 특정 세포 유형 또는 전이유전자가 더 적절하게 주어진 경우 AAVS1로 대체될 수 있는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 다른 세이프 하버 유전자의 예는, C-C 케모카인 수용체 유형 5 (CCR5), ROSA26 유전자좌, 및 TRAC를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다.

[0067] 81. 표적 게놈에 전달되는 공여자 전이유전자 작제물 크기에 대한 크기 제한이 있을 수 있음이 이해되고 본원에서 고려된다. 전이유전자의 허용가능한 크기를 증가시키는 하나의 방법은 합성 Cas9, 또는 상이한 박테리아 공급원으로부터의 Cas9에 전형적으로 사용되는 스트렙토코쿠스 피오게네스의 Cas9 (SpCas9)를 교환하여 추가 공간을 만드는 것이다. Cas9의 치환은 또한 표적화 특이성을 증가시키는데 사용될 수 있으므로, 더 적은 gRNA가 사용될 필요가 있다. 따라서, 예를 들어, Cas9는 스타필로코쿠스 아우레우스 (SaCas9), 악시다미노코쿠스 종 (AsCpf1), 라크노스피라카세 박테리움 (LbCpf1), 나이세리아 메닌기티디스 (NmCas9), 스트렙토코쿠스 써모필러스 (StCas9), 캄필로박터 제주니 (CjCas9), 향상된 SpCas9 (eSpCas9), SpCas9-HF1, Fokl-융합된 dCas9, 확장된 Cas9 (xCas9), 및/또는 촉매적으로 사멸된 Cas9 (dCas9)로부터 유래될 수 있다.

[0068] 82. 특정 Cas9의 사용은 Cas9 엔도뉴클레아제 (또는 대안)가 표적을 스크리닝하기 위해 사용되는 PAM 서열을 변경할 수 있음이 이해되고 본원에서 고려된다. 본원에 사용된 바와 같이, 적합한 PAM 서열은 NGG (SpCas9 PAM) NNGRRT (SaCas9 PAM) NNNNGATT (NmCAs9 PAM), NNNNRYAC (CjCas9 PAM), NNAGAAW (St), TTTV (LbCpf1 PAM 및 AsCpf1 PAM); TYCV (LbCpf1 PAM 변이체 및 AsCpf1 PAM 변이체)을 포함하고; 상기 N은 임의의 뉴클레오티드; V = A, C, 또는 G; Y = C 또는 T; W = A 또는 T; 및 R = A 또는 G일 수 있다.

[0069] 83. RNP 복합체를 만들기 위해, crRNA 및 tracrRNA는 약 5분 동안 95C에서 약 50 μM 내지 약 500μM (예를 들어, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 35, 375, 400, 425, 450, 475, 또는 500μM), 바람직하게는 100 μM 내지 약 300 μM, 가장 바람직하게는 약 200 μM의 1:1, 2:1, 또는 1:2 비율의 농도로 혼합되어 crRNA:tracrRNA 복합체 (즉, 가이드 RNA)를 형성할 수 있다. 이후, crRNA:tracrRNA 복합체는 약 20μM 내지 약 50μM (예를 들어 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47 48, 49, 또는 50μM) 최종 희석의 (예를 들어, Cas9과 같은) Cas 엔도뉴클레아제와 혼합될 수 있다.

[0070] 84. 표적 세포의 표적 서열에 결합되면, CRISPR 유전자좌는 이종성 DNA 단편 (예를 들어, 공여자 폴리뉴클레오티드)의 삽입에 의해, 내인성 DNA 단편의 결실에 의해, 내인성 DNA 단편의 역전 또는 전좌에 의해, 또는 이들의 조합에 의해 하나 이상의 염기쌍의 표적 DNA 삽입 또는 결실에 도입함으로써 게놈을 변형시킬 수 있다. 따라서, 개시된 방법은 상동성 재조합을 위해 DNA와 조합될 때 녹아웃(knock-out) 또는 녹인(knock-in)을 생성하는데 사용될 수 있다. Cas9/RNP의 전기천공을 통한 형질도입은 NK 세포에서 유전적 변형의 이전 제약을 극복하는 쉽고 상대적으로 효율적인 방법이라는 것이 본원에서 보여진다.

[0071] 85. 개시된 방법은 자연살해세포 (NK 세포), T 세포, B 세포, 대식세포, 섬유아세포, 골아세포, 간세포, 신경세포, 상피 세포, 및/또는 근육 세포를 포함하는 임의의 세포 유형과 함께 이용될 수 있음이 이해되고 본원에서 고려된다. 인간 NK 세포는 CD56 또는 CD16의 발현 및 T 세포 수용체 (CD3)의 부재에 의해 정의되는 말초 혈액 림프구의 하위집합이다. NK 세포는 주조직적합성 복합체 (MHC)-클래스 I 분자가 결여된 표적 세포를 감지하고 사멸시킨다. NK 세포 활성화 수용체는, 그 중에서도, 천연 세포독성 수용체 (NKp30, NKp44 및 NKp46), 및 렉틴-유사 수용체 NKG2D 및 DNAM-1을 포함한다. 이들의 리간드는 스트레스 받은, 형질전환된, 또는 감염된 세포 상에서 발현되지만, 정상 세포에서는 발현되지 않아, 정상 세포가 NK 세포 사멸에 대해 내성을 갖도록 한다. 일 측면에서, 표적 세포는 공여자 공급원 (예컨대, 입양 전달 요법을 위한 동종이계 공여자 공급원 또는 자가 공여자 공급원 (즉, 변형된 NK 세포의 최종 수령자), NK 세포주 (NK RPMI8866; HFWT, K562, 및 EBV-LCL을 포함하나, 이에 제한되지 않음)로부터, 또는 일차 NK 세포 공급원 또는 NK 세포주로부터 유래된 확장된 NK 세포의 공급원으로부터 일차 NK 세포일 수 있다.

[0072] 86. NK 세포의 형질도입 전에, NK 세포는 NK 세포의 증식에 적합한 배지에서 배양될 수 있다. 배양 조건은 사이토카인, 항체, 및/또는 피더세포의 첨가를 포함할 수 있는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 따라서, 일 측면에서, NK 세포의 증식을 지지하는 배지에서 세포를 형질도입하기 전에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일 동안 NK 세포를 인큐베이션하는 단계를 추가로 포함하는, NK 세포를 유전적으로 변형시키는

방법이 본원에 개시되며; 상기 배지는 사이토카인, 항체, 및/또는 피더세포를 추가로 포함한다. 예를 들어, 배지는 IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, 및/또는 IL-21을 포함할 수 있다. 일 측면에서, 배지는 또한 항-CD3 항체를 포함할 수 있다. 일 측면에서, 피더세포는 NK 세포를 자극하는 피더세포로부터 정제될 수 있다. 본원에 개시된, 청구된 발명에서 사용하기 위한 NK 세포 자극 피더세포는 조사된 자가 또는 동종이계 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 또는 비조사된 자가 또는 PBMC; RPMI8866; HFWT, K562; 막 결합된 IL-15, 및 41BBL, 또는 IL-21 또는 이들의 임의의 조합으로 형질감염된 K562 세포; 또는 EBV-LCL일 수 있다. 일부 측면에서, NK 세포는 IL-21, IL-15, 및/또는 41BBL의 용액과 조합하여 제공된 피더세포이다. 피더세포는 1:2, 1:1, 또는 2:1 비율로 NK 세포의 배양물에 씨딩될 수 있다. 배양 기간은 전기천공 후 1 내지 14 일 (즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일), 바람직하게는 3 내지 7일, 가장 바람직하게는 4 내지 6 일일 수 있는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다.

[0073] 87. 일차 NK 세포 및 확장된 NK 세포에 대한 인큐베이션 조건이 상이할 수 있음이 이해되고 본원에서 고려된다. 일 측면에서, 전기천공 전의 일차 NK 세포의 배양은 5일 미만 (예를 들어 1, 2, 3, 또는 4일) 동안 배지 및 사이토카인 (예컨대, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, 및/또는 IL-21) 및/또는 항-CD3 항체를 포함한다. 확장된 NK 세포의 경우, 배양은 (예를 들어, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, 및/또는 IL-21과 같은) 사이토카인 및/또는 항-CD3 항체에 추가하여 또는 그 대신에 (예를 들어, 1:1 비율로) NK 피더세포의 존재 하에 일어날 수 있다. 확장된 NK 세포의 배양은 형질도입 전 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10일 동안 일어날 수 있다. 따라서, 일 측면에서, 전기천공 전 IL-2의 존재 하에 4일 동안 일차 NK 세포를 인큐베이션하는 단계, 또는 전기천공 전 4, 5, 6, 또는 7일 동안 피더세포의 존재 하에 확장된 NK 세포를 인큐베이션하는 단계를 포함하는 NK 세포를 유전적으로 변형시키는 방법이 본원에 개시된다.

[0074] 88. 개시된 방법에서 NK 세포를 변형시키기 위한 형질도입 방법이 제한되는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 이들의 면역 기능으로 인해, NK 세포는 바이러스 및 박테리아 벡터 및 상기 벡터에 의한 NK 세포 아폽토시스의 유도에 내성이 있다. 따라서, 본 방법 이전에 NK 세포의 CRISPR/Cas 변형은 성공하지 못하였다. 바이러스 벡터의 문제를 피하기 위해, 개시된 방법은 전기천공을 사용하여 표적 NK 세포를 형질전환시킨다. 전기천공은 전기장을 세포에 가하여 세포막의 투과성을 증가시키는 기술이다. 전기장의 적용은 세포막을 가로질러 하전된 분자, 예컨대 핵산을 끌어당기는 멤브레인을 가로질러 전하 구배를 야기한다. 따라서, 일 측면에서, NK 세포의 표적 DNA 서열에 대해 특이적인 가이드 RNA(gRNA)를 수득하는 단계; 및 b) 전기천공을 통해 상기 표적 NK 세포 내로, 상기 NK 세포의 게놈 DNA 내의 표적 서열에 혼성화되는 상응하는 CRISPR/Cas 가이드 RNA와 복합체화된 클래스 2 CRISPR/Cas 엔도뉴클레아제(Cas9)를 포함하는 리보핵단백질(RNP) 복합체를 도입하는 단계를 포함하는, NK 세포를 유전적으로 변형시키는 방법이 본원에 개시된다.

[0075] 89. NK 세포의 형질도입 (예를 들어, 전기천공) 후, 현재 변형된 NK 세포는 변형된 NK 세포를 자극하는 피더세포를 포함하는 배지에서 증식될 수 있다. 따라서, 변형된 세포는 조사된 피더세포를 사용하여 전기천공 후 확장될 수 있기 때문에, 생존력과 증식 가능성을 유지한다. 본원에 개시된, 청구된 발명에서 사용하기 위한 NK 세포 자극 피더세포는 조사된 자가 또는 동종이계 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 또는 비조사된 자가 또는 PBMC; RPMI8866; HFWT, K562; 막 결합된 IL-15, 및 41BBL, 또는 IL-21 또는 이들의 임의의 조합으로 형질감염된 K562 세포; 또는 EBV-LCL일 수 있다. 일부 측면에서, NK 세포는 IL-21, IL-15, 및/또는 41BBL의 용액과 조합하여 제공된 피더세포이다. 피더세포는 1:2, 1:1, 또는 2:1 비율로 NK 세포의 배양물에 씨딩될 수 있다. 배양 기간은 전기천공 후 1 내지 14 일 (즉, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 또는 14일), 바람직하게는 3 내지 7일, 가장 바람직하게는 4 내지 6 일일 수 있는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 일부 측면에서, 변형된 NK 세포를 배양하기 위한 배지는 예를 들어, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, 및/또는 IL-21과 같은 사이토카인을 추가로 포함할 수 있다.

[0076] 90. 일 측면에서, NK 세포를 유전적으로 변형시키는 개시된 방법의 하나의 목표는 변형된 NK 세포를 생산하는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 따라서, 개시된 방법에 의해 제조된 유전적으로 변형된 NK 세포가 본원에 개시된다. 예를 들어, 또 다른 측면에서, 의약으로서 사용하기 위한, 바람직하게는 암 및/또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및/또는 예방하기 위한, 본원에 개시된 바와 같은 분화 클러스터 38(CD38)을 암호화하는 유전자의 녹아웃을 포함하는 유전적으로 변형된 NK 세포가 본원에 개시된다. 또 다른 측면에서, (i) 이를 필요로 하는 대상체에서 산화적 호흡 용량을 증가시키는 방법, 또는 (ii) 세포외 NAD 가수분해를 제한하고 이를 필요로 하는 대상체에서 산화환원 호흡 용량을 개선시키는 방법에 사용하기 위한 본원에 개시된 바와 같은 분화 클러스터 38(CD38)을 암호화하는 유전자의 녹아웃을 포함하는 유전적으로 변형된 NK 세포가 본원에 개시된다. 동일한 방식으로, 의약의 제조에 있어서, 바람직하게는 암 및/또는 전이 암을 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 및

/또는 예방하기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 개시된 바와 같은 분화 클러스터 38(CD38)을 암호화하는 유전자의 녹아웃을 포함하는 유전적으로 변형된 NK 세포의 용도가 또한 본원에 개시된다. 또 다른 측면에서, (i) 이를 필요로 하는 대상체에서 산화적 호흡 용량을 증가시키기 위한, 또는 (ii) 세포외 NAD 가수분해를 제한하고 이를 필요로 하는 대상체에서 산화환원 호흡 용량을 개선시키기 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 개시된 바와 같은 분화 클러스터 38(CD38)을 암호화하는 유전자의 녹아웃을 포함하는 유전적으로 변형된 NK 세포의 용도가 본원에 개시된다.

[0077] 91. 상기 언급된 바와 같이, 다발성 골수종, 백혈병(급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하나, 이에 제한되지 않음)과 같은 암을 치료하기 위해 다라투무맙과 같은 항-CD38 요법을 받는 대상체에서 NK 세포의 동족살해는 NK 세포가 이들의 세포 표면에서 높은 수준의 CD38을 발현하기 때문에 중요한 문제이다. 따라서, 암 치료에 유리할 NK 세포의 하나의 변형은 항-CD38 치료 동안 NK 세포 동족살해에 민감하지 않은 NK 세포 집단을 생성하기 위한 CD38의 녹아웃인 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 이러한 변형된 세포는 NK 세포의 첨가로 치료될 수 있는 임의의 질환 또는 병태의 면역요법에 매우 유용할 수 있다. 따라서, 일 측면에서, CD38을 암호화하는 유전자의 녹아웃을 포함하는 유전적으로 변형된 NK 세포가 본원에 개시된다.

[0078] 92. 본 개시 전반에 걸쳐 언급된 바와 같이, 개시된 변형된 NK 세포는 변형된 (즉, 조작된 NK 세포를 이를 필요로 하는 대상체로의 입양 전달과 같은 면역요법에서 사용하기에 이상적으로 적합하다. 따라서, 일 측면에서, 조작된 NK 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 입양 전달하는 방법이 본원에 개시되며, 상기 방법은 a) 변형될 표적 NK 세포를 수득하는 단계; b) 표적 DNA 서열에 대해 특이적인 gRNA를 수득하는 단계; c) 전기천공을 통해 상기 표적 NK 세포 내로, 조작된 NK 세포를 생성하는 상기 표적 NK 세포의 게놈 DNA 내의 표적 서열에 혼성화되는 상응하는 CRISPR/Cas 가이드 RNA와 복합체화된 클래스 2 CRISPR/Cas 엔도뉴클레아제(Cas9)를 포함하는 RNP 복합체를 도입하는 단계; 및 d) 상기 조작된 NK 세포를 대상체 내로 전달하는 단계;를 포함한다.

[0079] 93. 일 측면에서, 개시된 면역요법 방법에 사용된 변형된 NK 세포는 공여자 공급원 (예를 들어, 입양 전달 요법을 위한 동종이계 공여자 공급원 또는 자가 공여자 공급원 (즉, 변형된 NK 세포의 최종 수령자), NK 세포주 (NK RPMI8866; HFWT, K562, 및 EBV-LCL을 포함하나, 이에 제한되지 않음)로부터, 또는 일차 NK 세포 공급원 또는 NK 세포주로부터 유래된 확장된 NK 세포의 공급원으로부터 일차 NK 세포일 수 있다. 일차 NK 세포가 사용될 수 있기 때문에, NK 세포의 개시된 변형은 생체외 또는 시험관내 일어날 수 있는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다.

[0080] 94. NK 세포의 형질도입 후, 변형된 NK 세포는 변형된 (즉, 조작된) NK 세포를 대상체에게 투여하기 전에 확장되고 자극될 수 있다. 예를 들어, NK 세포를 이를 필요로 하는 대상체에게 입양 전달하는 방법이 본원에 개시되어 있으며, 상기 NK 세포는 대상체로 투여되기 전에 조사된 mbIL-21 발현 피더세포로 확장된다. 일부 측면에서, 변형된 (즉, 조작된) NK 세포의 자극 및 확장은 상기 대상체에게 변형된 NK 세포를 투여한 후 또는 투여함과 동시에 생체내에서 일어날 수 있는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 따라서, 본원에서는 IL-21 또는 조사된 mbIL-21 발현 피더세포의 투여를 통해 대상체로 NK 세포의 전달 후에 상기 대상체에서 NK 세포를 확장시키는 면역요법 방법이 개시된다.

[0081] **1. 혼성화/선택적 혼성화**

[0082] 95. 용어 혼성화는 전형적으로 적어도 2개의 핵산 분자, 예컨대 프라이머 또는 프로브와 유전자 사이의 서열 유도 상호작용을 의미한다. 서열 유도된 상호작용은 뉴클레오티드 특이적 방식으로 2개의 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체 또는 뉴클레오티드 유도체 사이에서 일어나는 상호작용을 의미한다. 예를 들어, C와 상호작용하는 G 또는 T와 상호작용하는 A는 서열 유도된 상호작용이다. 전형적으로 서열 유도된 상호작용은 뉴클레오티드의 왓슨-크릭 면 또는 후그스틴 면 상에서 일어난다. 2개의 핵산의 혼성화는 당업자에게 공지된 다수의 조건 및 파라미터에 의해 영향을 받는다. 예를 들어, 반응의 염 농도, pH, 및 온도는 모두 2개의 핵산 분자가 혼성화되는지 여부에 영향을 미친다.

[0083] 96. 2개의 핵산 분자 사이의 선택적 혼성화에 대한 파라미터는 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서 선택적 혼성화 조건은 엄격한 혼성화 조건으로서 정의될 수 있다. 예를 들어, 혼성화의 엄격성은 혼성화 및 세척 단계 중 하나 또는 둘 모두의 온도 및 염 농도 둘 다에 의해 제어된다. 예를 들어, 선택적 혼성화를 달성하기 위한 혼성화 조건은 Tm (분자의 절반이 혼성화 파트너로부터 해리되는 용융 온도)보다 약 12 내지 25 ℃ 낮은 온도에서 높은 이온 강도 용액 (6X SSC 또는 6X SSPE) 중에서 혼성화한 후, 세척 온도가 Tm보다 약 5℃ 내지 20℃ 낮도록 선택된 온도 및 염 농도의 조합으로 세척하는 것을 수반할 수 있다. 온도 및 염 조건은 필터

상에 고정된 참조 DNA 샘플을 관심 표지된 핵산에 혼성화한 다음, 다른 엄격성의 조건 하에서 세척되는 예비 실험에서 경험적으로 쉽게 결정된다. 혼성화 온도는 전형적으로 DNA-RNA 및 RNA-RNA 혼성화의 경우 더 높다. 조건은 엄격성을 달성하기 위해 상기 기재된 바와 같이, 또는 당업계에 알려져 있는 바와 같이 사용될 수 있다. DNA:DNA 혼성화에 대한 바람직한 엄격한 혼성화 조건은 6X SSC 또는 6X SSPE에서 (수용액 중에서) 약 68℃일 수 있고, 이어서 68℃에서 세척할 수 있다. 혼성화 및 세척의 엄격성은, 원하는 경우, 원하는 상보성의 정도가 감소함에 따라, 그리고 추가로, 가변성이 검색되는 임의의 영역의 G-C 또는 A-T 풍부도에 따라, 감소될 수 있다. 마찬가지로, 혼성화 및 세척의 엄격성은, 원하는 경우, 원하는 상동성이 증가함에 따라, 그리고 추가로, 높은 상동성이 요구되는 임의의 영역의 G-C 또는 A-T 풍부도에 따라, 증가될 수 있으며, 이들 모두는 당업계에 알려진 바와 같다.

[0084] 97. 선택적 혼성화를 정의하는 다른 방법은 다른 핵산에 결합된 핵산 중 하나의 양 (백분율)을 찾는 것이다. 예를 들어, 일부 구현예에서 선택적 혼성화 조건은 제한 핵산의 적어도 약 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 퍼센트가 비제한적 핵산에 결합되는 경우일 것이다. 전형적으로, 비제한적 프라이머는 예를 들어, 10 또는 100 또는 1000 배 과량이다. 이러한 유형의 검정은 제한 및 비제한적 프라이머 둘 다가 예를 들어, 이들의 k_d보다 10배 또는 100배 또는 1000배 낮은 경우, 또는 핵산 분자 중 하나만 10배 또는 100배 또는 1000배인 경우, 또는 하나 또는 둘 다의 핵산 분자가 이들의 k_d 이상인 경우의 조건 하에서 수행될 수 있다.

[0085] 98. 선택적 혼성화를 정의하는 또 다른 방법은 혼성화가 원하는 효소적 조작을 촉진하기 위해 요구되는 조건 하에서 효소적으로 조작되는 프라이머의 백분율을 찾는 것이다. 예를 들어, 일부 구현예에서 선택적 혼성화 조건은 프라이머의 적어도 약 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 퍼센트가 효소적 조작을 촉진하는 조건 하에서 효소적으로 조작되는 경우일 것이며, 예를 들어 효소적 조작이 DNA 연장인 경우, 선택적 혼성화 조건은 프라이머 분자의 적어도 약 60, 65, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 퍼센트가 연장되는 경우일 것이다. 바람직한 조건은 또한 제조자에 의해 제안되거나 조작을 수행하는 효소에 적합한 것으로 당업계에 지시된 것을 포함한다.

[0086] 99. 상동성과 마찬가지로, 2개의 핵산 분자 사이의 혼성화 수준을 결정하기 위한 본원에 개시된 다양한 방법이 있는 것으로 이해된다. 이들 방법 및 조건은 2개의 핵산 분자 사이에 상이한 백분율의 혼성화를 제공할 수 있지만, 임의의 방법의 파라미터를 충족시키는 것으로 달리 지시되지 않는 한 충분할 것으로 이해된다. 예를 들어, 80% 혼성화가 요구되는 경우 그리고 혼성화가 이들 방법 중 임의의 하나에서 요구되는 파라미터 내에서 일어나는 한, 본원에 개시된 것으로 간주된다.

[0087] 100. 당업자는 조성물 또는 방법이 총괄적으로 또는 단독으로 혼성화를 결정하기 위한 이들 기준 중 임의의 하나를 충족시키는 경우 이는 본원에 개시된 조성물 또는 방법임을 이해하는 것으로 이해된다.

[0088] **2. 핵산**

[0089] 101. 예를 들어 CD38을 암호화하는 핵산, 또는 CD38 녹아웃을 제조하기 위한 본원에 개시된 임의의 핵산, 또는 이의 단편, 뿐만 아니라 다양한 기능성 핵산을 포함하는, 핵산 기반인 본원에 개시된 다양한 분자가 있다. 개시된 핵산은 예를 들어, 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유사체 또는 뉴클레오티드 대체물로 구성된다. 이들 및 다른 분자의 비제한적인 예가 본원에서 논의된다. 예를 들어, 벡터가 세포에서 발현되는 경우, 발현된 mRNA는 전형적으로 A, C, G, 및 U로 구성될 것이라는 것이 이해된다. 마찬가지로, 예를 들어 안티센스 분자가 예를 들어 외인성 전달을 통해 세포 또는 세포 환경에 도입되는 경우, 안티센스 분자가 세포 환경에서 안티센스 분자의 분해를 감소시키는 뉴클레오티드 유사체로 구성되는 것이 유리한 것으로 이해된다.

[0090] **a) 뉴클레오티드 및 관련 분자**

[0091] 102. 뉴클레오티드는 염기 모이어티, 당 모이어티 및 포스페이트 모이어티를 함유하는 분자이다. 뉴클레오티드는 뉴클레오사이드간 연결을 생성하는 이들의 포스페이트 모이어티 및 당 모이어티를 통해 함께 연결될 수 있다. 뉴클레오티드의 염기 모이어티는 아데닌-9-일 (A), 시토신-1-일 (C), 구아닌-9-일 (G), 우라실-1-일 (U), 및 티민-1-일 (T)일 수 있다. 뉴클레오티드의 당 모이어티는 리보스 또는 데옥시리보스이다. 뉴클레오티드의 포스페이트 모이어티는 5가 포스페이트이다. 뉴클레오티드의 비제한적인 예는 3'-AMP (3'-아데노신 일인산염) 또는 5'-GMP (5'-구아노신 일인산염)일 수 있다. 당업계에서 이용가능한 매우 다양한 이러한 유형의 분자가 있으며, 본원에서 이용가능하다.

[0092] 103. 뉴클레오티드 유사체는 염기, 당, 또는 포스페이트 모이어티에 대한 일부 유형의 변형을 함유하는 뉴클레오티드이다. 뉴클레오티드에 대한 변형은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 및 2-아미노아데닌 뿐만 아니라 당 또는 포스페이트 모이어티에서의 변형을 포함할 것이다. 당업계에서 이용가능한 매우 다양한 이러한 유형의 분자가 있으며, 본원에서 이용가능하다.

[0093] 104. 뉴클레오티드 대체물은 뉴클레오티드와 유사한 기능적 특성을 갖지만, 포스페이트 모이어티, 예컨대 펩티드 핵산 (PNA)를 함유하지 않는 분자이다. 뉴클레오티드 대체물은 왓슨-크릭 또는 휴그스틴 방식으로 핵산을 인식하지만, 포스페이트 모이어티 이외의 모이어티를 통해 함께 연결된 분자이다. 뉴클레오티드 대체물은 적절한 표적 핵산과 상호작용할 때 이중 나선 유형 구조를 따를 수 있다. 당업계에서 이용가능한 매우 다양한 이러한 유형의 분자가 있으며, 본원에서 이용가능하다.

[0094] 105. 예를 들어, 세포 흡수를 향상시키기 위해 다른 유형의 분자 (접합체)를 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체에 연결시키는 것 또한 가능하다. 접합체는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체에 화학적으로 연결될 수 있다. 이러한 접합체는 지질 모이어티 예컨대 콜레스테롤 모이어티를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. (Letsinger 등, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, 86, 6553-6556). 당업계에서 이용가능한 매우 다양한 이러한 유형의 분자가 있으며, 본원에서 이용가능하다.

[0095] 106. 왓슨-크릭 상호작용은 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유사체, 또는 뉴클레오티드 대체물의 왓슨-크릭 면과의 적어도 하나의 상호작용이다. 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유사체, 또는 뉴클레오티드 대체물의 왓슨-크릭 면은 퓨린 기반 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유사체, 또는 뉴클레오티드 대체물의 C2, N1, 및 C6 위치 및 피리미딘 기반 뉴클레오티드, 뉴클레오티드 유사체, 또는 뉴클레오티드 대체물의 C2, N3, C4 위치를 포함한다.

[0096] 107. 휴그스틴 상호작용은 이중체 DNA의 주요 홈에서 노출되는 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유사체의 휴그스틴 면에서 일어나는 상호작용이다. 휴그스틴 면은 퓨린 뉴클레오티드의 N7 위치 및 C6 위치에서 반응성 기 (NH2 또는 O)를 포함한다.

[0097] **b) 서열**

[0098] 108. 본원에 개시된 신호전달 경로에 관여된 단백질 분자와 관련된 다양한 서열, 예를 들어 CD38이 있으며, 이들 모두는 핵산에 의해 암호화되거나 핵산이다. 이들 유전자의 인간 유사체, 뿐만 아니라 다른 유사체, 및 이들 유전자의 대립유전자, 및 스플라이스 변이체 및 다른 유형의 변이체에 대한 서열은, Genbank를 비롯한 다양한 단백질 및 유전자 데이터베이스에서 이용가능하다. 당업자는 서열 불일치 및 차이를 해결하고 특정 서열과 관련된 조성물 및 방법을 다른 관련 서열로 조정하는 방법을 이해한다. 프라이머 및/또는 프로브는 본원에 개시되고 당업계에 공지된 정보가 주어진 임의의 주어진 서열에 대해 설계될 수 있다.

[0099] **c) 프라이머 및 프로브**

[0100] 109. 개시된 핵산, 예컨대 본원에서 개시된 바와 같은 CD38과 상호작용할 수 있는 프라이머 및 프로브를 포함하는 조성물이 개시된다. 특정 구현예에서, 프라이머는 DNA 증폭 반응을 지지하는데 사용된다. 전형적으로, 프라이머는 서열 특이적 방식으로 연장될 수 있을 것이다. 서열 특이적 방식의 프라이머 확장은 프라이머가 혼성화되거나 달리 회합된 핵산 분자의 서열 및/또는 조성물이 프라이머의 확장에 의해 생성된 생성물의 조성물 또는 서열을 지시하거나 영향을 미치는 임의의 방법을 포함한다. 따라서, 서열 특이적 방식으로 프라미어의 확장은 PCR, DNA 서열분석, DNA 확장, DNA 중합, RNA 전사, 또는 역전사를 포함하나, 이에 제한되지는 않는다. 서열 특이적 방식으로 프라이머를 증폭하는 기술 및 조건이 바람직하다. 특정 구현예에서, 프라이머는 DNA 증폭 반응, 예컨대 PCR 또는 직접적인 서열분석에 사용된다. 특정 구현예에서, 프라이머는 또한 비-효소적 기술을 사용하여 연장될 수 있으며, 예를 들어, 프라이머를 연장시키는데 사용되는 뉴클레오티드 또는 올리고뉴클레오티드는 서열 특이적 방식으로 프라이머를 연장하기 위해 화학적으로 반응하도록 변형되는 것으로 이해된다. 전형적으로 개시된 프라이머는 개시된 핵산 또는 핵산의 영역과 혼성화되거나, 이들은 핵산의 보체 또는 핵산 영역의 보체와 혼성화된다.

[0101] 110. 특정 구현예에서, 핵산과의 상호작용을 위한 프라이머 또는 프로브의 크기는 프라이머의 원하는 효소적 조작, 예컨대 DNA 증폭 또는 프로브 또는 프라이머의 단순 혼성화를 지지하는 임의의 크기일 수 있다. 전형적인 프라이머 또는 프로브는 적어도 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74,

75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3500, 또는 4000개의 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0102] 111. 다른 구현예에서, 프라이머 또는 프로브는 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3500, 또는 4000개 이하의 뉴클레오티드 길이일 수 있다.

[0103] 112. CD38 유전자에 대한 프라이머는 전형적으로 CD38 유전자 또는 완전한 유전자의 영역을 함유하는 증폭된 DNA 생성물을 생산하는데 사용할 수 있다. 일반적으로, 전형적으로 생성물의 크기는 3개, 또는 2개 또는 1개의 뉴클레오티드 이내에 정확하게 결정될 수 있는 크기일 것이다.

[0104] 113. 특정 구현예에서, 이 생성물은 적어도 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3500, 또는 4000개의 뉴클레오티드 길이이다.

[0105] 114. 다른 구현예에서, 상기 생성물은 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1250, 1500, 1750, 2000, 2250, 2500, 2750, 3000, 3500, 또는 4000개 이하의 뉴클레오티드 길이이다.

[0106] **3. 발현 시스템**

[0107] 115. 세포에 전달되는 핵산은 전형적으로 발현 조절 시스템을 함유한다. 예를 들어, 바이러스 및 레트로바이러스 시스템에 삽입된 유전자는 일반적으로 원하는 유전자 산물의 발현을 조절하는데 도움이 되는 프로모터, 및/또는 인핸서를 함유한다. 프로모터는 일반적으로 전사 개시 부위와 관련하여 상대적으로 고정된 위치에 있을 때 기능하는 DNA의 서열 또는 서열들이다. 프로모터는 RNA 중합효소 및 전사 인자의 기본적인 상호작용에 필요한 핵심 요소를 함유하고, 상류 요소 및 반응 인자를 함유할 수 있다.

[0108] **a) 바이러스 프로모터 및 인핸서**

[0109] 116. 포유동물 숙주 세포에서 벡터로부터 전사를 조절하는 바람직한 프로모터는 다양한 공급원, 예를 들어, 폴리오마, 유인원 바이러스 40(SV40), 아데노바이러스, 레트로바이러스, B형 간염 바이러스 및 가장 바람직하게는 사이토메갈로바이러스와 같은 바이러스의 게놈으로부터, 또는 이종성 포유동물 프로모터, 예를 들어 베타 액틴 프로모터로부터 수득될 수 있다. SV40 바이러스의 초기 및 후기 프로모터는 SV40 바이러스 복제 기점을 또한 함유하는 SV40 제한 단편으로서 편리하게 수득된다 (Fiers 등, *Nature*, 273: 113 (1978)). 인간 사이토메갈로바이러스의 즉각적인 초기 프로모터는 *Hin*dIII E 제한 단편으로서 편리하게 수득된다 (Greenway, P.J. 등, Gene 18: 355-360 (1982)). 물론, 숙주 세포 또는 관련 종으로부터의 프로모터도 본원에서 유용하다.

[0110] 117. 인핸서는 일반적으로 전사 개시 부위로부터 고정된 거리없이 기능하는 DNA의 서열을 지칭하며 전사 단위에 대해 5' (Laimins, L. 등, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 993 (1981)) 또는 3' (Lusky, M.L., 등, *Mol. Cell Bio.* 3: 1108 (1983))일 수 있다. 또한, 인핸서는 인트론 내에 (Banerji, J.L. 등, *Cell* 33: 729 (1983)) 뿐만 아니라 암호화 서열 자체 내에 (Osborne, T.F., 등, *Mol. Cell Bio.* 4: 1293 (1984)) 있을 수 있다. 이들은 일반적으로 그 길이가 10 내지 300 bp이고, 이들은 시스에서 기능한다. 인핸서는 프로모터 근처로부터 전사를 증가시키는 기능을 한다. 인핸서는 또한 종종 전사의 조절을 매개하는 반응 요소를 함유한다. 프로모터는 또한 전사의 조절을 매개하는 반응 요소를 함유할 수 있다. 인핸서는 종종 유전자의 발현 조절을 결정한다. 많은 인핸

서 서열이 현재 포유동물 유전자 (글로빈, 엘라스타제, 알부민, -태아단백질 및 인슐린)로부터 알려져 있지만, 전형적으로 하나는 일반적인 발현을 위해 진핵 세포 바이러스로부터의 인핸서를 사용할 것이다. 바람직한 예는 복제 기점의 후측에 있는 SV40 인핸서 (bp 100-270), 사이토메갈로바이러스 초기 프로모터 인핸서, 복제 기점의 후측에 있는 폴리오마 인핸서, 및 아데노바이러스 인핸서이다.

[0111] 118. 프로모터 및/또는 인핸서는 이들의 기능을 촉발하는 광 또는 특정 화학적 현상에 의해 특이적으로 활성화될 수 있다. 시스템은 시약 예컨대 테트라사이클린 및 덱사메타손에 의해 조절될 수 있다. 또한, 조사, 예컨대 감마선 조사, 또는 알킬화 화학요법 약물에 노출시켜 바이러스 벡터 유전자 발현을 향상시키는 방법이 있다.

[0112] 119. 특정 구현예에서, 프로모터 및/또는 인핸서 영역은 구성적 프로모터 및/또는 인핸서로서 작용하여 전사될 전사 단위 영역의 발현을 최대화할 수 있다. 특정 작제물에서 프로모터 및/또는 인핸서 영역은 특정 시간에 특정 유형의 세포에서만 발현되더라도 모든 진핵 세포 유형에서 활성화된다. 이러한 유형의 바람직한 프로모터는 CMV 프로모터 (650개의 염기)이다. 다른 바람직한 프로모터는 SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 (전장 프로모터), 및 레트로바이러스 벡터 LTR이다.

[0113] 120. 모든 특정 조절 요소가 클로닝되어 흑색종 세포와 같은 특정 세포 유형에서 선택적으로 발현되는 발현 벡터를 구축하는데 사용될 수 있음이 밝혀졌다. 신경교 섬유질 산성 단백질(Glial fibrillary acidic protein, GFAP) 프로모터는 신경교 기원의 세포에서 유전자를 선택적으로 발현시키는데 사용되어 왔다.

[0114] 121. 진핵 숙주 세포 (효모, 진균, 곤충, 식물, 동물, 인간 또는 유핵 세포)에 사용되는 발현 벡터는 mRNA 발현에 영향을 미칠 수 있는 전사의 종결에 필요한 서열을 함유할 수도 있다. 이러한 영역은 조직 인자 단백질을 암호화하는 mRNA의 미번역된 부분에서 폴리아데닐화된 세그먼트로서 전사된다. 3' 미번역된 영역 또한 전사 종결 부위를 포함한다. 전사 단위는 또한 폴리아데닐화 영역을 함유하는 것이 바람직하다. 이 영역의 하나의 이점은 전사된 단위가 mRNA처럼 처리되고 수송될 가능성을 증가시킨다는 것이다. 발현 작제물에서 폴리아데닐화 신호의 확인 및 사용은 잘 확립되어 있다. 상동성 폴리아데닐화 신호는 전이유전자 작제물에서 사용되는 것이 바람직하다. 특정 전사 단위에서, 폴리아데닐화 영역은 SV40 초기 폴리아데닐화 신호로부터 유래되고 약 400개의 염기로 구성된다. 전사된 단위는 다른 표준 서열을 단독으로 함유하거나 상기 서열과 조합하여 작제물로부터의 발현 또는 그 안정성을 개선시키는 것이 또한 바람직하다.

[0115] **b) 마커**

[0116] 122. 바이러스 벡터는 마커 생성물을 암호화하는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 이 마커 생성물은 유전자가 세포에 전달되었는지 확인하고 전달되면 발현되는지를 결정하는데 사용된다. 바람직한 마커 유전자는 β-갈락토시다아제, 및 녹색 형광 단백질을 암호화하는 *E. Coli* lacZ 유전자이다.

[0117] 123. 일부 구현예에서, 마커는 선택가능한 마커일 수 있다. 포유동물 세포에 대한 적합한 선택가능한 마커의 예는 디하이드로폴레이트 환원효소(DHFR), 티미딘 키나제, 네오마이신, 네오마이신 유사체 G418, 하이드로마이신, 및 퓨로마이신이다. 이러한 선택가능한 마커가 포유동물 숙주 세포로 성공적으로 전달될 때, 형질전환된 포유동물 숙주 세포는 선택적 압력 하에 놓이면 생존할 수 있다. 선택적 요법의 두 가지 널리 사용되는 뚜렷한 범주가 있다. 첫 번째 범주는 세포의 대사 및 보충 배지와 무관하게 성장할 수 있는 능력이 부족한 돌연변이 세포주의 사용을 기반으로 한다. 두 가지 예는 다음과 같다: CHO DHFR- 세포 및 마우스 LTK-세포. 이들 세포는 티미딘 또는 하이포잔틴과 같은 영양소의 첨가 없이 성장하는 능력이 결여되어 있다. 이들 세포는 완전한 뉴클레오티드 합성 경로에 필요한 특정 유전자가 없기 때문에, 누락된 뉴클레오티드가 보충 배지에 제공되지 않으면 이들은 생존할 수 없다. 배지 보충에 대한 대안은 온전한 DHFR 또는 TK 유전자를 각각의 유전자가 결여된 세포 내로 도입하고, 따라서 이들의 성장 요건을 변경하는 것이다. DHFR 또는 TK 유전자로 형질전환되지 않은 개별 세포는 보충되지 않은 배지에서 생존할 수 없을 것이다.

[0118] 124. 두 번째 범주는 임의의 세포 유형에서 사용되는 선택 체계를 지칭하며 돌연변이 세포주의 사용이 요구되지 않는 우성 선택이다. 이들 체계는 전형적으로 숙주 세포의 성장을 저지하기 위해 약물을 사용한다. 신규한 유전자를 갖는 세포는 약물 내성을 전달하는 단백질을 발현할 것이고 선택에서 살아남을 것이다. 이러한 우성 선택의 예는 약물 네오마이신, (Southern P. 및 Berg, P., *J. Molec. Appl. Genet.* 1: 327 (1982)), 마이코페놀산, (Mulligan, R.C. 및 Berg, *P. Science* 209: 1422 (1980)) 또는 하이그로마이신, (Sugden, B. 등, *Mol. Cell. Biol.* 5: 410-413 (1985))을 사용한다. 세 가지 예는 적절한 약물 G418 또는 네오마이신 (게네티신), xgpt (마이코페놀산) 또는 하이그로마이신, 각각에 대한 내성을 전달하기 위해 진핵생물 제어 하에서 박테리아 유전자를 이용한다. 기타는 네오마이신 유사체 G418 및 퓨라마이신을 포함한다.

[0119] **4. 펩티드**

[0120] **a) 단백질 변이체**

[0121] 125. 단백질 변이체 및 유도체는 당업자에게 잘 이해되며, 아미노산 서열 변형을 수반할 수 있다. 예를 들어, 아미노산 서열 변형은 전형적으로 3가지 부류 중 하나 이상에 속한다: 치환, 삽입 또는 결실 변이체. 삽입은 아미노 및/또는 카르복실 말단 융합 뿐만 아니라 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 삽입은 통상적으로 아미노 또는 카복실 말단 융합의 삽입보다 더 작은 삽입, 예를 들어, 1개 내지 4개의 잔기 정도일 것이다. 실시예에 기재된 것들과 같은 면역원성 융합 단백질 유도체는 시험관내 가교결합에 의해 또는 융합체를 암호화하는 DNA로 형질전환된 재조합 세포 배양에 의해 표적 서열에 면역원성을 부여하기에 충분히 큰 폴리펩티드를 융합함으로써 제조된다. 결실은 단백질 서열로부터 하나 이상의 아미노산 잔기의 제거를 특징으로 한다. 전형적으로, 약 2개 내지 6개 이하의 잔기가 단백질 분자 내의 임의의 한 부위에서 결실된다. 이들 변이체는 통상적으로 단백질을 암호화하는 DNA 내의 뉴클레오티드의 부위 특이적인 돌연변이유발에 의해 제조되어, 변이체를 암호화하는 DNA를 생성한 후, 재조합 세포 배양물에서 DNA를 발현한다. 공지된 서열을 갖는 DNA의 미리 결정된 부위에서 치환 돌연변이를 제조하기 위한 기술, 예를 들어 M13 프라이머 돌연변이유발 및 PCR 돌연변이유발은 잘 알려져 있다. 아미노산 치환은 전형적으로 단일 잔기이나, 수많은 상이한 위치에서 한번에 일어날 수 있으며; 삽입은 일반적으로 약 1개 내지 10개의 아미노산 잔기 정도일 것이고; 결실은 약 1개 내지 30개 잔기의 범위일 것이다. 결실 또는 삽입은 바람직하게는 인접한 쌍, 즉 2개 잔기의 결실 또는 2개 잔기의 삽입으로 이루어진다. 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 임의의 조합은 조합되어 최종 작제물에 도달할 수 있다. 돌연변이는 판독 프레임 외부에 서열을 배치해서는 아니 되며, 바람직하게는 이차 mRNA 구조를 생성할 수 있는 상보적 영역을 생성하지 않을 것이다. 치환 변이체는 적어도 하나의 잔기가 제거되고, 그 자리에 상이한 잔기가 삽입된 것이다. 이러한 치환은 일반적으로 하기 표 1 및 표 2에 따라 이루어지며, 보존적 치환으로 지칭된다.

[0122] **표 1:** 아미노산 약어

아미노산	약어	
알라닌	Ala	A
알로이소류신	AIle	
아르기닌	Arg	R
아스파라긴	Asn	N
아스파르트산	Asp	D
시스테인	Cys	C
글루탐산	Glu	E
글루타민	Gln	Q
글리신	Gly	G
히스티딘	His	H
이소류신	Ile	I
류신	Leu	L
라이신	Lys	K
페닐알라닌	Phe	F
프롤린	Pro	P
피로글루탐산	pGlu	
세린	Ser	S
트레오닌	Thr	T
티로신	Tyr	Y
트립토판	Trp	W
발린	Val	V

[0123]

[0124] **표 2:** 아미노산 치환

[0125] 원래 잔기 예시적인 보존적 치환, 기타는 당업계에 공지되어 있음.

Ala	Ser
Arg	Lys; Gln
Asn	Gln; His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn, Lys
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn;Gln
Ile	Leu; Val
Leu	Ile; Val
Lys	Arg; Gln
Met	Leu; Ile
Phe	Met; Leu; Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp; Phe
Val	Ile; Leu

[0126]

[0127] 126. 기능 또는 면역학적 동일성의 실질적인 변화는 표 2의 치환보다 덜 보존적 치환을 선택함으로써, 즉, (a) 예를 들어 시트 또는 나선 형태로서 치환 영역에서 폴리펩티드 골격의 구조, (b) 표적 부위에서 분자의 전하 또는 소수성 또는 (c) 측쇄의 벌크를 유지하는데 이들의 효과가 더 현저하게 상이한 잔기를 선택함으로써 이루어진다. 일반적으로 단백질 특성에서 가장 큰 변화를 일으킬 것으로 예상되는 치환은 (a) 친수성 잔기, 예를 들어 세릴 또는 트레오닐이, 소수성 잔기, 예를 들어 류실, 이소류실, 페닐알라닐, 발릴 또는 알라닐로 (또는 이에 의해) 치환되거나; (b) 시스테인 또는 프롤린이 임의의 다른 잔기로 (또는 이에 의해) 치환되거나; (c) 양전기 측쇄, 예를 들어, 라이실, 아르기닐, 또는 히스티딜을 갖는 잔기가 음전기 잔기, 예를 들어, 글루타밀 또는 아스파르틸로 (또는 이에 의해) 치환되거나; 또는 (d) 부피가 큰 측쇄, 예를 들어, 페닐알라닌을 갖는 잔기가 측쇄, 예를 들어, 글리신을 갖지 않는 것으로 (또는 이에 의해) 치환되거나, 이 경우에, (e) 황산화 및/또는 당화를 위한 부위의 수를 증가시킴으로써 치환되는 것일 것이다.

[0128] 127. 예를 들어, 하나의 아미노산 잔기를 생물학적으로 및/또는 화학적으로 유사한 다른 것으로 대체하는 것은 보존적 치환으로서 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, 보존적 치환은 하나의 소수성 잔기를 다른 잔기로, 또는 하나의 극성 잔기를 다른 잔기로 대체하는 것이다. 치환은 예를 들어, Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; 및 Phe, Tyr와 같은 조합을 포함한다. 각각의 명시적으로 개시된 서열의 이러한 보존적으로 치환된 변이는 본원에 제공된 모자이크 폴리펩티드 내에 포함된다.

[0129] 128. N-당화 (Asn-X-Thr/Ser) 또는 O-당화 (Ser 또는 Thr)를 위한 부위를 삽입하기 위해 치환 또는 결실 돌연변이유발이 이용될 수 있다. 시스테인 또는 다른 불안정한 잔기의 결실이 또한 바람직할 수 있다. 잠재적인 단백질분해 부위, 예를 들어 Arg의 결실 또는 치환은 예를 들어 염기성 잔기 중 하나를 결실시키거나 하나를 글루타미닐 또는 히스티딜 잔기로 치환시킴으로써 달성된다.

[0130] 129. 특정 번역후 유도체화는 발현된 폴리펩티드에 대한 재조합 숙주 세포의 작용의 결과이다. 글루타미닐 및 아스파르기닐 잔기는 흔히 상응하는 글루타밀 및 아스파릴 잔기로 번역후에 탈아미드화된다. 대안적으로, 이들 잔기는 약산성 조건 하에서 탈아미드화된다. 다른 번역후 변형은 프롤린 및 라이신의 하이드록실화, 세릴 또는 트레오닐 잔기의 하이드록실기의 인산화, 라이신, 아르기닌, 및 히스티딘 측쇄의 o-아미노기의 메틸화 (T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco pp 79-86 [1983]), N-말단 아민의 아세틸화, 및 일부 경우에, C-말단 카르복실의 아미드화를 포함한다.

[0131] 130. 본원에 개시된 단백질의 변이체 및 유도체를 정의하는 한 방법은 특정 공지된 서열에 대한 상동성/동일성 측면에서 변이체 및 유도체의 정의를 통하는 것으로 이해된다. 언급된 서열에 대해 적어도, 70% 또는 75% 또는 80% 또는 85% 또는 90% 또는 95% 상동성을 갖는 본원에 개시된 이들 및 다른 단백질의 변이체가 구체적으로 개시된다. 당업자는 두 단백질의 상동성을 결정하는 방법을 쉽게 이해한다. 예를 들어, 상동성은, 상동성이 가장 높은 수준에 있도록 2개의 서열을 정렬한 후에 계산될 수 있다.

[0132] 131. 상동성을 계산하는 또 다른 방법은 공개된 알고리즘에 의해 수행될 수 있다. 비교를 위한 서열의 최적 정

렬은 Smith 및 Waterman *Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)의 로컬 상동성 알고리즘에 의해, Needleman 및 Wunsch, *J. MoL Biol.* 48: 443 (1970)의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, Pearson 및 Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 2444 (1988)의 유사성 탐색 방법에 의해, 이들 알고리즘의 컴퓨터화된 구현에 의해 (GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package 내, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 또는 검사에 의해 수행될 수 있다.

[0133] 132. 동일한 유형의 상동성은 예를 들어 Zuker, M. *Science* 244:48-52, 1989, Jaeger 등 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:7706-7710, 1989, Jaeger 등 *Methods Enzymol.* 183:281-306, 1989에 개시된 알고리즘에 의해 핵산에 대해 수득될 수 있다.

[0134] 133. 보존적 돌연변이 및 상동성의 설명은 변이체가 보존적인 돌연변이인 특정 서열에 대해 적어도 70% 상동성을 갖는 구현예와 같은 임의의 조합으로 함께 조합될 수 있는 것으로 이해된다.

[0135] 134. 본 명세서가 다양한 단백질 및 단백질 서열을 논의함에 따라, 이들 단백질 서열을 암호화할 수 있는 핵산이 또한 개시되는 것으로 이해된다. 이는 특정 단백질 서열과 관련된 모든 축퇴성 서열, 즉 하나의 특정 단백질 서열을 암호화하는 서열을 갖는 모든 핵산 뿐만 아니라 단백질 서열의 개시된 변이체 및 유도체를 암호화하는 축퇴성 핵산을 포함하는 모든 핵산을 포함할 것이다. 따라서, 각각의 특정 핵산 서열이 본원에 기재되어 있지 않을 수 있지만, 각각의 모든 서열은 개시된 단백질 서열을 통해 본원에 사실상 개시되고 기재되는 것으로 이해된다. 아미노산 서열은 특정 DNA 서열이 유기체 내에서 단백질을 암호화하는 것을 나타내지 않지만, 개시된 단백질의 특정 변이체가 본원에 개시되는 경우, 단백질을 암호화하는 알려진 핵산 서열이 또한 알려져 있고, 본원에 개시되고 기재된 것으로 또한 이해된다.

[0136] 135. 개시된 조성물에 혼입될 수 있는 수많은 아미노산 및 펩티드 유사체가 있는 것으로 이해된다. 예를 들어, 표 1 및 표 2에 나타낸 아미노산과 상이한 기능성 치환기를 갖는 수많은 D개 아미노산 또는 아미노산이 있다. 자연 발생 펩티드의 반대 입체 이성질체 뿐만 아니라 펩티드 유사체의 입체 이성질체가 개시된다. 이러한 아미노산은 tRNA 분자를 선택한 아미노산으로 충전하고, 부위 특이적 방식으로 유사체 아미노산을 펩티드 사슬에 삽입하기 위해, 예를 들어, 앰버 코돈을 이용하는 유전적 작제물을 조작함으로써 폴리펩티드 사슬에 용이하게 혼입될 수 있다.

[0137] 136. 펩티드와 유사하지만, 천연 펩타이드 결합을 통해 연결되지 않는 분자가 생성될 수 있다. 예를 들어, 아미노산 또는 아미노산 유사체에 대한 결합은 CH_2NH--, --CH_2S--, --CH_2--CH_2--, --CH=CH-- (시스 및 트랜스), --$COCH_2$--, --CH(OH)CH_2--, 및 --CHH_2SO-을 포함할 수 있다 (이들 및 기타는 Spatola, A. F., *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins*, B. Weinstein, eds., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983); Spatola, A. F., *Vega Data* (1983년 3월), Vol. 1, Issue 3, Peptide Backbone Modifications (총평); Morley, *Trends Pharm Sci* (1980) pp. 463-468; Hudson, D. 등, Int J Pept Prot Res 14:177-185 (1979) (--CH_2NH--, CH_2CH_2--); Spatola 등 *Life Sci* 38:1243-1249 (1986) (--CH H_2--S); Hann J. *Chem. Soc Perkin Trans.* I 307-314 (1982) (--CH--CH--, 시스 및 트랜스); Almquist 등 *J. Med. Chem.* 23:1392-1398 (1980) (--$COCH_2$--); Jennings-White 등 *Tetrahedron Lett* 23:2533 (1982) (--$COCH_2$--); Szelke 등 유럽 출원, EP 45665 CA (1982): 97:39405 (1982) (--CH(OH)CH_2--); Holladay 등 *Tetrahedron.* Lett 24:4401-4404 (1983) (--C(OH)CH_2--); 및 Hruby *Life Sci* 31:189-199 (1982) (--CH_2--S--)에서 확인될 수 있고; 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다. 특히 바람직한 비-펩티드 결합은 --CH_2NH--이다. 펩티드 유사체가 b-알라닌, g-아미노부티르산 등과 같은 결합 원자 사이에 하나 이상의 원자를 가질 수 있는 것으로 이해된다.

[0138] 137. 아미노산 유사체 및 유사체 및 펩티드 유사체는 종종 향상되거나 바람직한 특성, 예컨대, 보다 경제적인 생산, 더 큰 화학적 안정성, 향상된 약리학적 특성 (반감기, 흡수, 역가, 효능 등), 변경된 특이성 (예를 들어, 광범위한 생물학적 활성), 감소된 항원성 등을 갖는다.

[0139] 138. D-아미노산은 보다 안정적인 펩티드를 생성하기 위해 사용될 수 있는데, 이는 D 아미노산이 펩티다제 등에 의해 인식되지 않기 때문이다. 공통 서열의 하나 이상의 아미노산을 동일한 유형의 D-아미노산 (예를 들어, L-라이신 대신에 D-라이신)으로 체계적으로 치환하는 것이 보다 안정적인 펩티드를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 시스테인 잔기는 2개 이상의 펩티드를 함께 고리화하거나 부착시키기 위해 사용될 수 있다. 이는 펩티드를 특정 형태로 제한하는데 유익할 수 있다.

[0140] **5. 약제학적 담체/의약품의 전달**

[0141] 139. 상기 기재된 바와 같이, 조성물은 또한 약제학적으로 허용가능한 담체에서 생체내 투여될 수 있다. "약제학적으로 허용가능한"은 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않은 것이 아닌 물질을 의미하고, 즉, 물질은 임의의 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기하거나 이것이 함유된 약제학적 조성물의 임의의 다른 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지 않으면서 핵산 또는 벡터와 함께 대상체에게 투여될 수 있다. 담체는 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 활성 성분의 임의의 분해를 최소화하고 대상체에서 임의의 유해한 부작용을 최소화하도록 자연적으로 선택될 것이다.

[0142] 140. 조성물은 국소 비강내 투여 또는 흡입제에 의한 투여를 비롯하여, 경구로, 비경구로 (예를 들어, 정맥내로), 근육내 주사에 의해, 복강내 주사에 의해, 경피로, 체외로, 국소적으로 등으로 투여될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같이, "국소 비강내 투여"는 콧구멍 중 하나 또는 둘 모두를 통한 코 및 비강으로 조성물의 전달을 의미하고, 분무 기전 또는 액적 기전에 의해, 또는 핵산 또는 벡터의 에어로졸화를 통한 전달을 포함할 수 있다. 흡입제에 의한 조성물의 투여는 분무 또는 액적 기전에 의한 전달을 통해 코 또는 구강을 통해 이루어질 수 있다. 전달은 또한 삽관을 통해 호흡기계 (예를 들어, 폐)의 임의의 영역으로의 직접적인 전달일 수 있다. 필요한 조성물의 정확한 양은 대상체의 종, 연령, 체중 및 일반적인 병태, 치료되고 있는 알러지성 장애의 중증도, 사용되는 특정 핵산 또는 벡터, 이의 투여 방식 등에 따라 대상체 별로 달라질 것이다. 따라서, 모든 조성물에 대한 정확한 양을 특정하는 것은 가능하지 않다. 그러나, 적절한 양은 본원의 교시에 주어진 정례적인 실험만을 사용하여 당업자에 의해 결정될 수 있다.

[0143] 141. 조성물의 비경구 투여는, 사용되는 경우, 일반적으로 주사를 특징으로 한다. 주사제는 액체 용액 또는 현탁액, 주사 전에 액체 중의 현탁액의 용액에 적합한 고체 형태로서, 또는 에멀젼으로서 종래의 형태로 제조될 수 있다. 비경구 투여를 위한 보다 최근에 개정된 접근 방식은 일정한 투여량이 유지되도록 서방형 또는 지속 방출 시스템의 사용을 수반한다. 예를 들어, 본원에 참고로 포함된 미국 특허 제3,610,795호를 참조한다.

[0144] 142. 물질은 (예를 들어, 극미립자, 리포좀, 또는 세포에 혼입된) 용액, 현탁액일 수 있다. 이들은 항체, 수용체, 또는 수용체 리간드를 통해 특정 세포 유형에 표적화될 수 있다. 다음의 참고문헌은 특정 단백질을 종양 조직에 표적화하기 위한 상기 기술의 사용 예이다 (Senter 등, *Bioconjugate Chem.*, 2:447-451, (1991); Bagshawe, K.D., *Br. J. Cancer*, 60:275-281, (1989); Bagshawe 등, *Br. J. Cancer*, 58:700-703, (1988); Senter 등, *Bioconjugate Chem.*, 4:3-9, (1993); Battelli 등, *Cancer Immunol. Immunother.*, 35:421-425, (1992); Pietersz 및 McKenzie, *Immunolog. Reviews*, 129:57-80, (1992); 및 Roffler 등, *Biochem. Pharmacol*, 42:2062-2065, (1991)). 비히클 예컨대 "스텔스(stealth)" 및 다른 항체 접합된 리포좀 (결장 암종에 대한 지질 매개된 약물 표적화 포함), 세포 특이적인 리간드를 통한 DNA의 수용체 매개된 표적화, 림프구 유도된 종양 표적화, 및 생체내 쥣과 신경교종 세포의 고도로 특이적인 치료적 레트로바이러스 표적화. 다음의 참고문헌은 특정 단백질을 종양 조직에 표적화하기 위한 상기 기술의 사용 예이다 (Hughes 등, *Cancer Research*, 49:6214-6220, (1989); 및 Litzinger 및 Huang, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1104:179-187, (1992)). 일반적으로, 수용체는 구성적 또는 리간드 유도된 엔도시토시스의 경로에 관여한다. 이들 수용체는 클라트린-코팅된 피트(pit)에 모여서, 클라트린-코팅된 소포를 통해 세포에 들어가며, 수용체가 분류된 산성화된 엔도좀을 통과하고, 이후 세포 표면으로 재순환되거나, 세포내에서 저장되거나, 리소좀에서 분해된다. 내재화 경로는 다양한 기능, 예컨대 영양소 흡수, 활성화된 단백질의 제거, 거대분자의 청소능, 바이러스 및 독소의 기회적 유입, 리간드의 해리 및 분해, 및 수용체-수준 조절을 제공한다. 많은 수용체는 세포 유형, 수용체 농도, 리간드의 유형, 리간드 원자가, 및 리간드 농도에 따라 하나 이상의 세포내 경로를 따른다. 수용체-매개된 엔도시토시스의 분자 및 세포 기전이 검토되었다 (Brown 및 Greene, *DNA and Cell Biology* 10:6, 399-409 (1991)).

[0145] 143. 개시된 변형된 NK 세포 및 변형된 NK 세포의 입양 전달 방법이 암에 대한 효과적인 면역요법일 수 있는 것으로 이해되고 본원에서 고려된다. 개시된 방법 및 조성물은 암과 같이 조절되지 않는 세포 증식이 일어나는 임의의 질환을 치료, 억제, 감소 및/또는 예방하는데 사용될 수 있다. 다양한 유형의 암의 비제한적인 목록은 다음과 같다: 림프종(호지킨 및 비호지킨), 백혈병, 암종, 고형 조직의 암종, 편평 세포 암종, 선암종, 육종, 신경교종, 고급 신경교종, 모세포종, 신경모세포종, 형질세포종, 조직구종, 흑색종, 선종, 저산소성 종양, 골수종, AIDS-관련 림프종 또는 육종, 전이성 암, 또는 일반적인 암. 개시된 조성물이 치료에 사용될 수 있는 대표적이지만 암의 비제한적인 목록은 다음과 같다: 림프종, B 세포 림프종, T 세포 림프종, 균상식육종, 호지킨병, 골수성 백혈병 (AML을 포함하나, 이에 제한되지 않음), T-세포 급성 림프구성 백혈병 (T-ALL), 방광암, 뇌암, 신경계 암, 두경부암, 두경부의 편평 세포 암종, 폐암 예컨대 소세포 폐암 및 비-소세포 폐암, 신경모세포종/교모세포종, 난소암, 피부암, BPDCN, 다발성 골수종, 간암, 흑색종, 구강, 인후, 후두, 및 폐의 편평 세포

암종, 자궁경부암, 자궁경부암종, 유방암, 및 상피암, 신장암, 비뇨생식기암, 폐암(pulmonary cancer), 식도암종, 두경부암종, 대장암, 조혈암; 고환암; 결장암, 직장암, 전립선암, 또는 췌장암. 따라서, 일 측면에서, CD38 유전자의 녹아웃을 포함하도록 변형된 NK 세포를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 (예를 들어, 다발성 골수종, (급성 골수성 백혈병(AML), T-세포 급성 림프구성 백혈병(T-ALL), 또는 모구 형질세포양 수지상세포 종양(BPDCN)을 포함하나, 이에 제한되지 않는) 백혈병과 같은) 암 및/또는 전이 또는 전이를 치료, 감소, 억제, 저하, 개선 또는 예방하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 측면에서, 상기 방법은 (예를 들어, 다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 및 MOR202를 포함하나, 이에 제한되지 않는 항-CD38과 같은) CD38을 표적화하는 약제를 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 추가적으로, 상기 방법은 또한 대상체에게 (예를 들어, 포말리도마이드, 레날리도마이드, 또는 아프레밀라스트와 같은) 혈관신생 억제제 및 (예를 들어, 덱사메타손, 베타메타손, 프레드니솔론, 메틸프레드니솔론, 트리암시놀론, 또는 플루드로코르티손 아세테이트와 같은) 글루코코르티코이드 및/또는 ATRA를 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0146] 144. 본원에 언급된 바와 같이, (예를 들어, 본원에 개시된 방법에 의해 제조된 CD38 녹아웃 NK 세포를 포함하나, 이에 제한되지 않는 본원에 개시된 CD38 녹아웃 NK 세포와 같은) 개시된 변형 NK 세포는 대상체에게 투여되는 항-CD38 요법이 NK 세포 동족살해를 초래할 수 있거나 초래한 치료에 사용될 수 있다. 따라서, 일 측면에서, 본원에 개시된 임의의 유전적으로 변형된 NK 세포(본원에 개시된 CD38 녹아웃 NK 세포를 포함함)를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 항-CD38 면역요법을 받는 대상체에서 NK 세포 동족살해를 감소시키는 방법이 또한 본원에 개시된다. 일 측면에서, 항-CD38 면역요법은 다라투무맙, 이사툭시맙, TAK-079, 및/또는 MOR202를 포함하나, 이에 제한되지 않는 항-CD38 항체를 대상체에게 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0147] **D. 실시예**

[0148] 145. 하기 실시예는 본원에 청구된 화합물, 조성물, 물품, 장치 및/또는 방법이 어떻게 제조되고 평가되는지에 대한 완전한 개시 및 설명을 당업자에게 제공하기 위해 제시되고, 순전히 예시적이며, 본 개시를 제한하도록 의도되지 않는다. 수치 (예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위해 노력했지만, 일부 오류 및 편차를 고려해야 한다. 달리 명시되지 않는 한, 부는 중량부이고, 온도는 ℃ 또는 주위 온도이며, 압력은 대기압 또는 대기압에 가깝다.

[0149] **1. 실시예 1: 동족살해를 극복하고 ADCC를 향상시키기 위한 CD38-KO NK 세포 생성**

[0150] 146. 자연살해세포는 항-CD38 단클론성 항체인 다라투무맙(DARA)에 의해 CD38-발현 다발성 골수종(MM)을 표적화하는데 중요한 역할을 한다. DARA 요법에서 NK 세포의 동족살해를 극복하기 위해, Cas9/RNP를 사용하여 녹아웃 NK 세포를 생성하였다. 구체적으로, gRNA 서열은 CD38을 결실시키기 위해 Cas9/RNP를 사용하여 표적화하였다. 하기 서열 (CD38의 시작 코돈 근처 엑손 1에서)을 표적화하는 gRNA는 Integrated DNA Technologies에서 상업적으로 생산되었다: 5'-CTGAACTCGCAGTTGGCCAT-3' (서열번호: 1)

[0151] NK 세포를 Cas9/RNP로 전기천공하고 14일 동안 확장하였다. 결과적으로 유전자 결실은 90% 이상 효과적이었고, KO 집단의 양성 선택을 위한 임의의 방법도 사용하지 않고 NK 세포에서 CD38 발현을 대조군 NK 세포의 87%에서 CD38-결실된 NK 세포의 7%로 감소시켰다(도 1). NK 세포는 다라투무맙-매개된 동족살해에 대한 민감도에 대해 테스트되었다. 비변형된 대조군 NK 세포는 동족살해에 대해 77%의 민감도를 나타내었다 (생존력이 64%에서 14.6%로 감소됨). 대조적으로, CD38-KO NK 세포는 동족살해에 대해 11%의 민감도를 나타내었다 (생존력이 55.8%에서 49.9%로 감소됨)(도 2).

[0152] 147. 다음으로, 다발성 골수종에 대한 개선된 항체-의존적 세포성 세포독성(ADCC)에 대해 NK 세포를 테스트하였다. 3개의 상이한 표적 세포와 3개의 E:T 비율에 걸쳐 측정했을 때, CD38-KO NK 세포는 야생형 대조군과 비교하여 이들의 ADCC를 37.9%로 증가시켰고 (중앙값, p=0.004), 최종 생존 암 세포 개체군을 22.3%로 감소시켰다 (중앙값 , p=0.004) (도 3). 개별 결과는 도 4-6에 나타내었다.

[0153] **2. 실시예 2: 도입.**

[0154] 148. 다발성 골수종 (MM)은 골수 (BM)에 악성 형질 세포의 클론성 축적을 특징으로 한다. 자가 줄기세포 이식과 프로테아좀 억제제와 같은 신규 약제 (PI-보르테조밉/카르필조밉) 뿐만 아니라 면역조절 IMiD 약물 (레날리도마이드/포말리도마이드)의 도입이 MM 환자의 생존을 현저하게 개선하였지만, 이후 거의 모든 환자가 재발되고 겨우 13개월의 전체 생존 중앙값을 갖는 나쁜 예후로부터 고통받고 있다.

[0155] 149. 가장 최근에, CD38을 표적화하는 단클론성 항체인, 다라투무맙 (DARA) 및 이사툭시맙은 MM 환자의 관리에 현저한 영향을 미쳤다. DARA는 새로 진단된 MM 환자 및 재발성/불응성 MM 환자에 대해 미국 식품의약국 (FDA)의

승인을 받았다. DARA는 다음과 같은 여러 기전을 통해 표적 세포를 사멸시킨다: 보체 의존적 세포독성(CDC), 항체 의존적 세포성 세포독성(ADCC), 항체 의존적 세포성 식균작용(ADCP), 표적 세포 상의 CD38에 대한 가교에 의해 유도된 아폽토시스, 뿐만 아니라 $CD38^{+}$ 면역억제 세포의 제거를 통한 면역조절 효과. 이러한 모든 작용이 항-종양 활성과 관련되어 있지만, MM 환자에서 나타나는 임상 반응에 있어서 어떠한 기전이 중요한 역할을 하는지는 여전히 불분명하다.

[0156] 150. DARA의 잘 확립된 임상적 이점에도 불구하고, 대다수의 환자는 결국 질환 재발을 경험하고 계속해서 MM에 굴복한다. 현재 연구 및 임상 노력은 DARA에 대한 내성 기전을 밝히고, 반응을 심화/증가하기 위한 조합 요법을 개발하기 위해 진행 중이다. 임상 증거는 IMiD가 DARA와 상승작용을 하고, 결과적으로 질환 제어가 더 잘됨을 나타내었다. 이는 부분적으로 이카로스/아이올로스의 세레브론-매개된 분해를 통해 MM 세포에 대한 DARA-매개된 ADCC 뿐만 아니라 IMiD-유도된 CD38 상향-조절을 매개하는 자연 살해(NK) 세포의 활성화 때문일 수 있다.

[0157] 151. 추가 증거는 표적 세포 상의 CD38 발현 수준이 DARA에 대한 민감도와 상관관계가 있음을 나타낸다. 더 높은 CD38 발현 수준을 갖는 MM 세포는 DARA에 의해 우선적으로 사멸되는 반면, 잔류 MM 세포는 DARA로 처리하는 동안 더 낮은 CD38 발현 수준을 나타낸다. CD38의 전사는 CD38 유전자의 인트론 I에 존재하는 RA 반응성 요소를 통해 레티노산(RA)에 의해 직접적으로 제어되기 때문에, 올트랜스레티노산(all-trans retinoic acid, ATRA)은 MM 세포를 비롯한 다양한 조혈 세포에서 CD38 발현을 상향-조절한다. 또한, ATRA는 보체 억제 단백질(CD55 및 CD59)의 발현을 하향-조절하고, DARA와 상승작용하여 표적 MM 세포를 사멸시킨다. 이 전략은 현재 MM 환자를 위해 ATRA와 DARA를 조합한 임상 시험에서 테스트 중이다 (NCT02751255).

[0158] 152. DARA에 대한 차선의 반응에 대해 또 다른 추정되는 기전은 또한 NK 세포가 비교적 높은 수준의 CD38을 발현하기 때문에, DARA 처리 후 환자에서 NK 세포의 신속한 결실이다. 순환하는 NK 세포의 이러한 감소는 처리 중단 후 3-6개월 동안 지속되어, MM 세포에 대한 비효율적인 ADCC를 초래한다. NK 세포의 입양 전달은 이러한 기전을 극복하기 위한 전략이 될 수 있다. 전임상 모델에서, 생체외 확장된 NK 세포의 보충은 질환 부담을 제어하는데 있어서 DARA의 현저하지만 다소 개선되는 결과로 이어지는데, 이는 상기 NK 세포가 또한 DARA-매개된 제거의 대상이 되기 때문이다. DARA-매개된 제거를 극복하기 위한 접근 방식은 NK ($CD38^{KO}$ NK) 세포에서 CD38을 결실시키기 위한 것이다. NK 세포의 유전자 편집은 이들의 DNA-감지 기전 및 관련 아폽토시스로 인해 도전적이었지만, Cas9 리보핵단백질 복합체(Cas9/RNP)로 DNA가 없는 방법을 사용하여 일차 NK 세포에서 효율적인 유전자 결실을 달성할 수 있다.

[0159] 153. 여기에서, NK 세포에 대한 CD38 결실의 생물학적 결과는 시험관내 및 생체내 접합 및 동족살해, MM 세포에 대한 ADCC를 평가함으로써 DARA 면역요법과 관련하여 조사하였다. 마지막으로, CD38의 역할은 NK 세포 대사 및 전사에 대한 니코틴아미드 아데닌 디뉴클레오티드(NAD^{+}) 수준을 조절하는 세포외효소(ectoenzyme)로서 분석되었다.

[0160] **3. 실시예 3: 재료 및 방법.**

[0161] 154. *NK 세포 정제 및 확장.* 말초 혈액 NK 세포는 건강한 공여자로부터 분리되었다. 정제된 NK 세포 ($CD3^{-}$/$CD56^{+}$)는 2:1의 비율로 조사된 막 결합 IL-21 (mbIL21)/4-1BBL 발현 K562 (CSTX002)를 사용하여 자극하고, AIM-V/ICSR 확장 배지 (CTS™AIMV™ SFM/ CTS™ Immune Cell SR, Thermo Fisher Scientific) 및 50 IU의 인간 재조합 IL-2 (rIL-2) (Novartis)에서 7일 동안 성장시켰다. $CD3^{+}$, $CD19^{+}$, $CD33^{+}$ 세포는 자극 후 검출되지 않았다 (도 7). 확장 6일째 전기천공하기 전에, 배지의 절반을 교체하였다.

[0162] 155. *다발성 골수종 세포.* MM 세포주 H929, MM.1S 및 U266은 미국세포주은행(American Type Culture Collection)에서 구입하였다. OPM-2 및 KMS-11 세포주는 독일 미생물 및 세포배양 센터(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)에서 수득하였다. 일차 MM 세포는 IRB-승인된 프로토콜 및 존스 홉킨스 대학교의 서면 동의 하에 새로 진단되거나 재발된 MM 환자로부터 수집하였다. 환자 정보는 표 1에 제공되었다. $CD138^{+}$ MM 세포 정제 및 세포 배양은 이전에 게재되었다. 단핵 세포는 Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare Bio-Sciences AB, 스웨덴)를 사용하여 밀도 구배 원심분리에 의해 신선한 BM 흡인물로부터 분리하였다. $CD138^{+}$ MM 세포는 제조업체의 지침 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)에 따라 자기 비드 및 컬럼으로 선별하였다. 모든 MM 세포주 및 일차 MM 세포는 10% 열-불활성화된 FBS (Corning, Manassas, VA), 2 mM L-글루타민 (Gibco, Grand Island, NY), 100 unit/ml 페니실린 및 100 μg/ml 스트렙토마이신 (Gibco, Grand Island, NY)이 보충된

RPMI 1640 배지 (Gibco, UK)에서 배양하였다.

[0163] **표 1**

	연령	하위유형	형질세포의 빈도 (생검)	ISS	염색체	치료 이력	마지막 DARA 주입
환자-1	75	IgG 람다 골수종	50%	NA	nuc ish(D3Z1,CCND1-XT)x3,(D9Z1,D15Z4)x3-4	나이브(naïve)	없음
환자-2	67	IgG 람다 골수종	70-80%	1	t(11;14) 및 11q-	PI, IMiD, 자가 SCT, DARA XPO1 억제제, BCL2 억제제, 항-BCMA Ab	22 개월 전
환자-3	47	IgG 카파 형질세포종	<5%	1	불명	나이브	없음
환자-4	73	IgA 람다 골수종	10-15%	1	1q+, 1p-, 6+, 9+, 15+, 정례적 파트너없이 IgH 전좌	나이브	없음
환자-5	57	IgA 카파 골수종	40-50%	3	1q+, t(4;14), -13 myc 중단	나이브	없음
DARA-내성 환자	42	IgG 람다 골수종	<1%	3	+1q, 일염색체성 13, del 14	PI, 자가 SCT, IMiD, DARA	10 일 전

[0164]

[0165] 156. *마우스*. NOD.Cg-*Prkdc*^{scid}*Il2rg*^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) 마우스는 Jackson Laboratory에서 구입하였으며, 특정 병원체가 없는 조건 하에서 유지하였다. 6 내지 10주령 수컷 NSG 마우스는 존스 홉킨스 대학교의 동물 연구 위원회에서 승인한 동물 프로토콜에 따라 실험에 사용되었다.

[0166] 157. *면역표현형*. NK 세포 및 MM 세포를 형광단-접합된 항체로 염색하였다. 항체 목록은 표 2에 나타내었다. 세포를 세척하고, LSR II 유세포 분석기 (Becton Dickinson Biosciences) 및 FlowJo 소프트웨어 (Tree Star Inc, Ashland, OR)를 사용하여 유세포 분석법으로 분석하였다.

[0167] **표 2**

상표	*반응성*	*명칭*	*클론*	*포맷*
BD	*인간*	*CD3*	*SK7*	*FITC*
BD Pharmingen	*인간*	*CD16*	*3G8*	*PE*
BD Pharmingen	*인간*	*CD16*	*3G8*	*Alexa Fluor 647*
BD Pharmingen	*인간*	*CD19*	*SJ25C1*	*APC-Cy7*
BD Horizon	*인간*	*CD33*	*WM53*	*BV421*
BD	*인간*	*CD38*	*HB7*	*PE*
Biolegend	*인간*	*CD38*	*HB7*	*APC*
Biolegend	*인간*	*CD38*	*HIT2*	*비오틴*
BD Pharmingen	*인간*	*CD56*	*B159*	*Alexa Fluor 647*
BD Pharmingen	*인간*	*CD138*	*MI15*	*PE*
BD Pharmingen	*인간*	*CD45*	*HI30*	*APC*
BD Horizon	*인간*	*CD45*	*HI30*	*BV421*
BD Pharmingen	*마우스*	*CD45*	*30-F11*	*FITC*

[0168]

[0169] 158. *CRISPR 변형된 세포의 생성*. CD38^{KO} 및 CD16^{KO} NK 세포를 생성하기 위해, 본 발명자들은 CD38 유전자[34]의 엑손 1을 표적화하는 crisprRNA (crRNA) (5-CTGAACTCGCAGTTGGCCAT, 서열번호 1)와 CD16A 유전자의 엑손 5를 표적화하는 crRNA (5-AAAGAGACTTGGTACCCAGG, 서열번호 3)를 사용하였다. Cas9/RNP 복합체 생성은 이전에 설명되었다. CD38^{KO} 및 CD16^{KO} NK 세포를 생성하기 위해, 본 발명자들은 CD38 유전자의 엑손 1을 표적화하는 crisprRNA (crRNA) (5-CTGAACTCGCAGTTGGCCAT; 서열번호 1)와 CD16A 유전자의 엑손 5를 표적화하는 crRNA (5-AAAGAGACTTGGTACCCAGG; 서열번호 4)를 사용하였다. Cas9/RNP 복합체 생성은 이전에 설명되었다. 간략하게, 사전

-전사된 Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA 및 Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA (카탈로그# 1072532)는 IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, Iowa)에서 구입하였다. 가이드 RNA (gRNA)는 뉴클레아제가 없는 IDTE, pH 7.5 (1X TE 용액, 카탈로그 # 11-01-02-02)에서 200 μM의 각각의 crRNA 및 tracrRNA와 함께 총 부피 10 μl로 95℃에서 5분 동안 인큐베이션하여 제조하였다. Cas9/RNP 복합체는 2 μl의 Alt-R® S.p. HiFi Cas9 뉴클레아제 V3 단백질 (122 pmol) (카탈로그# 1081060), 2 μl의 gRNA (400 pmol), 및 1 μl의 PBS를 총 부피 5 μl로 실온에서 15-20분 동안 인큐베이션하여 형성하였다. 7일-확장된 NK 세포를 P3 일차 세포 4D-NucleofectorTM X 용액 20 μl와 Cas9/RNP 복합체 5 μl 및 100 μM의 Alt-R® Cas9 전기천공 인핸서 (카탈로그# 1075915) 1 μl에 재현탁하고, 펄스 EN-138이 있는 Lonza 4D-Nucleofector 시스템을 사용하여 전기천공시켰다. 야생형 NK (CD38WT NK) 세포는 Cas9/RNP 복합체 없이 전기천공시켰다. 전기천공 후, NK 세포는 유세포 분석법을 사용하여 CRISPR 변형의 효율성을 평가하기 전에 50 IU의 rIL-2가 보충된 AIM-V/ICSR 성장 배지에서 2일 동안 휴지시켰다. 이후, 세포를 CSTX002로 확장하였다. 잔류 CD38+ NK 세포는 비오틴화된 항-CD38 항체 (BioLegend)에 뒤이어 항-비오틴 마이크로비드 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)로 표지하고, LD 컬럼 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) 상에서 결실시켜 제거하였다.

[0170] 159. *CD38-표적화된 Cas9/RNP의 표적외 효과 확인.* 전체 게놈 서열분석을 사용하여 CD38을 표적화하는 Cas9/RNP의 표적외 효과를 확인하였다. 게놈 DNA (gDNA)는 DNeasy 혈액 및 조직 키트 (Qiagen, Cat No./ID: 69504)를 사용하여 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포로부터 분리하였다. DNA 라이브러리는 NEBNext Ultra II-FS DNA 라이브러리 준비 키트 (New England Biolabs, Ipswhich MA)를 사용하여 구축하였다. 샘플은 효소적으로 단편화되고, 5' 인산화되고, dA-테일링되고(dA-Tailed), 샘플 배정 오류(mis-assignment)를 방지하고 인덱스 호핑(index hopping)을 해결하기 위해 고유한, 이중 인덱싱된 어댑터 접근 방식으로 결찰되었다 (Integrated DNA Technologies, Iowa). 어댑터-결찰된 DNA는 한계-주기(limit-cycle) PCR에 의해 증폭시키고, 자기-비드 기반 접근 방식을 사용하여 정제하였다. 라이브러리 품질은 Tapesation High-Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent Biotechonologies)로 분석하고, KAPA qPCR (KAPA BioSystems)로 정량화하였다. 라이브러리는 Illumina HiSeq4000 플랫폼 상에서 ~30X 범위의 깊이까지 2 x 150 bp 리드 길이(read length)로 서열분석되었다.

[0171] 160. *CD38-표적화된 Cas9/RNP의 표적외 효과 확인.* 전체 게놈 서열분석을 사용하여 CD38을 표적화하는 Cas9/RNP의 표적외 효과를 확인하였다. 게놈 DNA (gDNA)는 DNeasy 혈액 및 조직 키트 (Qiagen, Cat No./ID: 69504)를 사용하여 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포로부터 분리하였다. DNA 라이브러리는 NEBNext Ultra II-FS DNA 라이브러리 준비 키트 (New England Biolabs, Ipswhich MA)를 사용하여 구축하였다. 샘플은 효소적으로 단편화되고, 5' 인산화되고, dA-테일링되고, 샘플 배정 오류를 방지하고 인덱스 호핑을 해결하기 위해 고유한, 이중 인덱싱된 어댑터 접근 방식으로 결찰되었다 (Integrated DNA Technologies, Iowa). 어댑터-결찰된 DNA를 한계-주기 PCR로 증폭시키고, 자기-비드 기반 접근 방식을 사용하여 정제하였다. 라이브러리 품질은 Tapesation High-Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent Biotechonologies)로 분석하고, KAPA qPCR (KAPA BioSystems)로 정량화하였다. 라이브러리는 Illumina HiSeq4000 플랫폼 상에서 ~30X 범위의 깊이까지 2 x 150 bp 리드 길이로 서열분석되었다.

[0172] 161. *NK 기능 분석.* NK 세포 접합 분석은 이전에 게재된 바와 같이, 그리고 상기 구체화된 바와 같이 수행되었다. 동족살해를 정량화하기 위해, $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포를 각각 10 μg/ml의 DARA 또는 용매 대조군으로 4시간 또는 24시간 동안 처리한 다음, PO-PRO™-1 염료 (Invitrogen, Eugene, Oregon) 및 7-아미노액티노마이신 D (7-AAD) (Invitrogen, Eugene, Oregon)[25]로 염색하였다. 유동-기반 사멸 분석은 보충 방법에 구체화된 바와 같이 수행되었다. 간략하게, $CD38^{WT}$ 또는 $CD38^{KO}$ NK 세포는 10 μg/ml의 DARA 또는 대조군으로서 용매의 존재 하에 4시간 또는 24시간 동안 CFSE-표지된 표적 MM 세포와 공동-배양하였다.

[0173] 162. *NSG 마우스 내로 인간 NK 세포의 입양 전달.* 동일한 개별 공여자로부터의 생체외 확장된 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포를 해동하고, 조사된 CSTX002로 1주일 동안 재-자극하였다. 각 그룹의 10^7개 NK 세포를 행크 균형 염 용액(Hank's balanced salt solution) (Gibco, Grand Island, NY)에 현탁하고, 동일한 날 DARA (8 mg/kg) 또는 용매 대조군으로 복강내 전-처리된 NSG 마우스에 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. 마우스는 격일로 rIL-2 (50,000 IU)를 복강내로 제공하였다. 말초 혈액 (7일 후), 비장 및 BM (9일 후)을 수집하고, 각 마우스에서 NK 세포의

지속성을 분석하였다. 비장에서의 인간 NK 세포 및 2개의 대퇴골로부터의 BM에 대한 절대 수도 계산하였다.

[0174] 163. *RNA 서열분석 및 독창성 경로 분석.* 가닥-특이적 RNA-seq 라이브러리는 제조업체의 권장사항 (New England Biolabs, Ipswhich MA)에 따라 NEBNext Ultra II 방향성 RNA 라이브러리 준비 키트를 사용하여 준비하였다. 요약하면, 동일한 공여자 (n = 6) $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포로부터 분리된 총 RNA, (총 12개 샘플) 품질은 Agilent 2100 바이오분석기 (Agilent Biotechnologies)로 RNA 6000 나노 키트를 사용하여 평가하고, 농도는 Qubit RNA HS 분석 키트 (Life Technologies)를 사용하여 측정하였다. 40-500 ng 분취량의 총 RNA는 NEB의 인간/마우스/랫트 RNAse-H 기반 결실 키트 (New England BioLabs)를 사용하여 rRNA 결실시켰다. rRNA 제거 후, mRNA는 단편화시킨 다음 무작위 헥사머 프라이머로 제1- 및 제2-가닥 cDNA 합성에 사용하였다. 이중 가닥 cDNA 단편은 말단-수선 및 a-테일링과 이중-고유 어댑터 (Integrated DNA Technologies)의 결찰을 거쳤다. 어댑터-결찰된 cDNA를 한계-주기 PCR로 증폭시키고, 자기-비드 기반 접근 방식을 사용하여 정제하였다. 라이브러리 품질은 Tapestation High-Sensitivity D1000 ScreenTape (Agilent Biotechonologies)로 분석하고, KAPA qPCR (KAPA BioSystems)로 정량화하였다. 라이브러리를 풀링하고, Illumina HiSeq 4000 플랫폼 상에서 2 x 150 bp 리드 길이로 서열분석하여 샘플 당 대략 6천만-8천만 개의 쌍-말단 리드(paired-end read)를 생성하였다. 본 발명자들은 다음으로 정규화된 RNA-seq 데이터를 사용하고, 적어도 하나의 샘플에서 10 FPM 이상으로 발현되지 않은 유전자를 제거하여 독창성 경로 분석 (IPA)에 입력하기 전에 필터링하였다. 차등적으로-발현된 유전자 (DEG)는 $CD38^{WT}$와 $CD38^{KO}$ NK 세포 사이의 유전자 발현 수준의 대응표본 양측 t-검정이 0.05 미만의 p-값을 산출한 것으로 확인되었다. DEG에 대한 p-값 컷오프를 0.01 또는 0.1로 조정하거나, 최소 유전자 발현 컷오프를 5 FPM으로 조정하는 것은 결론에 질적으로 영향을 미치지 않는다. $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포 전반에 걸친 각 유전자의 평균 배수 변화는 보고된 경로에서 평균의 배수 변화와 거의 동일하므로, 이러한 결론에 대해 개인 간 영향 (동일한 공여자의 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포)은 무시해도 될 정도의 것으로 간주될 수 있다. IPA의 핵심 분석에 대한 모든 기본 설정이 구현되었다. 본 발명자들은 $CD38^{WT}$ NK 세포가 DARA-유도된 동족살해에 의해 사멸되기 때문에, DARA 존재 하에서 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 전사체 프로파일을 연구할 수 없었다.

[0175] 164. 차등적으로-발현된 유전자 (DEG)는 $CD38^{WT}$와 $CD38^{KO}$ NK 세포 사이의 유전자 발현 수준의 대응표본 양측 t-검정이 0.05 미만의 p-값을 산출한 것으로 확인되었다. DEG에 대한 p-값 컷오프를 0.01 또는 0.1로 조정하거나, 최소 유전자 발현 컷오프를 5 FPM으로 조정하는 것은 결론에 질적으로 영향을 미치지 않는다. $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포 전반에 걸친 각 유전자의 평균 배수 변화는 보고된 경로에서 평균의 배수 변화와 거의 동일하므로, 이러한 결론에 대해 개인 간 영향 (동일한 공여자의 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포)은 무시해도 될 정도의 것으로 간주될 수 있다. IPA의 핵심 분석에 대한 모든 기본 설정이 구현되었다. 본 발명자들은 $CD38^{WT}$ NK 세포가 DARA-유도된 동족살해에 의해 사멸되기 때문에, DARA 존재 하에서 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 전사체 프로파일을 연구할 수 없었다.

[0176] 165. *대사 분석.* 산소 소비율 (OCR) 및 세포외 산성화율 (ECAR)을 측정하기 위해, 본 발명자들은 Seahorse XFe24 (Agilent Technologies) 상에서 Agilent 세포외 플럭스 분석 키트 (Agilent Technologies)를 사용하였다. 확장된 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포는 37℃의 비-CO_2 인큐베이터에서 측정하기 전에 1-2시간 동안 XF RPMI에서 인큐베이션하였다. 배지는 pH 7.35-7.4에서 페놀 레드가 없는 10 μM 글루코스 및 2 μM L-글루타민으로 보충되었다. OCR, 산화적 인산화 (OXPHOS)의 측정, 및 ECAR은 1 μM 올리고마이신, 1.5 μM FCCP, 및 0.5 μM 로테논 및 안티마이신 A를 세포 배양물에 첨가한 후 기본 조건 하에서 분석하였다.

[0177] 166. *접합 분석, 동족살해 분석 및 유동-기반 세포독성 분석.* NK 세포 접합 분석은 Burshtyn 등에 의해 설명된 바와 같이 약간의 변형으로 수행되었다. 간략하게, $2x10^6$ 세포 ($1x10^7$ 세포/ml)의 각각의 NK 세포를 5 μM의 녹색 염료 CFDA SE (CFSE) 세포 추적자 (Invitrogen, Eugene, Oregon)로 37℃에서 15분 동안, 또는 5 μM의 적색 염료 PKH26 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)으로 실온에서 5분 동안 염색하였다. 염색은 세포 현탁액에 완전 배지를 첨가하여 중단하였다. 세포를 완전 배지로 2회 세척하였다. 녹색 및 적색 표지된 NK 세포를 10 μg/ml의 DARA 또는 용매 대조군 (식염수)이 보충된 총 부피 200 μl에 1:1 비율로 혼합하고, 5% CO_2 인큐베이터에서 37℃에서 4시간 동안 공동-배양하였다. 이후, 세포를 부드럽게 수집하고, 200 μl의 4% 포름알데히드로 고정하고 20,000개 세포를 유세포 분석법을 사용하여 접합에 대해 분석하였다.

[0178] 167. 동족살해를 정량화하기 위해, $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포를 각각 10 μg/ml의 DARA 또는 용매 대조군으로 4시간 또는 24시간 동안 처리한 다음, PO-PRO™-1 염료 (Invitrogen, Eugene, Oregon) 및 7-아미노액티노마이신 D (7-AAD) (Invitrogen, Eugene, Oregon)로 염색하였다. 생존 NK 세포 (PO-PRO™-1 음성/7-AAD 음성)는 비드 (Becton Dickinson Biosciences)를 사용하여 빈도 또는 절대 수를 기반으로 평가하였다.

[0179] 168. ADCC를 평가하기 위해, MM 세포주 또는 정제된 일차 $CD138^{+}$ MM 세포를 5 μM의 CFSE로 표지하고, 10 μg/ml의 DARA 또는 대조군으로서 용매의 존재 하에 평저형 96-웰 플레이트 (Falcon, USA)에서 지시된 이펙터-대-표적 (E:T) 비율로 $CD38^{WT}$ 또는 $CD38^{KO}$ NK 세포와 공동-배양하였다[38]. DARA-내성 일차 샘플 ($CD38^{음성/저(low)}$)의 빈도가 낮기 때문에, 본 발명자들은 이러한 세포를 정제하지 않고, MM 세포를 $CD138^{+}CD45^{-}$ 세포로 정의하였다. 표적 세포의 생존력은 MM 세포주의 경우 4시간 후, 그리고 일차 샘플의 경우 24시간 후에 분석하였다. 일부 실험에서, 골수종 세포주는 4시간 세포독성 분석 전에 2일 동안 50 nM의 ATRA로 전처리하였다. 전반적으로 DARA-매개된 NK 세포성 세포독성에 대한 ATRA의 효과를 연구하기 위해, MM 세포 및 NK 세포를 DARA 및 50 nM의 ATRA의 존재 하에 48시간 동안 공동-배양하였다. 생존가능한 표적 세포는 총 CFSE 양성 세포 중 7-AAD 음성/CFSE 양성 세포의 백분율 또는 절대 수로부터 또는 비드를 사용하여 평가하였다. 백그라운드는 이펙터 세포 및 DARA의 부재 하에 인큐베이션된 표적 세포로부터 결정하였다. DARA-매개된 ADCC의 백분율 (%)은 다음 공식에 따라 계산하였다: (1- DARA가 있는 이펙터 세포의 존재 하에 생존가능한 표적 세포의 백분율 또는 절대 수 / 용매 대조군이 있는 상응하는 샘플의 백분율 또는 절대 수) × 100. 모든 분석은 2명 또는 3명의 독립적인 공여자와 함께 3회 반복으로 수행되었다.

[0180] 169. *통계 분석.* 통계 분석은 GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc)을 사용하여 수행하였다. 스튜던트 t-검정은 두 개의 독립적인 그룹을 비교하는데 사용하였다. 3개 이상의 그룹을 일원 ANOVA 검정에 이어 Tukey의 다중 비교 검정으로 비교하였다. $p < 0.05$는 통계적 유의성을 나타내는 것으로 간주되었다.

[0181] **4. 실시예 4: 결과.**

[0182] 170. *NK 세포에서 Cas9/RNP를 사용한 효율적인 유전자 표적화.* Cas9/RNP 방법을 사용하여, $CD38^{KO}$ NK 세포는 건강한 공여자의 생체외 확장된 말초 혈액 NK(PB-NK) 세포로부터 성공적으로 생성되었다 (도 8a). 유세포 분석은 CD38 녹아웃 효율성이 81.9 ± 6.9%인 것으로 나타났다 (n = 5, 평균 ± SD, 도 8b). 자기 분리를 사용하여, NK 세포를 99% 이상 $CD38^{KO}$로 정제하여 추가 실험에 사용하였다 (도 8c). $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포는 유사한 확장 속도를 보였고, $CD38^{KO}$ NK 세포의 순도는 후속적인 배양 후에 보존되었다 (도 8d). $CD38^{WT}$과 $CD38^{KO}$ NK 세포 간의 CD16 발현 수준에서는 차이가 관찰되지 않았다 (도 7b).

[0183] 171. *NK 세포에서 Cas9/RNP의 낮은 표적외 효과.* 고충실도 Cas9 (HiFi-Cas9)은 전기천공 후 이의 빠른 분해로 인해 낮은 표적외 편집을 가지는 것으로 나타났다. CRISPR-변형된 NK 세포에서 표적외 효과를 연구하기 위해, 전체 게놈 시퀀싱(WGS)을 수행하였으며, $CD38^{KO}$ NK 세포에 독점적인 SNP 및 INDEL을 갖는 26개의 유전자가 발견되었다. 돌연변이는 암호화 영역으로 제한되었기 때문에, 모든 유전자는 중간 또는 높은 잠재적 영향의 돌연변이를 가졌다. 18개 유전자에는 중간 영향 (미스센스 및 비-프레임 이동)으로 분류된 돌연변이가 있고, (CD38을 포함하는) 8개 유전자에는 SnpEff에 의해 높은 영향 (개시소실, 종결획득 및 프레임 이동)으로 분류된 돌연변이가 있다 (표 3). RNA-seq에 의해, 가능한 고-영향 돌연변이를 갖는 표적외 유전자 중 4개만이 NK 세포에서 유의미한 수준으로 발현된다 (CC2D1B, DENND4B, KMT2C, 및 WDR89, 도 9). 이러한 결과는 NK 세포에서 CD38 표적화에 대한 이 gRNA의 효율성 및 특이성을 나타낸다.

[0184] 표 3.

유전자	Chr	위치	$CD38^{KO}$ NK 의 변이형 대립 유전자 빈도	$CD38^{WT}$ NK 의 변이형 대립 유전자 빈도	Ref	Alt	필터	유전자 내 Loc	효과	영향
ANKRD36C	2	96517484	6.90%	0.00%	T	G	클러스터드_이벤트, t_lod,매핑_퀄리티	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
APOBEC3H	22	39497425	19.05%	0.00%	T	A	통과	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
CC2D1B	1	52825875	8.00%	0.00%	T	TC	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	프레임 이동	높음
CC2D1B	1	52825879	7.69%	0.00%	C	CAG	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	프레임 이동	높음
CC2D1B	1	52825881	7.69%	0.00%	C	CCTTGGAGTCGCAGCTAGCCTCTGTGAGG (서열번호 5)	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	프레임 이동&종결획득	높음
CCDC181	1	169388367	19.05%	0.00%	C	T	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
CCDC181	1	169388373	18.18%	0.00%	C	T	클러스터드_이벤트, 베이스_퀄리티	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
CD38	4	15780022	12.00%	0.00%	CCCCGCCTGGAGCCCTATGGCCAACTGCGAGTTCAGCCCGGTGTCCGGGGACAAA (서열번호 6)	C	클러스터드_이벤트	암호화_서열	개시소실&비프레임 이동 결실	높음

[0185]

CD38	4	15780032	31.25%	0.00%	AGCCCTATG	A	클러스터드_이벤트	암호화_서열	프레임 이동&개시소실	높음
CD38	4	15780039	13.33%	0.00%	TG	T	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	프레임 이동	높음
CD38	4	15780040	12.50%	0.00%	GGCCAA	G	클러스터드_이벤트	암호화_서열	프레임 이동	높음
CR1	1	207782852	8.00%	0.00%	T	TTCTGG	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	프레임 이동	높음
CR1	1	207782853	8.00%	0.00%	A	AGCTGTGC	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	프레임 이동	높음
CR1	1	207782855	8.33%	0.00%	T	TTTATTAGTAG (서열번호 7)	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	프레임 이동	높음
CR1	1	207782860	7.69%	0.00%	G	A	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
DENND4B	1	153903191	8.70%	0.00%	TG	T	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	프레임 이동	높음
DENND4B	1	153903197	8.33%	0.00%	CCCTAGAGTT (서열번호 8)	C	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	비프레임 이동 결실	중간
DENND4B	1	153903210	10.53%	0.00%	A	T	클러스터드_이벤트, 베이스_퀄리티,리드_위치	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
DENND4B	1	153903213	9.52%	0.00%	A	T	클러스터드_이벤트, 베이스_퀄리티,리드_위치	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
DENND4B	1	153903216	11.11%	0.00%	A	AAACTCTAGG (서열번호 9)	클러스터드_이벤트, 베이스_퀄리티,리드_위치	암호화_서열	증결획득&비프레임 이동 삽입	높음
FGF7	15	49776539	12.50%	0.00%	A	T	통과	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
FGFR2	10	123244918	10.53%	0.00%	G	GGGCACCGGC AGGAAAGACA AC (서열번호 10)	통과	암호화_서열	비프레임 이동 삽입	중간
FGFR2	10	123244922	10.53%	0.00%	A	ACCAACGAACT GTAAGGGCT (서열번호 11)	통과	암호화_서열	프레임 이동	높음

[0186]

FHOD1	16	67270885	10.53%	0.00%	G	A	통과	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
FOXP3	X	49107814	9.09%	0.00%	T	A	통과	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
KMT2C	7	151962134	9.76%	0.00%	G	T	통과	암호화_서열	종결획득	높음
MT-ATP6	MT	9181	1.33%	0.00%	A	G	통과	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
MYH4	17	10352331	10.00%	0.00%	T	G	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
MYH4	17	10352336	8.70%	0.00%	C	CAGG	클러스터드_이벤트, t_lod,리드_위치	암호화_서열	비프레임 이동 삽입	중간
MYH4	17	10352338	8.70%	0.00%	T	TGCAGAAGAA (서열번호 12)	클러스터드_이벤트, t_lod,리드_위치	암호화_서열	비프레임 이동 삽입	중간
MYH4	17	10352340	9.09%	0.00%	C	A	클러스터드_이벤트, 베이스_퀄리티,t_lod ,리드_위치	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
NBPF14	1	14825277	15.38%	0.00%	T	TCTC	통과	암호화_서열	비프레임 이동 삽입	중간
OR2T4	1	248525100	12.50%	0.00%	G	A	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
OR2T4	1	248525135	11.11%	0.00%	G	A	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
OR2T4	1	248525138	13.79%	0.00%	C	T	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC1	8	101718932	7.41%	0.00%	C	G	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC1	8	101718968	7.14%	0.00%	C	T	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC1	8	101721705	8.33%	0.00%	G	T	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	비동의성 SNV	중간

[0187]

PABPC1	8	101721709	8.33%	0.00%	T	A	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC1	8	101721812	11.54%	0.00%	G	A	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC1	8	101721817	10.71%	0.00%	T	C	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC1	8	101721839	10.34%	0.00%	C	A	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
FGFR2	10	123244918	10.53%	0.00%	G	GGGCACCGGCAGGAAAGACAC (서열번호 10)	통과	암호화_서열	비프레임 이동 삽입	중간
FGFR2	10	123244922	10.53%	0.00%	A	ACCAACGAACTGTAAGGGCT (서열번호 11)	통과	암호화_서열	프레임 이동	높음
PABPC3	13	256708851	9.38%	0.00%	A	G	통과	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC3	13	256711545	6.67%	0.00%	C	A	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC3	13	256711549	9.38%	0.00%	A	G	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC3	13	256711555	9.68%	0.00%	G	A	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC3	13	256711558	9.38%	0.00%	C	T	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC3	13	256711564	10.34%	0.00%	A	T	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC3	13	256711573	15.63%	0.00%	CA	TG	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC3	13	256711585	18.75%	0.00%	TA	CC	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC3	13	256711699	12.50%	0.00%	GT	CC	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간

[0188]

PABPC3	13	25671742	7.14%	0.00%	G	A	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
PABPC3	13	25671759	7.14%	0.00%	C	T	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
WDR89	14	64066367	10.00%	0.00%	A	T	클러스터드_이벤트, t_lod	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
WDR89	14	64066453	14.29%	0.00%	G	A	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
WDR89	14	64066471	12.00%	0.00%	GT	AG	클러스터드_이벤트, 매핑_퀄리티	암호화_서열	종결획득	높음
FGF7	15	49776539	12.50%	0.00%	A	T	통과	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
FHOD1	16	67270885	10.53%	0.00%	G	A	통과	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
MYH4	17	10352331	10.00%	0.00%	T	G	클러스터드_이벤트	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
MYH4	17	10352336	8.70%	0.00%	C	CAGG	클러스터드_이벤트, t_lod,리드_위치	암호화_서열	비프레임 이동 삽입	중간
MYH4	17	10352338	8.70%	0.00%	T	TGCAGAAGAA (서열번호 12)	클러스터드_이벤트, t_lod,리드_위치	암호화_서열	비프레임 이동 삽입	중간
MYH4	17	10352340	9.09%	0.00%	C	A	클러스터드_이벤트, 베이스_퀄리티,t_lod ,리드_위치	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
STXBP4	17	53237239	12.50%	0.00%	T	G	클러스터드_이벤트, 매핑_퀄리티	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
STXBP4	17	53237241	12.50%	0.00%	G	T	클러스터드_이벤트, 매핑_퀄리티	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
STXBP4	17	53237250	13.04%	0.00%	A	C	클러스터드_이벤트, 매핑_퀄리티	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
SIGLEC10	19	51919263	11.11%	0.00%	G	T	클러스터드_이벤트, 매핑_퀄리티	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
SIGLEC10	19	51919279	12.50%	0.00%	A	G	클러스터드_이벤트, 매핑_퀄리티	암호화_서열	개시소실	낮음
SIGLEC10	19	51919302	9.52%	0.00%	T	C	클러스터드_이벤트, 매핑_퀄리티	암호화_서열	비동의성 SNV	중간

APOBEC3H	22	39497425	19.05%	0.00%	T	A	통과	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
FOXP3	X	49107814	9.09%	0.00%	T	A	통과	암호화_서열	비동의성 SNV	중간
MT-ATP6	MT	9181	1.33%	0.00%	A	G	통과	암호화_서열	비동의성 SNV	중간

[0189]

[0190] 172. *DARA-유도된 동족 살해에 대한 CD38^{KO} NK 세포의 내성.* DARA는 CD38 및 CD16을 교차연결하여 NK-대-NK ADCC를 통해 NK 세포 동족살해를 유도한다. CD38^{KO} NK 세포가 DARA-유도된 동족살해에 내성이 있는지를 연구하기 위해, 대응표본 CD38^{WT} 및 CD38^{KO} NK 세포의 접합 및 생존력을 평가하였다. DARA는 CD38^{WT} NK 세포 접합체의 형성을 증가시킬 수 있으나, CD38^{KO} NK 세포 접합체의 형성에는 영향을 미치지 않았다 (도 10a 내지 도 10b). 이 결과와 일치하게, DARA는 CD38^{WT} NK 세포의 ADCC-의존적 아폽토시스를 유도할 수 있는 반면, CD38^{KO} NK 세포는 DARA와 함께 인큐베이션하는 동안 내내 이들의 생존력을 보존하였다 (도 10c 내지 도 10d). 유사하게, NK 세포에서 CD16의 결실은 또한 DARA 처리 후 이들의 생존력을 보존하였다. 추가적으로, NK 세포 및 보체의 부재 하에서 DARA-매개된 용해가 관찰되지 않았다 (도 11b). 이러한 결과는 CD16 및 CD38이 DARA-유도된 동족살해에 필요하고 충분하며, NK 세포에서 CD38의 결실은 이들이 DARA-유도된 동족살해에 내성을 갖게 됨을 나타낸다.

[0191] 173. 다음으로, DARA에 대한 $CD38^{KO}$ NK 세포의 내성이 또한 생체내에서 우수한 지속성에 기여할 수 있는지를 연구하기 위해, $CD38^{WT}$ 또는 $CD38^{KO}$ NK 세포를 DARA로 처리된 NSG 마우스에 융합하고, PB, 비장 및 BM에서 NK 세포 빈도를 조사하였다. $CD38^{WT}$ 또는 $CD38^{KO}$ NK 세포는 대조군 마우스에서 비교할 만한 생착을 보였다 (도 10e 내지 도 10f). 대조적으로, DARA를 사용한 처리는 $CD38^{WT}$ NK 세포의 생착을 현저하게 감소시켰지만 $CD38^{KO}$ NK 세포의 지속성에는 영향을 미치지 않았다 (도 10e 내지 도 10f). $CD38^{WT}$ NK 세포는 비장 및 BM 뿐만 아니라 말초 혈액에서 DARA에 의해 결핍된 반면, $CD38^{KO}$ NK 세포는 대조군과 DARA-처리된 마우스 간의 임의의 이러한 구획에서 유의한 결핍을 보이지 않았다 (도 10f). 종합하면, 이러한 결과는 $CD38^{KO}$ 세포가 시험관내 및 생체내에서 DARA에 내성이 있음을 나타낸다.

[0192] 174. *MM 세포에 대한 $CD38^{KO}$ NK 세포의 우수한 DARA-매개된 ADCC.* DARA-유도된 NK 세포의 결핍은 표적 세포에 대한 세포 의존적 세포독성을 약화시킬수 있기 때문에, $CD38^{KO}$ NK 세포는 또한 $CD38^{WT}$ NK 세포보다 표적 세포를 더 효율적으로 사멸시킬 수 있다. 이를 연구하기 위해, CD38 발현 수준이 높거나 낮거나 없는 상이한 MM 세포주에 대해 DARA의 존재 또는 부재 하에서 대응표본 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 세포독성을 테스트하였다 (도 12a). 각각의 MM 세포주에 대한 직접적인 세포독성은 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포 간에 동등하지만, DARA의 존재하에서 $CD38^{KO}$ NK 세포는 $CD38^{+}$ 표적 세포에 대해 현저하게 더 높은 세포독성을 보였으며 (도 12b), 이는 $CD38^{KO}$ NK 세포의 더 높은 ADCC를 나타낸다 (도 12c). $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포 모두 $CD38^{-}$ 세포주 U266에 대해 ADCC를 나타내지 않았다. $CD38^{WT}$ NK 세포는 OPM-2 및 KMS-11과 같은 낮은 수준의 CD38 발현을 갖는 MM 세포에 대해 ADCC가 미미하거나 전혀 보이지 않는 반면, $CD38^{KO}$ NK 세포는 이러한 MM 세포주에 대해 현저하게 더 강한 ADCC를 나타내었다. 세포주를 사용한 결과와 유사하게, $CD38^{KO}$ NK 세포는 DARA-내성 사례로부터의 일차 $CD38^{low}$ MM 세포에 대한 개선된 세포독성을 포함하여 (도 12f 및 도 18), 일차 MM 샘플에 대해 더 높은 DARA-매개된 ADCC 활성을 보였다 (도 12d 내지 도 12e). $CD38^{WT}$ NK와 비교하여 CD38 발현과 $CD38^{KO}$ NK의 개선된 ADCC 사이의 관계를 추가로 연구하고 (도 13), 통계적으로 유의한 역 상관관계를 발견하였다 ($r = -0.786$, $p=0.048$). 전반적으로, 이 결과는 $CD38^{KO}$ NK 세포가 낮은 CD38 발현으로 인해 DARA-내성인 재발성 및 불응성 MM에 대한 DARA의 효능을 개선할 수 있음을 나타낸다 (도 18).

[0193] 175.*NK 세포성 세포독성에 대한 ATRA의 억제 효과.* MM 세포에서 CD38의 하향-조절은 DARA에 대한 내성을 발달시키는데 중요한 역할을 하는 것으로 간주된다. ATRA 처리는 $CD38^{low}$ 표적 세포에서 CD38 수준의 상향-조절을 통해 이러한 내성을 극복할 수 있다. MM 세포에서 CD38을 상향-조절하고 NK 세포에서 CD38을 결실시키는 시너지 효과를 조사하기 위해, MM 세포는 DARA 및 NK 세포를 사용하여 ADCC를 평가하기 전에 ATRA로 전처리하였다. ATRA를 사용한 전처리는 MM 표적 세포에서 CD38 수준을 상향-조절하고 (도 14), 이는 $CD38^{WT}$ 및 대응표본 $CD38^{KO}$ NK 세포 둘 다의 존재 하에서 DARA-매개된 ADCC를 개선함을 나타내는 것으로 확인되었다(도 15a-15b). 이후, 생체내 NK 세포에서 CD38 발현에 대한 ATRA의 직접적인 효과는 강화요법 동안 ATRA가 처리된 급성 전골수구성 백혈병 (APL)에 걸린 환자의 PB-NK를 사용하여 를 조사하였다. 처리 전에 수득된 샘플과 비교하여, ATRA 처리는 이들 환자의 PB-NK에 대한 CD38의 현저한 상향-조절과 관련이 있었다 (도 15c). 유사하게, 생체외 ATRA 처리는 $CD38^{WT}$에서 CD38 수준을 상향-조절하지만, 대응표본 $CD38^{KO}$ NK 세포에서는 아니었다 (도 15d). 추가로, ATRA는 또한 $CD38^{WT}$ NK 세포의 동족살해를 향상시켰다 (도 15e). ATRA를 사용한 MM 세포의 전처리와 대조적으로, ATRA를 사용한 MM 및 NK 세포 둘 다의 동시 처리는 $CD38^{WT}$ NK 세포의 DARA-매개된 ADCC를 현저하게 손상시켰지만 $CD38^{KO}$ NK 세포의 DARA-매개된 ADCC에는 영향을 미치지 않았다 (도 15f). ATRA는 $CD38^{WT}$ 및 대응표본 $CD38^{KO}$ NK 세포 둘 다의 *직접적인* 세포독성을 동일한 정도로 현저하게 감소시켰다 (도 15f). 따라서, MM 표적 세포에서 ATRA-유도된 CD38의 상향-조절은 증가된 NK 세포 동족살해 및 손상된 NK 세포 기능에 의해 상쇄될 수 있으며, 이는 $CD38^{KO}$ NK 세포의 사용에 의해 완화될 수 있는 DARA의 전반적 효능을 감소시킨다 (도 15g).

[0194] 176. *$CD38^{KO}$ NK에서 더 높은 OXPHOS 활성.* CD38은 46-kDa 유형 II 막투과성 당단백질이며, 세포내 NAD^{+} 수준을

조절하기 위한 NAD^+ 가수분해효소로서 세포외효소 활성을 포함하는 다중 기능을 갖는 것으로 나타났다. NAD^+는 ATP 생성에 기여하는 효소-촉매 반응의 필수 보조인자이기 때문에, CD38은 세포 대사에서 중요한 역할을 한다. 최근 연구는 T 세포에서 CD38 녹아웃이 OXPHOS 및 ATP 합성을 촉진하는 세포내 NAD^+ 수준을 높이고, 결과적으로 암에 대한 더 높은 세포독성을 초래함을 보고하였다. T-세포와 유사하게, 대사 개입은 종양 환경에서 NK 세포의 세포독성 및 생존에 중요한 역할을 한다. NK 세포 대사에 대한 CD38 녹아웃의 영향을 조사하였다. 우선, RNA-seq는 야생형 및 $CD38^{KO}$ NK 세포에 대해 수행하였고, DEG를 식별하고 IPA를 사용하여 DEG에서 차별적으로-조절된 경로를 식별하였다. IPA는 $CD38^{KO}$ NK 세포에서 콜레스테롤 생합성 ($p < 0.00001$) 및 OXPHOS ($p < 0.00001$) 경로에서 현저한 변화를 보여주었다. 이러한 경로에 있어서 유전자의 분석은 $CD38^{KO}$ NK 세포에서 ATP 합성, NAD 재순환 및 전자 수송과 특이적으로 관련된 미토콘드리아 유전자의 발현이 보통 정도이지만 현저한 증가가 확인되었다 (표 1, 도 16a 및 도 17). 주성분 분석은 기준선에서 현저한 공여자-의존적 변이를 나타내었지만, 기준선에서 이미 스펙트럼의 맨 끝에 있는 공여자 #10을 제외하고, 모든 공여자 쌍 사이에서 CD38 결실에 대한 일관된 방향성 변화를 나타내었다 (도 16b). 이러한 대사 경로에서 유전자의 상향-조절을 고려하여, $CD38^{KO}$ NK 세포의 세포 대사를 조사하였다. 미토콘드리아 스트레스 테스트 분석을 사용하여, 더 높은 OCR 및 비교가능한 ECAR이 관찰되었고, $CD38^{WT}$ NK 세포와 비교하여 $CD38^{KO}$ NK 세포에서 현저하게 더 높은 OCR/ECAR 비율을 초래하였다 (도 16c, 16d, 16e, 16f 및 16d). 이 결과는 CD38의 결실이 NK 세포가 이들의 생물에너지 요구를 달성하기 위해 OXPHOS를 우선적으로 사용하도록 유도함을 나타낸다. 중요하게, $CD38^{KO}$ NK 세포는 또한 $CD38^{WT}$ NK 세포와 비교하여 더 높은 여유 호흡 용량 (SRC) 및 미토콘드리아 호흡 용량을 가졌다 (도 16d). 이러한 유리한 대사 이동은 $CD38^{KO}$ NK 세포의 향상된 DARA-매개된 세포독성과 일치한다.

[0195] **표 1. IPA에 의해 확인된 현저하게 변경된 대사 경로와 관련된 DEG의 배수 변화 및 *p* 값.**

유전자	발현 배수 변화	발현 p-값
ATP5MF	1.258	0.0323
ATP5PB	1.132	0.0471
ATP5PF	1.211	0.0492
COX11	1.129	0.00759
COX6A1	1.178	0.0247
COX7A2	1.175	0.00928
COX7B	1.118	0.0362
NDUFA4	1.173	0.0125
UQCR10	1.181	0.0456
UQCRC2	1.144	0.0366
HMGCR	1.089	0.0255
HSD17B7	1.123	0.036
IDI1	1.113	0.0259
LBR	1.102	0.0362
MSMO1	1.124	0.00151
NSDH1	1.135	0.0413

[0196]

[0197] 177. DARA의 사용은 재발성/불응성 MM 환자에게 효과적이었다. 그러나, 선행요법에 통합되고 MM의 치료에 있어서 표준 치유로서 이의 승인에도 불구하고, 질환의 재발이 불가피하다는 것이 점점 더 분명해지고 있다. DARA 처리에 대한 MM 세포의 내성 기전이 설명되기 시작하였다. 이러한 기전 중 일부는 종양 이질성 및 골수 미세환경의 역할과 같이 이전에 제안된 IMiD 또는 PI에 대한 내성 기전과 중첩되지만, 다른 기전은 단클론성 항체 요법에 고유할 수 있다.

[0198] 178. 단클론성 항체는 4가지 기전을 통해 표적을 제거한다: CDC, ADCC, ADCP 및 수용체 가교를 통한 활성화-유도된 세포 사멸. 따라서, 내성 기전은 이러한 기전의 억제를 통해 발생한다. 예를 들어, DARA 내성은 MM 세포 표면의 보체 억제 단백질 (CD55 및 CD59)의 과발현과 관련되어, DARA-매개된 CDC를 손상시킨다. ADCC와 관련하여, 고유한 상황이 DARA와 함께 발생하는데, 이는 높은 수준의 CD38을 발현하는 NK 세포가 치료 동안 제거되어, DARA-매개된 ADCC를 손상시킨다. 생체외 확장된 NK 세포의 입양 전달에 의한 DARA-매개된 ADCC의 구제는 $CD38^{low}$ NK 세포를 사용한 전임상 모델에서 성공적이었다. 그러나, 이러한 $CD38^{low}$ NK 세포는 생체외 확장 동안 CD38 발현을 재획득하고, 따라서 DARA-매개된 제거에 대한 감수성을 회복하여, 임상 번역이 불가능하게 만들었다. 또한, 특히 DARA로 치료된 다발성 골수종 환자는 NK 세포를 포함하는 면역 세포의 수가 상대적으로 적다. 따라서, 본 발명자들은 제3자 보편적인-공여자 전략이 최적의 NK 세포 기능을 위해 바람직한 KIR 유전자형 또는

FCGR3A 다형성을 가진 공여자의 선택을 허용할 수 있는 동종이계 NK 세포에 대한 연구에 집중하였다.

[0199] 179. 여기에서, $CD38^{KO}$ NK 세포는 CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 생성되었다. 이들 세포는 DARA-유도된 접합 및 동족살해에 내성이 있고, 생체내 DARA의 존재 하에서 지속되었다. $CD38^{KO}$ NK 세포는 대응표본 $CD38^{WT}$ 세포와 비교할 때 MM 세포주 및 일차 샘플에 대해 우수한 ADCC 활성을 보였다. $CD38^{KO}$ NK 세포는 낮은 CD38 발현을 갖는 MM 세포주 및 DARA 처리 동안 재발된 환자로부터의 MM 세포에 대해 특히 효과적인 반면, $CD38^{WT}$ NK 세포는 이러한 표적 세포에 대해 활성이 최소이거나 전혀 없었다. DARA 처리 동안 낮은 CD38-발현 MM 세포에 대한 선택적 압력을 고려해 볼 때, $CD38^{KO}$ NK 세포는 이 잔류 질환에 대한 DARA의 치료 효과를 강화할 수 있다.

[0200] 180. NK 세포에서 CD38의 결실은 이들 세포의 증가된 미토콘드리아 호흡 용량 및 OXPHOS 대사 및 콜레스테롤 합성을 선호하는 보상적 전사체 프로파일과 관련이 있었다. $CD38^{KO}$ NK 세포의 이펙터 기능에서 이러한 대사 이동의 역할은 직접적으로 조사되지 않았지만, 이전 연구는 T 세포에서 CD38을 녹아웃시키는 것이 더 높은 OXPHOS 활성 및 항종양 효과를 초래함을 보였다.

[0201] 181. 항원 밀도는 단클론성 항체에 의한 표적 인식 및 이펙터 기능에 중요한 인자이며, 따라서 표적 세포에 대한 CD38 수준의 상향-조절은 DARA 활성을 향상시키기 위한 가능성을 갖는다. 최근에, IMiD와 DARA 사이의 임상적 시너지 효과는 부분적으로 IMiD에 의한 MM 세포의 CD38 상향-조절에 기인한다. ATRA는 또한 MM 세포에서 CD38 수준을 상향-조절하고, 이들을 DARA-매개된 CDC 및 ADCC에 민감하게 만드는 것으로 나타났다. 알려진 유리한 면역조절 프로파일을 가진 IMiD와는 대조적으로, NK 세포의 ADCC 활성에 대한 ATRA의 효과에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 여기에서, ATRA 처리는 MM 세포에서 CD38 수준을 상향-조절하지만, APL에 걸린 환자의 생체외 확장된 NK 세포 및 생체내 순환 NK 세포에서도 CD38을 상향-조절하는 것으로 확인되었다. NK 세포에 대한 이러한 조절 효과는 DARA-유도된 동족살해를 향상시키고, 생체내 MM 세포에 대한 DARA-매개된 ADCC를 손상시킬 수 있다. $CD38^{KO}$ NK 세포는 동족살해가 없었지만, $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포 둘 다의 직접적인 세포독성은 ATRA에 의해 현저하게 억제되었다. 따라서, MM 세포에 대한 CD38 수준의 ATRA-매개된 상향-조절은 NK 세포 기능에 대한 이의 부정적인 영향에 의해 상쇄되었다. 종합하면, ATRA를 사용한 처리의 최종 결과는 $CD38^{WT}$ NK 세포에 대해 전반적으로 손상된 DARA-매개된 ADCC 활성인 반면, $CD38^{KO}$ NK 세포의 사용은 ADCC에 대한 ATRA의 부정적인 영향을 구제하였다.

[0202] 182. ATRA 처리는 MM 세포 상의 CD55 및 CD59 발현을 감소시킴을 통해 DARA-매개된 CDC를 높일 수 있음을 언급하는 것이 중요하다. 임상 개발을 위한 대부분의 단클론성 항체는 이들의 CDC 활성을 기반으로 선택되지만, 4가지 작용 기전 중 임상 환경에서 가장 중요한 역할을 하는 것은 불분명하다. 상기 기전을 차별화하기 위한 전임상 모델은 쥣과(murine) 이종이식편에서 MM을 근절함에 있어서 DARA 단독의 높은 효능으로 인해 어려웠으며, 생체외 확장된 NK 세포의 추가는 DARA 단독에 비해 상대적으로 작은 이점을 갖는다. $CD38^{lo}$ MM 환자-유래 이종이식편의 개발은 DARA 및 NK 세포 조합의 약동학 모델링과 $CD38^{KO}$ 및 $CD38^{WT}$ NK 세포의 비교에 유용할 수 있다. MM 환자를 위한 ATRA 및 DARA의 조합을 테스트하는 현재 임상 시험 (NCT02751255)은 이러한 약물에 일시적이고 시차를 둔 노출을 제공하는 고유의 치료 일정을 사용한다. DARA 약동학은 치료 동안 비교적 일정하며, ATRA 수준은 복잡한 전신 및 조직 의존적 피드백 기전에 의해 엄격하게 조절된다. 이 조합을 사용한 임상 결과 이외에, NK 세포 수, 기능 및 DARA-매개된 ADCC 및 CDC에 대한 이 치료 일정의 영향을 이해하는 것이 중요하다. 추가적으로, 항-KIR 항체는 일차 골수종 세포의 다라투무맙-매개된 용해를 향상시키는 것으로 나타났다. $CD38^{KO}$ 및 $CD38^{WT}$ NK 세포의 ADCC 활성에 대한 KIR 기능/유전자형 및 FCRGIIIA 다형성의 영향을 조사하는 것은 향후 연구의 중요한 영역이며, 이러한 발견의 임상 번역을 위한 필요한 단계이다.

[0203] 183. 이 연구는 $CD38^{KO}$ NK 세포가 MM 세포에 대한 DARA의 효과를 높일 수 있다는 개념의 증거를 제공하였다. Cas9/RNP를 사용하여 새로 개발된 DNA가 없는 접근 방식은 WGS에 의해 평가된 바와 같이 매우 낮은 빈도의 표적외 효과로 $CD38^{KO}$ NK 세포를 효율적으로 생성하는데 성공하였다.

[0204] 184. 임상적으로 유의미한 수를 달성하는데 중요한 유전적으로-변형된 NK 세포를 확장하는 방법도 여기에서 적용되었다. 종합적으로, 이러한 결과는 MM 뿐만 아니라 잠재적으로 다른 $CD38^{+}$ 혈액 악성종양, 예컨대 급성 골수

성 백혈병, B 및 T 세포 림프모구성 백혈병 및 림프종에 대해 DARA와 조합된 입양 면역 요법을 위한 생체외 확장된 $CD38^{KO}$ NK 세포의 합리성 및 실행 가능성을 입증한다. 추가적으로, NK 세포에서 CD38 결실시키기 위한 방법은 세포 제조 동안 이들의 동족살해를 피하고 생체내 효과적인 항종양 활성을 위해 CD38 키메라 항원 수용체-NK 세포를 생성하는데 적용될 수 있다.

[0205] **5. 실시예 5: 및 이사툭시맙을 사용한 병용 요법**

[0206] 185. MM에 대한 DARA와 조합된 입양 면역 요법에 대한 NK $CD38^{KO}$ NK 세포의 효능을 인식하여, DARA 이외의 다른 항-CD38 면역요법, 예컨대 이사툭시맙을 암 치료에 사용할 수 있다.

[0207] 186. *이사툭시맙-유도된 동족살해에 대한 $CD38^{KO}$ NK 세포의 내성.* DARA와 마찬가지로, 이사툭시맙은 CD38 및 CD16을 교차연결하여 NK-대-NK ADCC를 통해 NK 세포 동족살해를 유도한다. $CD38^{KO}$ NK 세포가 이사툭시맙-유도된 동족살해에 내성이 있는지를 연구하기 위해, 대응표본 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 접합 및 생존력을 평가할 수 있다. 이사툭시맙은 $CD38^{WT}$ NK 세포 접합체의 형성을 증가시킬 수 있으나, $CD38^{KO}$ NK 세포 접합체의 형성에는 영향을 미치지 않는다. 또한, 이사툭시맙은 $CD38^{WT}$ NK 세포의 ADCC-의존적 아폽토시스를 유도할 수 있는 반면, $CD38^{KO}$ NK 세포는 이사툭시맙과 함께 인큐베이션하는 동안 내내 이들의 생존력을 보존한다. 유사하게, NK 세포에서 CD16의 결실은 또한 이사툭시맙 처리 후 이들의 생존력을 보존한다. 이러한 결과는 CD16 및 CD38이 이사툭시맙-유도된 동족살해에 필요하고 충분하며, NK 세포에서 CD38의 결실은 이들이 이사툭시맙-유도된 동족살해에 내성을 갖게 됨을 나타낸다.

[0208] 187. 다음으로, 이사툭시맙에 대한 $CD38^{KO}$ NK 세포의 내성이 또한 생체내에서 우수한 지속성에 기여할 수 있는지를 연구하기 위해, $CD38^{WT}$ 또는 $CD38^{KO}$ NK 세포를 이사툭시맙으로 처리된 NSG 마우스에 융합하고, PB, 비장 및 BM에서 NK 세포 빈도를 조사할 수 있다. $CD38^{WT}$ 또는 $CD38^{KO}$을 조사할 수 있다. 이사툭시맙을 사용한 처리는 $CD38^{WT}$ NK 세포의 생착을 현저하게 감소시킬 수 있지만 $CD38^{KO}$ NK 세포의 지속성에는 영향을 미치지 않았다. 처리 결과로서, $CD38^{WT}$ NK 세포는 비장 및 BM 뿐만 아니라 말초 혈액에서 이사툭시맙에 의해 결핍된 반면, $CD38^{KO}$ NK 세포는 대조군과 이사툭시맙-처리된 마우스 간의 임의의 이러한 구획에서 유의한 결핍을 보이지 않는다.

[0209] 188. *MM 세포에 대한 $CD38^{KO}$ NK 세포의 우수한 이사툭시맙-매개된 ADCC.* DARA-유도된 NK 세포의 결핍은 표적 세포에 대한 세포 의존적 세포독성을 약화시킬수 있기 때문에, $CD38^{KO}$ NK 세포는 또한 $CD38^{WT}$ NK 세포보다 표적 세포를 더 효율적으로 사멸시킬 수 있다. 이것이 이사툭시맙에도 적용되는지를 연구하기 위해, CD38 발현 수준이 높거나 낮거나 없는 상이한 MM 세포주에 대해 이사툭시맙의 존재 또는 부재 하에서 대응표본 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포의 세포독성을 테스트할 수 있다. 각각의 MM 세포주에 대한 직접적인 세포독성은 $CD38^{WT}$ 및 $CD38^{KO}$ NK 세포 간에 동등하지만, 이사툭시맙의 존재 하에서 $CD38^{KO}$ NK 세포는 $CD38^{+}$ 표적 세포에 대해 현저하게 더 높은 세포독성을 보이며, 이는 $CD38^{KO}$ NK 세포의 더 높은 ADCC를 나타낸다. DARA 실험에서와 같이, $CD38^{WT}$ NK 세포는 OPM-2 및 KMS-11과 같은 낮은 수준의 CD38 발현을 갖는 MM 세포에 대해 ADCC가 미미하거나 전혀 보이지 않는 반면, $CD38^{KO}$ NK 세포는 이러한 MM 세포주에 대해 현저하게 더 강한 ADCC를 나타낸다. 세포주에 대한 결과와 유사하게, $CD38^{KO}$ NK 세포는 일차 MM 샘플에 대해 더 높은 이사툭시맙-매개된 ADCC 활성을 보인다.

[0210] **E. 참고문헌**

[0211] Abdallah N, Kumar SK. Daratumumab in untreated newly diagnosed multiple myeloma. *Ther Adv Hematol*. 2019;10:2040620719894871.

[0212] Alici, E., Sutlu, T. & Sirac Dilber, M. Retroviral gene transfer into primary human natural killer cells. *Methods Mol Biol*. 506 127-137, doi:10.1007/978-1-59745-409-4_10, (2009).

[0213] Alonso S, Hernandez D, Chang YT 등, Hedgehog and retinoid signaling alters multiple myeloma microenvironment and generates bortezomib resistance. *J Clin Invest*. 2016;126(12):4460-4468.

[0214] Baertsch MA, Hundemer M, Hillengass J, Goldschmidt H, Raab MS. Therapeutic monoclonal antibodies in combination with pomalidomide can overcome refractoriness to both agents in multiple myeloma: A case-based approach. *Hematol Oncol*. 2018;36(1):258-261.

[0215] Bhatnagar V, Gormley NJ, Luo L 등, FDA Approval Summary: Daratumumab for Treatment of Multiple Myeloma After One Prior Therapy. *Oncologist*. 2017;22(11):1347-1353.

[0216] Bride KL, Vincent TL, Im SY 등, Preclinical efficacy of daratumumab in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 2018;131(9):995-999.

[0217] Carlsten, M. & Childs, R. W. Genetic Manipulation of NK Cells for Cancer Immunotherapy: Techniques and Clinical Implications. *Front Immunol.* 6 266, doi:10.3389/fimmu.2015.00266, (2015).C

[0218] asneuf T, Xu XS, Adams HC, 3rd 등, Effects of daratumumab on natural killer cells and impact on clinical outcomes in relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood Adv*. 2017;1(23):2105-2114.

[0219] Chatterjee S, Daenthanasanmak A, Chakraborty P 등, CD38-NAD(+)Axis Regulates Immunotherapeutic Anti-Tumor T Cell Response. *Cell Metab*. 2018;27(1):85-100 e108.

[0220] Chini EN. CD38 as a regulator of cellular NAD: a novel potential pharmacological target for metabolic conditions. *Curr Pharm Des*. 2009;15(1):57-63.

[0221] Cingolani P, Platts A, Wang le L 등, A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of Drosophila melanogaster strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012;6(2):80-92.

[0222] Ciurea SO, Schafer JR, Bassett R 등, Phase 1 clinical trial using mbIL21 ex vivo-expanded donor-derived NK cells after haploidentical transplantation. *Blood*. 2017;130(16):1857-1868.

[0223] Clemens PL, Yan X, Lokhorst HM 등, Pharmacokinetics of Daratumumab Following Intravenous Infusion in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma After Prior Proteasome Inhibitor and Immunomodulatory Drug Treatment. *Clin Pharmacokinet*. 2017;56(8):915-924.

[0224] de Haart SJ, Holthof L, Noort WA 등, Sepantronium bromide (YM155) improves daratumumab-mediated cellular lysis of multiple myeloma cells by abrogation of bone marrow stromal cell-induced resistance. *Haematologica*. 2016;101(8):e339-342.

[0225] de Weers M, Tai YT, van der Veer MS 등, Daratumumab, a novel therapeutic human CD38 monoclonal antibody, induces killing of multiple myeloma and other hematological tumors. *J Immunol*. 2011;186(3):1840-1848.

[0226] Denman CJ, Senyukov VV, Somanchi SS 등, Membrane-bound IL-21 promotes sustained ex vivo proliferation of human natural killer cells. *PLoS One*. 2012;7(1):e30264.

[0227] DeWitt, M. A., Corn, J. E. & Carroll, D. Genome editing via delivery of Cas9 ribonucleoprotein. *Methods*. 121-122 9-15, (2017).

[0228] Di Gaetano N, Cittera E, Nota R 등, Complement activation determines the therapeutic activity of rituximab in vivo. *J Immunol*. 2003;171(3):1581-1587.

[0229] Dimopoulos MA, Oriol A, Nahi H 등, Daratumumab, Lenalidomide, and Dexamethasone for Multiple Myeloma. *N Engl J Med*. 2016;375(14):1319-1331.

[0230] Eyquem, J 등, Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature*. 543 (7643), 113-117, doi:10.1038/nature21405, (2017).

[0231] Fedele PL, Willis SN, Liao Y 등, IMiDs prime myeloma cells for daratumumab-mediated cytotoxicity through loss of Ikaros and Aiolos. *Blood*. 2018;132(20):2166-2178.

[0232] Gandhi UH, Cornell RF, Lakshman A 등, Outcomes of patients with multiple myeloma refractory to CD38-targeted monoclonal antibody therapy. *Leukemia*. 2019;33(9):2266-2275.

[0233] Gao Z, Tong C, Wang Y, Chen D, Wu Z, Han W. Blocking CD38-driven fratricide among T cells enables effective antitumor activity by CD38-specific chimeric antigen receptor T cells. *J Genet Genomics*. 2019;46(8):367-377.

[0234] Gavriatopoulou M, Kastritis E, Ntanasis-Stathopoulos I 등, The addition of IMiDs for patients with daratumumab-refractory multiple myeloma can overcome refractoriness to both agents. *Blood*. 2018;131(4):464-467.

[0235] Guo Y, Feng K, Tong C 등, Efficiency and side effects of anti-CD38 CAR T cells in an adult patient with relapsed B-ALL after failure of bi-specific CD19/CD22 CAR T cell treatment. *Cell Mol Immunol*. 2020.

[0236] Guven, H 등, Efficient gene transfer into primary human natural killer cells by retroviral transduction. *Exp Hematol.* 33 (11), 1320-1328, doi:10.1016/j.exphem.2005.07.006, (2005).

[0237] Hari P, Raj RV, Olteanu H. Targeting CD38 in Refractory Extranodal Natural Killer Cell-T-Cell Lymphoma. *N Engl J Med*. 2016;375(15):1501-1502.

[0238] Howard M, Grimaldi JC, Bazan JF 등, Formation and hydrolysis of cyclic ADP-ribose catalyzed by lymphocyte antigen CD38. *Science*. 1993;262(5136):1056-1059.

[0239] Hu Y, Turner MJ, Shields J 등, Investigation of the mechanism of action of alemtuzumab in a human CD52 transgenic mouse model. *Immunology*. 2009;128(2):260-270.

[0240] Hu Y, Wang H, Wang Q, Deng H. Overexpression of CD38 decreases cellular NAD levels and alters the expression of proteins involved in energy metabolism and antioxidant defense. *J Proteome Res*. 2014;13(2):786-795.

[0241] Kararoudi MN, Likhite S, Elmas E, Schwartz M, Meyer K, Lee DA. Highly efficient site-directed gene insertion in primary human natural killer cells using homologous recombination and CRISPaint delivered by AAV. *bioRxiv*. 2019:743377.

[0242] Kelly BJ, Fitch JR, Hu Y 등, Churchill: an ultra-fast, deterministic, highly scalable and balanced parallelization strategy for the discovery of human genetic variation in clinical and population-scale genomics. *Genome Biol*. 2015;16:6.

[0243] Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J. & Kim, J. S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* 24 (6), 1012-1019, doi:10.1101/gr.171322.113, (2014).

[0244] Kishimoto H, Hoshino S, Ohori M 등, Molecular mechanism of human CD38 gene expression by retinoic acid. Identification of retinoic acid response element in the first intron. *J Biol Chem*. 1998;273(25):15429-15434.

[0245] Krejcik J, Casneuf T, Nijhof IS 등, Daratumumab depletes CD38+ immune regulatory cells, promotes T-cell expansion, and skews T-cell repertoire in multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(3):384-394.

[0246] Krejcik J, Frerichs KA, Nijhof IS 등, Monocytes and Granulocytes Reduce CD38 Expression Levels on Myeloma Cells in Patients Treated with Daratumumab. *Clin Cancer Res*. 2017;23(24):7498-7511.

[0247] Kumar SK, Dimopoulos MA, Kastritis E 등, Natural history of relapsed myeloma, refractory to immunomodulatory drugs and proteasome inhibitors: a multicenter IMWG study. *Leukemia*. 2017;31(11):2443-2448.

[0248] Laubach J, Garderet L, Mahindra A 등, Management of relapsed multiple myeloma: recommendations of the International Myeloma Working Group. *Leukemia*. 2016;30(5):1005-1017.

[0249] Lee, D. A., Verneris, M. R. & Campana, D. Acquisition, preparation, and functional assessment of human NK cells for adoptive immunotherapy. *Methods Mol Biol.* 651 61-77, doi:10.1007/978-1-60761-786-0_4, (2010).

[0250] Leone RD, Emens LA. Targeting adenosine for cancer immunotherapy. *J Immunother Cancer*. 2018;6(1):57.

[0251] Leung-Hagesteijn C, Erdmann N, Cheung G 등, Xbp1s-negative tumor B cells and pre-plasmablasts mediate therapeutic proteasome inhibitor resistance in multiple myeloma. *Cancer Cell*. 2013;24(3):289-304.

[0252] Li A, He M, Wang H 등, All-trans retinoic acid negatively regulates cytotoxic activities of nature killer cell line 92. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;352(1):42-47.

[0253] Liang, X. 등, Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol.* 208 44-53, doi:10.1016/j.jbiotec.2015.04.024, (2015).

[0254] Liang, Z. 등, Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nat Commun.* 8 14261, doi:10.1038/ncomms14261, (2017).

[0255] Liu J, Zhao YJ, Li WH 등, Cytosolic interaction of type III human CD38 with CIB1 modulates cellular cyclic ADP-ribose levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017.

[0256] Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA 등, IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90(6):2188-2195.

[0257] Martin T, Baz R, Benson DM 등, A phase 1b study of isatuximab plus lenalidomide and dexamethasone for relapsed/refractory multiple myeloma. *Blood*. 2017;129(25):3294-3303.

[0258] Mateos MV, Dimopoulos MA, Cavo M 등, Daratumumab plus Bortezomib, Melphalan, and Prednisone for Untreated Myeloma. *N Engl J Med*. 2018;378(6):518-528.

[0259] Mehta, R. S. & Rezvani, K. Chimeric Antigen Receptor Expressing Natural Killer Cells for the Immunotherapy of Cancer. *Front Immunol.* 9 283, doi:10.3389/fimmu.2018.00283, (2018).

[0260] Meyer S, Leusen JH, Boross P. Regulation of complement and modulation of its activity in monoclonal antibody therapy of cancer. *MAbs*. 2014;6(5):1133-1144.

[0261] Minard-Colin V, Xiu Y, Poe JC 등, Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcgammaRI, FcgammaRIII, and FcgammaRIV. *Blood*. 2008;112(4):1205-1213.

[0262] Moreau P, Attal M, Hulin C 등, Bortezomib, thalidomide, and dexamethasone with or without daratumumab before and after autologous stem-cell transplantation for newly diagnosed multiple myeloma (CASSIOPEIA): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet*. 2019;394(10192):29-38.

[0263] Naeimi Kararoudi M, Dolatshad H, Trikha P 등, Generation of Knock-out Primary and Expanded Human NK Cells Using Cas9 Ribonucleoproteins. *J Vis Exp*. 2018(136).

[0264] Naik J, Themeli M, de Jong-Korlaar R 등, CD38 as a therapeutic target for adult acute myeloid leukemia and T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 2019;104(3):e100-e103.

[0265] Nijhof IS, Casneuf T, van Velzen J 등, CD38 expression and complement inhibitors affect response and resistance to daratumumab therapy in myeloma. *Blood*. 2016;128(7):959-970.

[0266] Nijhof IS, Groen RW, Lokhorst HM 등, Upregulation of CD38 expression on multiple myeloma cells by all-trans retinoic acid improves the efficacy of daratumumab. *Leukemia*. 2015;29(10):2039-2049.

[0267] Nijhof IS, Groen RW, Noort WA 등, Preclinical Evidence for the Therapeutic Potential of CD38-Targeted Immuno-Chemotherapy in Multiple Myeloma Patients Refractory to Lenalidomide and Bortezomib. *Clin Cancer Res*. 2015;21(12):2802-2810.

[0268] Nijhof IS, Lammerts van Bueren JJ, van Kessel B 등, Daratumumab-mediated lysis of primary multiple myeloma cells is enhanced in combination with the human anti-KIR antibody IPH2102 and lenalidomide. *Haematologica*. 2015;100(2):263-268.

[0269] Nooka AK, Joseph NS, Kaufman JL 등, Clinical efficacy of daratumumab, pomalidomide, and dexamethasone in patients with relapsed or refractory myeloma: Utility of re-treatment with daratumumab among

refractory patients. *Cancer*. 2019;125(17):2991-3000.

[0270] O'Brien KL, Finlay DK. Immunometabolism and natural killer cell responses. *Nat Rev Immunol*. 2019;19(5):282-290.

[0271] Orlowski RZ, Moreau P, Niesvizky R 등, Carfilzomib-Dexamethasone Versus Bortezomib-Dexamethasone in Relapsed or Refractory Multiple Myeloma: Updated Overall Survival, Safety, and Subgroups. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2019;19(8):522-530 e521.

[0272] Pomeroy EJ, Hunzeker JT, Kluesner MG 등, A Genetically Engineered Primary Human Natural Killer Cell Platform for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther*. 2020;28(1):52-63.

[0273] Raab MS, Podar K, Breitkreutz I, Richardson PG, Anderson KC. Multiple myeloma. *Lancet*. 2009;374(9686):324-339.

[0274] Rezvani K, Rouce R, Liu E, Shpall E. Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther*. 2017;25(8):1769-1781.

[0275] Rezvani, K., Rouce, R., Liu, E. & Shpall, E. Engineering Natural Killer Cells for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther.* 25 (8), 1769-1781, doi:10.1016/j.ymthe.2017.06.012, (2017).

[0276] Rosario M, Liu B, Kong L 등, The IL-15-Based ALT-803 Complex Enhances FcgammaRIIIa-Triggered NK Cell Responses and In Vivo Clearance of B Cell Lymphomas. *Clin Cancer Res*. 2016;22(3):596-608.

[0277] Saltarella I, Desantis V, Melaccio A 등, Mechanisms of Resistance to Anti-CD38 Daratumumab in Multiple Myeloma. *Cells*. 2020;9(1).

[0278] Sanchez-Martinez D, Krzywinska E, Rathore MG 등, All-trans retinoic acid (ATRA) induces miR-23a expression, decreases CTSC expression and granzyme B activity leading to impaired NK cell cytotoxicity. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;49:42-52.

[0279] Schultz, L. M., Majzner, R., Davis, K. L. & Mackall, C. New developments in immunotherapy for pediatric solid tumors. *Curr Opin Pediatr.* 30 (1), 30-39, doi:10.1097/mop.0000000000000564, (2018).

[0280] Somanchi, S. S., Senyukov, V. V., Denman, C. J. & Lee, D. A. Expansion, purification, and functional assessment of human peripheral blood NK cells. *J Vis Exp.* (48), doi:10.3791/2540, (2011).

[0281] Stevison F, Jing J, Tripathy S, Isoherranen N. Role of Retinoic Acid-Metabolizing Cytochrome P450s, CYP26, in Inflammation and Cancer. *Adv Pharmacol*. 2015;74:373-412.

[0282] Sutlu, T. 등, Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy. *Hum Gene Ther.* 23 (10), 1090-1100, doi:10.1089/hum.2012.080, (2012).

[0283] Uruno A, Noguchi N, Matsuda K 등, All-trans retinoic acid and a novel synthetic retinoid tamibarotene (Am80) differentially regulate CD38 expression in human leukemia HL-60 cells: possible involvement of protein kinase C-delta. *J Leukoc Biol*. 2011;90(2):235-247.

[0284] Usmani SZ, Weiss BM, Plesner T 등, Clinical efficacy of daratumumab monotherapy in patients with heavily pretreated relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2016;128(1):37-44.

[0285] Vakulskas CA, Dever DP, Rettig GR 등, A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat Med*. 2018;24(8):1216-1224.

[0286] van de Donk N, Usmani SZ. CD38 Antibodies in Multiple Myeloma: Mechanisms of Action and Modes of Resistance. *Front Immunol*. 2018;9:2134.

[0287] van de Donk NW, Janmaat ML, Mutis T 등, Monoclonal antibodies targeting CD38 in hematological malignancies and beyond. *Immunol Rev*. 2016;270(1):95-112.

[0288] van der Veer MS, de Weers M, van Kessel B 등, Towards effective immunotherapy of myeloma: enhanced

elimination of myeloma cells by combination of lenalidomide with the human CD38 monoclonal antibody daratumumab. *Haematologica*. 2011;96(2):284-290.

[0289] Viel, S. 등, TGF-beta inhibits the activation and functions of NK cells by repressing the mTOR pathway. *Sci Signal*. 9 (415), ra19, doi:10.1126/scisignal.aad1884, (2016).

[0290] Vouillot, L., Thelie, A. & Pollet, N. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3 (Bethesda)*. 5 (3), 407-415, doi:10.1534/g3.114.015834, (2015).

[0291] Wang Y, Zhang Y, Hughes T 등, Fratricide of NK Cells in Daratumumab Therapy for Multiple Myeloma Overcome by Ex Vivo-Expanded Autologous NK Cells. *Clin Cancer Res*. 2018;24(16):4006-4017.

[0292] Wang, M. 등, Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113 (11), 2868-2873, doi:10.1073/pnas.1520244113, (2016).

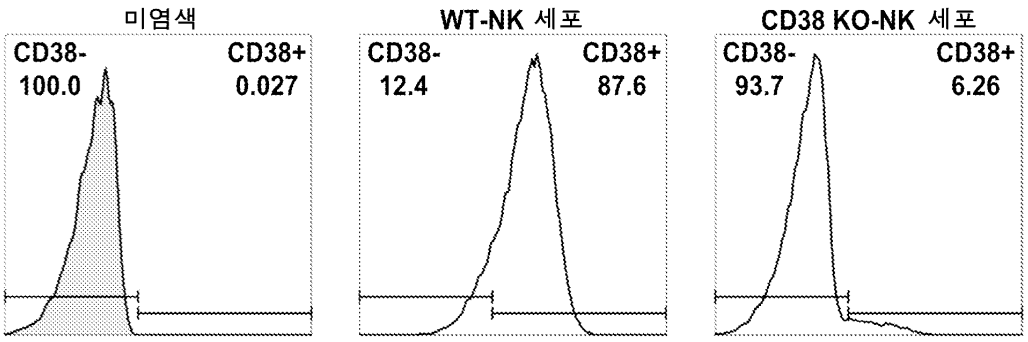
[0293] Xu XS, Dimopoulos MA, Sonneveld P 등, Pharmacokinetics and Exposure-Response Analyses of Daratumumab in Combination Therapy Regimens for Patients with Multiple Myeloma. *Adv Ther*. 2018;35(11):1859-1872.

[0294] Zent CS, Secreto CR, LaPlant BR 등, Direct and complement dependent cytotoxicity in CLL cells from patients with high-risk early-intermediate stage chronic lymphocytic leukemia (CLL) treated with alemtuzumab and rituximab. *Leuk Res*. 2008;32(12):1849-1856.

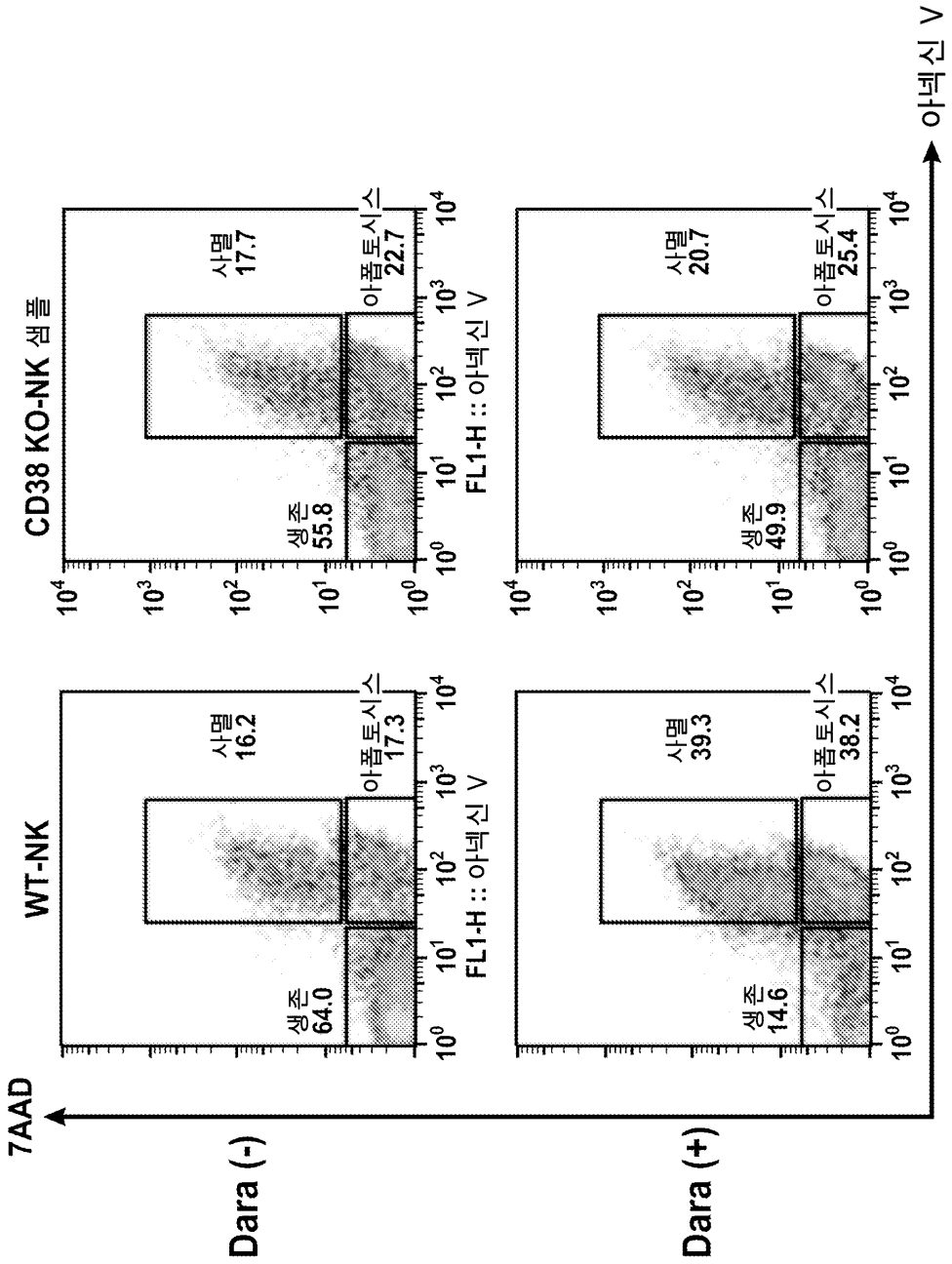
[0295] Zuris, J. A. 등, Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol*. 33 (1), 73-80, doi:10.1038/nbt.3081, (2015).

도면

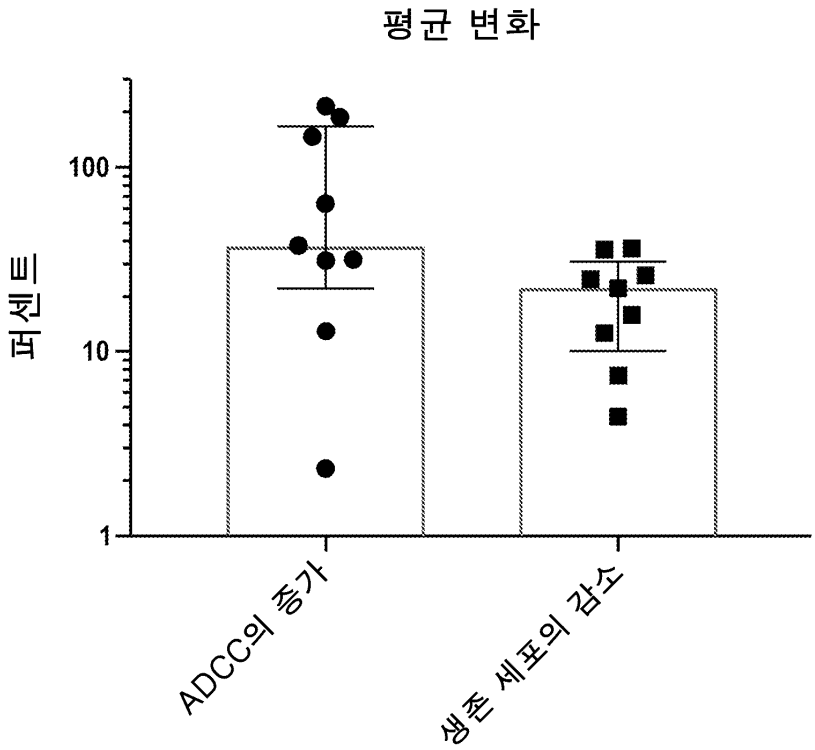
도면1



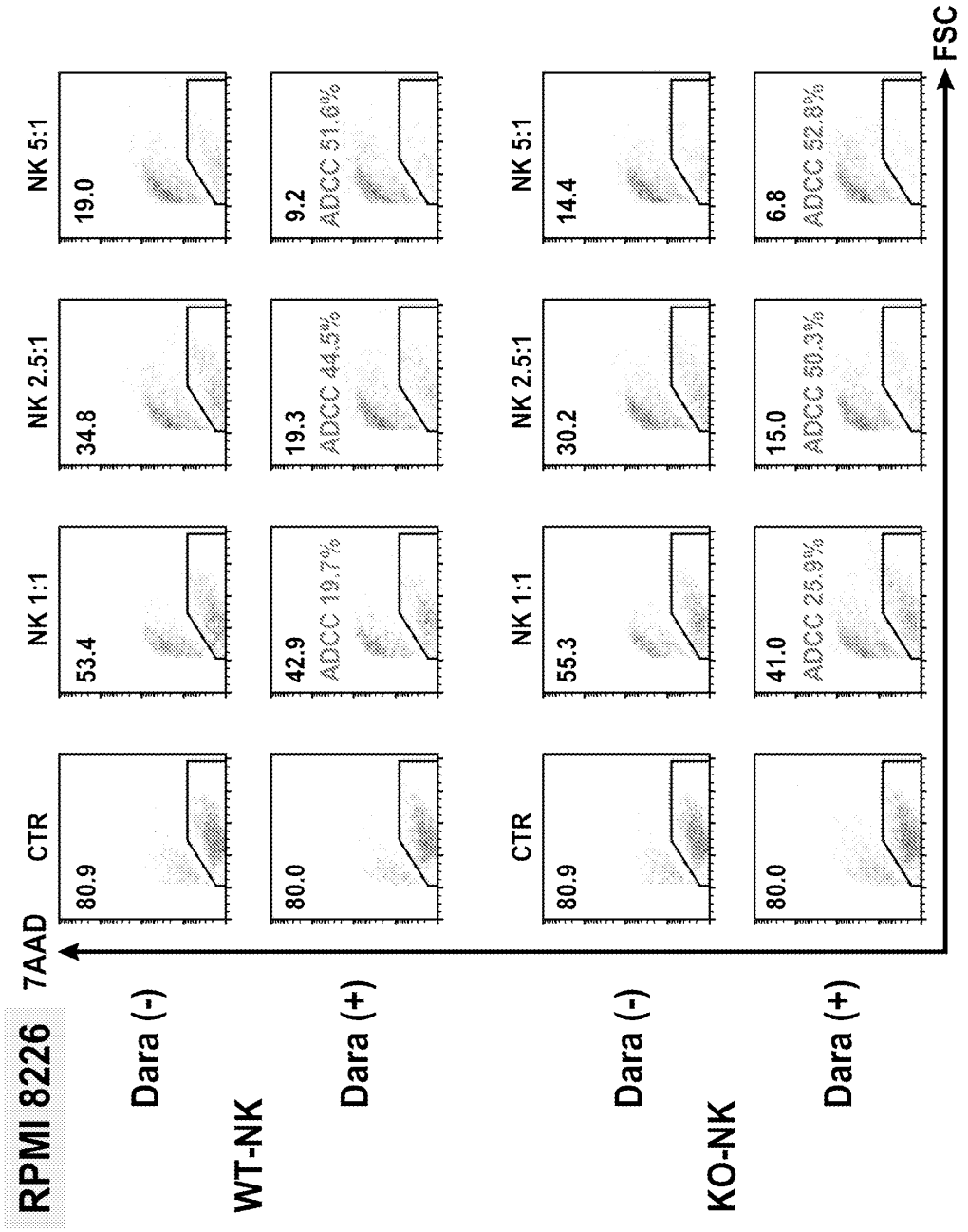
도면2


7AAD
아넥신 V
Dara (-)
Dara (+)
WT-NK
CD38 KO-NK 샘플
생존
64.0
사멸
16.2
아폽토시스
17.3
생존
55.8
사멸
17.7
아폽토시스
22.7
생존
14.6
사멸
39.3
아폽토시스
38.2
생존
49.9
사멸
20.7
아폽토시스
25.4
FL1-H :: 아넥신 V

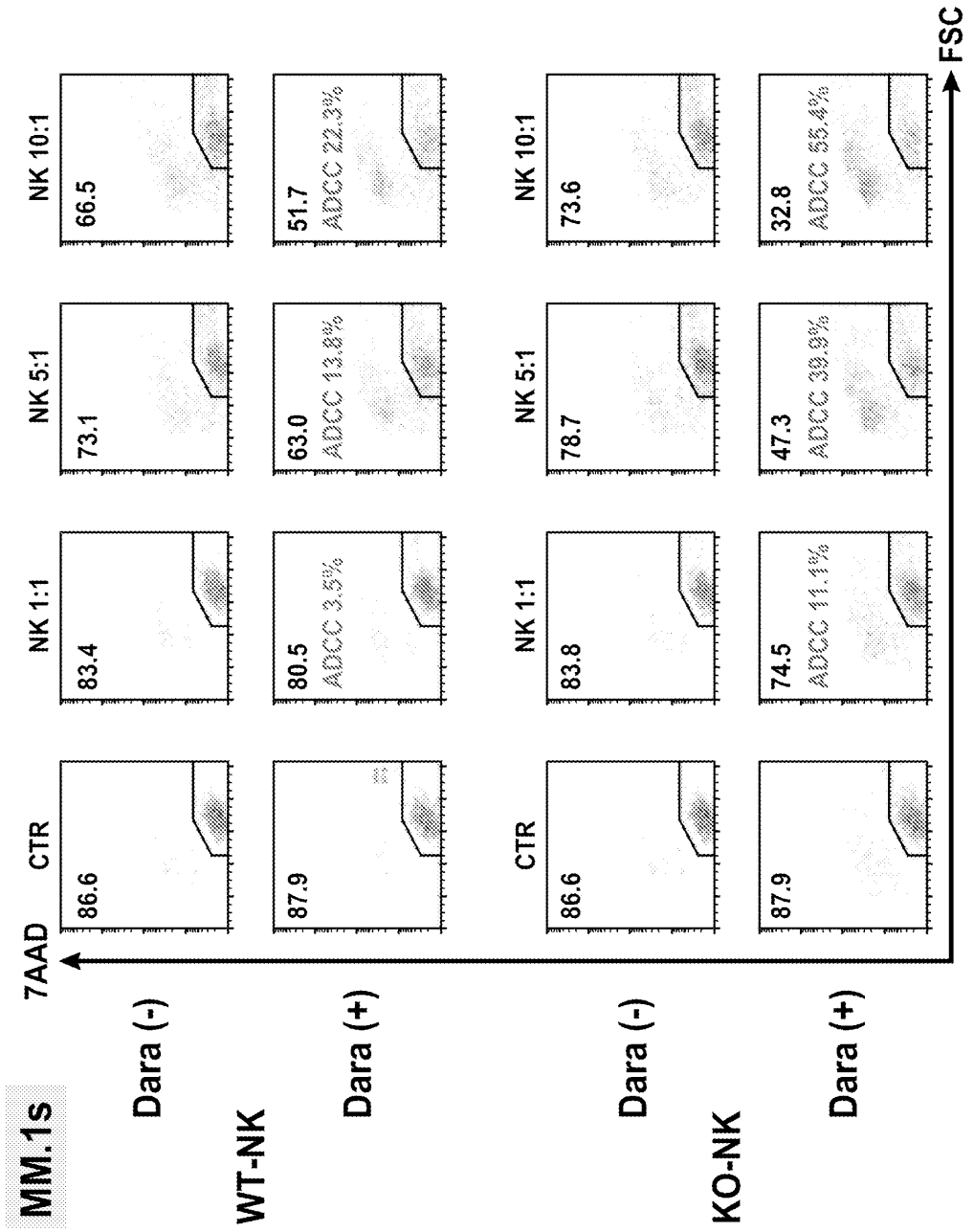
도면3



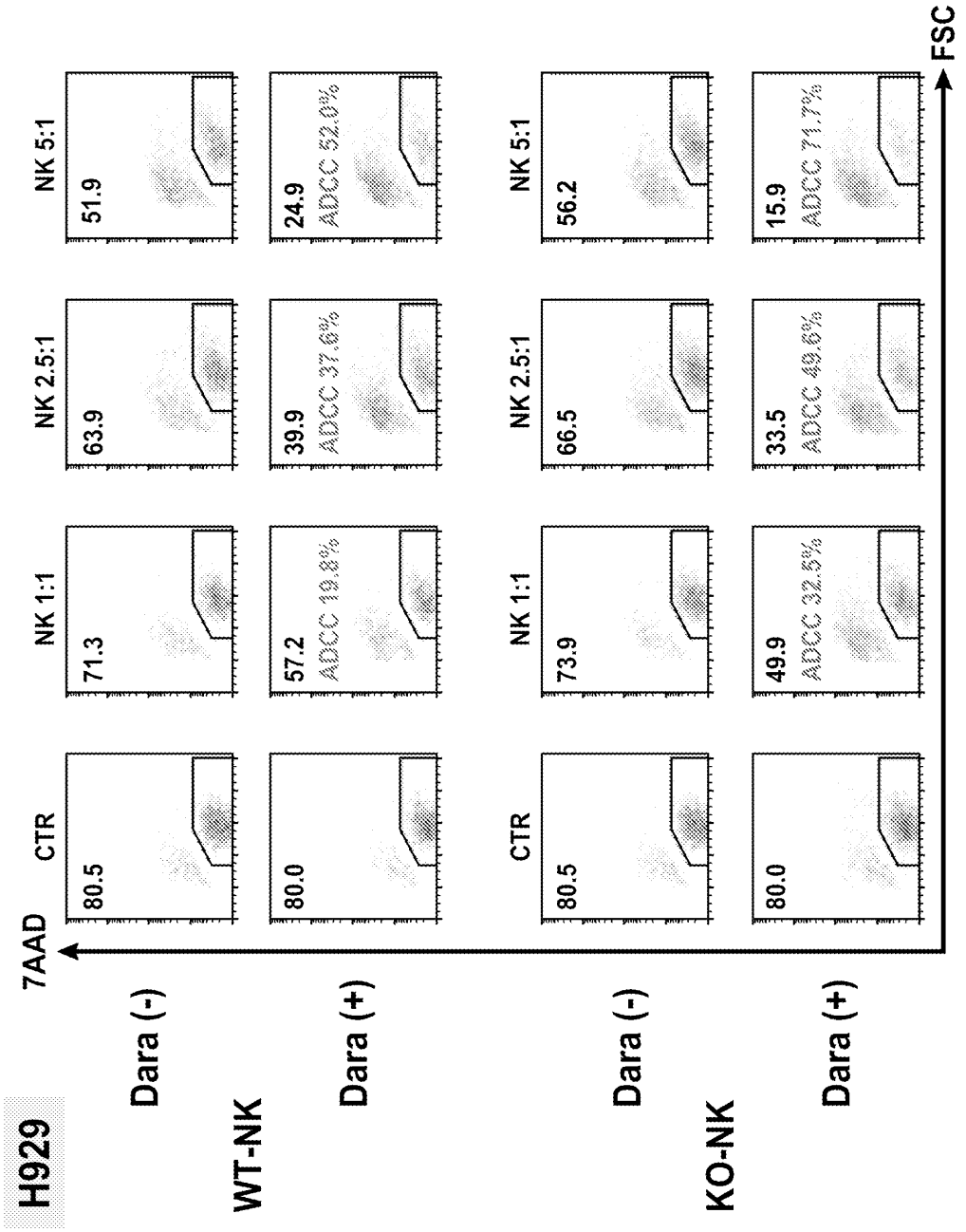
도면4


RPMI 8226
7AAD
FSC
CTR
NK 1:1
NK 2.5:1
NK 5:1
Dara (-)
Dara (+)
WT-NK
KO-NK
80.9
53.4
34.8
19.0
80.0
42.9
ADCC 19.7%
19.3
ADCC 44.5%
9.2
ADCC 51.6%
CTR
NK 1:1
NK 2.5:1
NK 5:1
Dara (-)
Dara (+)
KO-NK
80.9
55.3
30.2
14.4
80.0
41.0
ADCC 25.9%
15.0
ADCC 50.3%
6.8
ADCC 52.8%

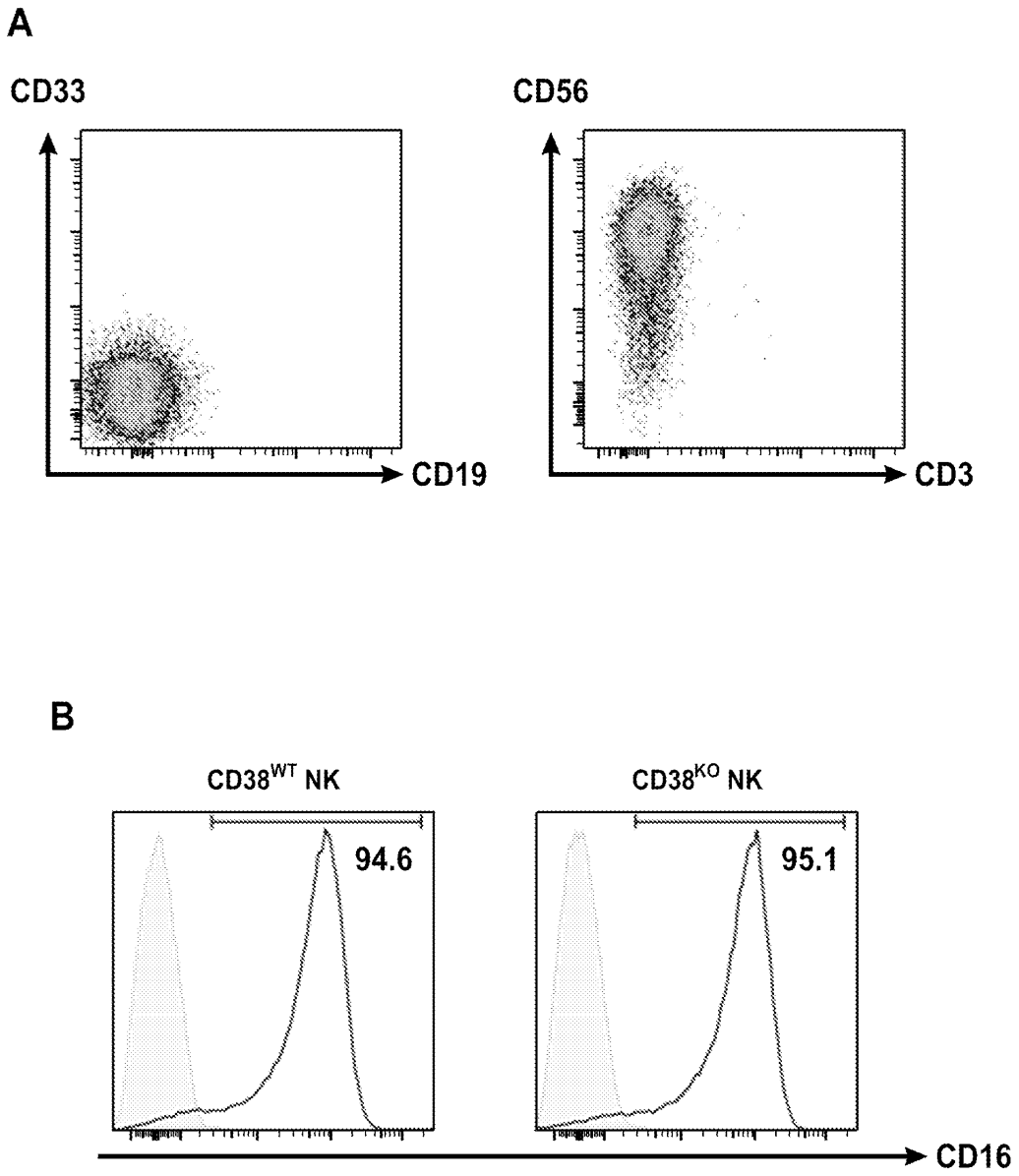
도면5


MM.1s
7AAD
FSC
WT-NK
KO-NK
Dara (-)
Dara (+)
CTR
NK 1:1
NK 5:1
NK 10:1
86.6
83.4
73.1
66.5
87.9
80.5
ADCC 3.5%
63.0
ADCC 13.8%
51.7
ADCC 22.3%
74.5
ADCC 11.1%
47.3
ADCC 39.9%
32.8
ADCC 55.4%

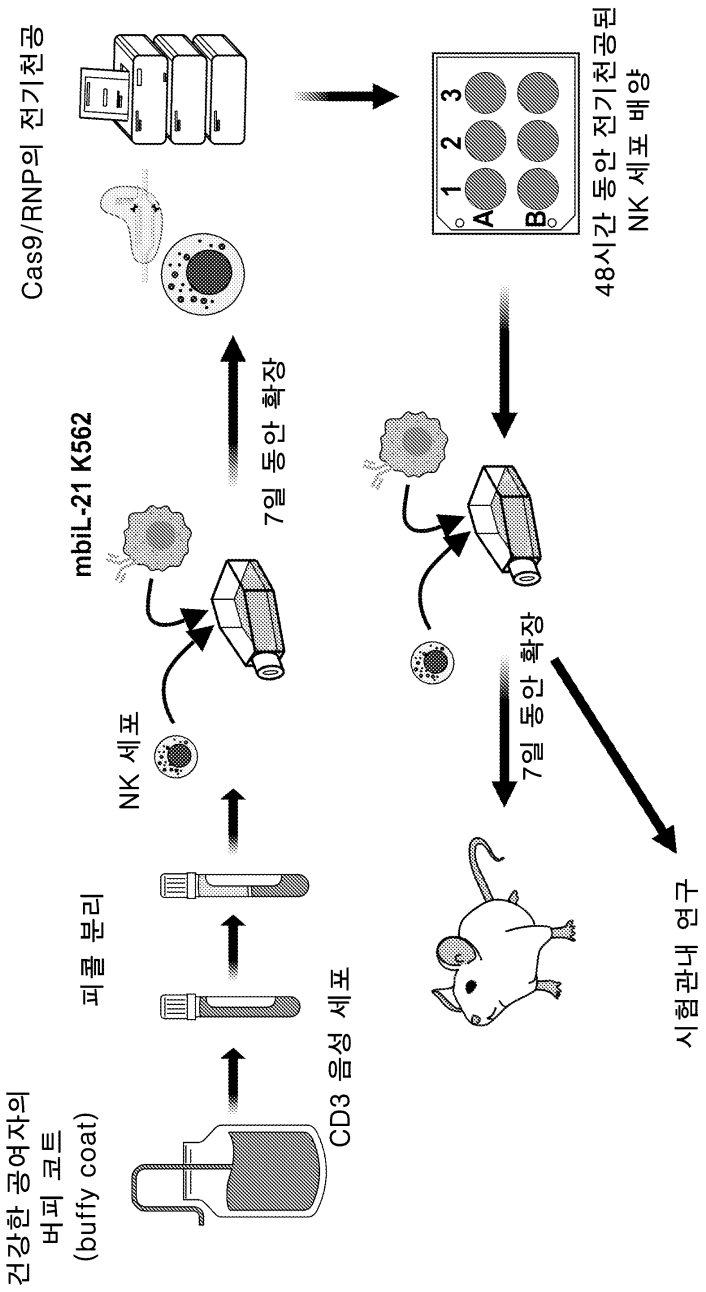
도면6


H929
WT-NK
KO-NK
Dara (-)
Dara (+)
CTR
NK 1:1
NK 2.5:1
NK 5:1
7AAD
FSC
80.5
71.3
63.9
51.9
80.0
57.2
ADCC 19.8%
39.9
ADCC 37.6%
24.9
ADCC 52.8%
73.9
66.5
56.2
49.9
ADCC 32.5%
33.5
ADCC 49.6%
15.9
ADCC 71.7%

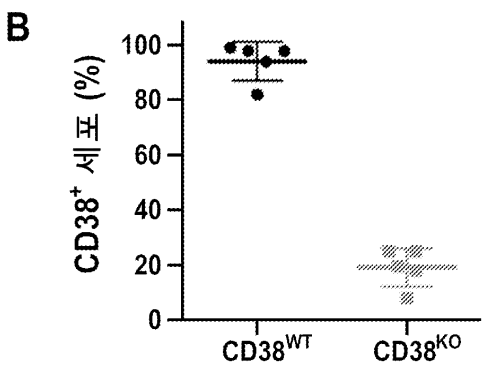
도면7



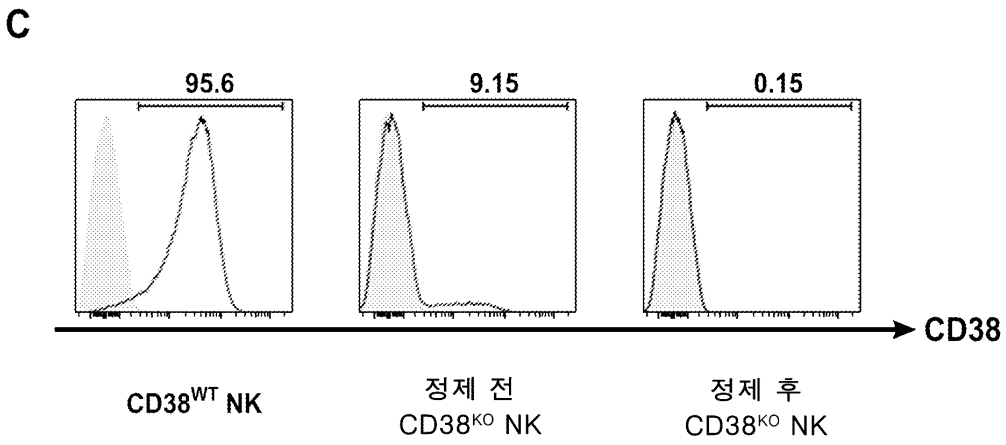
도면8a


건강한 공여자의
버피 코트
(buffy coat)
피콜 분리
CD3 음성 세포
NK 세포
mbiL-21 K562
7일 동안 확장
Cas9/RNP의 전기천공
48시간 동안 전기천공된
NK 세포 배양
7일 동안 확장
시험관내 연구

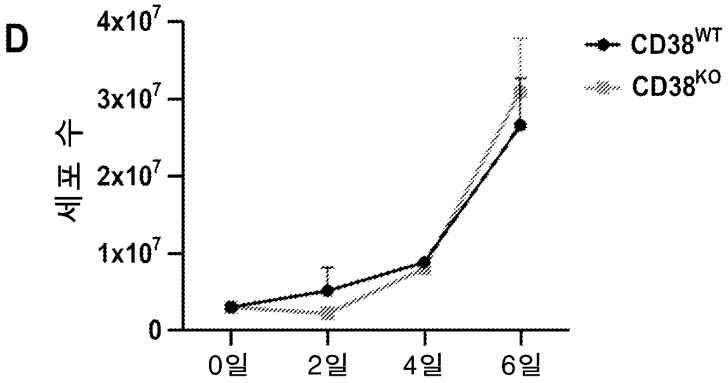
도면8b


B
CD38+ 세포 (%)
100
80
60
40
20
0
CD38WT
CD38KO

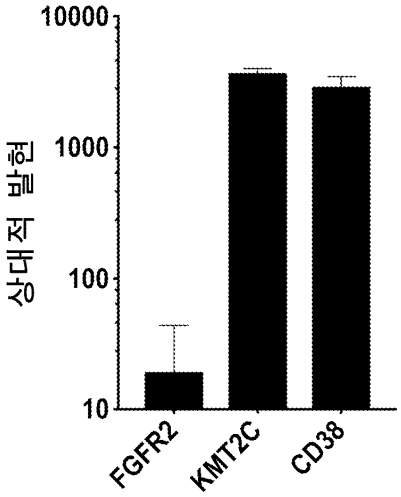
도면8c



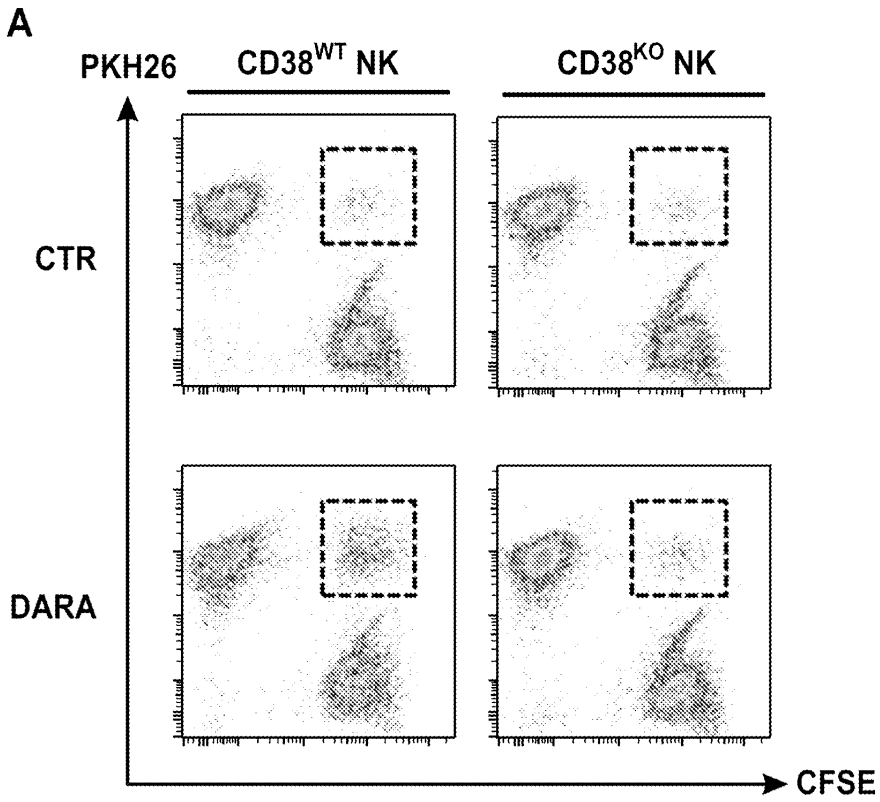
도면8d



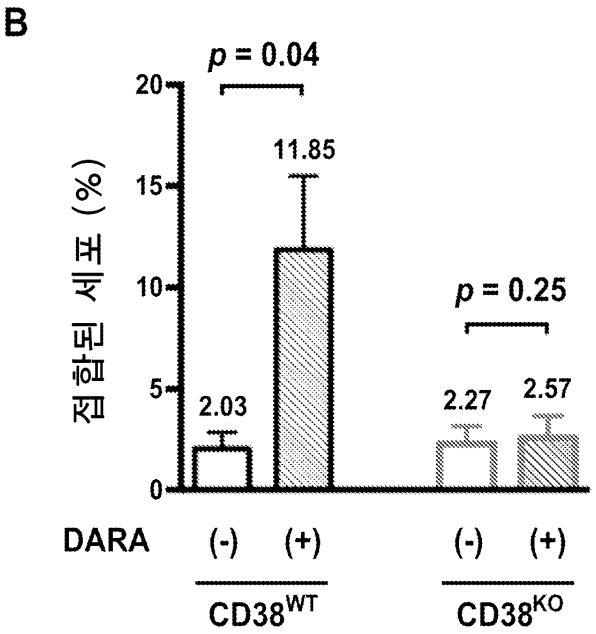
도면9



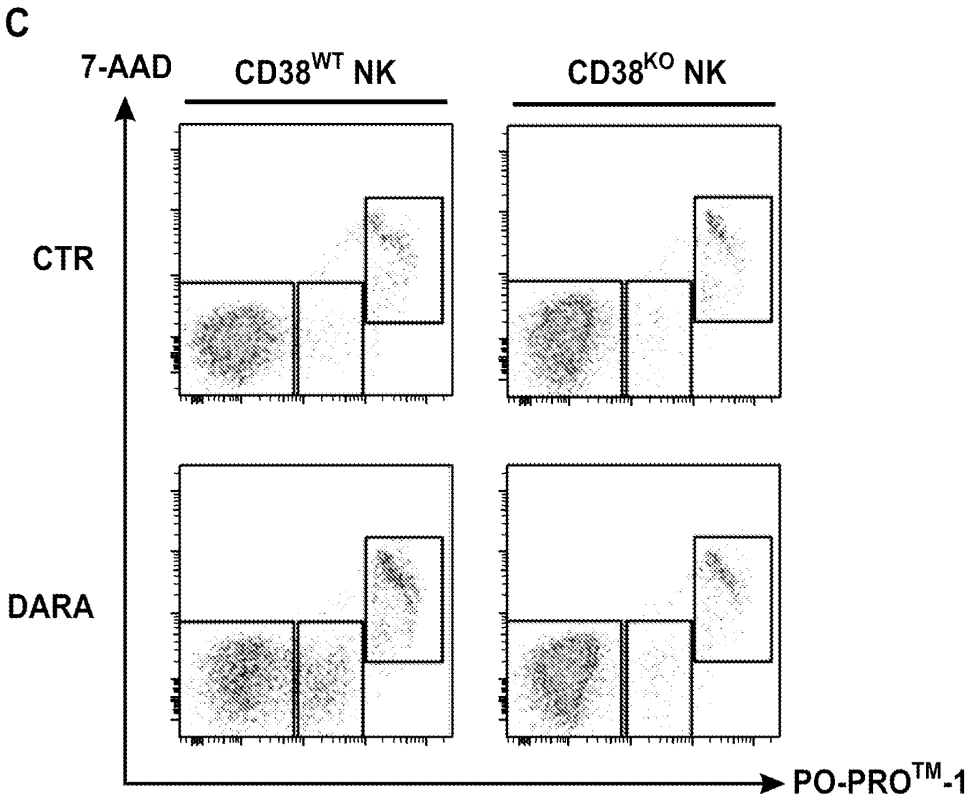
도면10a


A
PKH26
CD38WT NK
CD38KO NK
CTR
DARA
CFSE

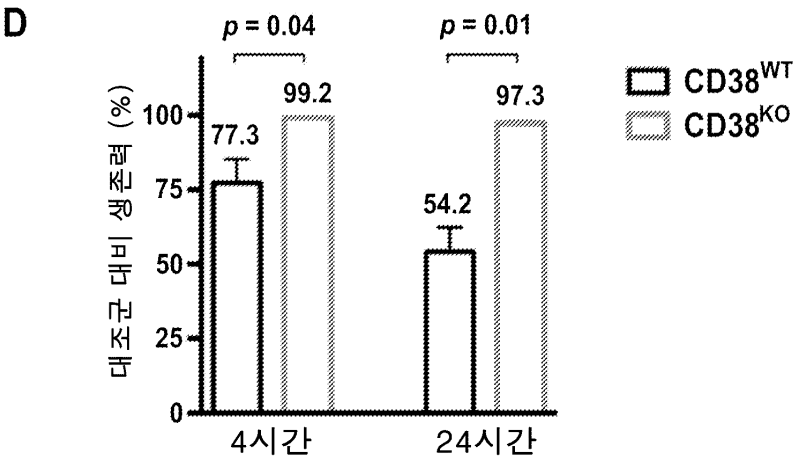
도면10b


B
p = 0.04
p = 0.25
11.85
2.03
2.27
2.57
20
15
10
5
0
접합된 세포 (%)
DARA
(-)
(+)
(-)
(+)
CD38WT
CD38KO

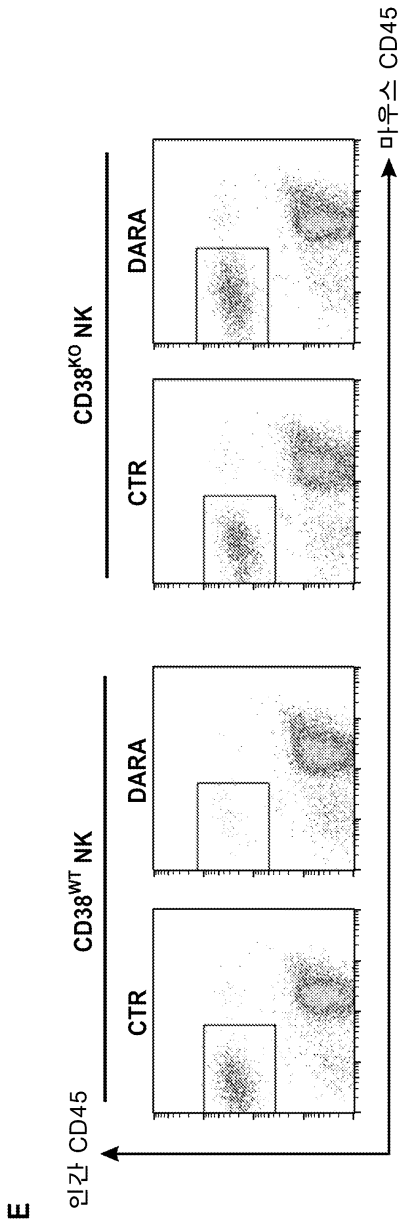
도면10c


C
7-AAD
CD38WT NK
CD38KO NK
CTR
DARA
PO-PRO™-1

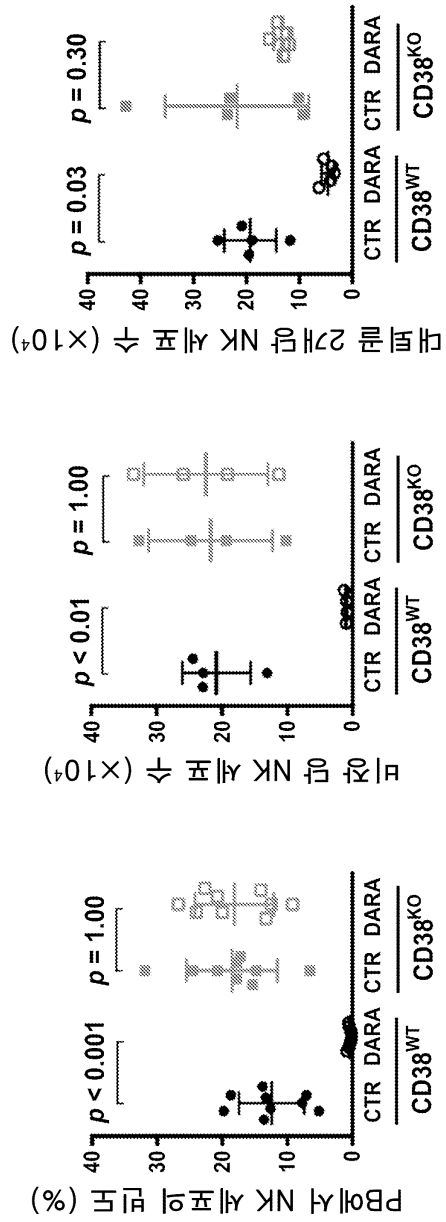
도면10d


D
p = 0.04
p = 0.01
99.2
97.3
77.3
54.2
100
75
50
25
0
대조군 대비 생존력 (%)
4시간
24시간
CD38WT
CD38KO

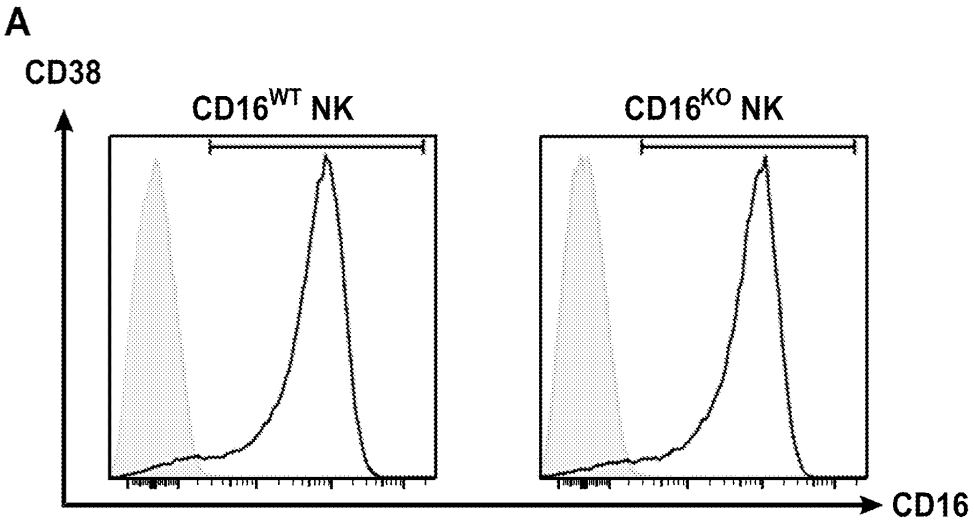
도면10e



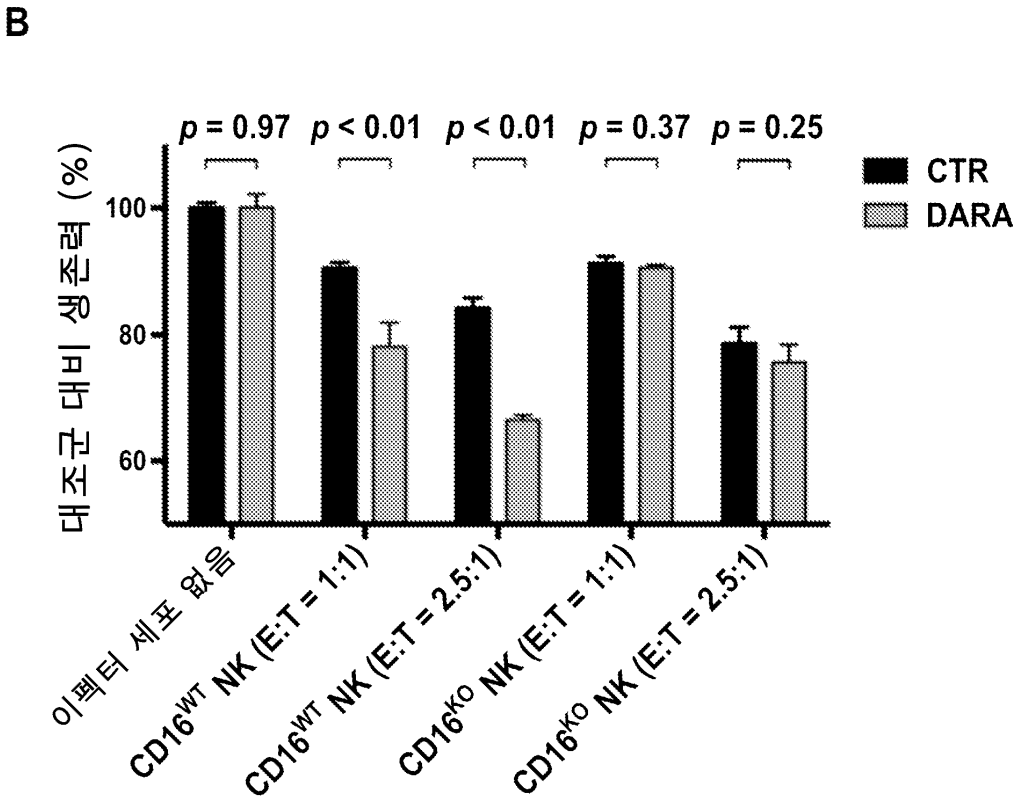
도면10f


대퇴골 2개당 NK 세포 수 (×10⁴)
p = 0.03
p = 0.30
CTR DARA CTR DARA
CD38WT
CD38KO
비장 당 NK 세포 수 (×10⁴)
p < 0.01
p = 1.00
PB에서 NK 세포의 빈도 (%)
p < 0.001
p = 1.00
0
10
20
30
40

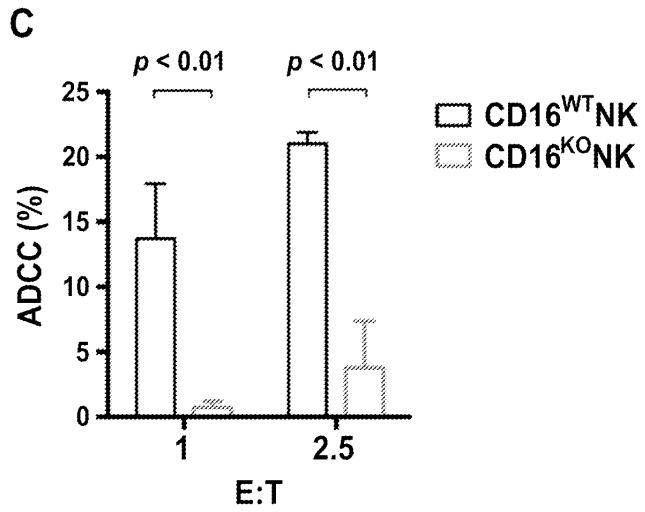
도면11a


A
CD38
CD16WT NK
CD16KO NK
CD16

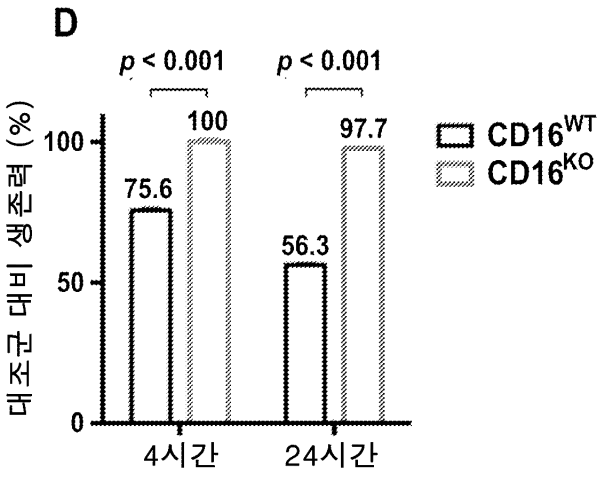
도면11b


B
p = 0.97
p < 0.01
p < 0.01
p = 0.37
p = 0.25
CTR
DARA
대조군 대비 생존력 (%)
100
80
60
이펙터 세포 없음
CD16WT NK (E:T = 1:1)
CD16WT NK (E:T = 2.5:1)
CD16KO NK (E:T = 1:1)
CD16KO NK (E:T = 2.5:1)

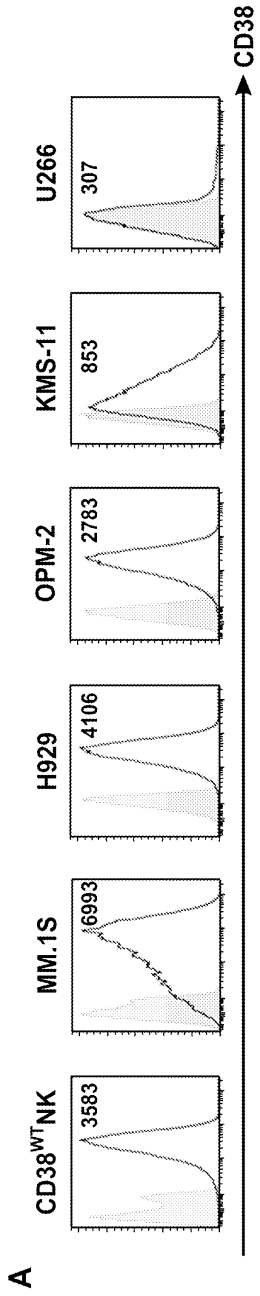
도면11c


C
p < 0.01
p < 0.01
25
20
15
10
5
0
ADCC (%)
1
2.5
E:T
CD16WTNK
CD16KONK

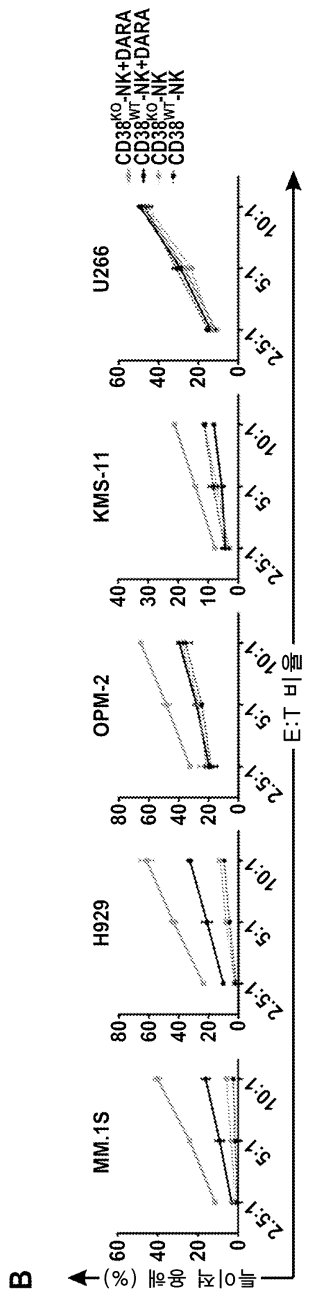
도면11d


D
p < 0.001
p < 0.001
100
50
0
대조군 대비 생존력 (%)
75.6
100
56.3
97.7
4시간
24시간
CD16WT
CD16KO

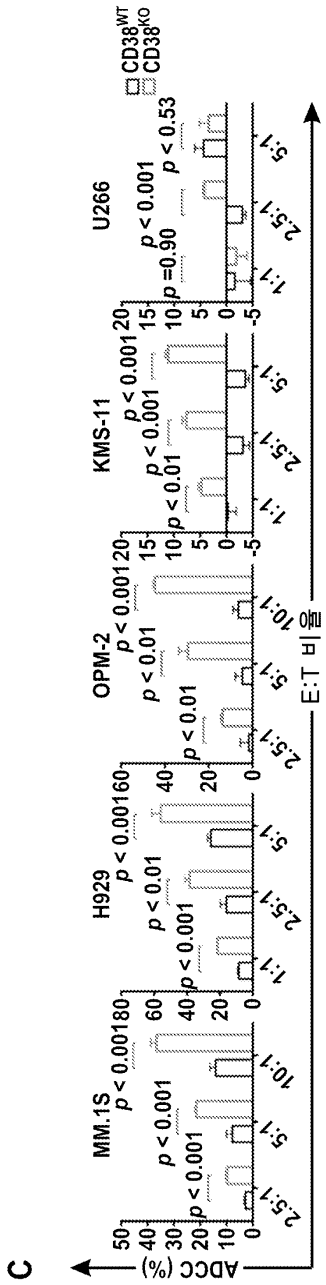
도면12a


A
CD38
CD38WTNK
3583
MM.1S
6993
H929
4106
OPM-2
2783
KMS-11
853
U266
307

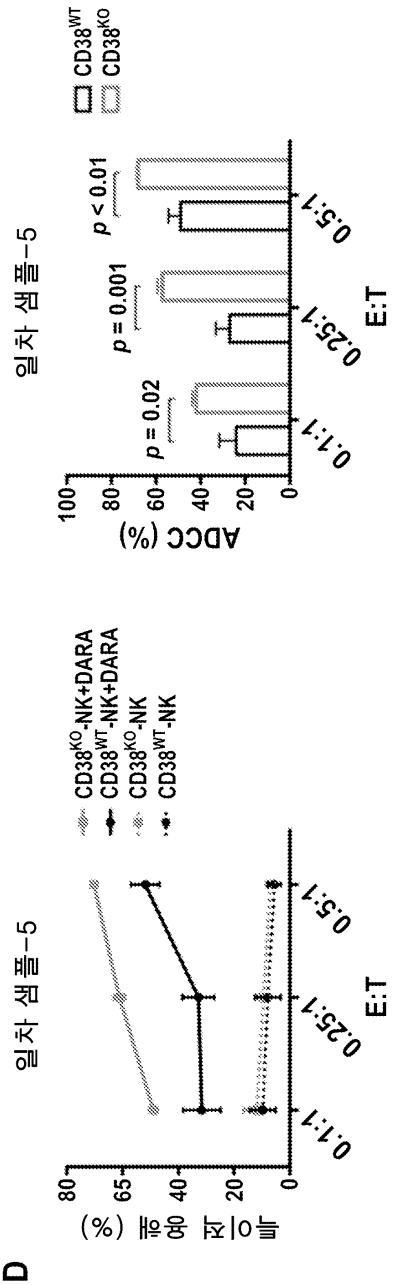
도면12b


B
특이적 용해 (%)
MM.1S
H929
OPM-2
KMS-11
U266
E:T 비율
2.5:1
5:1
10:1
CD38KO_NK+DARA
CD38WT_NK+DARA
CD38KO_NK
CD38WT_NK

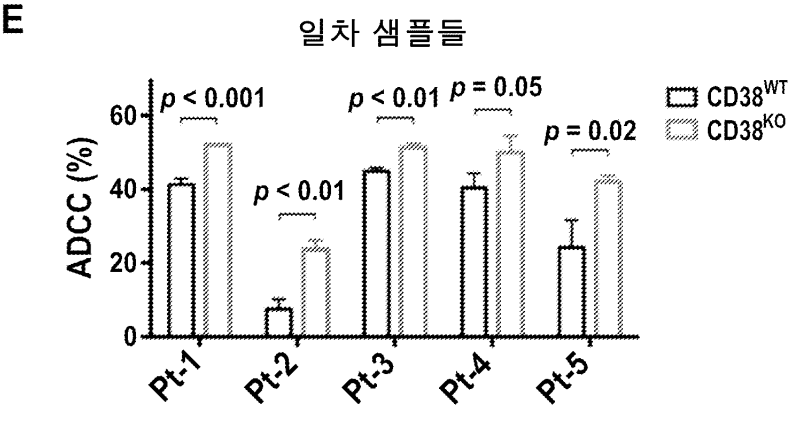
도면12c


C
ADCC (%)
E:T 비율
MM.1S
H929
OPM-2
KMS-11
U266
CD38WT
CD38KO
p < 0.00180
p < 0.001
p < 0.001
p < 0.00160
p < 0.01
p < 0.001
p < 0.00120
p < 0.01
p < 0.01
p < 0.001
p < 0.001
p =0.90
p < 0.53
2.5:1
5:1
10:1
1:1
2.5:1
5:1
10:1
1:1
2.5:1
5:1
10:1
1:1
2.5:1
5:1
1:1
2.5:1
5:1

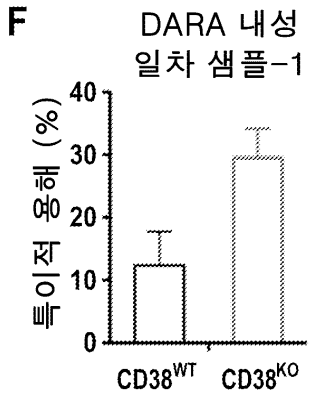
도면12d


D
일차 샘플-5
특이적 용해 (%)
CD38KO-NK+DARA
CD38WT-NK+DARA
CD38KO-NK
CD38WT-NK
E:T
0:1:1
0.25:1
0.5:1
일차 샘플-5
ADCC (%)
CD38WT
CD38KO
p = 0.02
p = 0.001
p < 0.01
E:T
0:1:1
0.25:1
0.5:1

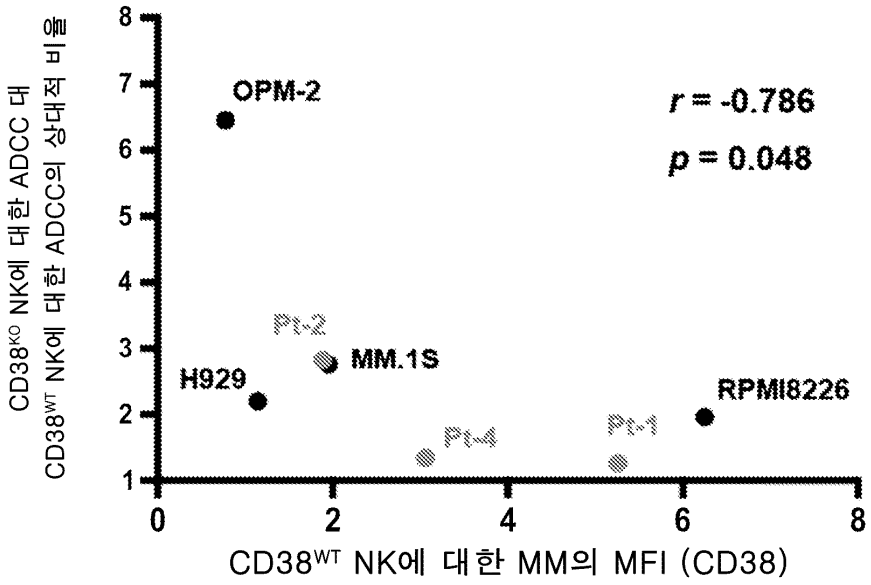
도면12e


E
일차 샘플들
ADCC (%)
p < 0.001
p < 0.01
p < 0.01
p = 0.05
p = 0.02
CD38WT
CD38KO
Pt-1
Pt-2
Pt-3
Pt-4
Pt-5

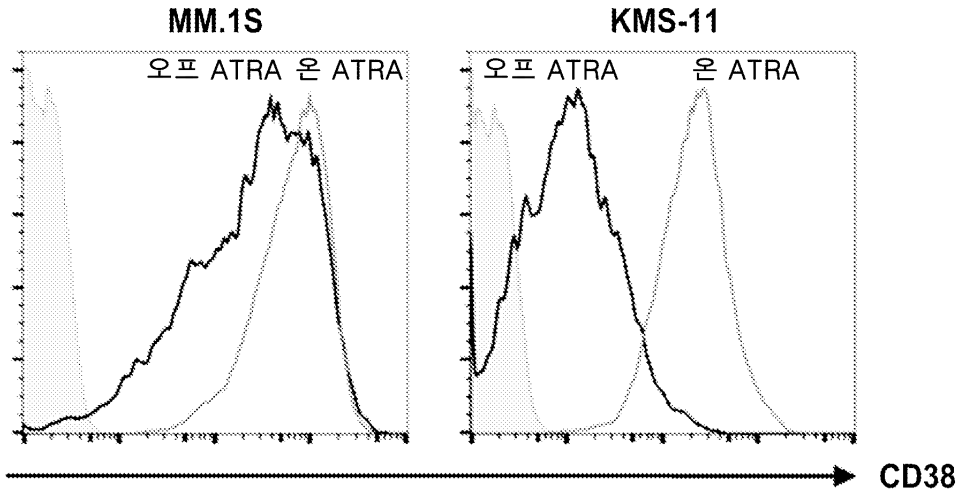
도면12f



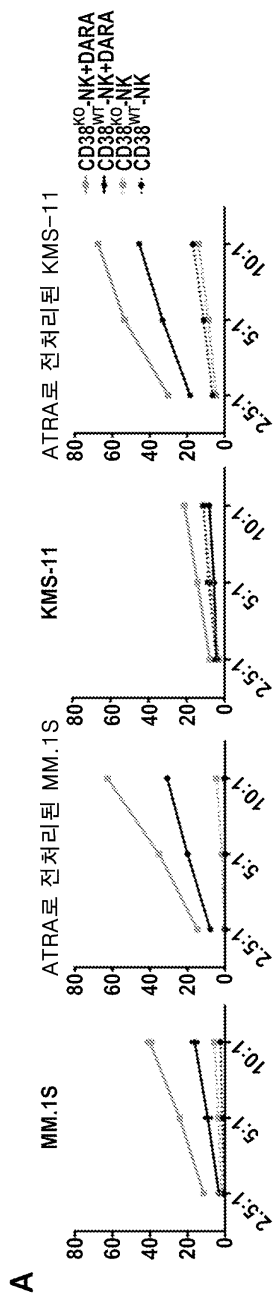
도면13



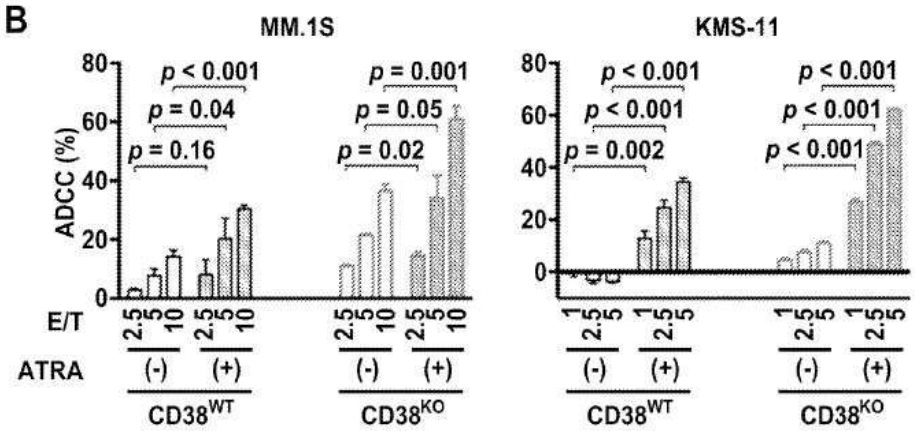
도면14



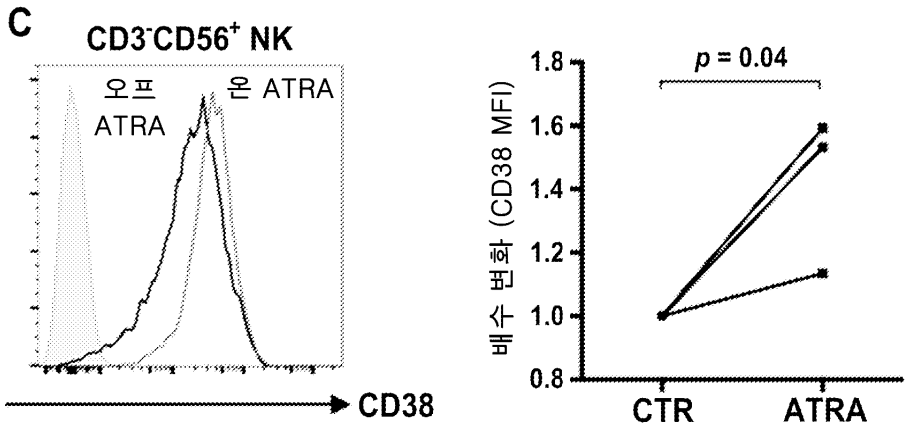
도면15a


A
MM.1S
KMS-11
ATRA로 전처리된 MM.1S
ATRA로 전처리된 KMS-11
CD38KO-NK+DARA
CD38WT-NK+DARA
CD38KO-NK
CD38WT-NK
0
20
40
60
80
2.5:1
5:1
10:1

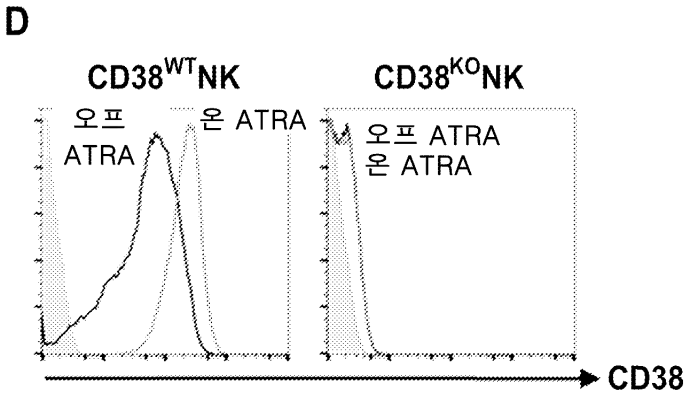
도면15b



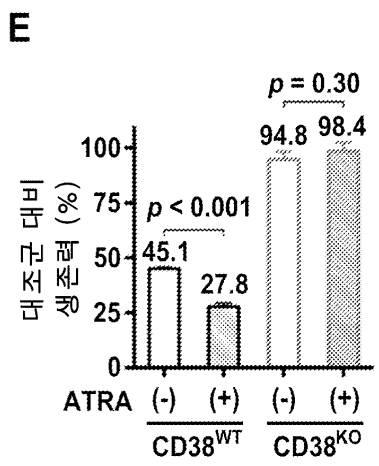
도면15c



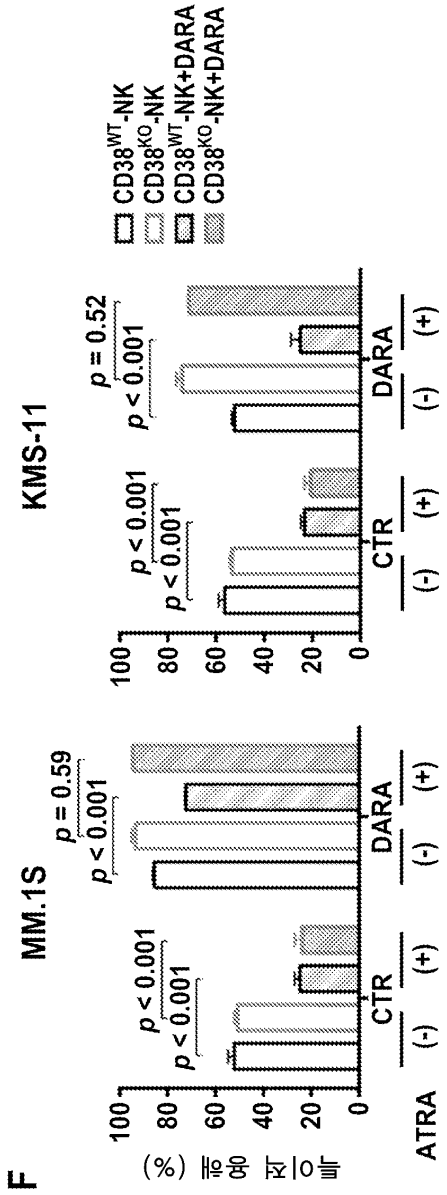
도면15d



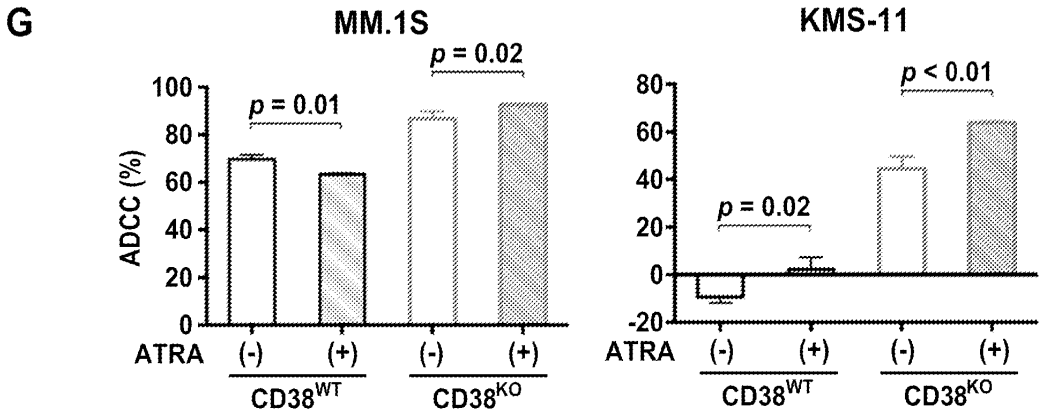
도면15e


E
p = 0.30
94.8
98.4
100
75
50
25
0
대조군 대비 생존력 (%)
p < 0.001
45.1
27.8
ATRA (-) (+) (-) (+)
CD38WT
CD38KO

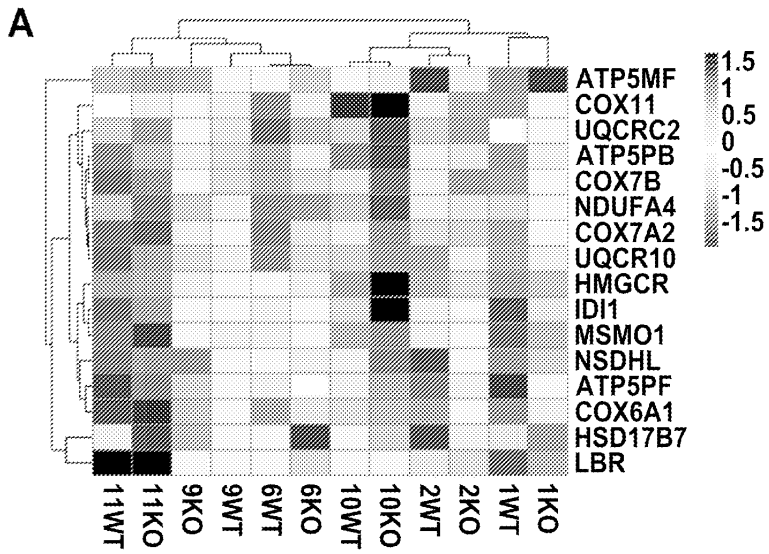
도면15f


F
MM.1S
KMS-11
CD38WT-NK
CD38KO-NK
CD38WT-NK+DARA
CD38KO-NK+DARA
특이적 용해 (%)
100
80
60
40
20
0
p < 0.001
p < 0.001
p = 0.59
p < 0.001
p < 0.001
p = 0.52
CTR
DARA
ATRA (-) (+) (-) (+)

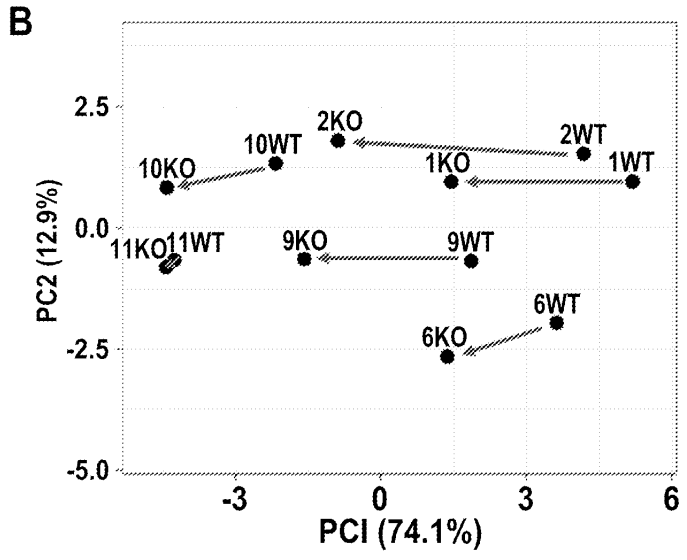
도면15g



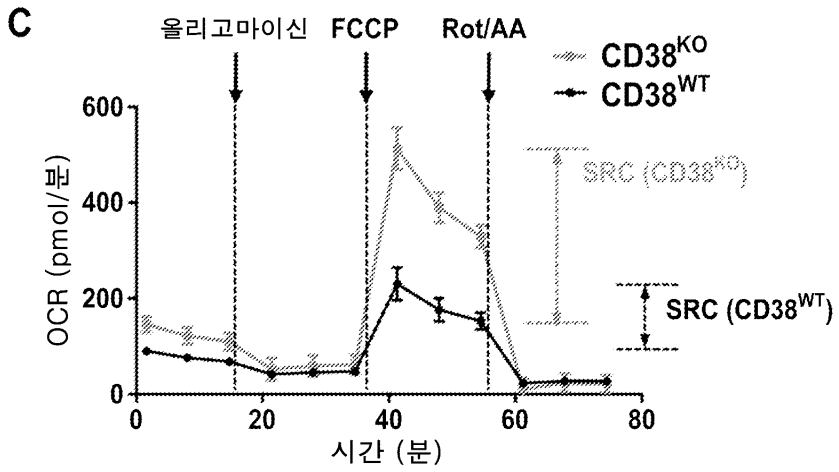
도면16a



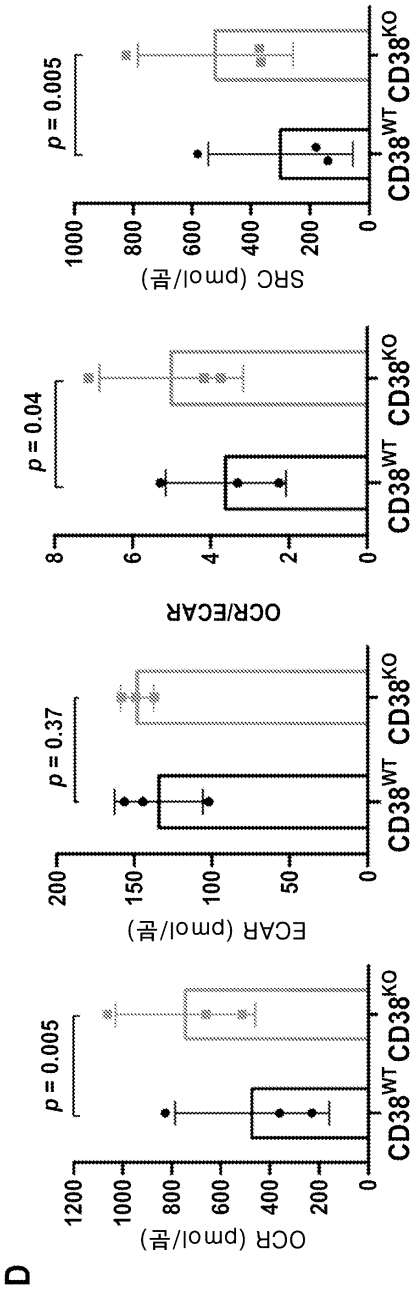
도면16b



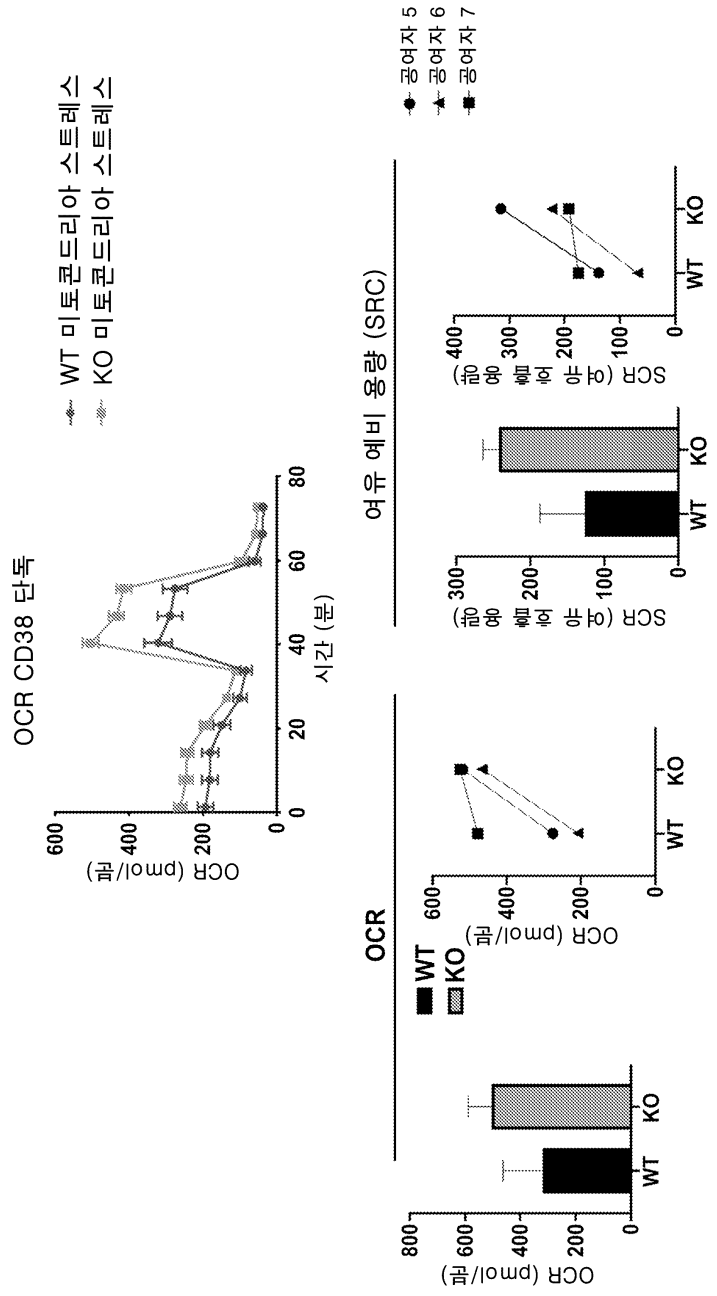
도면16c


C
올리고마이신
FCCP
Rot/AA
CD38KO
CD38WT
SRC (CD38KO)
SRC (CD38WT)
OCR (pmol/분)
600
400
200
0
0
20
40
60
80
시간 (분)

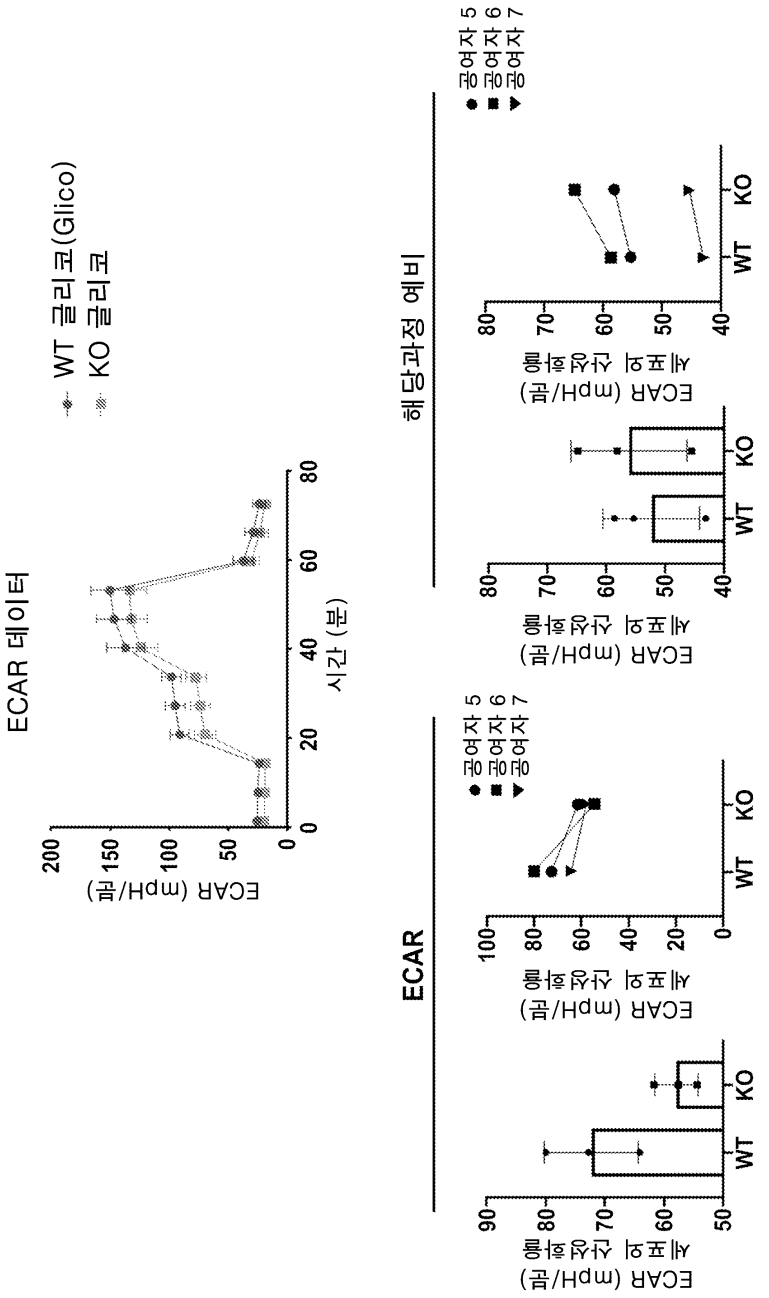
도면16d


D
OCR (pmol/분)
1200
1000
800
600
400
200
0
p = 0.005
CD38WT
CD38KO
ECAR (pmol/분)
200
150
100
50
0
p = 0.37
CD38WT
CD38KO
OCR/ECAR
8
6
4
2
0
p = 0.04
CD38WT
CD38KO
SRC (pmol/분)
1000
800
600
400
200
0
p = 0.005
CD38WT
CD38KO

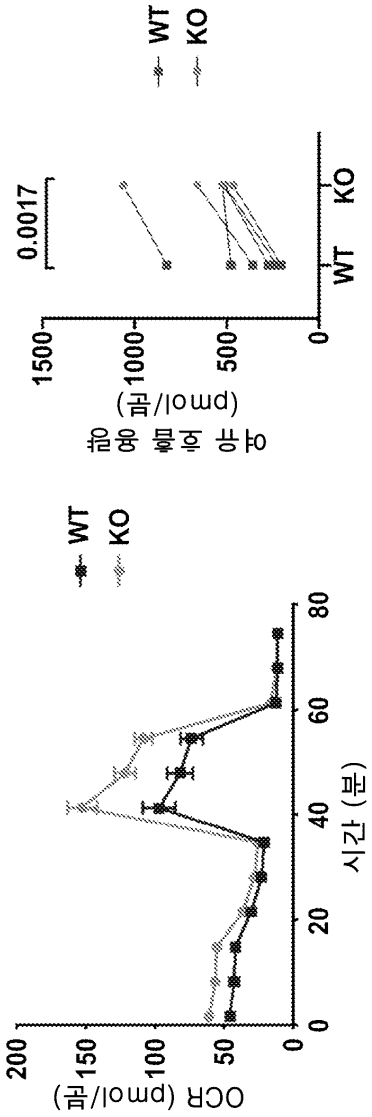
도면16e


OCR CD38 단독
WT 미토콘드리아 스트레스
KO 미토콘드리아 스트레스
OCR (pmol/분)
시간 (분)
여유 예비 용량 (SRC)
공여자 5
공여자 6
공여자 7
OCR
WT
KO
SCR (여유 호흡 용량)

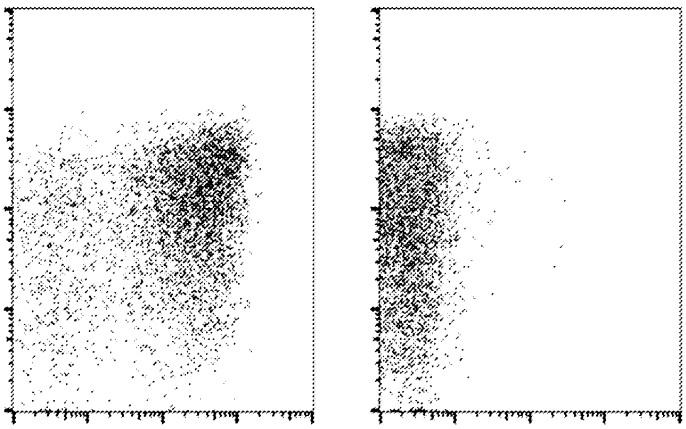
도면16f


ECAR 데이터
WT 글리코(Glico)
KO 글리코
ECAR (mpH/분)
시간 (분)
해당과정 예비
ECAR
공여자 5
공여자 6
공여자 7
세포외 산성화율
WT
KO

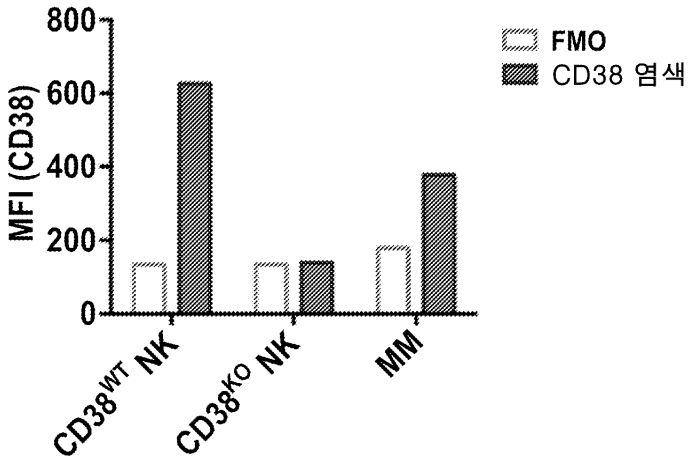
도면16g


WT
KO
0.0017
1500
1000
500
0
WT
KO
여유 호흡 용량
(pmol/분)
WT
KO
200
150
100
50
0
0
20
40
60
80
OCR (pmol/분)
시간 (분)

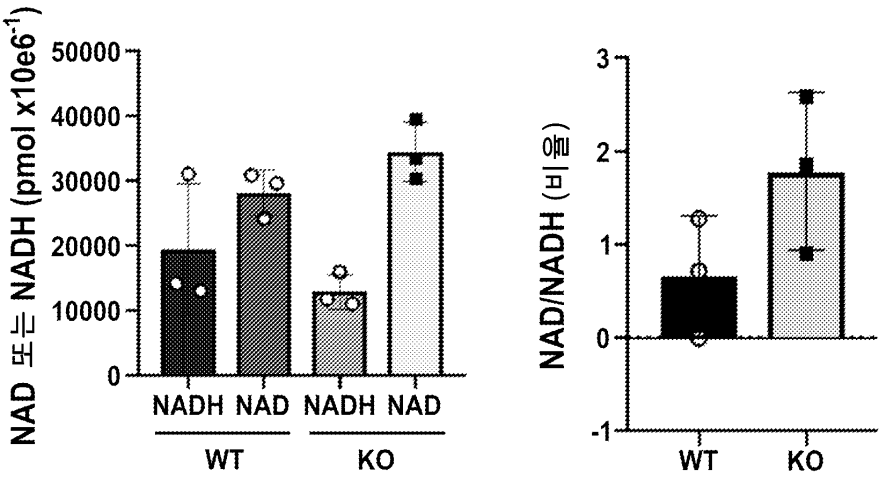
도면17



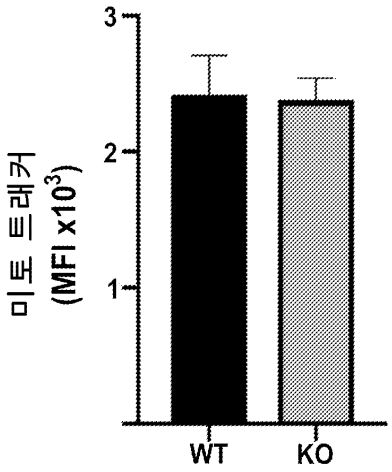
도면18



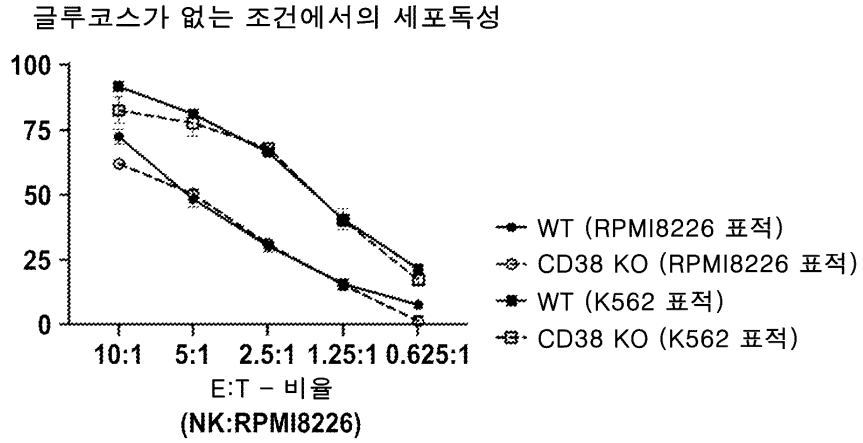
도면19



도면20



도면21



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> RESEARCH INSTITUTE AT NATIONWIDE CHILDREN'S

THE JOHNS HOPKINS UNIVERSITY

<120> GENERATION OF CD38 KNOCK-OUT PRIMARY AND EXPANDED HUMAN NK CELLS

<130> 10935-005WO1

<150> 62/928,524

<151> 2019-10-31

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 1

ctgaactcgc agttggccat 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 2

ggggccacta gggacaggat 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 3

aaagagactt ggtacccagg 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 4

aaagagactt ggtacccagg 20

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 5

ccttggagtc gcagctagcc tctgtgagg 29

<210> 6

<211> 55

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 6

ccccgcctgg agccctatgg ccaactgcga gttcagcccg gtgtccgggg acaaa 55

<210> 7

<211> 11

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 7

tttattagta g 11

<210> 8

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 8

ccctagagtt 10

<210> 9

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 9

aaactctagg 10

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 10

gggcaccggc aggaaagaca ac 22

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 11

accaacgaac tgtaagggct 20

<210> 12

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic construct

<400> 12

tgcagaagaa 10