(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0096638
(43) 공개일자 2021년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/63 (2006.01) *A61K 35/17* (2014.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C07K 14/705* (2006.01)
C12N 15/10 (2017.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/85 (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
C12N 9/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/63 (2013.01)
A61K 35/17 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7019926
(22) 출원일자(국제) 2019년11월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년06월25일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/063641
(87) 국제공개번호 WO 2020/113029
국제공개일자 2020년06월04일
(30) 우선권주장
62/772,406 2018년11월28일 미국(US)

(71) 출원인
보드 오브 리전츠, 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템
미국 텍사스주 78701 오스틴 웨스트 7번 스트리트 210
(72) 발명자
바사르 라펫
미국 텍사스주 77030 휴스턴 유닛 # 0065 홀콤브 블러바드 1515 스템 셀 트랜스플랜테이션 & 셀 써래피 유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터
쉬팔 엘리자베스
미국 텍사스주 77030 휴스턴 유닛 # 0065 홀콤브 블러바드 1515 스템 셀 트랜스플랜테이션 & 셀 써래피 유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터
레즈바니 케이티
미국 텍사스주 77030 휴스턴 유닛 # 0065 홀콤브 블러바드 1515 스템 셀 트랜스플랜테이션 & 셀 써래피 유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터
(74) 대리인
장훈

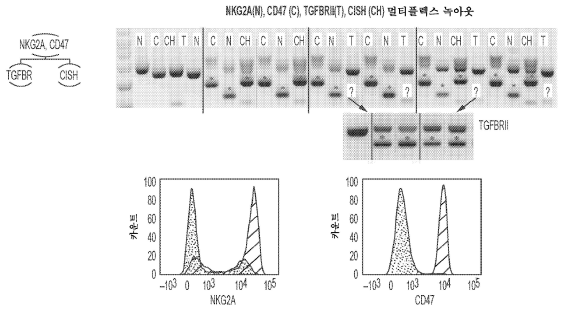
전체 청구항 수 : 총 148 항

(54) 발명의 명칭 **억제성 환경에 대한 기능 및 내성을 증진시키기 위한 면역 세포의 멀티플렉스 게놈 편집**

(57) 요 약

본원에서는 다중 유전자의 파괴와 함께 면역 세포를 생성하기 위한 방법이 제공된다. 추가로 면역 세포의 유전자좌에 키메라 항원 수용체를 삽입하기 위한 방법이 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/705 (2013.01)
C12N 15/102 (2013.01)
C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01)
C12N 5/0646 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2510/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

면역 세포에서 적어도 2개의 유전자의 파괴를 위한 시험관내 방법으로서, 상기 적어도 2개의 유전자가 NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, 및 CD7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 시험관내 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 파괴가 각각의 유전자에 대한 가이드 RNA (gRNA)를 상기 면역 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 적어도 2개의 유전자가 (a) NKG2A와 CISH, (b) NKG2A와 TGFBRII, (c) CISH와 TGFBRII, (d) TIGIT와 FOXO1, (e) TIGIT와 TGFBRII, (f) CD96과 FOXO1, (g) CD96과 TGFBRII, (h) FOXO1과 TGFBRII, (i) CD96과 TIGIT, (j) CISH와 TIGIT, (k) TIM3과 CISH, (l) TIM3과 TGFBRII, (m) FOXO1과 TGFBRII, (n) TIM3과 TIGIT, (o) SIGLEC7과 CISH, (p) SIGLEC7과 TGFBRII, (q) CD47과 CISH, (r) CD47과 TGFBRII, (s) SIRPA와 CISH, (t) SIRPA와 TGFBRII, (u) CD47과 TIGIT, (v) CD47과 SIRPA, (w) A2AR과 CISH, (x) A2AR과 TGFBRII, (y) ADAM17과 CISH, (z) TGFBRII와 ADAM17, (a1) A2AR과 TIGIT, (b1) SHP1과 CISH, (c1) CISH과 TGFBRII, (d1) SHP1과 TGFBRII, (e1) SHP1과 TIGIT, 또는 (f1) SHP1과 TIM3으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 3개의 유전자가 파괴된, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 적어도 3개의 유전자가 (1) NKG2A, CISH와 TGFBRII, (2) TIGIT, FOXO1과 TGFBRII, (3) TGFBRII, CD96과 TIGIT, (4) TGFBR2, CISH와 TIGIT, (5) TIM3, CISH와 TGFBRII, (6) CD96, FOXO1과 TGFBRII, (7) TGFBRII, TIM3와 TIGIT, (8) SIGLEC7, CISH와 TGFBRII, (9) CD47, CISH와 TGFBRII, (10) SIRPA, CISH와 TGFBRII, (11) TGFBRII, CD47과 TIGIT, (12) TGFBRII, CD47과 SIRPA, (13) A2AR, CISH와 TGFBRII, (14) TGFBRII, CISH와 ADAM17, (15) TGFBRII, TIM3과 TIGIT, (16) TGFBRII, A2AR과 TIGIT, (17) SHP1, CISH와 TGFBRII, (18) TGFBRII, CISH와 SHP1, (19) TGFBRII, SHP1과 TIGIT, 또는 (20) TGFBRII, SHP1과 TIM3으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 6

제2항에 있어서, RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 도입하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 RNA 가이드된 엔도뉴클레아제가 Cas9인, 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 RNA 가이드된 엔도뉴클레아제를 도입하는 단계가 상기 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제를 암호화하는 핵산을 상기 면역 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 핵산이 mRNA인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 3개, 4개, 5개 또는 6개 유전자가 파괴된, 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 유전자가 (a)-(j1) 서브그룹 중 2개를 포함하는, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 유전자가 (a)-(j1)의 하나의 서브그룹 및 1-23개 서브그룹 중 하나를 포함하는, 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 상기 유전자가 1 내지 23개 서브그룹 중 2개를 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항에 있어서, 상기 파괴가 동시에 일어나는, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포가 T 세포, NK 세포, NK T 세포, B 세포 또는 줄기 세포인, 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 면역 세포가 키메라 항원 수용체 (CAR) 및/또는 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하도록 가공된, 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 면역 세포가 CAR을 발현하도록 가공된, 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 면역 세포가 TCR을 발현하도록 가공된, 방법.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 면역 세포가 CAR 및 TCR을 발현하도록 가공된, 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 면역 세포가 바이러스-특이적인, 방법.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 T 세포가 바이러스-특이적인 T 세포인, 방법.

청구항 22

제15항에 있어서, 상기 T 세포가 조절 T 세포인, 방법.

청구항 23

제15항에 있어서, 상기 B 세포가 조절 B 세포인, 방법.

청구항 24

제15항에 있어서, 상기 줄기 세포가 중간엽 줄기 세포 (MSC) 또는 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포인, 방법.

청구항 25

제15항에 있어서, 상기 T 세포가 $CD8^+$ T 세포, $CD4^+$ T 세포, 감마-델타 T 세포 또는 이의 혼합물인, 방법.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포가 말초 혈액, 제대혈, 골수 또는 이의 혼합물로부터 단리된, 방법.

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포가 제대혈로부터 단리된, 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 제대혈이 2개 이상의 개별 제대혈 유닛으로부터 풀링되는, 방법.

청구항 29

제2항 내지 28항 중 어느 한 항에 있어서, 도입하는 단계가 형질감염 또는 형질도입 단계를 포함하는, 방법.

청구항 30

제2항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 도입하는 단계가 전기천공을 포함하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 전기천공이 1회 초과로 수행되는, 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 2개 라운드의 전기천공이 수행되는, 방법.

청구항 33

제32항에 있어서, 제1 그룹의 CRISPR gRNA가 제1 전기천공에서 도입되고, 제2 그룹의 CRISPR gRNA가 제2 라운드의 전기천공에서 도입되는, 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 제1 그룹 및/또는 제2 그룹의 CRISPR gRNA가 1, 2, 3, 또는 4개의 CRISPR gRNA를 포함하는, 방법.

청구항 35

제32항에 있어서, 2개의 CRISPR gRNA가 제1 전기천공에서 도입되고, 2개의 CRISPR gRNA가 제2 라운드의 전기천공에서 도입되는, 방법.

청구항 36

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 NKG2A, CD47, TGFβR2, 및 CISH를 파괴하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 37

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 NKG2A, CISH, TGFβR2 및 ADORA2를 파괴하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 38

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 NKG2A, TGFβR2, 및 CISH를 파괴하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 39

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 TIGIT, CD96, CISH 및 ADORA2를 파괴하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 40

제1항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 ADAM17, TGFβR2, NKG2A, 및 SHP1을 파괴하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 파괴가 상기 면역 세포의 증진된 항종양 세포독성, 생체내 증식, 생체내 지속성 및/또는 개선된 기능을 유도하는, 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 상기 면역 세포가 IFN-γ, CD107, 및/또는 TNFα의 증가된 분비를 갖는, 방법.

청구항 43

제41항에 있어서, 상기 면역 세포가 퍼포린 및/또는 그랜자임 B의 증가된 생성을 갖는, 방법.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, CAR 또는 TCR을 상기 면역 세포에 도입하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 45

제44항에 있어서, 상기 도입 단계가 상기 CAR 또는 TCR을 암호화하는 핵산을 상기 면역 세포에 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 상기 핵산이 발현 벡터내에 있는, 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 상기 발현 벡터가 레트로바이러스 벡터인, 방법.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 레트로바이러스 벡터가 아데노바이러스 관련 벡터인, 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 아데노바이러스 관련 벡터가 AAV6인, 방법.

청구항 50

제46항에 있어서, 상기 벡터가 억제성 유전자 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 억제성 유전자 서열이 NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 및 CD7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 52

제50항에 있어서, 상기 벡터가 상기 억제성 유전자에 대한 가이드 RNA를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 53

제52항에 있어서, 상기 CAR이 상기 억제성 유전자에 대한 상동성 아암(arm)에 의해 플랭킹된, 방법.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 CAR 서열을 포하하는 벡터를 도입하는 단계가 상기 면역 세포에서 상기 억제성 유전자좌에서 CAR의 삽입을 유도하는, 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 상기 CAR이 상기 억제성 유전자의 엑손에 삽입되는, 방법.

청구항 56

제54항에 있어서, 상기 CAR이 상기 억제성 유전자의 내인성 프로모터의 제어하에 있는, 방법.

청구항 57

제54항에 있어서, 상기 벡터를 도입하는 단계가 상기 억제성 유전자의 발현을 추가로 파괴시키는, 방법.

청구항 58

면역 세포에서 적어도 2개의 유전자의 파괴된 발현을 갖는 면역 세포로서, 상기 적어도 2개의 유전자가 NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, 및 CD7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 면역 세포.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 세포가 제1항 내지 제57항 중 어느 한 항에 따라 제조되는, 세포.

청구항 60

제58항에 있어서, 3개, 4개, 5개 또는 6개 유전자가 파괴된, 세포.

청구항 61

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 T 세포, NK 세포, NK T 세포, B 세포 또는 줄기 세포인, 세포.

청구항 62

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 키메라 항원 수용체 (CAR) 및/또는 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하도록 가공된, 세포.

청구항 63

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 CAR을 발현하도록 가공된, 세포.

청구항 64

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 TCR을 발현하도록 가공된, 세포.

청구항 65

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 CAR 및 TCR을 발현하도록 가공된, 세포.

청구항 66

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 바이러스-특이적인, 세포.

청구항 67

제61항에 있어서, 상기 T 세포가 바이러스-특이적인 T 세포인, 세포.

청구항 68

제61항에 있어서, 상기 T 세포가 조절 T 세포인, 세포.

청구항 69

제61항에 있어서, 상기 B 세포가 조절 B 세포인, 세포.

청구항 70

제61항에 있어서, 상기 줄기 세포가 중간엽 줄기 세포 (MSC) 또는 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포인, 세포.

청구항 71

제61항에 있어서, 상기 T 세포가 $CD8^+$ T 세포, $CD4^+$ T 세포, 또는 감마-델타 T 세포인, 세포.

청구항 72

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 말초 혈액, 제대혈, 골수 또는 이의 혼합물로부터 단리된, 세포.

청구항 73

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 제대혈로부터 단리된, 세포.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 제대혈이 2개 이상의 개별 제대혈 유닛으로부터 풀링되는, 세포.

청구항 75

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 파괴된 NKG2A, CD47, TGFβR2, 및 CISH를 갖는, 세포.

청구항 76

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 파괴된 NKG2A, CISH, TGFβR2 및 ADORA2를 갖는, 세포.

청구항 77

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 파괴된 NKG2A, TGFβR2, 및 CISH를 갖는, 세포.

청구항 78

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 파괴된 TIGIT, CD96, CISH, 및 ADORA2를 갖는, 세포.

청구항 79

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 파괴된 ADAM17, TGFβR2, NKG2A, 및 SHP1을 갖는, 세포.

청구항 80

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 증진된 항종양 세포독성, 생체내 증식, 생체내 지속성 및/또는 개선된 기능을 갖는, 세포.

청구항 81

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 IFN-γ, CD107, 및/또는 TNFα의 증가된 분비를 갖는, 세포.

청구항 82

제58항에 있어서, 상기 면역 세포가 퍼포린 및/또는 그랜자임 B의 증가된 생성을 갖는, 세포.

청구항 83

제58항에 있어서, 상기 세포가 CAR 및/또는 TCR을 발현하도록 가공된, 세포.

청구항 84

제83항에 있어서, 상기 CAR이 상기 세포의 내인성 억제성 유전자좌에 삽입된, 세포.

청구항 85

제84항에 있어서, 상기 억제성 유전자좌가 NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 및 CD7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 세포.

청구항 86

제84항에 있어서, 상기 CAR이 상기 억제성 유전자의 내인성 프로모터의 제어하에 있는, 세포.

청구항 87

제84항에 있어서, 상기 CAR이 CRISPR-매개된 유전자 편집에 의해 억제성 유전자좌에 삽입된, 세포.

청구항 88

제83항 내지 제87항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 F(ab')2, Fab', Fab, Fv, 및 scFv로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원-결합 도메인을 포함하는, 세포.

청구항 89

제83항 내지 제88항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 CD19, CD319 (CS1), ROR1, CD20, 암배아 항원, 알파 페토단백질, CA-125, MUC-1, 상피 종양 항원, 흑색종-관련 항원, 돌연변이된 p53, 돌연변이된 ras, HER2/Neu, ERBB2, 폴레이트 결합 단백질, HIV-1 외피 당단백질 gp120, HIV-1 외피 당단백질 gp41, GD2, CD5, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, 메소텔린, GD3, HERV-K, IL-11R알파, 카파쇄, 람다쇄, CSPG4, ERBB2, WT-1, TRAIL/DR4, VEGFR2, CD33, CD47, CLL-1, U5snRNP200, CD200, BAFF-R, BCMA, 및 CD99로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 종양 관련 항원을 표적화하는, 세포.

청구항 90

제83항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 CD3ζ, CD28, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, FcεRIγ, ICOS/CD278, ILRB/CD122, IL-2RG/CD132, DAP12, CD70, 및 CD40으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 신호전달 도메인을 포함하는, 세포.

청구항 91

제58항 내지 제90항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 이종성 사이토킨을 발현하도록 가공된, 세포.

청구항 92

제83항에 있어서, 상기 세포가 자살 유전자를 추가로 포함하는, 세포.

청구항 93

제92항에 있어서, 상기 자살 유전자가 막 결합된 종양 괴사 인자 (TNF)-알파 돌연변이체 유전자인, 세포.

청구항 94

CAR, 억제성 유전자 서열, 및 gRNA를 암호화하는 발현 벡터.

청구항 95

제94항에 있어서, 상기 억제성 유전자 서열이 NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R,

ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 및 CD7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 억제성 유전자로부터 기원하는, 벡터.

청구항 96

제94항에 있어서, 상기 gRNA가 상기 억제성 유전자에 특이적인, 벡터.

청구항 97

제94항에 있어서, 상기 벡터가 레트로바이러스 벡터인, 벡터.

청구항 98

제94항에 있어서, 상기 레트로바이러스 벡터가 AAV 벡터인, 벡터.

청구항 99

제94항에 있어서, 상기 CAR이 상기 억제성 유전자에 대한 상동성 아암에 의해 플랭킹된, 벡터.

청구항 100

제94항 내지 제99항 중 어느 한 항의 벡터를 발현하도록 가공된 숙주 세포.

청구항 101

제100항에 있어서, 상기 세포가 T 세포, NK 세포, B 세포 또는 줄기 세포인, 세포.

청구항 102

제100항에 있어서, 상기 세포가 제58항 내지 제83항 중 어느 한 항의 세포인, 세포.

청구항 103

제58항 내지 제93항 중 어느 한 항의 면역 세포 집단을 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 104

면역 관련 장애, 감염성 질환 또는 암의 치료를 위해 제58항 제93항 중 어느 한 항의 세포 집단을 포함하는 조성물.

청구항 105

제58항 내지 제93항 중 어느 한 항의 유효량의 면역 세포를 대상체에게 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 106

제105항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 감염성 질환, 암 또는 면역 관련 장애인, 방법.

청구항 107

제106항에 있어서, 상기 면역 관련 장애가 자가면역 장애, 이식편 대 숙주 질환, 동종이식 거부 또는 염증성 병태인, 방법.

청구항 108

제106항에 있어서, 상기 면역-관련 장애가 염증성 병태이고, 상기 면역 세포가 필수적으로 글루코코르티코이드 수용체를 발현하지 않는, 방법.

청구항 109

제105항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포가 상기 대상체에 자가인, 방법.

청구항 110

제105항 내지 제108항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 면역 세포가 상기 대상체에 대해 동종이계인, 방법.

청구항 111

제106항에 있어서, 상기 면역 관련 장애가 암인, 방법.

청구항 112

제111항에 있어서, 상기 암이 고형암 또는 조혈 악성 종양인, 방법.

청구항 113

제105항 내지 제112항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 제2 치료학적 제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 114

제113항에 있어서, 상기 적어도 제2 치료학적 제제가 화학치료요법, 면역치료요법, 수술, 방사선치료요법 또는 생물치료요법을 포함하는, 방법.

청구항 115

제113항 또는 제114항에 있어서, 상기 면역 세포 및/또는 상기 적어도 제2 치료학적 제제가 정맥내로, 복막내로, 기관내, 종양내, 근육내, 내시경으로, 병변내, 경피적으로, 피하내, 국부적으로, 또는 직접 주사 또는 관류에 의해 투여되는, 방법.

청구항 116

CAR을 발현하도록 면역 세포를 가공하기 위한 방법으로서, 상기 방법이 상기 면역 세포의 억제성 유전자좌에 CAR을 삽입하기 위해 CRISPR gRNA를 사용함을 포함하는, 방법.

청구항 117

제116항에 있어서, 상기 CAR이 발현 벡터에 의해 암호화된, 방법.

청구항 118

제117항에 있어서, 상기 발현 벡터가 레트로바이러스 벡터인, 방법.

청구항 119

제118항에 있어서, 상기 레트로바이러스 벡터가 아데노바이러스 관련 벡터인, 방법.

청구항 120

제119항에 있어서, 상기 아데노바이러스 관련 벡터가 AAV6인, 방법.

청구항 121

제117항에 있어서, 상기 벡터가 억제성 유전자 서열을 추가로 포함하는, 방법.

청구항 122

제121항에 있어서, 상기 억제성 유전자 서열이 NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 및 CD7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 억제성 유전자로부터 기원하는, 방법.

청구항 123

제116항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CRISPR gRNA가 상기 억제성 유전자에 대한 것인, 방법.

청구항 124

제116항 내지 제123항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 상기 억제성 유전자에 대한 상동성 아암에 의해 플랭킹된, 방법.

청구항 125

제116항 내지 제124항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 상기 억제성 유전자의 엑손에 삽입되는, 방법.

청구항 126

제116항 내지 제125항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 상기 억제성 유전자의 내인성 프로모터의 제어하에 있는, 방법.

청구항 127

제116항 내지 제126항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 상기 억제성 유전자의 발현을 파괴하는, 방법.

청구항 128

제116항 내지 제127항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 CD19, CD319 (CS1), ROR1, CD20, 암배아 항원, 알파페토단백질, CA-125, MUC-1, 상피 종양 항원, 흑색종-관련 항원, 돌연변이된 p53, 돌연변이된 ras, HER2/Neu, ERBB2, 폴레이트 결합 단백질, HIV-1 외피 당단백질 gp120, HIV-1 외피 당단백질 gp41, GD2, CD5, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, 메소텔린, GD3, HERV-K, IL-11R알파, 카파쇄, 람다쇄, CSPG4, ERBB2, WT-1, TRAIL/DR4, VEGFR2, CD33, CD47, CLL-1, U5snRNP200, CD200, BAFF-R, BCMA, 및 CD99로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 종양 관련 항원을 표적화하는, 방법.

청구항 129

제116항 내지 제128항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CAR이 CD3ζ, CD28, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, FcεRIγ, ICOS/CD278, ILRB/CD122, IL-2RG/CD132, DAP12, CD70, CD40 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 신호전달 도메인을 포함하는, 방법.

청구항 130

제116항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 이종성 사이토킨을 발현하도록 가공된, 방법.

청구항 131

제116항 내지 제130항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 자살 유전자를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 132

제131항에 있어서, 상기 자살 유전자가 막 결합된 종양 괴사 인자 (TNF)-알파 돌연변이체 유전자인, 방법.

청구항 133

상기 면역 세포의 억제성 유전자에 삽입된 CAR을 갖는 면역 세포.

청구항 134

제133항에 있어서, 상기 세포가 제116항 내지 제132항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조되는, 면역 세포.

청구항 135

제133항 또는 제134항의 면역 세포 집단을 포함하는 조성물.

청구항 136

제135항에 있어서, 상기 면역 세포가 T 세포, B 세포, 또는 NK 세포인, 조성물.

청구항 137

제133항 내지 제136항 중 어느 한 항의 세포 집단을 포함하는, 면역 관련 장애, 감염성 질환 또는 암의 치료를 위한 조성물.

청구항 138

제58항 내지 제93항, 제100항, 제133항 및 제134항 중 어느 한 항의 유효량의 세포를 대상체에게 투여함을 포함하는, 상기 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 139

제138항에 있어서, 상기 질환 또는 장애가 감염성 질환, 암 또는 면역 관련 장애인, 방법.

청구항 140

제139항에 있어서, 상기 면역 관련 장애가 자가면역 장애, 이식편 대 숙주 질환, 동종이식 거부 또는 염증성 병태인, 방법.

청구항 141

제139항에 있어서, 상기 면역-관련 장애가 염증성 병태이고, 상기 면역 세포가 필수적으로 글루코코르티코이드 수용체를 발현하지 않는, 방법.

청구항 142

제138항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 상기 대상체에 대해 자가인, 방법.

청구항 143

제138항 내지 제141항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포가 동종이계인, 방법.

청구항 144

제138항에 있어서, 상기 면역 관련 장애가 암인, 방법.

청구항 145

제144항에 있어서, 상기 암이 고형암 또는 조혈 악성 종양인, 방법.

청구항 146

제138항 내지 제145항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 제2 치료학적 제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 147

제146항에 있어서, 상기 적어도 제2 치료학적 제제가 화학치료요법, 면역치료요법, 수술, 방사선치료요법 또는 생물치료요법을 포함하는, 방법.

청구항 148

제146항 또는 제147항에 있어서, 상기 면역 세포 및/또는 상기 적어도 제2 치료학적 제제가 정맥내로, 복막내로, 기관내, 종양내, 근육내, 내시경으로, 병변내, 경피적으로, 피하내, 국부적으로, 또는 직접 주사 또는 관류에 의해 투여되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] [0001] 본 출원은 2018년 11월 28일자로 출원된 미국 가특허 출원 제62/772,406호에 대한 우선권을 주장하며, 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다.

[0002] 1. 기술 분야

[0003] [0002] 본원 발명은 일반적으로 면역학, 세포 생물학, 분자 생물학 및 의약 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 면역 세포의 멀티플렉스 편집 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0004] 2. 관련 분야의 기재

[0005] [0003] 세포 면역학은 암 치료를 위한 많은 전망을 유지하고 있다. 그러나, 단독으로 적용되는 경우 대부분의 면역치료학적 접근법은 대다수의 악성 종양, 특히 고형 종양에 대해 제한된 가치를 갖는다. 상기 제한된 성공의 이유는 종양 세포의 표면 상의 종양 항원의 감소된 발현을 포함하고, 이는 면역계에 의한 이들의 검출, 면역 세포 불활성화를 유도하는 PD1, NKG2A, TIGIT 또는 CISH와 같은 억제성 수용체에 대한 리간드의 발현; 및 면역 반응을 억제하고 종양 세포 증식 및 생존률을 촉진시키는 형질전환 성장 인자-β (TGFβ) 및 아데노신과 같은 물질을 방출하는 미소환경에서 세포 (예를 들어, 조절 T 세포 또는 골수성-유래된 서프레서 세포)의 유도를 감소시킨다. 따라서 세포 면역치료요법의 개선된 방법에 대한 필요성이 충족되지 않고 있다.

발명의 내용

[0006] 발명의 개요

[0007] [0004] 본원의 개시내용은 특히 가공된 면역 세포를 포함하는 암 면역치료요법과 관련된 조성물 및 방법을 제공한다. 특정 구현예는 수동에 의해 변형되어 1개, 2개 이상의 유전자의 발현이 결핍되어 있거나 발현이 감소된 특정 면역 세포에 관한 것이고, 특정 경우에, 상기 변형(들)을 갖는 세포는 또한 항원 수용체인 비-천연 단백질을 포함하는 하나 이상의 이종성 단백질을 발현한다. 또한, 비-천연 면역 세포를 생성하는 방법이 포함된다. 특정 경우에, 이종성 항원 수용체는 발현이 감소되거나 제거된 유전자의 게놈 유전자좌에 도입된다.

[0008] [0005] 하나의 구현예에서, 본원의 개시내용은 면역 세포에서 적어도 2개의 유전자의 파괴를 위한 시험관내 방법을 제공하고, 여기서, 상기 적어도 2개의 유전자는 NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정 양상에서, 3개, 4개, 5개 또는 6개 이상의 유전자가 파괴된다. 특정 양상에서, 2개 이상의 유전자의 파괴는 예를 들어, 동일한 방법 단계에서 동시에 일어난다. 상기 방법은 각각의 유전자에 대한 가이드 RNA (gRNA)를 면역 세포에 도입함을 포함할 수 있다.

[0009] [0006] 상기 방법은 예를 들어, 하기와 같은 유전자의 특정 조합의 녹다운을 포함할 수 있다: (a) NKG2A와 CISH, (b) NKG2A와 TGFBRII, (c) CISH와 TGFBRII, (d) TIGIT와 FOXO1, (e) TIGIT와 TGFBRII, (f) CD96과 FOXO1, (g) CD96과 TGFBRII, (h) FOXO1과 TGFBRII, (i) CD96과 TIGIT, (j) CISH와 TIGIT, (k) TIM3과 CISH, (l) TIM3과 TGFBRII, (m) FOXO1과 TGFBRII, (n) TIM3과 TIGIT, (o) SIGLEC7과 CISH, (p) SIGLEC7과 TGFBRII, (q) CD47과 CISH, (r) CD47과 TGFBRII, (s) SIRPA와 CISH, (t) SIRPA와 TGFBRII, (u) CD47과 TIGIT, (v) CD47과 SIRPA, (w) A2AR과 CISH, (x) A2AR과 TGFBRII, (y) ADAM17과 CISH, (z) TGFBRII와 ADAM17, (a) A2AR과 TIGIT, (b) SHP1과 CISH, (c) CISH과 TGFBRII, (d) SHP1과 TGFBRII, (e) SHP1과 TIGIT, 또는 (f) SHP1과 TIM3. 상기 방법은 (1) NKG2A, CISH와 TGFBRII, (2) TIGIT, FOXO1과 TGFBRII, (3) TGFBRII, CD96과 TIGIT, (4) TGFBR2, CISH와 TIGIT, (5) TIM3, CISH와 TGFBRII, (6) CD96, FOXO1과 TGFBRII, (7) TGFBRII, TIM3와 TIGIT, (8) SIGLEC7, CISH와 TGFBRII, (9) CD47, CISH와 TGFBRII, (10) SIRPA, CISH와 TGFBRII, (11) TGFBRII, CD47과 TIGIT, (12) TGFBRII, CD47과 SIRPA, (13) A2AR, CISH와 TGFBRII, (14) TGFBRII, CISH와 ADAM17, (15) TGFBRII, TIM3과 TIGIT, (16) TGFBRII, A2AR과 TIGIT, (17) SHP1, CISH와 TGFBRII, (18) TGFBRII, CISH와 SHP1, (19) TGFBRII, SHP1과 TIGIT, 또는 (20) TGFBRII, SHP1과 TIM3의 녹다운을 포함할 수 있다. 임의의 상기 서브그룹은 상기된 바와 같은 제2 서브그룹과 조합될 수 있다. 예를 들어, 서브그룹 a-j1 중 임의의 하나는 다른 서브그룹 a-j1 중 임의의 하나 이상과 조합될 수 있거나, 서브그룹 a-j1의 임의의 하나의 이상은 다른 서브그룹 1-23의 임의의 하나 이상과 조합될 수 있거나, 서브그룹 1-23의 어느 하나 이상은 다른

서브그룹 1-23의 임의의 하나 이상과 조합될 수 있다.

[0010] **[0007]** 일부 양상에서, 상기 방법은 Cas9와 같은 RNA-가이드 엔도뉴클레아제를 세포에 도입함을ㄹ 추가로 포함한다. RNA 가이드된 엔도뉴클레아제의 도입은 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제를 암호화하는 mRNA와 같은 핵산을 면역 세포에 도입하는 것을 포함할 수 있다.

[0011] **[0008]** 특정 양상에서, 면역 세포는 T 세포, NK 세포, B 세포, 대식세포, NK T 세포 또는 줄기 세포이다. 또 다른 경우에, 면역 세포는 T 세포가 아니고 CAR T 세포를 포함하지 않는다. 일부 양상에서, 면역 세포는 하나 이상의 키메라 항원 수용체 (CAR) 및/또는 하나 이상의 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하도록 가공된다. 면역 세포는 바이러스 특이적, 예를 들어, 바이러스 특이적 T 세포일 수 있다. T 세포는 조절 T 세포일 수 있다. B 세포는 조절 B 세포일 수 있다. 일부 양상에서, 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포 (MSC) 또는 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포이다. 특정 양상에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포, $CD4^+$ T 세포 또는 감마-델타 T 세포이다. 면역 세포는 말초 혈액, 제대혈, 골수 또는 이의 혼합물로부터 단리될 수 있다. 일부 양상에서, 제대혈은 2개 이상의 개별 제대혈 유닛으로부터 풀링된다.

[0012] **[0009]** 일부 양상에서, 도입 단계는 형질감염 또는 형질도입을 포함한다. 예를 들어, 도입은 1회 초과, 예를 들어, 전기천공의 2 또는 3라운드 수행될 수 있는 전기천공을 포함한다. 일부 양상에서, 제1 그룹의 CRISPR gRNA는 제1 전기천공에서 도입되고 제2 그룹의 CRISPR gRNA는 제2 라운드의 전기천공에서 도입된다. 특정 경우에, 제1 그룹의 CRISPR gRNA는 제2 그룹의 CRISPR gRNA와는 상이하다. 특정 양상에서, 제1 그룹 및/또는 제2 그룹의 CRISPR gRNA는 1, 2, 3, 또는 4개 이상의 CRISPR gRNA를 포함한다. 일부 양상에서, 2개의 CRISPR gRNA는 제1 전기천공에서 도입되고 2개의 상이한 CRISPR gRNA는 제2 라운드의 전기천공에서 도입된다. 특정 구현예에서, CRISPR gRNA 그룹은 이중 적어도 2개가 상이한 유전자를 표적화하는 gRNA 그룹을 포함하고; 특정 구현예에서, gRNA 각각의 그룹은 상이한 유전자를 표적화한다.

[0013] **[0010]** 특정 양상에서, 상기 방법은 NKG2A, CD47, TGFβR2, 및 CISH; NKG2A, CISH, TGFβR2 및 ADORA2; NKG2A, TGFβR2 및 CISH; TIGIT, CD96, CISH, 및 ADORA2; or ADAM17, TGFβR2, NKG2A, 및 SHP1을 파괴함을 포함한다.

[0014] **[0011]** 일부 양상에서, 상기 파괴는 면역 세포의 증진된 항종양 세포독성, 생체내 증식, 생체내 지속성 및/또는 개선된 기능을 유도한다. 특정 양상에서, 면역 세포는 변형(들)이 부재인 경우와 비교하여 IFN-γ, CD107, 및/또는 TNFα의 분비를 증가시켰다. 일부 양상에서, 면역 세포는 변형(들)이 부재인 경우와 비교하여 퍼포린 및/또는 그랜자임 B의 증가된 생성을 갖는다.

[0015] **[0012]** 추가의 양상에서, 상기 방법은 CAR 및/또는 TCR을 면역 세포에 도입하는 단계, 예를 들어, CAR 및/또는 TCR을 암호화하는 핵산을 면역 세포에 도입함을 추가로 포함한다. 일부 양상에서, 핵산은 발현 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터에 있다. 특정 양상에서, 벡터는 아데노바이러스 관련 벡터, 예를 들어, AAV6이다. 일부 양상에서, 벡터는 본원의 NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 억제성 유전자 서열과 같은 억제성 유전자 서열을 추가로 포함한다. 특정 양상에서, 벡터는 억제성 유전자에 대한 가이드 RNA를 추가로 포함한다. CAR은 억제성 유전자에 대한 상동성 아암에 의해 플랭킹될 수 있다. 일부 양상에서, CAR 서열을 포함하는 벡터의 도입은 면역 세포에서 억제성 유전자좌, 예를 들어, 억제성 유전자의 엑손에서 CAR의 삽입을 유도하여 상기 CAR이 억제성 유저자의 내인성 프로모터의 제어하에 있도록 한다. 특정 양상에서, 상기 벡터의 도입은 억제성 유전자의 발현을 추가로 파괴한다.

[0016] **[0013]** 또 다른 구현예에서, 면역 세포, 예를 들어, 각각의 유전자에 대한 CRISPR 가이드 RNA (gRNA)를 면역 세포에 도입하는 것을 포함하는 단계에 의해 생성된 면역 세포에서 적어도 2개의 유전자의 발현이 파괴된 본원의 구현예의 면역 세포가 제공되고, 여기서, 상기 적어도 2개의 유전자는 NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 양상에서, 3개, 4개, 5개 또는 6개 이상의 유전자가 파괴된다.

[0017] **[0014]** 특정 양상에서, 면역 세포는 T 세포, NK 세포, B 세포, 또는 줄기 세포이다. 일부 양상에서, 면역 세포는 키메라 항원 수용체 (CAR) 및/또는 T 세포 수용체 (TCR)를 발현하도록 가공된다. 면역 세포는 바이러스 특이적, 예를 들어, 바이러스 특이적 T 세포일 수 있다. T 세포는 조절 T 세포일 수 있다. B 세포는 조절 B 세포일 수 있다. 일부 양상에서, 줄기 세포는 중간엽 줄기 세포 (MSC) 또는 유도된 만능 줄기 (iPS) 세포이다. 특정 양

상에서, T 세포는 $CD8^+$ T 세포, $CD4^+$ T 세포 또는 감마-델타 T 세포이다. 면역 세포는 말초 혈액, 제대혈, 또는 골수로부터 단리될 수 있다. 일부 양상에서, 제대혈은 2개 이상의 개별 제대혈 유닛으로부터 풀링된다.

[0018] **[0015]** 특정 양상에서, 상기 방법은 NKG2A, CD47, TGFβR2, 및 CISH; NKG2A, CISH, TGFβR2 및 ADORA2; NKG2A, TGFβR2 및 CISH; TIGIT, CD96, CISH, 및 ADORA2; 또는 ADAM17, TGFβR2, NKG2A, 및 SHP1과 같은 특정 그룹의 유전자를 파괴함을 포함한다.

[0019] **[0016]** 일부 양상에서, 상기 파괴는 면역 세포의 증진된 항종양 세포독성, 생체내 증식, 생체내 지속성 및/또는 개선된 기능을 유도한다. 특정 양상에서, 면역 세포는 IFN-γ, CD107, 및/또는 TNFα의 분비를 증가시켰다. 일부 양상에서, 면역 세포는 퍼포린 및/또는 그랜자임 B의 증가된 생성을 갖는다.

[0020] **[0017]** 일부 양상에서, 세포는 CAR 및/또는 TCR을 발현하도록 가공된다. CAR은 예를 들어, 세포의 내인성 억제성 유전자좌에 삽입될 수 있고, 억제성 유전자좌는 NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 양상에서, CAR은 억제성 유전자의 내인성 프로모터의 제어하에 있다. 특정 양상에서, CAR은 CRISPR-매개된 유전자 편집에 의해 억제성 유전자좌에 삽입된다.

[0021] **[0018]** 일부 양상에서, CAR은 F(ab')2, Fab', Fab, Fv, 및 scFv로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 항원-결합 도메인을 포함한다. 특정 양상에서, CAR은 CD19, CD319 (CS1), ROR1, CD20, 암배아 항원, 알파페토단백질, CA-125, MUC-1, 상피 종양 항원, 흑색종-관련 항원, 돌연변이된 p53, 돌연변이된 ras, HER2/Neu, ERBB2, 폴레이트 결합 단백질, HIV-1 외피 당단백질 gp120, HIV-1 외피 당단백질 gp41, GD2, CD5, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, 메소텔린, GD3, HERV-K, IL-11R알파, 카파쇄, 람다쇄, CSPG4, ERBB2, WT-1, TRAIL/DR4, VEGFR2, CD33, CD47, CLL-1, U5snRNP200, CD200, BAFF-R, BCMA, CD99 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 종양 관련 항원을 표적화한다. 특정 양상에서, CAR은 CD3ζ, CD28, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, FcεRIγ, ICOS/CD278, ILRB/CD122, IL-2RG/CD132, DAP12, CD70, CD40 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 양상에서, 면역 세포는 IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, 및 IL-21 중 하나 이상과 같은 하나 이상의 이종성 사이토킨을 포함한다. 특정 양상에서, CAR은 막결합된 비분비성 TNF-알파 돌연변이체 또는 유도성 카스파제 9와 같은 자살 유전자를 추가로 포함한다.

[0022] **[0019]** 본원에서는 추가로 적어도 하나의 CAR 및/또는 TCR, 적어도 하나의 억제성 유전자 서열 및 적어도 하나의 gRNA를 암호화하는 발현 벡터가 제공된다. 일부 양상에서, 억제성 유전자 서열은 NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5 및 CD7로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 억제성 유전자로부터 기원한다. 특정 양상에서, gRNA는 억제성 유전자에 특이적이다. 일부 양상에서, 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어, AAV 벡터이다. CAR은 억제성 유전자에 대한 상동성 아암에 의해 플랭킹될 수 있다. 또한, 본원에서는 구현예의 벡터를 발현하도록 가공된, 구현예의 세포와 같은 숙주 세포가 제공된다. 양상에서, 세포는 T 세포, NK 세포, B 세포, 또는 줄기 세포이다.

[0023] **[0020]** 또한, 본원에서는 기재된 구현예의 면역 세포 집단을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 또 다른 구현예는 면역 관련 장애, 감염성 질환 및/또는 암의 치료를 위한 본원에 기재된 구현예의 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0024] **[0021]** 추가의 구현예에서, 기재된 구현예의 유효량의 면역 세포를 대상체에게 투여함을 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 일부 양상에서, 질환 또는 장애는 감염성 질환, 암, 예를 들어, 고형암 또는 혈액학적 악성 종양 또는 면역 관련 장애이다. 면역 관련 장애는 예를 들어, 자가면역 장애, 이식편 대 숙주 질환, 동종이식 거부 또는 염증성 병태이다. 일부 양상에서, 면역 관련 장애는 염증성 병태이고 면역 세포는 필수적으로 글루코코르티코이드 수용체를 발현하지 않는다. 특정 양상에서, 면역 세포는 수용자 개체와 관련하여 자가유래 또는 동종이계이다.

[0025] **[0022]** 추가의 양상에서, 상기 방법은 추가로 적어도 제2 치료학적 제제를 면역 세포를 투여받은 개체에 투여함을 포함한다. 일부 양상에서, 적어도 제2 치료학적 제제는 화학치료요법, 면역치료요법, 수술, 방사선치료요법, 호르몬 치료요법 또는 생물치료요법을 포함한다. 특정 양상에서, 면역 세포 및/또는 적어도 제2 치료학적 제제는 정맥내로, 복막내로, 기관내, 종양내, 근육내, 내시경으로, 병변내, 경피적으로, 피하내, 국부적으로, 또는 직접 주사 또는 관류에 의해 투여된다.

[0026] [0023] 또 다른 구현예는 면역 세포의 억제성 유전자좌에 CAR을 삽입하기 위해 CRISPR gRNA를 사용함을 포함하는 CAR을 발현하도록 면역 세포를 가공하기 위한 방법을 제공한다. 일부 양상에서, CAR은 발현 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 플라스미드, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노바이러스 관련 바이러스 벡터 등에 의해 암호화되어 있다. 특정 양상에서, 바이러스 벡터는 아데노바이러스 관련 벡터, 예를 들어, AAV6이다.

[0027] [0024] 일부 양상에서, 벡터는 억제성 유전자 서열을 추가로 포함하고, 예를 들어, 억제성 유전자 서열은 NKG2A, SIGLEC-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, ADORA2, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPA, SHIP1, ADAM17, RPS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 양상에서, CRISPR gRNA는 억제성 유전자에 대한 것이다. 특정 양상에서, CAR은 억제성 유전자에 대한 상동성 아암에 의해 플랭킹된다. 특정 양상에서, CAR은 억제성 유전자의 엑손과 같은 유전자의 임의의 일부에서 억제성 유전자좌에 삽입된다. CAR은 억제성 유전자의 내인성 프로모터의 제어하에 있을 수 있다. 특정 양상에서, CAR은 억제성 유전자의 발현을 파괴한다.

[0028] [0025] 일부 양상에서, CAR은 CD19, CD319 (CS1), ROR1, CD20, 암배아 항원, 알파페토단백질, CA-125, MUC-1, 상피 종양 항원, 흑색종-관련 항원, 돌연변이된 p53, 돌연변이된 ras, HER2/Neu, ERBB2, 폴레이트 결합 단백질, HIV-1 외피 당단백질 gp120, HIV-1 외피 당단백질 gp41, GD2, CD5, CD123, CD23, CD30, CD56, c-Met, 메소텔린, GD3, HERV-K, IL-11R알파, 카파쇄, 람다쇄, CSPG4, ERBB2, WT-1, TRAIL/DR4, VEGFR2, CD33, CD47, CLL-1, U5snRNP200, CD200, BAFF-R, BCMA, CD99 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 종양 관련 항원을 표적화한다. 특정 양상에서, CAR은 CD3ζ, CD28, OX40/CD134, 4-1BB/CD137, FcεRIγ, ICOS/CD278, ILRB/CD122, IL-2RG/CD132, DAP12, CD70, 및 CD40으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 양상에서, CAR을 암호화하는 벡터는 또한 IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21, 또는 이의 조합물과 같은 사이토킨을 암호화한다. 또 다른 경우에, 사이토킨은 CAR을 암호화하는 벡터로부터 분리된 벡터 상에 있다. 특정 양상에서, CAR을 암호화하는 핵산 작제물은 추가로 자살 유전자, 예를 들어, 유도성 카스파제 9 또는 막 결합된 비분비성 TNF-알파 돌연변이체를 포함한다.

[0029] [0026] 추가로, 본원에서는 면역 세포, 예를 들어, 본원의 방법에 의해 생성된 면역 세포의 억제성 유전자에 삽입된 적어도 하나의 CAR을 갖는 면역 세포가 제공한다. 또한 본원에서는 T 세포, B 세포, NK 세포, NK T 세포, 대식 세포, 줄기 세포, 이의 혼합물 등의 집단과 같은, 개시내용의 구현예의 면역 세포 집단을 포함하는 조성물이 제공된다.

[0030] [0027] 또 다른 구현예는 구현예의 세포 집단을 포함하는 조성물을 제공하고, 특정 구현예에서, 상기 집단은 적어도 면역 관련 장애, 감염성 질환 및/또는 암을 치료하기 위한 것을 적어도 포함하는, 임의의 종류의 의학적 병태의 치료를 위해 사용된다.

[0031] [0028] 추가의 구현예는 구현예의 유효량의 면역 세포를 대상체에게 투여함을 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 양상에서, 질환 또는 장애는 감염성 질환; 암, 예를 들어, 고형암 또는 혈액학적 악성 종양; 및/또는 면역 관련 장애이다. 면역 관련 장애는 일부 경우에, 자가면역 장애, 이식편 대 숙주 질환, 동종이식 거부 및/또는 염증성 병태일 수 있다. 일부 양상에서, 면역 관련 장애는 염증성 병태이고 면역 세포는 필수적으로 글루코코르티코이드 수용체를 발현하지 않는다. 특정 양상에서, 면역 세포는 수용자 개체와 관련하여 자가유래 또는 동종이계이다.

[0032] [0029] 추가의 양상에서, 상기 방법은 추가로 적어도 제2 치료학적 제제를 개체에게 투여함을 포함한다. 일부 양상에서, 적어도 제2 치료학적 제제는 화학치료요법, 면역치료요법, 수술, 방사선치료요법, 호르몬 치료요법 또는 생물치료요법을 포함한다. 특정 양상에서, 면역 세포 및/또는 적어도 제2 치료학적 제제는 정맥내로, 복막내로, 기관내, 종양내, 근육내, 내시경으로, 병변내, 경피적으로, 피하내, 국부적으로, 또는 직접 주사 또는 관류에 의해 투여된다. 면역 세포 및 적어도 제2 치료학적 제제는 동일한 시점에 또는 상이한 시점에 투여될 수 있고, 이들이 상이한 시점에 또는 동일한 시점에 투여되지만 동일한 제형으로 있지 않은 경우, 이들은 동일한 경로에 의해 투여될 수 있거나 투여되지 않을 수 있다.

[0033] [0030] 본원 개시내용의 다른 목적, 특성 및 이점은 하기의 상세한 설명으로부터 자명할 것이다. 그러나, 상세한 설명 및 본원 개시내용의 특정 구현예를 제시하는 구체적인 실시예는, 상기 상세한 설명으로부터 본 발명의 개념과 범위 내에서 다양한 변화 및 변형을 줄 수 있음이 당업계의 숙련자에게는 명백하기 때문에, 단지 예시로서만 제공되는 것임을 알아야 한다.

도면의 간단한 설명

[0034] **[0031]** 하기의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하고 본 발명의 특정 양상을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 제공된 특정 구현예의 상세한 설명과 함께 이들 도면 중 하나 이상을 참조로 보다 잘 이해될 수 있다.

[0032] **도 1**: CRISPR/Cas9는 NK 세포에서 효율적인 다중 유전자 (NKG2A, CD47, TGFBR2, 및 CISH) 파괴를 매개한다. 상기 유전자 세트에서, NKG2A 및 CD47은 제1 라운드의 전기천공 및 제2 라운드의 전기천공에서 녹아웃되고, CISH 및 TGFBR2가 표적화되었다. 녹아웃 효율은 2개 라운드의 전기천공을 위해 PCR 및 유동-세포측정을 사용하여 성공적으로 입증되었다. 유동 패널에서 적색 (우측 상에 피크) 및 청색 (좌측 상에 피크) 히스토그램은 각각 CRISPR KO 전 및 후 단백질의 발현을 나타낸다.

[0033] **도 2**: 또 다른 세트의 유전자 (TIGIT (T), CD96 (C), CISH (CH), 아데노신(A))를 사용한 NK 세포에서의 멀티플렉스 유전자 편집의 입증. 상기 유전자 세트에서, TIGIT 및 CD96은 제1 라운드의 전기천공 및 제2 라운드의 전기천공에서 녹아웃되고, CISH 및 아데노신이 표적화되었다. 녹아웃 효율은 2개 라운드의 전기천공을 위해 PCR 및 유동-세포측정을 사용하여 성공적으로 입증되었다. 유동 패널에서 적색 (우측 상에 피크) 및 청색 (좌측 상에 피크) 히스토그램은 각각 CRISPR KO 전 및 후 단백질의 발현을 나타낸다.

[0034] **도 3**: NK 세포에서 다중 유전자(NKG2A, CD47, TGFBR2 및 CISH)의 파괴는 표적 종양 세포에 대해 증진된 기능을 유도한다. 표적 세포주를 사용한 자극 후 IFN-γ, TNFα 및 CD107 분비가 증진되었다. IFN-γ, TNFα 및 CD107 생성의 유동 세포측정 분석은 브레펠딘 A의 존재하에 5시간 동안 표적 세포주로 동시 자극된 다양한 NK 세포 (편집된 것 대 Cas9 단독)를 수행하여 수행하였다.

[0035] **도 4a-4b**: NK 세포에서 다중 유전자 (NKG2A, CD47, TGFBR2 및 CISH)의 파괴는 증진된 항종양 세포독성을 유도한다. (**도 4a**) 유전자 편집된 NK 세포 대 Cas9 단독 NK 세포의 세포독성 활성은 K562에 대해 ^{51}Cr-방출 검정에 의해 측정하였다(**도 4b**). 재조합 TGF-B 처리 (50ng/ml)의 30분 후, pSMAD 활성은 유동 세포측정에 의해 측정하였다. 외인성 TGF-β의 첨가는 KO CAR-NK 세포에서 pSMAD의 활성화를 유도하는데 실패하였다.

[0036] **도 5**: NK 세포는 CyTOF 분석에 의해 도시된 바와 같이 사이토킨 자극 또는 표적 인지시 CD16 및 CD62L 발현을 상실한다.

[0037] **도 6**: NK 세포에서 ADAM17의 녹아웃은 CD16 및 CD62L의 발산을 차단한다.

[0038] **도 7**: NK 세포에서 녹아웃 ADAM17은 K562 표적에 대한 ADCC 및 세포독성을 개선시킨다.

[0039] **도 8**: 72h에서 NK 세포에서 SHP1 녹아웃 효율의 FACS-기반 스크리닝.

[0040] **도 9**: NK 세포에서 SHP1의 파괴는 증진된 항종양 효능을 유도한다. NK 세포는 4시간 동안 1:1 비율로 K562 또는 Raji 세포와 함께 동시 배양하였다. 배양 후, 세포는 어넥신 V로 염색시키고 생 세포 및 죽은 세포를 분석하였다. K562 세포는 NK 세포 사멸에 민감성이고 Raji 세포는 NK 세포 사멸에 내성이다.

[0041] **도 10a-10b**: NK 세포에서 SHP1의 파괴는 증진된 항종양 효능을 유도한다(**도 10a**). NK 세포는 5시간 동안 2:1 비율로 K562 또는 Raji 세포와 함께 동시 배양하였다(**도 10b**). 다양한 이펙터:표적 비율에서 용해 퍼센트, IFNγ, TNFα, 및 CD107a의 퍼센트, 및 생 세포 또는 죽은 세포의 퍼센트를 나타낸다.

[0042] **도 11**: NK-CAR 세포에서 SHP1의 파괴는 아폽토시스 검정에 의한 평가시 증진된 항종양 효능을 유도한다.

[0043] **도 12a-12c**: (**도 12a**) 7일 FACS-기반 NKG2A 녹아웃 효율. (**도 12b**)) 확장된 NK 세포에서 NKG2A의 파괴는 증진된 항종양 효능을 유도한다. (**도 12c**) NK-CAR 세포에서 NKG2A의 파괴는 Raji 표적에 대해 증진된 항종양 효능을 유도한다.

[0044] **도 13**: 접근법은 또 다른 세트의 유전자 - TIGIT (T), CD96 (C), CISH (CH), 및 아데노신 (ADORA2A) (A)을 사용하여 입증되었다. 상기 세트의 유전자에 대해, TIGIT 및 CD96은 제1 라운드의 전기천공 동안에 NK 세포의 하나의 세트에서 녹아웃되었다. CISH 및 아데노신(ADORA2A)은 TIGIT 및 CD96 KO 세포에서 제2 라운드의 녹아웃을 위해 표적화하였다. 녹아웃 효율은 2개 라운드의 전기천공을 위해 PCR 및 유동-세포측정을 사용하여 성공적으로 입증되었다. 유동 패널에서 적색 (우측 상에 피크) 및 청색 (좌측 상에 피크) 히스토그램은 각각 CRISPR KO 전 및 후 단백질의 발현을 나타낸다.

[0045] **도 14**: NK 세포에서 다중 유전자의 파괴는 증진된 항종양 효능을 유도한다. 이를 평가하기 위해, 다중

유전자 (NKG2A, CISH, TGFBRII 및 아데노신 (ADORA2A)) 녹아웃 세포 및 cas9 단독으로 전기천공된 세포는 5시간 동안 K562 (NK 민감성) 및 Raji (NK 내성) 세포와 함께 대조군으로서 사용하였다. NK 세포 기능은 유동 세포측정 및 표적 세포주 자극 시 KO 세포에서 TNFα, IFNɣ, 및 CD107a에서의 관찰된 증가에 의해 평가하였다.

[0046] 도 15: NK 세포에서 다중 유전자의 파괴는 증진된 항종양 효능을 유도한다. 이를 평가하기 위해, 다중 유전자 (NKG2A, CISH, TGFBRII) 녹아웃 세포 및 cas9 단독으로 전기천공된 세포는 대조군으로서 사용하였다. NKG2A 발현은 유동 세포측정에 의해 확인하였다. 외인성 TGF-β의 첨가는 KO CAR-NK 세포에서 pSMAD의 활성화를 유도하는데 실패하였다.

[0047] 도 16: NK-CAR 세포에서 다중 유전자 (NKG2A, CD47, TGFβR2 및 CISH)의 파괴는 증진된 항종양 효능을 유도한다.

[0048] 도 17: TGFβR2 KO는 TGFβ의 억제성 효과로부터 NK-CAR 세포를 보호한다.

[0049] 도 18: 멀티플렉스 유전자 편집은 상이한 NK-CAR 작제물을 사용하고 상이한 표적에 대해 재현가능하다.

[0050] 도 19: 다중 억제성 유전자의 멀티플렉스 유전자 편집은 NK 구조를 유지하고 TFGβ에 의해 유도된 소모로부터 NK 세포를 보호한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] **[0051]** 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 사람 면역 세포 (예를 들어, T 세포, NK 세포, CAR-형질도입된 T 세포, 또는 CAR-형질도입된 NK 세포)에서 동시에 녹다운(또는 녹아운)된 2개의 이상의 유전자(예를 들어, 유전자(예를 들어, 아데노신 2a 수용체, TGFβR2, NKG2A, TIGIT 및/또는 CISH)를 포함하는, 표 1에 열거된 것들)에 대해 CRISPR-Cas9 기술을 사용한 신규 접근법을 제공한다. 면역 세포는 말초 혈액 또는 제대혈 또는 이의 조합으로부터 유래할 수 있다.

[0036] **[0052]** 본원의 연구는 이들의 단백질의 감소된 발현이 T 세포 및 NK 세포의 개선된 기능, 생체내 증식 및 지속성 및 세포독성과 상호관련됨을 입증하였다. 상기 전략은 또한 TGFβ 및 아데노신에 의해 대부분 구동되는 면역억제 종양 미세환경으로부터 T 세포, NK 세포, NK T 세포 및 iNKT 세포를 보호한다. 따라서, 본원의 방법을 사용하여 다양한 입양 세포 치료요법 생성물(예를 들어, NK 세포, T 세포, 예를 들어, 바이러스 특이적 T 세포 및 조절 T 세포, B 세포, 예를 들어, 조절 B 세포, CAR-형질도입된 NK 세포, CAR-T 세포 및 TCR 가공된 T 및 NK 세포, iNKT 세포, NKT 세포)의 효능을 개선시킬 수 있다. 입양 세포 치료요법 생성물을 사용하여 예를 들어 암(예를 들어, 혈액학적 또는 고체 악성종양)에서 감염성 질환 및 면역 장애에 이르는 다양한 질환을 치료할 수 있다.

[0037] **[0053]** 특정 구현예에서, 면역 세포는 적어도 하나의 CAR을 발현하고, CAR 가공은 과거 수년 내 많은 진전이 있었다. 사실, CAR-CD19은 B 세포 백혈병 및 림프종을 갖는 환자에서 인상적인 임상적 결과를 나타냈고 지난 해에 2개의 CAR T 생성물의 FDA 승인을 유도하였다. CAR-형질도입된 T 세포는 과거 수년 동안 선도를 이끌었고, 출원인에 의해 주도된 단계 I/II CAR NK 시험 뿐만 아니라 모든 임상전 연구는 또한 암에 대한 CAR-NK 세포의 효과를 보여주었다. CAR 가공에서의 진전에도 불구하고, CAR은 여전히 대부분 무작위로 세포의 DNA에 통합하여 클론 확장, 발암성 형질전환, 변경된 전이유전자 발현 또는 전사 사일런싱을 유도할 수 있는 바이러스 벡터를 사용하여 T 세포 또는 NK 세포로 형질도입된다. 따라서, CAR의 특정 DNA 유전자좌로의 삽입을 표적화하는 방법의 모색이 가치가 있을 수 있다.

[0038] **[0054]** 따라서, 하나의 구현예에서, 본원의 개시내용은 억제성 유전자 또는 관문 단백질의 유전자좌에서와 같이 특정 유전자좌에 CRISPR/Cas9를 사용하여 CAR을 삽입하기 위한 방법을 제공한다. 유전자좌에 CAR의 삽입을 또한 사용하여 유전자의 발현을 동시에 파괴할 수 있고, 임의로 또한 이것이 경우에 따라 상기 유전자의 프로모터의 제어하에 있도록 한다. 구체적으로, 본원의 방법은 예를 들어, AAV6 벡터 및 CRISPR/Cas9 기술을 사용하여, NKG2A, CISH, PD-1, TIGIT, TIM3, SHP1, 또는 TGFβR2를 포함하지만 이에 제한되지 않는 표 1에 열거된 것들과 같은 억제 유전자의 유전자좌에 CAR의 삽입을 지시할 수 있다. 억제성 유전자좌에 CAR의 삽입은 관문 분자(예를 들어)의 억제성 효과를 파괴할 수 있어, 또한 CAR 발현이 관문 프로모터의 조절하에 있도록 하고 종양 미세환경에서 상향조절되도록 한다. 이것은 관문 분자의 상향조절이 CAR 치료요법의 성공에 부정적 영향을 줄 수 있는 고형 종양에서 CAR 치료요법의 적용을 위해 유용하다. 따라서, 추가의 방법은 증가된 안전성 프로필을 가질 수 있는 CAR 삽입 방법을 사용하여 T 세포, B 세포, NK, NKT 또는 iNKT 세포와 같은, 입양 세포 치료요법을 생성하기 위해 제공된다.

[0039] I. 정의

[0040] [0055] 본원에서 사용된 바와 같이, 특정 성분과 관련하여 "필수적으로 부재"라는 용어는 해당 특정 성분이 의도적으로 조성물 내로 전혀 조제하여 넣지 않았고/않았거나 해당 특정 성분이 오염물로서만 존재하거나 미량으로만 존재하는 것을 의미하기 위해 사용된다. 따라서, 조성물의 의도치 않은 임의의 오염으로 야기된 특정 성분의 총량은 0.05% 미만, 바람직하게는 0.01%이다. 표준 분석 방법으로 특정 성분의 양이 검출될 수 없는 조성물이 가장 바람직하다.

[0041] [0056] 본원 명세서에서, 단수형 관사("a" 또는 "an")는 하나 이상을 의미할 수 있다. 본원 청구항(들)에서 사용된 바와 같은, 용어 "포함하는"과 함께 사용되는 경우, 용어 “a” 또는 “an”은 하나 또는 하나 초과를 의미할 수 있다. 본원에서 "또 다른" 이라는 말은 적어도 두번째 또는 그 이상을 의미할 수 있다. 여전히 추가로, 용어 “갖는”, “포함하는(including)”, “함유하는” 및 “포함하는(comprising)”은 상호교환될 수 있고 당업자는 이들 용어가 개방형 용어인 것으로 인지된다. 특정 구현예에서, 본원 개시내용의 양상은 예를 들어, 본원 개시내용의 하나 이상의 서열로 “로 필수적으로 이루어진” 또는 “로 이루어진”일 수 있다. 본원 개시내용의 일부 구현예는 본 발명의 하나 이상의 구성성분, 방법 단계 및/또는 방법으로 이루어지거나 본질적으로 이루어질 수 있다. 본 명세서에 기재된 임의의 방법 또는 조성물은 본 명세서에 기재된 임의의 다른 방법 또는 조성물에 대해 실시될 수 있는 것으로 고려된다. 본 출원의 범위는 본 명세서에 기재되는 공정, 기계, 제조, 물질의 조성물, 수단, 방법들 및 단계들의 특정 구현예에 한정하려는 것은 아니다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 “또는” 및 “및/또는”을 사용하여 조합하여 또는 서로 배타적으로 다수의 성분들을 기재한다. 예를 들어, “x, y, 및/또는 z”는 “x” 단독, “y” 단독, “z” 단독, “x, y, 및 z,” “(x 및 y) 또는 z,” “x 또는 (y 및 z),” 또는 “x 또는 y 또는 z”을 언급할 수 있다. 이것은 구체적으로 x, y, 또는 z가 하나의 구현예로부터 배제될 수 있는 것으로 고려된다.

[0042] [0057] 청구항에서 "또는" 이라는 용어의 사용은, 그것이 명시적으로 대안만을 언급하지 않는 한 또는 명세서가 대안 및 "및/또는"만을 언급하는 정의를 뒷받침하고 있더라도 그 대안이 상호 배타적이지 않는 한 "및/또는"을 의미하는 것으로 사용된다. 본원에서 "또 다른" 이라는 말은 적어도 두번째 또는 그 이상을 의미할 수 있다. 용어 “약”, “실질적으로” 및 “대략적으로”는 일반적으로 기재된 값의 + 또는 - 5%를 의미한다.

[0043] [0058] 본원 명세서 전반에 걸쳐 “하나의 구현예”, “구현예”, “특정 구현예”, “관련 구현예”, “특정 구현예”, “추가의 구현예” 또는 “추가의 구현예” 또는 이의 조합에 대한 언급은 상기 구현예와 관련하여 기재된 특정 특성, 구조 또는 특징이 본원 개시내용의 적어도 하나의 구현예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본원 명세서의 다양한 위치에서 이전의 문장의 출현은 모두 동일한 구현예를 필수적으로 언급하지는 않는다. 추가로, 특정 특성, 구조 또는 특징은 하나 이상의 구현예에서 임의의 적합한 방식으로 조합될 수 있다.

[0044] [0059] “면역 장애", "면역 관련 장애" 또는 "면역 매개된 장애"는 면역 반응이 질환의 발병 또는 진행에서 주요 역할을 수행하는 장애를 언급한다. 면역 매개된 장애는 자가면역 장애, 동종이식 거부, 이식편 대 숙주 질환 및 염증성 및 알레르기성 병태를 포함한다.

[0045] [0060] “면역 반응"은 면역계 세포, 예를 들어, 자극에 대한 B 세포, 또는 T 세포, 또는 선천성 면역 세포의 반응이다. 하나의 구현예에서, 반응은 특정 항원에 특이적이다("항원-특이적 반응").

[0046] [0061] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “억제성 유전자”는 이의 유전자 생성물이 직간접적으로 면역 세포의 하나 이상의 유형의 활성, 증식 및/또는 지속성에 해로운 유전자를 언급한다.

[0047] [0062] “자가면역 질환"은 면역계가 결과적으로 조직에 대한 손상과 함께, 정상 숙주의 일부인 항원 (즉, 자가항원)에 대한 면역 반응 (예를 들어, B 세포 또는 T 세포 반응)을 생성하는 질환을 언급한다. 자가항원은 숙주 세포로부터 유래될 수 있거나, 정상적으로 점막 표면에 군집하는 미생물 (공생 유기체로서 공지된)과 같은 공생 유기체로부터 유래할 수 있다.

[0048] [0063] 본원에 사용된 바와 같은 용어 “가공된”은 세포, 핵산, 폴리펩타이드, 벡터 등을 포함하는, 사람의 손에 의해 생성된 실체를 언급한다. 적어도 일부 경우에, 가공된 실체는 합성이고 천연적으로 존재하지 않거나 본원의 개시내용에 사용되는 방식으로 구성되지 않는 요소를 포함한다.

[0049] [0064] 질환 또는 병태의 “치료하는" 또는 치료는 질환의 징후 또는 증상을 완화시키는 노력에서 하나 이상의 약물을 환자에게 투여함을 포함할 수 있는 프로토콜을 실행함을 언급한다. 바람직할 수 있는 치료 효과는 질환 진행율의 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화, 차도 또는 개선된 예후를 포함한다. 완화는 이들의 출현 후 뿐만

아니라 질환 또는 병태의 징후 또는 증상 출현 전에 일어날 수 있다. 따라서, "치료하는" 또는 "치료"는 질환 또는 목적하지 않을 수 있는 병태를 “예방하는” 또는 이의 “예방”을 포함할 수 있다. 추가로, "치료하는" 또는 "치료"는 징후 또는 증상의 완전한 완화를 요구하지 않고, 치유를 요구하지 않으며 구체적으로 환자에 대해 단지 미진한 효과를 갖는 프로토콜을 포함한다.

[0050] **[0065]** 본원 전반에 걸쳐 사용된 바와 같은 용어 "치료학적 이득" 또는 "치료학적 유효량"은 상기 병태의 의학적 치료와 관련하여 대상체의 웰빙을 촉진시키거나 증진시키는 어떠한 것을 언급한다. 이것은 질환의 징후 또는 증상의 빈도 또는 중증도에서의 감소를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 암의 치료는 예를 들어, 종양 크기에서의 감소, 종양 공격성에서의 감소, 암 성장율에서의 감소 또는 전이의 예방을 포함할 수 있다. 암의 치료는 또한 암을 갖는 대상체의 생존을 지연시키는 것을 언급할 수 있다.

[0051] **[0066]** “대상체" 및 "환자"는 사람 또는 비-사람, 예를 들어, 영장류, 포유동물 및 척추동물을 언급한다. 특정 구현예에서, 대상체는 사람이다.

[0052] **[0067]** 본원에 사용된 바와 같은 “포유류”는 본원 발명의 방법을 위해 적당한 대상체이다. 포유류는 사람을 포함하는 고등 척추동물 부류의 포유류 (Mammalia)의 임의의 구성원일 수 있고; 새끼에게 영양을 공급하기 위해 우유를 분비하는 암컷의 신생아, 체모 및 유선을 특징으로 한다. 추가로, 포유류는 기후 조건의 변화에도 불구하고 일정한 체온을 유지하는 이들의 능력을 특징으로 한다. 포유류의 예는 사람, 고양이, 개, 소, 마우스, 래트, 말, 염소, 양, 및 침팬지이다. 포유류는 “환자” 또는 “대상체” 또는 “개체”로서 언급될 수 있다.

[0053] **[0068]** 용어 "약제학적 또는 약제학적으로 허용되는"은 동물, 예를 들어, 적절하게 사람에게 투여되는 경우 역반응, 알레르기 반응 또는 다른 원치않는 반응을 생성하지 않는 분자 실체 및 조성물을 언급한다. 항체 또는 추가의 활성 성분을 포함하는 약제학적 조성물의 제조는 본원 개시내용의 측면에서 당업자에게 공지되어 있다. 더욱이, 동물 (예를 들어, 사람) 투여에 대해, 제조는 생물학적 표준의 FDA 사무국에 의해 요구되는 바와 같이 멸균성, 발열성, 일반적인 안정성 및 순도 표준을 충족해야만 하는 것으로 이해된다.

[0054] **[0069]** 본원에 사용된 바와 같은, "약제학적으로 허용되는 담체"는 당업자에게 공지된 바와 같이, 임의의 및 모든 수성 용매(예를 들어, 물, 알콜/수용액, 식염수 용액, 비경구 비히클, 예를 들어, 염화나트륨, 링거 덱스트로스 등), 비-수성 용매(예를 들어, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 식물성 오일, 및 주사가능한 유기 에스테르, 예를 들어, 에틸올레에이트), 분산 매질, 코팅, 계면활성제, 항산화제, 보존제(예를 들어, 항세균 또는 항진균 제제, 항-산화물, 킬레이팅 제제 및 불활성 가스), 등장성 제제, 흡수 지연제, 염, 약물, 약물 안정화제, 겔, 결합제, 부형제, 붕해제, 윤활제, 감미제, 향제, 염료, 유체 및 영양물 보충제, 상기 유사 물질 및 이의 조합물을 포함한다. 약제학적 조성물 중 다양한 성분들의 pH 및 정확한 농도는 널리 공지된 파라미터에 따라 조정된다.

[0055] **[0070]** 본원에 사용된 바와 같은, 유전자의 "파괴"는 파괴 부재하에 유전자 생성물의 발현 수준과 비교하여, 세포에서 대상체 유전자에 의해 암호화된 하나 이상의 유전자 생성물의 발현의 제거 또는 감소를 언급한다. 예시적인 유전자 생성물은 유전자에 의해 암호화된 mRNA 및 단백질 생성물을 포함한다. 일부 경우에 파괴는 일시적이거나 가역적이고 다른 경우에 영구적이다. 일부 경우에 파괴는 절단된 또는 비-기능성 생성물이 생성될 수 있다는 사실에도 불구하고 기능성 또는 전장 단백질 또는 mRN에 대한 것이다. 본원에서 일부 구현예에서, 발현과는 반대로 유전자 활성 또는 기능은 파괴된다. 유전자 파괴는 일반적으로 인공 방법에 의해, 즉, 화합물, 분자, 복합체 또는 조성물의 첨가 또는 유도에 의해 및/또는 DNA 수준에서와 같이 유전자의 핵산 또는 이와 연관된 핵산의 파괴에 의해 유도된다. 유전자 파괴를 위한 예시적 방법은 유전자 사일런싱, 녹다운, 녹아웃, 및/또는 유전자 편집과 같은 유전자 파괴 기술을 포함한다. 이의 예는 안티센스 기술, 예를 들어, 일반적으로 발현의 일시적 감소를 유도하는, RNAi, siRNA, shRNA, 및/또는 리보자임과 같은 안티센스 기술, 및 예를 들어, 절단 유도 및/또는 상동성 재조합에 의한 표적화된 유전자 불활성화 또는 파괴를 유도하는 유전자 편집 기술을 포함한다. 이의 예는 삽입, 돌연변이 및 결실을 포함한다. 상기 파괴는 전형적으로 유전자에 의해 암호화된 정상 또는 “야생형” 생성물 발현의 억제 및/또는 완전한 부재를 유도한다. 상기 유전자 파괴의 예는 삽입, 프레임 전환(frameshift) 및 미스센스 돌연변이, 전체 유전자의 결실을 포함하는, 유전자 또는 유전자 일부의 결실, 녹인(knock-in) 및 녹아웃(knock-out)이다. 상기 파괴는 암호화 영역에서, 예를 들어, 하나 이상의 엑손에서 발생하여 예를 들어, 종료 코돈의 삽입에 의한 것과 같이 전장 생성물, 기능성 생성물 또는 임의의 생성물을 생성하지 못하는 능력을 유도할 수 있다. 상기 파괴는 또한 유전자의 전사를 방지하도록, 프로모터 또는 인핸서 또는 전사의 활성화에 영향을 미치는 다른 영역 내 파괴에 의해 발생할 수 있다. 유전자 파괴는 상동성 재조합에 의한 표적화된 유전자 불활성화를 포함하는, 유전자 표적화를 포함한다.

[0056] **II. 멀티플렉스 유전자 편집**

[0057] **[0071]** 특정 구현예에서, 본원의 개시내용은 임의의 유형의 면역 세포의 멀티플렉스 유전자 편집에 관한 것이다. CRISPR은 면역 세포에서 2개 이상의 유전자, 예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 유전자의 발현을 파괴하기 위해 사용될 수 있는 하나의 예이다. 유전자는 표 1에 열거된 유전자로부터 선택될 수 있고, 예를 들어, NK 세포 수용체 A (NKG2A), 시알산-결합 Ig-유사 렉틴 7 (SIGLEC-7, CD328), 림프구 활성화 3 (LAG3), T-세포 면역글로불린 뮤신 계열 구성원 3 (TIM3, CD366, HAVCR2), 사이토킨 유도성 SH2-함유 단백질 (CISH, CIS-1, SOCS), 포크헤드 박스 O1 (FOXO1), 형질전환 성장 인자 베타 수용체 2 (TGFβR2), Ig 및 ITIM 도메인을 갖는 T 세포 면역수용체(TIGIT), CD96, 아데노신 수용체 2A (ADORA2), 핵 수용체 서브계열 3 그룹 C 구성원 1 (NR3C1), 프로그램화된 세포사 1 (PD1), 프로그램화된 세포사 1 리간드 1 (PDL-1), 프로그램화된 세포사 1 리간드 2 (PDL-2), CD47, 신호 조절 단백질 알파 (SIRPA), SH2 도메인-함유 이노시톨 5-포스파타제 1 (SHIP1), ADAM 메탈로펩티다제 도메인 17 (ADAM17), 리보솜 단백질 S6 (RPS6), 진핵세포 해독 개시 인자 4E 결합 단백질 1 (4EBP1), CD25, CD40, 인터류킨 21 수용체 (IL21R), 세포간 접합 분자 1 (ICAM1), CD95, CD80, CD86, 인터류킨 21 수용체(IL10R), CD5, CD7일 수 있거나 다른 억제성 유전자일 수 있다. 유전자 편집은 다중 유전자의 발현을 동시에 파괴시킬 수 있다.

[0058] **[0072]** 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 유전자 내 파괴, 예를 들어, 녹-아웃, 삽입, 미스센스 또는 프레임 전환 돌연변이, 예를 들어, 이중대립유전자 프레임 전환 돌연변이, 유전자 전부 또는 일부의 결실, 예를 들어,따라서, 하나 이상의 엑손 또는 일부, 및/또는 녹-인을 실행함에 의해 수행된다. 예를 들어, 상기 파괴는 DNA-결합 표적화된 뉴클레아제, 예를 들어, 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN) 및 전사 활성화인자 유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN), 및 RNA-가이드된 뉴클레아제, 예를 들어, CRISPR-연합된 뉴클레아제 (Cas)를 포함하고, 구체적으로 유전자 또는 이의 일부의 서열에 표적화되도록 디자인된 서열 특이적 또는 표적화된 뉴클레아제에 의해 실행될 수 있다.

[0059] **[0073]** 일부 구현예에서, 상기 파괴는 유전자의 발현이 후기 시점에 회복되도록 일시적이거나 가역적이다. 다른 구현예에서, 상기 파괴는 가역적이거나 일시적이지 않고, 예를 들어, 영구적이다.

[0060] **[0074]** 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 전형적으로 표적화된 방식으로 유전자 내 하나 이상의 이중 가닥 파열 및/또는 하나 이상의 단일 가닥 파열의 유도에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 이중 가닥 또는 단일 가닥 파열은 뉴클레아제, 예를 들어, 엔도뉴클레아제, 예를 들어, 유전자-표적화된 뉴클레아제에 의해 수행된다. 일부 양상에서, 상기 파열은 유전자의 암호화 영역 내, 예를 들어, 엑손내 유도된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 유도는 암호화 영역의 N-말단 부위 부근에서, 예를 들어, 제1 엑손내, 제2 엑손 내 또는 후속 엑손내에서 일어난다.

[0061] **[0075]** 면역 세포는 가이드 RNA 및 CRISPR효소, 또는 CRISPR 효소를 암호화하는 mRNA에 도입될 수 있다. 일부 양상에서, 세포에는 동시에 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 가이드 RNA가 도입된다. 예를 들어, 세포에는 제1 전기 천공 동안에 1, 2 또는 3개 가이드 RNA가 도입될 수 있고 이어서 추가로 제2 전기 천공 동안에 1, 2 또는 3개의 추가의 가이드 RNA가 도입된다.

[0062] **[0076]** 일부 구현예에서, 유전자 파괴는 예를 들어, RNA 간섭 (RNAi), 짧은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 (shRNA)에 의한 안티센스 기술을 사용하여 성취되고/되거나 리보자임을 사용하여 유전자의 발현을 선택적으로 서프레싱하거나 리프레싱한다. siRNA 기술은 유전자로부터 전사되는 mRNA의 뉴클레오타이드 서열과 상동성인 서열 및 상기 뉴클레오타이드 서열과 상보적인 서열을 갖는 이중 가닥 RNA 분자를 사용하는 RNAi이다. siRNA는 일반적으로 유전자로부터 전사되는 mRNA의 하나의 영역과 상동성/상보성이거나 상이한 영역과 상동성/상보성인 다수의 RNA 분자를 포함하는 siRNA일 수 있다. 일부 양상에서, siRNA는 폴리시스트론성 작제물에 포함된다.

[0063] **[0077]** 일부 구현예에서, 상기 파괴는 유전자에 특이적으로 결합하거나 이에 하이브리드화하는, DNA-표적화 분자, 예를 들어, DNA-결합 단백질 또는 DNA-결합 핵산, 또는 복합체, 화합물 또는 이를 함유하는 조성물을 사용하여 성취된다. 일부 구현예에서, DNA-표적화 분자는 DNA-결합 도메인, 예를 들어, 아연 핑거 단백질(ZFP) DNA-결합 도메인, 전사 활성화인자-유사 단백질 (TAL) 또는 TAL 이펙터 (TALE) DNA-결합 도메인, 클러스터링된 규칙적 상호 분산된 팔린드롬 반복체 (CRISPR) DNA-결합 도메인, 또는 메가뉴클레아제로부터의 DNA-결합 도메인을 포함한다. 아연 핑거, TALE, 및 CRISPR 시스템 결합 도메인은 예를 들어, 천연적으로 존재하는 아연 핑거 또는 TALE 단백질의 인지 나선 영역의 가공 (하나 이상의 아미노산을 변경하는)을 통해 소정의 뉴클레오타이드 서열에 결합하도록 가공될 수 있다. 가공된 DNA 결합 단백질(아연 핑거 또는 TALE)은 천연적으로 존재하지 않는 단백질이다. 디자인을 위한 합리적 기준에는 기존 ZFP 및/또는 TALE 디자인의 정보와 결합 데이터를 저장하는 데

이터베이스에서 정보를 처리하기위한 대체 규칙 및 컴퓨터 알고리즘의 적용이 포함된다.

[0064] **[0078]** CRISPR-매개된 파괴를 위해, 가이드 RNA 및 엔도뉴클레아제는 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 면역 세포로 도입되어 세포 또는 서브세포 격실 내부로의 전달을 가능하게 하고 사용될 수 있는 제제/화학물질 및/또는 분자 (단백질 및 핵산)는 리포좀 전달 수단, 중합체 담체, 화학적 담체, 지질복합체, 다중복합체, 덴드리머, 나노입자, 에멀젼, 비제한적인 예로서 천연 세포내 이입 또는 포식 경로, 및 물리적 방법, 예를 들어, 전기천공을 포함한다. 특정 양상에서, 전기천공은 가이드 RNA 및 엔도뉴클레아제, 또는 엔도뉴클레아제를 암호화하는 핵산을 도입하기 위해 사용된다.

[0065] **[0079]** 하나의 예시적 특정 방법에서, 다중 유전자의 CRISPR 녹아웃을 위한 방법은 제대혈 또는 말초 혈액으로부터 면역 세포, 예를 들어, NK 세포와 같은 면역 세포의 단리를 포함할 수 있다. NK 세포는 단리될 수 있고, 하나의 예로서, 예를 들어, 1:2의 비율로 방사선조사된 피더 세포와 함께 배양 플레이트에 씨딩할 수 있다. 세포는 이어서 예를 들어, 200 IU/mL의 농도로 IL-2의 존재하에 gRNA 및 Cas9와 함께 전기천공될 수 있다. 상기 배지는 하나의 예로서 격일로 갈아줄 수 있다. 1 내지 3일 후, NK 세포는 피더 세포를 제거하기 위해 단리되고, 이어서 CAR 작제물로 형질도입될 수 있다. NK 세포는 이어서 추가의 유전자(들)에 대한 제2 CRISPR Cas9 녹아웃에 적용될 수 있다. 전기천공 후, NK 세포는 예를 들어, 5 내지 9일 동안 피더 세포와 함께 씨딩될 수 있다.

[0066] [0080] [표 1]

다중 편집 또는 CAR 녹-인을 위한 유전자. 녹-인을 위한 예시적 위치가 지적된다.

NK 세포, T 세포, 또는 MSC 세포	
NKG2A	엑손 4
SIGLEC-7	엑손 1
LAG3	엑손 1
TIM3	엑손 2
CISH	엑손 5
FOXO1	엑손 1
TGFBR2	엑손 5
TIGIT	엑손 2
CD96	엑손 2
ADORA2	엑손 2
NR3C1	엑손 2
PD1	엑손 1
PDL-1	엑손 3
PDL-2	엑손 3
CD47	엑손 2
SIRPA	엑손 2
SHIP1	엑손 1
ADAM17	엑손 1
B2M	엑손 2
CD16	
B 세포 또는 T 세포	
RPSS6	엑손 2
4EBP1	엑손 4
CD25	엑손 3
CD40	엑손 3
IL21R	엑손 1
ICAM1	엑손 4
CD95	엑손 2
CD80	엑손 3
CD86	엑손 1
IL10R	엑손 3
CD5	
CD7	엑손 2

[0067]

[0068] **[0081]** [표 2]

유전자 녹아웃을 위한 예시적 gRNA 서열.

CISH (엑손 4)	AGGCCACATAGTGCTGCACA (gRNA1); 서열번호 1
	TGTACAGCAGTGGCTGGTGG (gRNA2); 서열번호 2
NKG2A (엑손 4)	AACAACTATCGTTACCACAG; 서열번호 3
A2AR (엑손 3)	CTCCTCGGTGTACATCACGG (gRNA1); 서열번호 4
	AGTAGTTGGTGACGTTCTGC (gRNA2); 서열번호 5
TIGIT (엑손 3)	ACCCTGATGGGACGTACACT; 서열번호 6
CD96 (엑손 2)	AGGCACAGTAGAAGCCGTAT; 서열번호 7
TIM3 (엑손 2)	AGACGGGCACGAGGTTCCCT; 서열번호 8
SHP1 (엑손 4)	TCACGCACAAGAAACCGTCCA; 서열번호 9
PD1 (엑손 2)	CCCCTTCGGTCACCACGAGC; 서열번호 10
PDL1 (엑손 3)	ATTTACTGTCACGGTTCCCA; 서열번호 11
PDL2 (엑손 3)	CCCCATAGATGATTATGCAT; 서열번호 12
TGFBR2 (엑손 5)	GACGGCTGAGGAGCGGAAGA (gRNA1); 서열번호 13
	TGTGGAGGTGAGCAATCCCC (gRNA2); 서열번호 14

[0069]

[0070] **[0082]** 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 면역 세포는 2개 이상의 유전자를 변경하도록 변형된다. 일부 구현예에서, 변경된 유전자 발현은 유전자 내 파괴, 예를 들어, 녹 아웃, 삽입. 미스센스 또는 프레임 전환 돌연변이, 예를 들어, 양대립유전자 프레임 전환 돌연변이, 유전자 전부 또는 일부, 예를 들어, 하나 이상의 엑손 또는 이의 일부의 결실 및/또는 녹-인을 수행함에 의해 수행된다. 특정 구현예에서, 변경된 유전자 발현은 DNA-결합 표적화된 뉴클레아제, 예를 들어, RNA-가이드된 뉴클레아제, 예를 들어, CRISPR-연합된 뉴클레아제 (Cas)를 포함하고, 구체적으로 유전자 또는 이의 일부의 서열에 표적화되도록 디자인된 서열 특이적 또는 표적화된 뉴클레아제에 의해 실행될 수 있다.

[0071] **[0083]** 일부 구현예에서, 유전자의 발현, 활성 및/또는 기능의 변경은 유전자를 파괴함에 의해 수행된다. 일부 양상에서, 유전자는 이의 발현이 유전자 변형의 부재 또는 변형을 수행하기 위해 도입된 성분들의 부재하의 발현과 비교하여 적어도 또는 약 20, 30, 또는 40%, 일반적으로 적어도 또는 약 50, 60, 70, 80, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 100%까지 감소되도록 변형된다.

[0072] **[0084]** 일부 구현예에서, 상기 변경은 유전자의 발현이 필요에 따라 후기 시점에 회복되도록 일시적이거나 가역적이다. 다른 구현예에서, 상기 변경은 가역적이거나 일시적이지 않고, 예를 들어, 영구적이다.

[0073] **[0085]** 일부 구현예에서, 유전자 변경은 전형적으로 표적화된 방식으로 유전자 내 하나 이상의 이중 가닥 파열 및/또는 하나 이상의 단일 가닥 파열의 도입에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 이중 가닥 또는 단일 가닥 파열은 뉴클레아제, 예를 들어, 엔도뉴클레아제, 예를 들어, 유전자-표적화된 뉴클레아제에 의해 수행된다. 일부 양상에서, 상기 파열은 유전자의 암호화 영역 내, 예를 들어, 엑손내 유도된다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 상기 유도는 암호화 영역의 N-말단 부위 부근에서, 예를 들어, 제1 엑손내, 제2 엑손 내 또는 후속 엑손내에서 일어난다.

[0074] **[0086]** 일부 양상에서, 이중 가닥 또는 단일 가닥 파열은 예를 들어, 비-상동성 말단-접합 (NHEJ) 또는 상동성-지시된 복구(HDR)에 의해 세포성 복구 공정을 통해 복구를 진행한다. 일부 양상에서, 상기 복구 공정은 오류가 발생하기 용이하고, 유전자의 완전한 녹아웃을 유도할 수 있는, 프레임 전환 돌연변이, 예를 들어, 양대립유전자 프레임 전환 돌연변이와 같은 유전자의 파괴를 유도한다. 예를 들어, 일부 양상에서, 상기 파괴는 결실, 돌연변이 및/또는 삽입을 유도함을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 파괴는 조기 정지 코돈의 존재를 유도한다. 일부 양상에서, 삽입, 결실, 전좌, 프레임전환 돌연변이 및/또는 미성숙한 중지 코돈의 존재는 유전자의 발현, 활성 및/또는 기능의 파괴를 유도한다.

[0075] **[0087]** 일부 구현예에서, 변경은 RNA-가이드된 엔도뉴클레아제 (RGEN)을 통한 변경과 같은, 하나 이상의 DNA-결합 핵산을 사용하여 수행된다. 예를 들어, 상기 변경은 클러스터링된 규칙적으로 이격된 짧은 팔린드롬 반복체 (CRISPR) 및 CRISPR-연합 (Cas) 단백질을 사용하여 수행될 수 있다. 일반적으로, "CRISPR 시스템"은 총체적으로 Cas 유전자를 암호화하는 서열, tracr (트랜스-활성화 CRISPR) 서열(예를 들어, tracrRNA 또는 활성 부분 tracrRNA), tracr-쌍(mate) 서열 (내인성 CRISPR 시스템과 관련하여 “직접적인 반복체” 및 tracrRNA-가공된 부분 직접적인 반복체), 가이드 서열(또한, 내인성 CRISPR 시스템과 관련하여 “스페이서”로서 언급되는)), 및/또는 CRISPR 유전자좌로부터 다른 서열 및 전사체를 포함하는, CRISPR-연합 (“Cas”) 유전자의 발현에 관여하

거나 이의 활성을 지시하는 전사체 및 다른 요소들을 언급한다.

[0076] **[0088]** CRISPR/Cas 뉴클레아제 또는 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템은 뉴클레아제 기능 (예를 들어, 2개의 뉴클레아제 도메인)과 함께 DNA 및 Cas 단백질 (예를 들어, Cas9)에 서열 특이적으로 결합하는 비-암호화 RNA 분자 (가이드) RNA를 포함할 수 있다. CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소들은 예를 들어, 내인성 CRISPR 시스템을 포함하는 특정 유기체, 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes)로부터 유래된 I형, II형, 또는 III형 CRISPR 시스템으로부터 유래할 수 있다.

[0077] **[0089]** 일부 양상에서, Cas 뉴클레아제 및 gRNA (표적 서열 및 고정된 tracrRNA에 특이적인 crRNA의 융합을 포함하는)는 세포에 도입한다. 일반적으로, gRNA의 5' 말단에서 표적 부위는 Cas 뉴클레아제를 상보성 염기 쌍형성을 사용하여 표적 부위, 예를 들어, 유전자에 표적화시킨다. 표적 부위는 전형적으로 NGG 또는 NAG와 같은, 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM) 서열의 바로 5' 위치를 기준으로 선택될 수 있다. 이와 관련하여, gRNA는 가이드 RNA의 처음 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 14, 12, 11, 또는 10개의 뉴클레오타이드를 표적 DNA 서열에 상응하도록 변형시킴에 의해 목적하는 서열에 표적화된다. 일반적으로, CRISPR 시스템은 표적 서열의 부위에서 CRISPR 복합체의 형성을 촉진시키는 요소들에 의해 특징화된다. 전형적으로, "표적 서열"은 일반적으로 가이드 서열이 상보성을 갖도록 디자인된 서열을 언급하고, 여기서, 표적 서열과 가이드 서열 간의 하이브리드화는 CRISPR 복합체의 형성을 촉진시킨다. 완전한 상보성은 필수적으로 요구되지 않고, 단, 하이브리드화를 유발하고 CRISPR 복합체의 형성을 촉진시키기에 충분한 상보성이 있다.

[0078] **[0090]** CRISPR 시스템은 표적 부위에서 이중 가닥 파열 (DSB)에 이어서 본원에 논의된 바와 같은 파괴 또는 변경을 유도할 수 있다. 다른 구현예에서, "닉카제"로 간주되는 Cas9 변이체를 사용하여 표적 부위에서 단일 가닥을 닉킹(nick)한다. 쌍 형성 닉카제를 사용하여, 예를 들어, 각각 닉의 동시 도입시, 5' 오버행이 도입되도록 하는 한쌍의 상이한 gRNA 표적화 서열에 의해 지시되는 특이성을 개선시킬 수 있다. 다른 구현예에서, 촉매적 불활성 Cas9는 전사 리프레서 또는 활성화인자와 같은 이종성 이펙터 도메인에 융합되어 유전자 발현에 영향을 미친다.

[0079] **[0091]** 표적 서열은 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오타이드와 같은 임의의 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 서열은 세포의 핵 또는 세포질에, 예를 들어, 세포의 기관 내 위치할 수 있다. 일반적으로, 표적 서열을 포함하는 표적화된 유전자좌로의 재조합을 위해 사용될 수 있는 서열 또는 주형은 "편집 주형" 또는 "편집 폴리뉴클레오타이드" 또는 "편집 서열"로서 언급된다. 일부 양상에서, 외인성 주형 폴리뉴클레오타이드는 편집 주형으로서 언급될 수 있다. 일부 양상에서, 재조합은 상동성 재조합이다.

[0080] **[0092]** 전형적으로, 내인성 CRISPR 시스템과 관련하여, CRISPR 복합체 (표적 서열에 하이브리드화되고 하나 이상의 Cas 단백질과 복합체화된 가이드 서열을 포함하는)의 형성은 표적 서열에서 또는 이의 부근에서 (예를 들어, 이로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50개 이상의 염기쌍 내) 하나의 가닥 또는 가닥 둘다의 절단을 유도한다. 야생형 tracr 서열 전부 또는 일부 (예를 들어, 야생형 tracr 서열의 약 또는 약 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85, 또는 이상의 뉴클레오타이드)를 포함할 수 있거나 이들로 이루어질 수 있는 tracr 서열은 또한 예를 들어, tracr 서열의 적어도 일부를 가이드 서열에 작동적으로 연결된 tracr 쌍 서열의 전부 또는 일부에 하이브리드화함에 의해 CRISPR 복합체의 일부를 형성할 수 있다. tracr 서열은 하이브리드화하고 CRISPR 복합체의 형성에 관여하는 tracr 쌍 서열에 충분한 상보성, 예를 들어, 최적으로 정렬되는 경우 tracr 쌍 서열의 길이를 따라 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%또는 99%의 서열 상보성을 갖는다.

[0081] **[0093]** CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소들의 발현을 구동시키는 하나 이상의 벡터는 세포에 도입되어 CRISPR 시스템의 요소들의 발현이 하나 이상의 표적 부위에서 CRISRR 복합체의 형성을 지시할 수 있다. 성분들은 또한 단백질 및/또는 RNA로서 세포에 전달될 수 있다. 예를 들어, Cas 효소, tracr-쌍 서열에 연결된 가이드 서열 및 tracr 서열은 각각 별도의 벡터 상에 별도의 조절 요소들에 작동적으로 연결될 수 있다. 대안적으로, 동일하거나 상이한 조절 요소들로부터 발현되는 2개 이상의 요소들은 제1 벡터에 포함되지 않은 CRISPR 시스템의 임의의 성분들을 제공하는 하나 이상의 추가의 벡터와 함께 단일 벡터에 조합될 수 있다. 벡터는 제한 엔도뉴클레아제 인지 서열 (또한 "클로닝 부위"로서 언급되는)과 같은 하나 이상의 삽입 부위를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 삽입 부위는 하나 이상의 벡터의 하나 이상의 서열 요소들의 업스트림 및/또는 다운스트림에 위치한다. 다수의 상이한 가이드 서열이 사용되는 경우, 단일 발현 작제물은 세포 내 다수의 상이한 상응하는 표적 서열에 CRISPR 활성을 표적화하기 위해 사용될 수 있다.

[0082] **[0094]** 벡터는 Cas 단백질과 같은 CRISPR 효소를 암호화하는 효소-암호화 서열에 작동적으로 연결된 조절 요소를 포함할 수 있다. Cas 단백질의 비제한적인 예는 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8,

Cas9 (또한 Csn1 및 Csx12로서 공지된), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16, CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, 이의 상동체 또는 이의 변형된 버젼을 포함한다. 이들 효소는 공지되어 있고; 예를 들어, 에스. 피오게네스 Cas9 단백질의 아미노산 서열은 승인 번호 Q99ZW2하에 SwissProt 데이터베이스에서 발견될 수 있다.

[0083] **[0095]** CRISPR 효소는 Cas9 (예를 들어, 에스. 피오게네스로부터 또는 에스. 뉴모니아로부터)일 수 있다. CRISPR 효소는 예를 들어, 표적 서열 내 및/또는 표적 서열의 보체 내, 표적 서열의 위치에서 가닥 하나 또는 가닥 둘다의 절단을 지시할 수 있다. 상기 벡터는 상응하는 야생형 효소와 관련하여 돌연변이된 CRISPR 효소를 암호화하여 상기 돌연변이된 CRISPR 효소는 표적 서열을 함유하는 표적 폴리뉴클레오타이드의 가닥 하나 또는 가닥 둘다를 절단하는 능력이 부재일 수 있다. 예를 들어, 에스. 피오게네스로부터의 Cas9의 RuvC I 촉매 도메인에서 아스파르테이트 대 알라닌 치환 (D10A)은 가닥 둘다를 절단하는 뉴클레아제로부터 닉카제 (단일 가닥을 절단하는)로 Cas9를 전환시킨다. 일부 구현예에서, Cas9 닉카제는 가이드 서열(들), 예를 들어, 각각 DNA 표적의 센스 및 안티센스 가닥을 표적화하는 2개의 가이드 서열과 조합하여 사용될 수 있다. 상기 조합은 가닥 둘다를 닉킹하도록 하고 NHEJ 또는 HDR을 유도하기 위해 사용된다.

[0084] **[0096]** 일부 구현예에서, CRISPR 효소를 암호화하는 효소 암호화 서열은 특정 세포에서, 예를 들어, 진핵 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화되어 있다. 진핵 세포는 특정 유기체, 예를 들어, 사람, 마우스, 래트, 토끼, 개 또는 비-사람 영장류를 포함하는 포유동물의 세포이거나 이들로부터 유래된 세포일 수 있다. 일반적으로, 코돈 최적화는 고유 서열의 적어도 하나의 코돈을 고유 아미노산 서열을 유지하면서 숙주 세포의 유전자에서 보다 흔하게 또는 가능 흔하게 사용되는 코돈으로 대체함에 의해 관심 대상의 숙주 세포에서 증진된 발현을 위해 핵산 서열을 변형시키는 공정을 언급한다. 다양한 종은 특정 아미노산의 특정 코돈에 대해 특정 편향을 나타낸다. 코돈 편향(유기체 간의 코돈 용법에서의 차이)은 흔히 전령 RNA (mRNA)의 해독 효율과 상호관련되고, 이는 이어서 무엇 보다 해독될 코돈의 성질 및 특정 운반 RNA (tRNA) 분자의 가용성에 의존하는 것으로 사료된다. 세포에서 선택된 tRNA의 우세는 일반적으로 펩타이드 합성에서 가장 흔하게 사용되는 코돈을 반영한다. 따라서, 유전자들은 코돈 최적화를 기준으로 소정의 유기체에서 최적의 유전자 발현을 위해 조정될 수 있다.

[0085] **[0097]** 일반적으로, 가이드 서열은 표적 서열과 하이브리드화하고 CRISPR 복합체의 표적 서열로의 서열-특이적 결합을 지시하기에 충분히 표적 폴리뉴클레오타이드 서열과 상보성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오타이드 서열이다. 일부 구현예에서, 가이드 서열과 이의 상응하는 표적 서열 간의 상보성 정도는 적합한 정렬 알고리듬을 사용하여 최적으로 정렬되는 경우 약 또는 약 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 99%이상이다.

[0086] **[0098]** 최적의 정렬은 서열을 정렬시키기위한 임의의 적합한 알고리듬을 사용하여 결정될 수 있고 상기 알고리즘의 비제한적인 예는 스미스-워터맨 (Smith-Waterman) 알고리즘, 니들맨-운쉬(Needleman-Wunsch) 알고리즘, 버로우-휠러 트랜스폼 (Burrows-Wheeler Transform)을 기반으로 하는 알고리즘 (예를 들어, 버로우 휠러 얼라이너(Burrows Wheeler Aligner), 클러스탈 더블유 (Clustal W), 클러스탈 엑스(Clustal X), BLAT, 노보얼라인 (Novoalign) (Novocraft Technologies, ELAND (Illumina, San Diego, Calif.), SOAP (soap.genomics.org.cn에서 가용한), 및 Maq (maq.sourceforge.net에서 가용한)를 포함한다.

[0087] **[0099]** CRISPR 효소는 하나 이상의 이종성 단백질 도메인을 포함하는 융합 단백질의 일부일 수 있다. CRISPR 효소 융합 단백질은 임의의 추가의 단백질 서열 및 임의로 임의의 2개의 도메인 사이의 링커 서열을 포함할 수 있다. CRISPR 효소에 융합될 수 있는 단백질 도메인의 예는 제한 없이, 에피토프 태그, 리포터 유전자 서열, 및 하기의 활성 중 하나 이상을 갖는 단백질 도메인을 포함한다: 메틸라제 활성, 데메틸라제 활성, 전사 활성화 활성, 전사 억제 활성, 전사 방출 인자 활성, 히스톤 변형 활성, RNA 절단 활성 및 핵산 결합 활성. 에피토프 태그의 비제한적인 예는 히스티딘 (His) 태그, V5 태그, FLAG 태그, 인플루엔자 헤마글루티닌 (HA) 태그, Myc 태그, VSV-G 태그, 및 티오레독신 (Trx) 태그를 포함한다. 리포터 유전자의 예는 글루타티온-5-트랜스퍼라제 (GST), 서양고추냉이 퍼옥시다제 (HRP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제 (CAT) 베타 갈락토시다제, 베타-글루쿠로니다제, 루시퍼라제, 녹색 형광성 단백질 (GFP), HcRed, DsRed, 시안(cyan) 형광성 단백질 (CFP), 황색 형광성 단백질 (YFP), 및 청색 형광 단백질 (BFP)를 포함하는 자가형광 단백질을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. CRISPR 효소는 말토스 결합 단백질 (MBP), S-태그, Lex A DNA 결합 도메인 (DBD) 융합체, GAL4A DNA 결합 도메인 융합체 및 헤르페스 심플렉스 바이러스 (HSV) BP 16 단백질 융합체를 포함하지만 이에 제한되지 않는, DNA 분자에 결합하거나 다른 세포 분자에 결합하는 단백질 또는 단백질의 단편을 암호화하는 유전자 서열에 융합될 수 있다. CRISPR 효소를 포함하는 융합 단백질의 일부를 형성할 수 있는 추가의 도메인은 본원에 참조로

인용된 US 20110059502에 기재되어 있다.

[0088] **III. 억제성 유전자 유전자좌에서 CAR 및/또는 TCR의 삽입**

[0089] **[00100]** 일부 구현예에서, 본원의 개시내용은 면역 세포의 특이적 유전자 유전자좌에서 CAR 및/또는 TCR의 삽입에 관한 것이다. CAR 및/또는 TCR은 예를 들어, NKG2A, Siglec-7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, 아데노신 수용체 2A, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPAa, SHIP1, ADAM17, pS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, CD7, 및 이의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 유전자와 같은 억제성 유전자 유전자좌에 삽입될 수 있다.

[0090] **[00101]** 본원에 기재된 임의의 방법에서 하나 이상의 CAR 및/또는 TCR의 삽입은 부위-특이적일 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 CAR 및/또는 TCR은 프로모터에 인접 부위 또는 부근에 삽입될 수 있다. 또 다른 예에서, 하나 이상의 전이유전자는 유전자 (예를 들어, 억제성 유전자)의 엑손에 인접 부위, 부근 또는 내에 삽입될 수 있다. 상기 삽입을 사용하여 CAR 및/또는 TCR을 녹인시킬 수 있고 유전자의 발현을 동시에 파괴한다. 또 다른 예에서, 하나 이상의 CAR 및/또는 TCR은 유전자의 인트론에 인접 부위, 부근 또는 이내에 삽입될 수 있다. CAR 및/또는 TCR은 아데노-연합된 바이러스 (AAV) 바이러스 벡터에 의해 도입되고 표적화된 게놈 위치에 통합될 수 있다. 일부 경우에, rAAV 벡털를 사용하여 특정 위치로의 전이유전자의 삽입을 지시할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, CAR 및/또는 TCR은 NKG2A, Siglec 7, LAG3, TIM3, CISH, FOXO1, TGFBR2, TIGIT, CD96, 아데노신 수용체 2A, NR3C1, PD1, PDL-1, PDL-2, CD47, SIRPa, SHIP1, ADAM17, pS6, 4EBP1, CD25, CD40, IL21R, ICAM1, CD95, CD80, CD86, IL10R, CD5, 또는 CD7 유전자의 적어도 일부에 rAAV 또는 AAV 벡터에 의해 통합될 수 있다.

[0091] **[00102]** 세포의 표적화된 유전자좌의 변형은 DNA를 세포에 도입함에 의해 생성될 수 있고, 여기서, 상기 DNA는 표적 유전자좌와 상동성을 갖는다. DNA는 마커 유전자를 포함하여 통합된 작제물을 포함하는 세포의 선택을 가능하게 할 수 있다. 표적 벡터에서 상보성 DNA는 표적 유전자좌에서 염색체 DNA와 재조합할 수 있다. 마커 유전자는 상보성 DNA 서열, 3' 재조합 아암, 및5' 재조합 아암에 의해 플랭킹될 수 있다. 세포 내 다수의 유전자좌는 표적화될 수 있다. 예를 들어, 1개 이상의 표적 유전자좌에 특이적인 재조합 아암을 갖는 전이유전자는 1회 도입될 수 있어 다수의 게놈 변형은 단일 단계에서 일어난다. 상동성 아암은 0.2 kb 내지 약 5 kb 길이, 예를 들어, 약 0.2 kb, 0.4 kb 0.6 kb, 0.8 kb, 1.0 kb, 1.2 kb, 1.4 kb, 1.6 kb, 1.8 kb, 2.0kb, 2.2 kb, 2.4 kb, 2.6 kb, 2.8 kb, 3.0 kb, 3.2 kb, 3.4 kb, 3.6 kb, 3.8 kb, 4.0 kb, 4.2 kb, 4.4 kb, 4.6kb, 4.8 kb, 내지 약 5.0kb 길이일 수 있다.

[0092] **[00103]** 하나의 방법에서, 가이드 RNA는 예를 들어, 유전자의 프로모터, 엑손 또는 인트론에 인접한 부위에서 억제성 유전자의 영역을 표적화하도록 디자인될 수 있다. 가이드 RNA는 엑손, 예를 들어, 억제성 유전자의 제1, 제2 또는 제3 엑손의 5' 말단을 표적화할 수 있다. 가이드 RNA는 AAV 벡터 복구 매트릭스에 포함될 수 있다. AAV 벡터는 자가 절단 2A 펩타이드, 예를 들어, P2A 펩타이드에 이어서 CAR cDNA를 암호화할 수 있다. CAR 카세트 및 가이드 RNA 서열은 억제성 유전자에 대한 상동성 아암에 의해 플랭킹될 수 있다. 면역 세포에는 예를 들어, 전기 천공되어 AAV 벡터 및 Cas9, 예를 들어, Cas9 mRNA가 도입될 수 있다.

[0093] **IV. 면역 세포**

[0094] **[00104]** 본원 개시내용의 특정 구현예는 다중 유전자의 녹아웃을 갖고/갖거나 억제성 유전자좌에서 CAR의 녹킹을 갖도록 가공된 면역 세포에 관한 것이다. 면역 세포는 T 세포 (예를 들어, 조절 T 세포, $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, 또는 감마-델타 T 세포), NK 세포, 영구 NK 세포, NKT 세포, B 세포, 또는 줄기 세포 (예를 들어, 중간엽 줄기 세포 (MSC) 또는 유도된 만능 줄기 (iPSC) 세포)일 수 있다. 면역 세포는 바이러스 특이적일 수 있고 CAR을 발현하고/하거나 TCR을 발현할 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 단핵구 또는 과립구, 예를 들어, 골수세포, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 비만 세포, 호산구 및/또는 호염구이다. 또한 본원에서는 입양 세포 치료요법 (이 경우에 상기 세포는 자가유래 또는 동종이계일 수 있다)을 위해 세포를 사용하고 투여하는 방법 뿐만 아니라 면역 세포를 생성하고 가공하는 방법이 제공된다. 따라서, 면역 세포는 예를 들어, 암 세포를 표적화하기 위한 면역치료요법으로서 사용될 수 있다.

[0095] **[00105]** 면역 세포는 대상체, 특히 사람 대상체로부터 단리될 수 있다. 면역 세포는 관심 대상의 대상체, 예를 들어, 특정 질환 또는 병태를 갖는 것으로 의심되는 대상체, 특정 질환 또는 병태에 대한 소인을 갖는 것으로 의심되는 대상체, 또는 특정 질환 또는 병태에 대해 치료요법을 받고있는 대상체로부터 수득될 수 있다. 면역 세포는 혈액, 제대혈, 비장, 흉선, 림프절 및 골수를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 대상체내에 존재하는 임의의 위치로부터 수거될 수 있다. 단리된 면역 세포는 직접 사용될 수 있거나, 또는 이들은 예를 들어, 동결에

의해 일정 기간 동안 저장 될 수 있다.

[0096] **[00106]** 면역 세포는 혈액 (혈액 은행 또는 제대혈 은행에 의해 수거되는 혈액을 포함하는), 비장, 골수, 수술 과정 동안에 제거되고/되거나 노출된 조직 및 생검 과정에 의해 수득된 조직을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 이들의 존재하는 임의의 조직으로부터 집적/정제될 수 있다. 이로부터 면역 세포가 집적되고, 단리되고/되거나 정제되는 조직/기관은 생존 및 비-생존 대상체로부터 단리될 수 있고, 여기서, 상기 비-생존 대상체는 기관 공여자이다. 특정 구현예에서, 면역 세포는 혈액, 예를 들어, 말초 혈액 또는 제대혈 또는 이의 혼합물로부터 단리된다. 일부 양상에서, 제대혈로부터 단리된 면역 세포는 예를 들어, CD4- 양성 또는 CD8-양성 T 세포 억제에 의해 측정되는 바와 같이 증진된 면역조절 능력을 갖는다. 특정 양상에서, 면역 세포는 증진된 면역조절 능력을 위해 풀링된 혈액, 특히 풀링된 제대혈로부터 단리된다. 풀링된 혈액은 2개 이상의 공급원, 예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 공급원(예를 들어, 공여자 대상체)로부터 기원할 수 있다.

[0097] **[00107]** 면역 세포의 집단은 치료요법을 필요로 하거나 감소된 면역 세포 활성과 연관된 질환을 앓는 대상체로부터 수득될 수 있다. 따라서, 상기세포는 치료요법을 필요로 하는 대상체에 자가일 수 있다. 대안적으로, 면역 세포의 집단은 공여자, 바람직하게 조직적합성 일치된 공여자로부터 수득될 수 있다. 상기면역 세포 집단은 말초 혈액, 제대혈, 골수, 비장, 또는 면역 세포가 대상체 또는 공여자에 체류하는 임의의 다른 기관/조직으로부터 수거될 수 있다. 상기 면역 세포는 대상체 및/또는 공여자 풀로부터, 예를 들어, 풀링된 제대혈로부터 단리될 수 있다.

[0098] **[00108]** 면역 세포의 집단이 대상체와는 다른 공여자로부터 수득된 경우, 상기 공여자는 바람직하게 동종이계이고 단, 상기 수득된 세포는 이들이 대상체로 도입될 수 있다는 점에서 대상체-적합성이다. 동종이계 공여자 세포는 사람-백혈구-항원(HLA)-적합성이거나 적합성이 아닐 수 있다.

[0099] **A. T 세포**

[0100] **[00109]** 일부 구현예에서, 면역 세포는 T 세포이다. 기능성 항-종양 이펙터 세포의 유도화, 활성화 및 확장을 위한 여러 기본 접근법은 지난 20년 동안 기재되었다. 이들은 다음을 포함한다: 자가유래 세포, 예를 들어, 종양-침윤 림프구 (TIL); 자가유래 DC를 사용하여 생체외 활성화된 T 세포, 림프구, 인공 항원-제공 세포 (APC) 또는 T 세포 리간드 및 활성화 항체로 코팅된 비드, 또는 표적세포막을 포획함에 의해 단리된 세포; 항-숙주 종양 T 세포 수용체 (TCR)를 천연적으로 발현하는 동종이계 세포; 및 "T-몸체"로서 공지된 항체 유사 종양 인지 능력을 나타내는 종양-반응성 TCR 또는 키메라 TCR 분자를 발현하도록 유전학적으로 재프로그래밍되거나 “재지시된” 비-종양-특이적 자가유래 또는 동종이계 세포. 이들 접근법은 본원에 기재된 방법에 사용될 수 있는 T 세포 제조 및 면역화를 위한 수많은 프로토콜을 생성하였다.

[0101] **[00110]** 일부 구현예에서, T 세포는 혈액, 골수, 림프, 탯줄 또는 림프 기관으로부터 유래한다. 일부 양상에서, 세포는 사람 세포이다. 세포는 전형적으로 1차 세포, 예를 들어, 대상체로 부터 직접 단리되고/되거나 대상체로부터 단리되어 동결된 것들이다. 일부 구현예에서, 세포는 T 세포 또는 다른 세포 유형의 하나 이상의 서브세트, 예를 들어, 전체 T 세포 집단, $CD4^+$ 세포, $CD8^+$ 세포, 및 이의 서브집단, 예를 들어, 기능, 활성화 상태, 성숙도, 분화를 위한 잠재력, 확장, 재순환, 위치화 및/또는 지속성 능력, 항원-특이성, 항원 수용체의 유형, 특정 기관 또는 격실내에서의 존재, 마커 또는 사이토카인 분비 프로파일, 및/또는 분화 정도에 의해 한정된 것들을 포함한다. 치료될 대상체와 관련하여, 세포는 동종이계 및/또는 자가일 수 있다. 일부 양상에서, 예를 들어, 상용 기술에 대해, 세포들은 만능 및/또는 다능성 세포, 예를 들어, 줄기 세포, 예를 들어, 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC)이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터 세포를 단리하고, 이들을 제조하고, 가공하고, 배양하고/하거나 조작하고 이들을 냉동보존 전 또는 후에 동일한 환자에게 재도입함을 포함한다.

[0102] **[00111]** T 세포 (예를 들어, $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ T 세포)의 서브유형 및 서브집단 중에는 순수 T (T_N) 세포, 이펙터 T 세포 (T_{EFF}), 메모리 T 세포 및 이의 서브타입, 예를 들어, 줄기 세포 메모리 T (TSC_M), 중추 메모리 T (TC_M), 이펙터 메모리 T (T_{EM}), 또는 최종적으로 분화된 이펙터 메모리 T 세포, 종양-침윤 림프구(TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포독성 T 세포, 점막 연합 불변 T (MAIT) 세포, 천연적으로 존재하고 적응성 조절 T (Treg) 세포, 헬퍼 T 세포, 예를 들어, TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포, 난포 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포 및 델타/감마 T 세포가 있다.

[0103] **[00112]** 일부 구현예에서, T 세포 집단의 하나 이상은 특이적 마커, 예를 들어, 표면 마커에 대해 양성이거나 특이적 마커에 대해 음성인 세포에 대해 집적되거나 고갈된다. 일부 경우에, 상기 마커는 T 세포의 특정 집단

(예를 들어, 비-메모리 세포)상에 부재이거나 비교적 보다 낮은 수준으로 발현되는 것들 및 존재하거나 T 세포의 특정 다른 집단 (예를 들어, 메모리 세포) 상에 존재하거나 비교적 보다 높은 수준으로 발현되는 것들이다.

[0104] **[00113]** 일부 구현예에서, T 세포는 비-T 세포, 예를 들어, B 세포, 단핵구, 또는 다른 백혈구 세포 상에서 발현되는 마커, 예를 들어 CD 14의 음성 선택에 의해 PBMC 샘플로부터 분리된다. 일부 양상에서, $CD4^+$ 또는 $CD8^+$ 선택 단계는 $CD4^+$ 헬퍼 및 $CD8^+$ 세포독성 T 세포를 분리하기 위해 사용된다. 상기 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 집단은 추가로 하나 이상의 순수, 메모리 및/또는 이펙터 T 세포 서브집단상에서 발현되거나 비교적 보다 높은 정도로 발현되는 마커에 대한 양성 또는 음성 선택에 의해 서브집단으로 분류될 수 있다.

[0105] **[00114]** 일부 구현예에서, $CD8^+$ T 세포는 추가로 예를 들어, 각각의 서브집단과 관련된 표면 항원을 기준으로 양성 또는 음성 선택에 의해 순수, 중추 기억, 이펙터 기억 및/또는 중추 기억 줄기 세포에 대해 집적되거나 이들이 고갈된다. 일부 구현예에서, 중추 기억 T (T_{CM}) 세포에 대한 집적은 효능을 증가시키기 위해, 예를 들어, 일부 양상에서 특히 상기 서브집단에서 강력한, 투여 후 장기 생존, 확장 및/또는 생착을 개선시키기 위해 수행된다.

[0106] **[00115]** 일부 구현예에서, T 세포는 자가유래 T 세포이다. 상기 방법에서, 종양 샘플은 환자로부터 수득하였고, 단일 세포 현탁액을 수득한다. 단일 세포 현탁액은 임의의 적합한 방식, *예를 들어,* 기계적으로(*예를 들어,* gentleMACS™ 분해기를 사용하여 종양을 분해시키는, Miltenyi Biotec, Auburn, Calif.) 또는 효소적으로(예를 들어, 콜라게나제 또는 Dnase) 수득될 수 있다. 종양 효소 분해물의 단일-세포 현탁액을 인터류킨-2 (IL-2)에서 배양한다.

[0107] **[00116]** 배양된 T 세포를 풀링하고 신속하게 확장시킬 수 있다. 신속한 확장은 약 10 내지 약 14일의 기간 동안 적어도 약 50배 (예를 들어, 50-, 60-, 70-, 80-, 90-, 또는 100-배 이상)의 항원-특이적 T-세포 수의 증가를 제공한다. 보다 바람직하게, 신속한 확장은 약 10 내지 약 14일의 기간 동안 적어도 약 200-배 (예를 들어, 200-, 300-, 400-, 500-, 600-, 700-, 800-, 900-, 이상)의 증가를 제공한다.

[0108] **[00117]** 확장은 당업계에 공지된 바와 같은 임의의 다수의 방법에 의해 성취될 수 있다. 예를 들어, T 세포는 피더 림프구 및 인터류킨-2 (IL-2) 또는 인터류킨-15 (IL-15)의 존재하에 바람직하게는 IL-2의 존재하에 비-특이적 T-세포 수용체 자극을 사용하여 신속하게 확장될 수 있다. 비-특이적 T-세포 수용체 자극은 약 30 ng/ml 용량의 OKT3, 마우스 모노클로날 항-CD3 항체(Ortho-McNeil®, Raritan, N.J.로부터 가용함)를 포함한다. 대안적으로, T 세포는 임의로 벡터로 부터 발현될 수 있는, 암의 하나 이상의 항원 (이의 항원성 부분, 예를 들어, 에피토프(들) 또는 세포), 예를 들어, 사람 백혈구 항원 A2 (HLA-A2) 결합 펩타이드를 사용하여 , T-세포 성장 인자, 예를 들어, 300 IU/ml IL-2 또는 IL-15, 바람직하게는 IL-2의 존재하에 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)의 시험관내 자극에 의해 신속하게 확장될 수 있다. 시험관내 유도된 T-세포는 HLA-A2-발현 항원-제공 세포 상에 펄싱된 암의 동일한 항원(들)을 사용한 재-자극에 의해 신속하게 확장될 수 있다. 대안으로, T-세포는 예를 들어, 조사된 자가유래 림프구로 또는 조사된 $HLA\text{-}A2^+$ 동종이계 림프구 및 IL-2로 재자극될 수 있다.

[0109] **[00118]** 자가유래 T 세포를 변형시켜 자가유래 T 세포의 성장 및 활성화를 촉진시키는 T 세포 성장 인자를 발현시킬 수 있다. 적합한 T 세포 성장 인자들은 예를 들어, 인터류킨 (IL)-2, IL-7, IL-15, 및 IL-12를 포함한다. 변형을 위한 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌(Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 3^{rd} ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001; and Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994)을 참조한다. 특정 양상에서, 변형된 자가유래 T 세포는 고수준으로 T 세포 성장 인자를 발현한다. IL-12의 서열과 같은 T 세포 성장 인자 암호화 서열은 당업계에서 용이하게 가용하고, T 세포 성장 인자 암호화 서열로 작동가능하게 연결된 프로모터는 고수준의 발현을 촉진시킨다.

[0110] **B. NK 세포**

[0111] **[00119]** 일부 구현예에서, 면역 세포는 천연 킬러 (NK) 세포이다. NK 세포는 다양한 종양 세포, 바이러스 감염된 세포 및 골수 및 흉선에서 일부 정상 세포에 대해 자발적 세포독성을 갖는 림프구의 서브집단이다. NK 세포는 골수, 림프절, 비장, 편도 및 흉선에서 분화하고 성숙된다. NK 세포는 사람에서 CD16, CD56, 및 CD8와 같은 특이적 표면 마커에 의해 검출될 수 있다. NK 세포는 T 세포 항원 수용체, 범 T 마커 CD3, 또는 표면 면역글로불린 B 세포 수용체를 발현하지 않는다.

[0112] **[00120]** 특정 구현예에서, NK 세포는 사람 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 비자극된 백혈구성분채집 생성물 (PBSC), 사람 배아 줄기 세포 (hESC), 유도된 만능 줄기 세포 (iPSC), 골수, 또는 당업계에 널리 공지된 방법에 의한 제대혈로부터 유래한다. 특히, 제대 Cb는 NK 세포를 유도하기 위해 사용된다. 특정 양상에서, NK 세포는 NK 세포의 생체외 확장에 대해 이전에 기재된 방법에 의해 단리되고 확장된다(문헌참조: Spanholtz *et al.*, 2011; Shah *et al.*, 2013). 상기 방법에서, CB 단핵 세포는 피콜 밀도 구배 원심분리에 의해 단리되고 IL-2 및 인공 항원 제공 세포 (aAPC)와 함께 생물반응기에서 배양한다. 7일 후, 세포 배양물에서 CD3을 발현하는 임의의 세포를 고갈시키고 추가로 7일 동안 재배양한다. 세포는 다시 CD3-고갈시키고 특징 분석하여 $CD56^{+}/CD3^{-}$ 세포 또는 NK 세포의 퍼센트를 결정한다. 다른 방법에서, 제대 CB를 사용하여 $CD34^{+}$ 세포를 단리하고 $CD56^{+}/CD3^{-}$ 세포로 분화시키고 SCF, IL-7, IL-15, 및 IL-2를 함유하는 배지에서 배양함에 의해 NK 세포를 유도한다.

[0113] **[00121]** 특정 구현예에서, NK 세포는 이들의 제조 동안에 일부 시점에서 확장시킨다. 특정 경우에, NK 세포의 확장은 제대혈로부터의 단핵 세포 (MNC)를 항원 제공 세포(APC) 및 IL-2의 존재하에 자극하고; 상기 세포를 APC로 재자극하여 확장된 NK 세포를 생성함을 포함하고, 여기서, 적어도 일부 경우에 상기 방법은 생물반응기에서 수행된다. 자극 단계는 MNC가 NK 세포를 향하도록 지시할 수 있다. 재자극 단계는 IL-2의 존재를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 특정 양상에서, 상기 방법은 자극 단계 동안에 임의의 배지 성분의 제거 또는 첨가를 포함하지 않는다. 특정 양상에서, 상기 방법은 특정 시간표내에서, 예를 들어 15일 미만으로, 예를 들어 14일에 수행된다.

[0114] **[00122]** 특정 구현예에서, NK 세포는 상기 확장을 위한 생체외 방법에 의해 화강되고, 상기 방법은 (a) 제대혈로부터 단핵 세포 (MNC)의 출발 집단을 수득하는 단계; (b) 상기 MNC를 항원 제공 세포 (APC) 및 IL-2의 존재하에 자극하는 단계; 및 (c) 상기 세포를 APC로 재극하여 확장된 NK 세포를 생성하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 방법은 생물반응기에서 수행되고 양호한 제조 수행(GMP)에 적합하다. 단계 (b)의 자극은 MNC가 NK 세포를 향하도록 지시할 수 있다. 단계 (c)는 IL-2의 존재를 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다. 특정 양상에서, 상기 방법은 단계 (b) 동안에 임의의 배지 성분의 제거 또는 첨가를 포함하지 않는다. 특정 양상에서, 상기 방법은 15일 미만, 예를 들어, 14일에 수행된다.

[0115] **[00123]** 일부 양상에서, 상기 방법은 하나 이상의 특정 마커, 예를 들어, CD3에 양성인 세포를 고갈시키는 단계를 추가로 포함한다. 특정 양상에서, 상기 고갈 단계는 단계 (b)와 (c) 사이에서 수행된다. 일부 양상에서, 상기 세포는 CD3 고갈을 위해 생물반응기로부터 제거하고 단계 (c)를 위해 생물반응기에 위치시킨다.

[0116] **[00124]** 특정 양상에서, 제대혈로부터 NMC의 출발 집단을 수득하는 단계는 덱스트란, 사람 혈청 알부민(HSA), DNAse, 및/또는 염화마그네슘의 존재하에 제대혈을 해동시키는 단계를 포함한다. 특정 양상에서, 제대혈로부터 MNC의 출발 집단을 수득하는 단계는 덱스트란 및/또는 DNase의 존재하에 제대혈을 해동시키는 단계를 포함한다. 특정 양상에서, 제대혈은 5-20%, 예를 들어, 10%, 덱스트란의 존재하에 세척한다. 특정 양상에서, 제대혈은 예를 들어, 100-300 mM의 농도, 특히 200 mM의 농도에서 염화마그네슘의 존재하에 현탁시킨다. 일부 양상에서, 수득하는 단계는 피콜 밀도 구배 원심분리를 수행하여 단핵 세포 (MNC)를 수득하는 단계를 포함한다.

[0117] **[00125]** 특정 양상에서, 생물반응기는 가스 투과성 생물반응기이다. 특정 양상에서, 가스 투과성 생물반응기는 G-Rex100M 또는 G-Rex100이다. 일부 양상에서, 단계 (b)의 자극은 배지 3-5 L, 예를 들어, 3, 3.5, 4, 4.5, 또는 5 L에서 수행된다.

[0118] **[00126]** 일부 양상에서, APC는 감마 방사선 조사된다. 특정 양상에서, APC는 막-결합된 IL-21 (mbIL-21)을 발현하도록 가공된다. 특정 양상에서, APC는 IL-21, IL-15 및 IL-2을 발현하도록 가공된다. 일부 양상에서, MNC 및 APC는 1:2의 비율로 배양한다. 일부 양상에서, IL-2는 50-200 IU/mL, 예를 들어, 100 IU/mL의 농도로 있다. 특정 양상에서, IL-2는 2 내지 3일 마다 보충된다.

[0119] **[00127]** 특정 양상에서, 단계 (b)는 6 내지 8일 동안, 예를 들어, 7일 동안 수행된다. 일부 양상에서, 단계 (c)는 6 내지 8일 동안, 예를 들어, 7일 동안 수행된다. 일부 양상에서, 단계 (c)는 세포의 분할을 포함하지 않는다. 특정 양상에서, 단계 (c) 동안에 세포에 IL-2를 2회 공급하고 특정 경우에, 어떠한 다른 배지 성분들은 단계 (c) 동안에 첨가되지 않거나 제거되지 않는다.

[0120] **[00128]** 일부 양상에서, 상기 방법은 3, 4, 5, 또는 6개의 생물반응기의 사용을 포함한다. 특정 양상에서, 상기 방법은 10개 미만의 생물반응기의 사용을 포함한다.

[0121] **[00129]** 특정 양상에서, NK 세포는 적어도 500-배, 800-배, 1000-배, 1200-배, 1500-배, 2000-배, 2500-배,

3000-배 또는 5000-배 확장된다. 특정 양상에서, 생물반응기에서 NK 세포의 배양은 정적 액체 배양과 비교하여 1000-배 초과의 NK 세포를 생성한다.

[0122] **[00130]** 특정 양상에서, 상기 방법은 사람 백혈구 항원 (HLA) 매칭을 포함하지 않는다. 일부 양상에서, NK 세포의 출발 집단은 반일치(haploidentical) 공여자로부터 수득되지 않는다.

[0123] **[00131]** 일부 양상에서, 상기 확장된 NK 세포는 말초 혈액으로부터 확장된 NK 세포와 비교하여 증진된 항-종양 활성을 갖는다. 특정 양상에서, 확장된 NK 세포는 말초 혈액으로부터 확장된 NK 세포와 비교하여 하나 이상의 세포 사이클 유전자, 하나 이상의 세포 분열 유전자 및/또는 하나 이상의 DNA 복제 유전자의 보다 높은 발현을 갖는다. 일부 양상에서, 확장된 NK 세포는 말초 혈액으로부터 확장된 NK 세포와 비교하여 보다 높은 증식 능력을 갖는다. 일부 양상에서, 확장된 NK 세포는 소진되지 않는다. 특정 양상에서, 소진은 퍼포린, 그랜자임, CD57, KLRG1, 및/또는 PD1의 발현을 측정함에 의해 검출된다. 일부 양상에서, 확장된 NK 세포는 퍼포린 및/또는 그랜자임의 높은 발현을 갖는다. 특정 양상에서, 확장된 NK 세포는 CD57, KLRG1, 및/또는 PD1의 낮은 발현을 갖거나 발현을 갖지 않는다.

[0124] **[00132]** 일부 양상에서, 확장된 NK 세포는 임상적으로 관련된 용량을 포함한다. 특정 양상에서, 제대혈은 동결된 제대혈이다. 특정 양상에서, 동결된 제대혈은 하나 이상의 감염성 질환, 예를 들어, A형 간염, B형 간염, C형 간염, 트리파노소마 크루지(Trypanosoma cruzi), HIV, 사람 T-림프구 바이러스, 시필리스(syphyllis), 지카(Zika) 바이러스 등에 대해 시험되었다. 일부 양상에서, 제대혈은 풀링된 제대혈, 예를 들어, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개 개별 제대혈 유닛이다.

[0125] **[00133]** 일부 양상에서, NK 세포는 예를 들어, 수용자 개체와 관련하여 자가가 아니다. 특정 양상에서, NK 세포는 예를 들어, 수용자 개체와 관련하여 동종이계가 아니다.

[0126] **[00134]** 일부 양상에서, APC는 범용 항원 제공 세포(uAPC)이다. 특정 양상에서, uAPC는 (1) CD48 및/또는 CS1 (CD319), (2) 막-결합된 인터류킨-21 (mbIL-21), 및 (3) 41BB 리간드(41BBL)를 발현하도록 가공된다. 일부 양상에서, uAPC는 CD48을 발현한다. 특정 양상에서, uAPC는 CS1을 발현한다. 특정 양상에서, uAPC는 CD48 및 CS1을 발현한다. 일부 양상에서, uAPC는 필수적으로 내인성 HLA 부류 I, II, 및/또는 CD1d 분자를 발현하지 않는다. 특정 양상에서, uAPC는 ICAM-1 (CD54) 및/또는 LFA-3 (CD58)을 발현한다. 특정 양상에서, uAPC는 추가로 백혈병 세포-유래된 aAPC, 예를 들어, K562 세포로서 정의된다.

[0127] **C. 줄기 세포**

[0128] **[00135]** 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 면역 세포는 줄기 세포, 예를 들어, 유도된 만능 줄기 세포(PSC), 중간엽 줄기 세포 (MSC), 또는 조혈 줄기 세포 (HSC)일 수 있다.

[0129] **[00136]** 본원에 사용된 만능 줄기 세포는 통상적으로 iPS 세포 또는 iPSC로 약칭되는 유도된 만능 줄기(iPS) 세포일 수 있다. 생식 세포를 제외하고는, 어떤 세포라도 iPCS를 위한 출발점으로 사용될 수 있다. 예를 들어, 세포형은 케라틴세포, 섬유아세포, 조혈 세포, 간엽 세포, 간세포 또는 위세포일 수 있다. 세포 분화의 정도 또는 해당 세포가 수거되는 동물의 연령에는 제한이 없으며; 미분화 전구 세포 (체세포 줄기 세포를 포함) 및 최종적으로 분화된 성숙한 세포조차도 본원에 개시된 방법에서 체세포의 공급원으로 사용될 수 있다.

[0130] **[00137]** 체세포는 당업자에게 공지된 방법들을 사용하여 재프로그래밍되어 iPS 세포를 생성할 수 있다. 일반적으로, 핵 재프로그래밍 인자를 사용하여 체세포로부터 만능 줄기 세포를 생성한다. 일부 구현예에서, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 Klf4, c-Myc, Oct3/4, Sox2, Nanog 및 Lin28을 사용한다. 다른 구현예에서, Oct3/4, Sox2, c-Myc 및 Klf4 또는 Oct3/4, Sox2, Nanog, 및 Lin28가 사용된다.

[0131] **[00138]** iPSC는 일단 유도되면 다능성을 유지하기에 충분한 배지 중에서 배양될 수 있다. 특정 구현예에서, 비한정 조건이 사용될 수 있는데; 예를 들어, 만능 세포는 섬유아세포 피더 세포 또는 줄기 세포를 미분화 상태로 유지하기 위해 섬유아세포 피더 세포에 노출된 배지 상에서 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 피더 세포로서 세포 분열을 종료시키기 위해 방사선 또는 항생제로 처리된 마우스 배아 섬유아세포의 공존 하에 배양된다. 대안으로, 만능 세포는 TESR™ 배지 또는 E8™/필수 8™ 배지와 같은 합성된 피더 독립적인 배양 시스템을 사용하여 배양되어 필수적으로 미분화 상태로 유지될 수 있다.

[0132] **V. 유전학적으로 가공된 항원 수용체**

[0133] **[00139]** 본원 개시내용의 면역 세포는 가공된 TCR, CAR, 키메라 사이토킨 수용체, 케모킨 수용체, 이의 배합물 등과 같은 항원 수용체를 발현하도록 유전학적으로 가공될 수 있다. 예를 들어, 면역 세포는 암 항원에 대한 항

원 특이성을 갖는 CAR 및/또는 TCR을 발현하도록 변형된다. 상이한 항원에 대한 것과 같은 다중 CAR 및/또는 TCR은 면역 세포에 첨가될 수 있다. 일부 양상에서, 면역 세포는 CRISPR을 사용한 억제성 유전자좌에서 CAR 또는 TCR을 녹-인시킴에 의해 CAR 또는 TCR을 발현하도록 가공된다.

[0134] **[00140]** 변형을 위한 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 상기 문헌(Sambrook and Ausubel)을 참조한다. 예를 들어, 세포는 문헌(참조: Heemskerk et al., 2008 and Johnson et al., 2009)에 기재된 형질도입 기술을 사용하여, 암 항원에 대해 항원 특이성을 갖는 TCR을 발현하도록 형질도입될 수 있다.

[0135] **[00141]** 전장 TCR α 및 β (또는 γ 및 δ) 쇄를 암호화하는 RNA의 전기천공은 레트로바이러스적으로 형질도입되고 내인성 TCR 쇄의 쌍 형성에 의해 유발된 자가반응성을 갖는 장기간의 문제점을 극복하기 위한 대안으로서 사용될 수 있다. 상기 대안적 쌍형성이 일시적 형질감염 전략에서 일어나지만,능히 생성된 자가반응성 T 세포는 일부 시간 후 자가반응성을 상실하는데 그 이유는 형질도입된 TCR α 및 β 쇄가 단지 일시적으로 발현되기 때문이다. 도입된 TCR α 및 β 쇄 발현이 감소되는 경우, 단지 정상의 자가 T 세포를 잔류시킨다. 이것은 전장 TCR 쇄가 도입된 TCR 쇄를 결코 상실하지 않아 환자에서 일정한 해당 자가반응성을 유발하는 안정한 레트로바이러스 형질도입에 의해 도입되는 경우가 아니다.

[0136] **[00142]** 일부 구현예에서, 상기 세포는 하나 이상의 항원 수용체를 암호화하는 유전학적 가공을 통해 도입된 하나 이상의 핵산, 및 상기 핵산의 유전학적으로 가공된 생성물을 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 즉, 통상적으로 가공된 세포 및/또는 상기 세포가 유래되는 유기체에서 발견되지 않는, 또 다른 유기체 또는 세포로부터 수득된 것과 같이 세포로부터 수득된 세포 또는 샘플 중에 존재하지 않는 이종성이다. 일부 구현예에서, 핵산은 천연적으로 존재하지 않는, 예를 들어, 천연에서 발견되지 않는 핵산(예를 들어, *키메라*)이다.

[0137] **[00143]** 일부 구현예에서, CAR은 항원에 특이적으로 결합하는 세포외 항원-인지 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, 상기 항원은 세포 표면 상에서 발현되는 단백질이다. 일부 구현예에서, CAR은 TCR-유사 CAR이고 상기 항원은 가공된 펩타이드 항원, 예를 들어, TCR과 같이 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자와 관련하여 세포 표면 상에서 인지되는 세포내 단백질의 펩타이드 항원이다.

[0138] **[00144]** CAR 및 재조합 TCR을 포함하는 예시적 항원 수용체, 및 수용체를 가공하고 세포에 도입하기 위한 방법은 예를 들어, 문헌(참조: 국제 특허 출원 공개 공보 WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061, 미국 특허 출원 공개 공보 US2002131960, US2013287748, US20130149337, 미국 특허 제6,451,995호, 제7,446,190호, 제8,252,592호, 제8,339,645호, 제8,398,282호, 제7,446,179호, 제6,410,319호, 제7,070,995호, 제7,265,209호, 제7,354,762호, 제7,446,191호, 제8,324,353호, 및 제8,479,118호, 및 유럽 특허 출원 EP2537416)에 기재된 것들, 및/또는 문헌(참조: Sadelain et al., 2013; Davila et al. 2013; Turtle et al., 2012; Wu et al., 2012)에 기재된 것들을 포함한다. 일부 양상에서, 유전학적으로 가공된 항원 수용체는 미국 특허 제7,446,190호에 기재된 바와 같은 CAR, 및 국제 특허 출원 공개 공보 WO/2014055668 A1에 기재된 것들을 포함한다.

[0139] **A. 키메라 항원 수용체**

[0140] **[00145]** 일부 구현예에서, CAR은 다음을 포함한다: a) 하나 이상의 세포내 신호전달 도메인, b) 막관통 도메인, 및 c) 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인.

[0141] **[00146]** 일부 구현예에서, 가공된 항원 수용체는 활성화 또는 자극 CAR, 동시 자극 CAR (문헌참조: WO2014/055668), 및/또는 억제 CAR (iCAR, 문헌(Fedorov *et al.*, 2013)을 참조한다)을 포함하는 CAR을 포함한다. CAR은 일반적으로 일부 양상에서 링커 및/또는 막관통 도메인(들)을 통해 하나 이상의 세포내 신호전달 성분에 연결된 세포외 항원 (또는 리간드) 결합 도메인을 포함한다. 상기 분자는 전형적으로 천연 항원 수용체를 통한 신호, 동시 자극 수용체와 조합된 상기 수용체를 통한 신호 및/또는 단독의 동시 자극 수용체를 통한 신호를 모방하거나 근접한다.

[0142] **[00147]** 본원의 개시내용의 특정 구현예는 세포내 신호전달 도메인, 막관통 도메인 및 하나 이상의 신호전달 모티프를 포함하는 세포외 도메인을 포함하는, 면역원성을 감소시키기 위해 사람화된 CAR (hCAR)을 포함하는 항원-특이적 CAR 폴리펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는, 핵산의 용도에 관한 것이다. 특정 구현예에서, CAR은 하나 이상의 항원 간의 공유된 공간을 포함하는 에피토프를 인지할 수 있다. 특정 구현예에서, 결합 영역은 모노클로날 항체의 상보성 결정 영역, 모노클로날 항체의 가변 영역 및/또는 이의 항원 결합 단편을 포함할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 상기 특이성은 수용체에 결합하는 펩타이드 (예를 들어, 사이토카인)로부터 유래한다.

[0143] **[00148]** 사람 CAR 핵산은 사람 환자에 대한 세포성 면역치료요법을 증진시키기 위해 사용되는 사람 유전자들일

수 있는 것으로 고려된다. 특이적 구현예에서, 본 발명은 전장 CAR cDNA 또는 암호화 영역을 포함한다. 항원 결합 영역 또는 도메인은 본원에 참조로 인용되는 미국 특허 제7,109,304호에 기재된 것들과 같은 특정 사람 모노클로날 항체로부터 유래된 단일쇄 가변 단편 (scFv)의 V_H 및 V_L 쇄의 단편을 포함할 수 있다. 상기 단편은 또한 사람 항원-특이적 항체의 임의의 수의 상이한 항원 결합 도메인일 수 있다. 보다 구체적인 구현예에서, 상기 단편은 사람 세포에서 발현을 위한 사람 코돈 용법을 위해 최적호된 서열에 의해 암호화된 항원-특이적 scFv이다.

[0144] **[00149]** 정렬은 다량체성, 예를 들어, 디아바디 또는 다량체일 수 있다. 다량체는 경쇄 및 중쇄의 가변부의 가교 결합쌍에 의해 디아바디로 형성될 가능성이 높다. 작제물의 힌지 부분은 전체적으로 결실되고, 제1 시스테인이 유지되고, 세린 보다는 프롤린 치환, 제1 시스테인까지 절단된 다중 대안물을 가질 수 있다. Fc 부분은 결실될 수 있다. 안정하고/하거나 이량체화하는 임의의 단백질은 상기 목적에 작용할 수 있다. Fc 도메인, 예를 들어, 사람 면역글로불린으로부터의 CH2 또는 CH3 도메인 중 단지 하나를 사용할 수 있다. 또한, 이량체화를 개선시키기 위해 변형된 사람 면역글로불린의 힌지, CH2 및 CH3 영역을 사용할 수 있다. 또한 단지 면역글로불린의 힌지 부분을 사용할 수 있다. 또한 CD8알파 부분을 사용할 수 있다.

[0145] **[00150]** 일부 구현예에서, CAR 핵산은 막관통 도메인 및 변형된 CD28 세포내 신호전달 도메인과 같은, 다른 동시자극 수용체를 암호화하는 서열을 포함한다. 다른 동시자극 수용체는 하나 이상의 CD28, CD27, OX-40 (CD134), DAP10, DAP12 및 4-1BB (CD137)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. CD3z에 의해 개시된 원발성 신호에 추가로, 사람 CAR에 삽입된 사람 동시 자극 수용체에 의해 제공된 추가의 신호는 NK 세포의 완전한 활성화를 위해 중요하고 입양 면역요법의 생체내 지속성 및 치료학적 성공의 개선을 도와줄 수 있다.

[0146] **[00151]** 일부 구현예에서, 입양 치료요법에 의해 표적화될 특정 세포 유형에서 발현되는 항원, 예를 들어, 암 마커 및/또는 약화된 반응을 유도하기 위해 의도된 항원, 예를 들어, 정상 또는 비-환부 세포 유형 상에 발현되는 항원과 같은 특정 항원 (또는 마커 또는 리간드)에 대한 특이성을 갖는 CAR이 작제된다. 따라서, CAR은 전형적으로 세포외 부분에서, 하나 이상의 항원 결합 분자, 예를 들어, 하나 이상의 항원 결합 단편, 도메인, 또는 이의 일부, 또는 하나 이상의 항체 가변 도메인, 및/또는 항체 분자를 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 모노클로날 항체 (mAb)의 가변 중쇄 (VH) 및 가변 경쇄 (VL)로부터 유래된 단일쇄 항체 단편 (scFv)와 같은 항에 분자의 항원 결합 부분 또는 부분들을 포함한다.

[0147] **[00152]** 키메라 항원 수용체의 특정 구현예에서, 수용체의 항원 특이적 부분(이는 항원 결합 영역을 포함하는 세포외 도메인으로서 언급될 수 있다)은 종양 관련 항원 또는 병원체-특이적 항원 결합 도메인을 포함한다. 항원은 패턴-인지 수용체, 예를 들어, Dectin-1에 의해 인지되는 탄수화물 항원을 포함한다. 종양 관련 항원은 이것이 종양 세포의 세포 표면 상에서 발현되는 한 임의의 종류일 수 있다. 종양 관련 항원의 예시적 구현예는 CD19, CD20, 암배아 항원, 알파페토단백질, CA-125, MUC-1, CD56, EGFR, c-Met, AKT, Her2, Her3, 상피 종양 항원, 흑색종-관련 항원, 머스타드 p53, 돌연변이된 ras 등을 포함한다. 특정 구현예에서, CAR은 사이토킨과 동시 발현하여 저량의 종양 관련 항원이 있는 경우 지속성을 개선시킬 수 있다. 예를 들어, CAR은 하나 이상의 사이토킨, 예를 들어, IL-7, IL-2, IL-15, IL-12, IL-18, IL-21, 또는 이의 배합물과 함께 동시 발현될 수 있다.

[0148] **[00153]** 키메라 수용체를 암호화하는 개방 판독 프레임의 서열은 게놈 DNA 공급원, cDNA 공급원으로부터 수득될 수 있거나 합성되거나 (예를 들어, PCR을 통해) 이의 조합일 수 있다. 게놈 DNA의 크기 및 인트론의 수에 의존하여, 인트론이 mRNA를 안정화시키는것으로 밝혀짐에 따라 cDNA 또는 이의 조합을 사용하는 것이 바람직할 수 있다. 또한, 추가로, mRNA를 안정화시키기 위해 내인성 또는 외인성 비-암호화 영역을 사용하는 것이 유리할 수 있다.

[0149] **[00154]** 키메라 작제물은 누출된 DNA로서 또는 적합한 벡터에서 면역 세포로 도입될 수 있는 것으로 고려된다. 세포를, 누출된 DNA를 사용하는 전기천공에 의해 안정하게 형질감염시키는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제6,410,319호를 참조한다. 누출된 DNA는 일반적으로 발현을 위한 적당한 배향에서 플라스미드 발현 벡터 내 함유된, 키메라 수용체를 암호화하는 DNA를 언급한다.

[0150] **[00155]** 대안적으로, 바이러스 벡터(예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노-관련 바이러스 벡터 또는 렌티바이러스 벡터)를 사용하여 키메라 작제물을 마우스 세포에 도입할 수 있다. 본원의 개시 내용의 방법에 따라 사용하기 위해 적합한 벡터는 면역 세포에서 비-복제성이다. 바이러스를 기반으로 하는 다수의 벡터가 공지되어 있고, 여기서, 세포에 유지되는 바이러스의 카피수는 세포의 생존율을 유지하기에 충분히 낮고, 예를 들어, HIV, SV40, EBV, HSV, 또는 BPV를 기반으로 하는 벡터가 있다.

[0151] [00156] 일부 양상에서, 항원-특이적 결합, 또는 인지 성분은 하나 이상의 막관통 및 세포내 신호전달 도메인에 연결된다. 일부 구현예에서, CAR은 CAR의 세포외 도메인에 융합된 막관통 도메인을 포함한다. 하나의 구현예에서, 천연적으로 CAR 내 도메인 중 하나와 연합된 막관통 도메인이 사용된다. 일부 경우에, 막관통 도메인은 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해 동일하거나 상이한 표면 막 단백질의 막관통 도메인으로의 도메인의 결합을 회피하도록 아미노산 치환에 의해 선택되거나 변형된다.

[0152] [00157] 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 천연으로부터 또는 합성 공급원으로부터 유래한다. 공급원이 천연인 경우, 일부 양상에서 도메인은 임의의 막 결합된 또는 막관통 단백질로부터 유래한다. 막관통 영역은 T-세포 수용체, CD28, CD3 제타, CD3 엡실론, CD3 감마, CD3 델타, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD 16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD 134, CD137, CD154, ICOS/CD278, GITR/CD357, NKG2D, 및 DAP 분자의 알파, 베타, 또는 제타 쇄로부터 유래된 것들(즉, 이의 적어도 막관통 영역(들)을 포함하는)을 포함한다. 대안적으로, 일부 구현예에서 막관통 도메인은 합성이다. 일부 양상에서, 합성 막관통 도메인은 주로 소수성 잔기들, 예를 들어, 류신 및 발린을 포함한다. 일부 양상에서, 페닐알라닌, 트립토판 및 발린의 트리플렛은 합성 막관통 도메인의 각각의 말단에서 발견된다.

[0153] [00158] 특정 구현예에서, NK 세포와 같은 면역 세포를 유전학적으로 변형시키기 위해 본원에 기재된 플랫폼 기술은 (i) 전기천공 장치 (예를 들어, 뉴클레오펙터)를 사용한 비-바이러스 유전자 전달, (ii) 엔도도메인(예를 들어, CD28/CD3-ζ, CD137/CD3-ζ, 또는 다른 조합)을 통해 신호를 전달하는 CAR, (iii) 항원-인지 도메인을 세포 표면으로 연결하는 다양한 길이의 세포외 도메인을 갖는 CAR 및 일부 경우에, (iv) CAR^{+} 면역 세포를 강하게 및 수적으로 확장시킬 수 있도록 K562로부터 유래된 인공 항원 제공 세포 (aAPC)(문헌참조: Singh *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2011).

[0154] **B. T 세포 수용체 (TCR)**

[0155] [00159] 일부 구현예에서, 유전학적으로 가공된 수용체는 재조합 TCR 및/또는 천연적으로 존재하는 T 세포로부터 클로닝된 TCR을 포함한다. "T 세포 수용체" 또는 "TCR"은 가변 α 및 β 쇄 (또한 각각 TCRα 및 TCRβ로서 공지된) 또는 가변 γ 및 δ 쇄 (또한 각각 TCRγ 및 TCRδ로서 공지된)를 함유하고 MHC 수용체에 결합된 항원 펩타이드에 특이적으로 결합할 수 있는 분자를 언급한다. 일부 구현예에서, TCR은 αβ 형태이다.

[0156] [00160] 전형적으로, αβ 및 γδ 형태로 존재하는 TCR은 일반적으로 구조적으로 유사하지만 이들을 발현하는 T 세포는 고유의 해부하적 위치 또는 기능을 가질 수 있다. TCR은 세포의 표면 상에서 또는 가용성 형태로 발견될 수 있다. 일반적으로, TCR은 T 세포 (또는 T 림프구)의 표면상에서 발견되고, 여기서, 이것은 일반적으로 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 분자에 결합된 항원을 인지하는데 관여한다. 일부 구현예에서, TCR은 또한 불변 도메인, 막관통 도메인 및/또는 짧은 세포질 꼬리를 함유할 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Janeway et al, 1997) 예를 들어, 일부 양상에서, TCR의 각각의 쇄는 하나의 N-말단 면역글로불린 가변 도메인, 하나의 면역글로불린 불변 도메인, 막관통 영역 및 C-말단에 짧은 세포질 꼬리를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 신호 전달을 매개하는데 관여하는 CD3 복합체의 영구적 단백질과 연관된다. 달리 기재되지 않는 경우, 용어 "TCR"은 이의 기능성 TCR 단편을 포괄하는 것으로 이해되어야만 한다. 상기 용어는 또한 αβ 형태 또는 γδ 형태의 TCR을 포함하는, 온전하거나 전장의 TCR를 포괄한다.

[0157] [00161] 따라서, 본원의 목적을 위해, TCR에 대한 언급은 임의의 TCR 또는 MHC 분자, 즉, MHC-펩타이드 복합체에 결합된 특이적 항원 펩타이드에 결합하는 TCR의 항원-결합 부분과 같은 기능성 단편을 포함한다. 상호교환적으로 사용될 수 있는 "항원 결합 부분" 또는 항원 결합 단편" 은 TCR의 구조적 도메인의 일부를 함유하지만 완전한 TCR이 결합하는 항원(예를 들어, MHC-펩타이드 복합체)에 결합하는 분자를 언급한다. 일부 경우에, 항원 결합 부분은 TCR의 가변 도메인, 예를 들어, 특정 MHC-펩타이드 복합체에 결합하는 것에 대한 결합 부위를 형성하기에 충분한 TCR의 가변 α 쇄 및 가변 β 쇄와 같은 TCR의 가변 도메인을 함유하고, 여기서, 각각의 쇄는 3개의 상보성 결정 영역을 함유한다.

[0158] [00162] 일부 구현예에서, TCR 쇄의 가변 도메인은 연합하여 TCR 분자의 결합 부위를 형성함에 의해 항원 인지를 부여하고 펩타이드 특이성을 결정하는, 면역글로불린과 유사한 루프 또는 상보성 결정 영역 (CDR)을 형성한다. 전형적으로, 면역글로불린과 같이, CDR은 프레임워크 영역 (FR)에 의해 분리된다(문헌참조: 예를 들어, Jores *et al.*, 1990; Chothia *et al.*, 1988; Lefranc *et al.*, 2003). 일부 구현예에서, CDR3은 가공된 항원을 인지하기 위해 관여하는 주요 CDR이지만, 알파 쇄의 CDR1은 또한 항원성 펩타이드의 N-말단부와 상호작용하는 것으로 나타난 반면 베타 쇄의 CDR1은 펩타이드의 C-말단부와 상호작용한다. CDR2는 MHC 분자를 인지하는 것으

로 사료된다. 일부 구현예에서, β-쇄의 가변 영역은 추가로 초가변 (HV4) 영역을 함유할 수 있다.

[0159] **[00163]** 일부 구현예에서, TCR 쇄는 불변 도메인을 함유한다. 예를 들어, 면역글로불린과 같이, TCR 쇄(예를 들어, α-쇄, β-쇄)의 세포외 부분은 N-말단에서 2개의 면역글로불린 도메인, 가변 도메인 (예를 들어, V_a 또는 Vp; 전형적으로 캐뱃 넘버링을 기준으로 아미노산 1 내지 116: Kabat *et al.*, "Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.), 및 세포막에 인접한 하나의 불변 도메인(예를 들어, α-쇄 불변 도메인 또는 C_a, 전형적으로 캐뱃을 기준으로 아미노산 117 내지 259, β-쇄 불변 도메인 또는 Cp, 전형적으로 캐뱃을 기준으로 아미노산 117 내지 295)를 함유할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 2개의 쇄에 의해 형성되는 TCR의 세포외 부분은 CDR을 함유하는, 2개의 막-근접 불변 도메인 및 2개의 막-원위 가변 도메인을 함유한다. TCR 도메인의 불변 도메인은 짧은 연결 서열을 함유하고, 여기서, 시스테인 잔기는 디설파이드 결합을 형성하고 이는2개의 쇄 사이를 연결한다. 일부 구현예에서, TCR은 α 및 β 쇄 각각에서 추가의 시스테인 잔기를 가져 TCR은 불변 도메인에서 2개의 디설파이드 결합을 함유한다.

[0160] **[00164]** 일부 구현예에서, TCR 쇄는 막관통 도메인을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 양으로 하전되어 있다. 일부 경우에서, TCR 쇄는 세포질 꼬리를 함유한다. 일부 경우에, 상기 구조는 TCR이 CD3과 같은 다른 분자와 연합할 수 있게 한다. 예를 들어, 막관통 영역을 갖는 불변 도메인을 함유하는 TCR은 세포막에 단백질을 고정시키고 CD3 신호전달 장치 또는 복합체의 영구 서브유닛과 연합할 수 있다.

[0161] **[00165]** 일반적으로, CD3은 포유동물 및 ζ-쇄에서 3개의 고유 쇄(γ, δ, 및 ε)를 가질 수 있는 다중-단백질 복합체이다 . 예를 들어, 포유동물에서, 복합체는 CD3g 쇄, CD3d 쇄, 2개의 CD3e 쇄 및 CD3ζ 쇄의 동종이량체를 함유할 수 있다. CD3g, CD3d, 및 CD3e 쇄는 단일 면역글로불린 도메인을 함유하는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 고도의 관련 세포 표면 단백질이다. CD3g, CD3d, 및 CD3e 쇄의 막관통 영역은 음으로 하전되어 있고, 이는 이들 쇄가 양으로 하전된 T 세포 수용체 쇄와 연합하도록 하는 특징이다. CD3g, CD3d, 및 CD3e 쇄의 세포내 꼬리 각각은 면역수용체 티로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로서 공지된 단일의 보존된 모티프를 함유하는 반면 각각의 CD3ζ 쇄는 3개를 갖는다. 일반적으로, ITAM은 TCR 복합체의 신호전달 능력에 관여한다. 이들 악세사리 분자는 음으로 하전된 막관통 영역을 갖고 TCR로부터 세포로 신호를 전파하는 역할을 수행한다. CD3- 및 ζ-쇄는 TCR과 함께 T 세포 수용체 복합체로서 공지된 것을 형성한다.

[0162] **[00166]** 일부 구현예에서, TCR은 2개의 쇄 α 및 β (또는 임의로 γ 및 δ)의 이종이량체일 수 있거나 이것은 단일쇄 TCR 작제물일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 예를 들어, 디설파이드 결합 또는 다설파이드 결합들에 의해 연결된 2개의 별개의 쇄 (α 및 β 쇄 또는 γ 및 δ 쇄)를 함유하는 이종이량체이다. 일부 구현예에서, 표적 항원 (예를 들어, 암 항원)에 대한 TCR을 동정하고 세포에 도입한다. 일부 구현예에서, TCR을 암호화하는 핵산은 예를 들어, 공용의 TCR DNA 서열의 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 증폭 (PCR)에 의해 다양한 공급원으로부터 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 생물학적 공급원으로부터, 예를 들어, T 세포 (예를 들어, 세포독성 T 세포), T 세포 하이브리도마 또는 다른 공용의 공급원과 같은 세포로부터 수득된다. 일부 구현예에서, T 세포는 생체내 단리된 세포로부터 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 고친화성 T 세포 클론은 환자로부터 단리될 수 있고 TCR이 단리된다. 일부 구현예에서, T 세포는 배양된 T 세포 하이브리도마 또는 클론일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 항원에 대한 TCR 클론은 사람 면역계 유전자 (예를 들어, 사람 백혈구 항원 시스템 또는 HLA)로 가공된 유전자전이 마우스에서 생성되었다. 예를 들어, 문헌(tumor antigens (Parkhurst et al., 2009; Cohen et al., 2005))을 참조한다. 일부 구현예에서 파아지 디스플레이를 사용하여 표적 항원에 대한 TCR을 단리한다(문헌참조: 예를 들어, Varela-Rohena et al., 2008, 및 Li, 2005). 일부 구현예에서, TCR 또는 이의 항원-결합 부분은 합성적으로 TCR의 서열 지식으로부터 합성적으로 생성될 수 있다.

[0163] **C. 항원-제공 세포**

[0164] **[00167]** 대식세포, B 림프구 및 수지상 세포를 포함하는 항원-제공 세포는 이들의 특정 MHC 분자의 발현으로 구분된다. APC는 이들의 외부 세포막 상에 MHC 분자와 함께 항원을 내재화하고 상기 항원의 일부를 재발현한다. 상기 MHC는 다중 유전자좌와 함께 대형 유전학적 복합체이다. MHC 유전자좌는 부류 I 및 부류 II MHC로서 언급되는 2개 부류의 MHC 막 분자를 암호화한다. T 헬퍼 림프구는 일반적으로 MHC 부류 II 분자와 연합된 항원을 인지하고, T 세포독성 림프구는 MHC 부류 I 분자와 연합된 항원을 인지한다. 사람에서, MHC는 HLA 복합체로서 언급되고 마우스에서 H-2 복합체로서 언급된다.

[0165] **[00168]** 일부 경우에, aAPC는 구현예의 치료학적 조성물 및 세포 치료요법 생성물을 제조하는데 유용하다. 항원

제공 시스템의 제조 및 용도에 관한 일반 지침에 대해, 예를 들어, 문헌(미국 특허 제6,225,042호, 제6,355,479호, 제6,362,001호 및 제6,790,662호; 미극 특허 출원 공개 공보 제2009/0017000호 및 제2009/0004142호; 및 국제 공개 공보 제WO2007/103009호)을 참조한다.

[0166] **[00169]** aAPC 시스템은 적어도 하나의 외인성 원조 분자를 포함할 수 있다. 분자를 원조하는 임의의 적합한 수 및 조합이 사용될 수 있다. 원조 분자는 동시-자극 분자와 접착 분자와 같은 원조 분자로부터 선택될 수 있다. 예시적인 동시-자극 분자는 CD86, CD64 (FcγRI), 41BB 라간드, 및 IL-21을 포함한다. 접착 분자는 탄수화물-결합 당단백질, 예를 들어, 셀렉틴, 막관통 결합 당단백질, 예를 들어, 인테그린, 칼슘-의존성 단백질, 예를 들어, 캐드헤린, 및 단일-통과 막관통 면역글로불린 (ig) 슈퍼패밀리 단백질, 예를 들어, 예를 들어, 세포 대 세포 또는 세포 대 매트릭스 접촉을 촉진시키는 간 접착 분자 (ICAM)를 포함할 수 있다. 예시적 접착 분자는 LFA-3 및 ICAM, 예를 들어 ICAM-1을 포함한다. 동시-자극 분자 및 접착 분자를 포함하는, 예시적인 원조 분자의 선택, 클로닝, 제조 및 발현을 위해 유용한 기술, 방법 및 시약은 예를 들어, 미국 특허 제6,225,042호, 제6,355,479호, 및 제6,362,001호에 예시되어 있다.

[0167] **D. 항원**

[0168] **[00170]** 유전학적으로 가공된 항원 수용체에 의해 표적화된 항원들 중에는 입양 세포 치료요법을 통해 표적화될 질환, 병태 또는 세포 유형과 관련하여 발현되는 것들이다. 질환 및 병태 중에는 혈액암, 면역계의 암, 예를 들어, 림프종, 백혈병 및/또는 골수종, 예를 들어, B, T, 및 골수 백혈병, 림프종 및 다발성 골수종을 포함하는, 암 및 종양을 포함하는 증식성, 신생물성 및 악성 질환 및 장애들이 있다. 일부 구현예에서, 상기 항원은 정상 또는 비-표적화된 세포 또는 조직과 비교하여 질환 또는 병태의 세포, 예를 들어, 종양 또는 병원성 세포 상에서 선택적으로 발현되거나 과발현된다. 다른 구현예에서, 항원은 정상 세포 상에서 발현되고/되거나 가공된 세포 상에서 발현된다.

[0169] **[00171]** 임의의 적합한 항원은 본원의 방법에서 표적화될 수 있다. 항원은 특정 암 세포와 연관될 수 있지만 일부 경우에 비-암성 세포와는 연관되어 있지 않다. 예시적인 항원은 감염성 제제로부터의 항원 분자, 자동-/자가-항원, 종양-/암-연합된 항원, 및 종양 신생항원을 포함하지만이에 제한되지 않는다(문헌참조: Linnemann *et al.*, 2015). 특정 양상에서, 항원은 NY-ESO, EGFRvIII, Muc-1, Her2, CA-125, WT-1, Mage-A3, Mage-A4, Mage-A10, TRAIL/DR4, 및 CEA를 포함한다. 특정 양상에서, 2개 이상의 항원 수용체에 대한 항원은 CD19, EBNA, WT1, CD123, NY-ESO, EGFRvIII, MUC1, HER2, CA-125, WT1, Mage-A3, Mage-A4, Mage-A10, TRAIL/DR4, 및/또는 CEA를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이들 항원에 대한 서열은 예를 들어, GenBank® 데이터베이스에서 당업계에 공지되어 있다: CD19 (승인 번호 NG_007275.1), EBNA (승인 번호 NG_002392.2), WT1 (승인 번호 NG_009272.1), CD123 (승인 번호 NC_000023.11), NY-ESO (승인 번호 NC_000023.11), EGFRvIII (승인 번호 NG_007726.3), MUC1 (승인 번호 NG_029383.1), HER2 (승인 번호 NG_007503.1), CA-125 (승인 번호 NG_055257.1), WT1 (승인 번호 NG_009272.1), Mage-A3 (승인 번호 NG_013244.1), Mage-A4 (승인 번호 NG_013245.1), Mage-A10 (승인 번호 NC_000023.11), TRAIL/DR4 (승인 번호 NC_000003.12), 및/또는 CEA (승인 번호 NC_000019.10).

[0170] **[00172]** 종양 관련 항원은 예를 들어, 전립선암, 유방암, 결장직장암, 폐암, 췌장암, 신장암, 중피종, 난소암, 간암, 뇌암, 골암, 위암, 비장암, 고환암, 자궁경부암, 항문암, 담낭암, 갑상선암, 또는 흑색종암으로부터 유래할 수 있다. 예시적인 종양 관련 항원 또는 종양 세포 유래된 항원은 MAGE 1, 3, 및 MAGE 4 (또는 다른 MAGE 항원, 예를 들어, 국제 특허 공개 공보 WO 99/40188에 기재된 것들); PRAME; BAGE; RAGE, Lage (또한 NY-ESO-1으로서 공지된); SAGE; 및 HAGE 또는 GAGE를 포함한다. 종양 항원의 이들 비제한적인 예는 흑색종, 폐 암종, 육종 및 방광암종과 같은 광범위한 종양 유형에서 발현된다. 예를 들어, 미국 특허 제6,544,518호를 참조한다. 전립선 암 종양-관련 항원은 예를 들어, 전립선 특이적 막 항원(PSMA), 전립선-특이적 항원 (PSA), 전립선 산 포스페이트, NKX3.1, 및 전립선의 6개 막관통 상피 항원(STEAP)을 포함한다.

[0171] **[00173]** 다른 종양 관련 항원은 Plu-1, HASH-1, HasH-2, Cripto 및 Criptin을 포함한다. 추가로, 종양 항원은 많은 암의 치료에 유용한, 짧은 10개 아미노산 길이의 펩타이드인 전장 고나도트로핀 호르몬 방출 호르몬 (GnRH)과 같은 자가 펩타이드 호르몬일 수 있다.

[0172] **[00174]** 종양 항원은 종양-관련 항원 발현, 예를 들어, HER-2/neu 발현을 특징으로 하는 암으로부터 유래된 종양 항원을 포함한다. 관심 대상의 종양 관련 항원은 멜라닌세포-흑색종 계통 항원 MART-1/Melan-A, gp100, gp75, mda-7, 티로시나제 및 티로시나제 관련 단백질과 같은 계통 특이적 종양 항원을 포함한다. 예시적인 종양-관련 항원은 p53, Ras, c-Myc, 세포질 세린/트레오닌 키나제 (예를 들어, A-Raf, B-Raf, 및 C-Raf, 사이클린-의존성 키나제), MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, MAGE-A4, MAGE-A6, MAGE-A10, MAGE-A12, MART-1, BAGE, DAM-6,

-10, GAGE-1, -2, -8, GAGE-3, -4, -5, -6, -7B, NA88-A, MART-1, MC1R, Gp100, PSA, PSM, 티로시나제, TRP-1, TRP-2, ART-4, CAMEL, CEA, Cyp-B, hTERT, hTRT, iCE, MUC1, MUC2, 포스포이노시티드 3-키나제(PI3K), TRK 수용체, PRAME, P15, RU1, RU2, SART-1, SART-3, 발름스 종양 항원(Wilms' tumor antigen) (WT1), AFP, -카테닌/m, 카스파제-8/m, CEA, CDK-4/m, ELF2M, GnT-V, G250, HSP70-2M, HST-2, KIAA0205, MUM-1, MUM-2, MUM-3, 미오신/m, RAGE, SART-2, TRP-2/INT2, 707-AP, 아넥신 II, CDC27/m, TPI/mbcr-abl, BCR-ABL, 인터페론 조절 인자 4 (IRF4), ETV6/AML, LDLR/FUT, Pml/RAR, 종양 관련 칼슘 신호 전달인자 1 (TACSTD1) TACSTD2, 수용체 티로신 키나제(*예를 들어,* 상피 성장 인자 수용체 (EGFR) (특히, EGFRvIII), 혈소판 유래된 성장 인자 수용체 (PDGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR)), 세포질 티로신 키나제(예를 들어, src-패밀리, syk-ZAP70 패밀리), 인테그린-연결된 키나제(ILK), 신호 전달인자 및 전사 STAT3, STAT5, 및 STAT6의 신호 전달인자 및 활성화인자(*예를 들어,* HIF-1 및 HIF-2), 핵 인자 -카파 B (NF-B), 노치 수용체(*예를 들어,* 노치1-4), c-Met, 라파마이신의 포유동물 표적(mTOR), WNT, 세포외 신호 조절된 키나제 (ERK), 및 이들의 조절 서브유닛, PMSA, PR-3, MDM2, 메소텔린, 신장 세포 암종-5T4, SM22-알파, 카보닉 언하이드라제 I (CAI) 및 IX (CAIX) (또한 G250로서 공지된), STEAD, TEL/AML1, GD2, 프로테이나제 3, hTERT, 육종 전좌 중지점(breakpoint), EphA2, ML-IAP, EpCAM, ERG (TMPRSS2 ETS 융합 유전자), NA17, PAX3, ALK, 안드로겐 수용체, 사이클린 B1, 폴리시일산, MYCN, RhoC, GD3, 푸코실 GM1, 메소텔리안, PSCA, sLe, PLAC1, GM3, BORIS, Tn, GLoboH, NY-BR-1, RGsS, SART3, STn, PAX5, OY-TES1, 정자 단백질 17, LCK, HMWMAA, AKAP-4, SSX2, XAGE 1, B7H3, 레구마인, TIE2, Page4, MAD-CT-1, FAP, MAD-CT-2, fos 관련 항원 1, CBX2, CLDN6, SPANX, TPTE, ACTL8, ANKRD30A, CDKN2A, MAD2L1, CTAG1B, SUNC1, LRRN1 및 유전자형 중 임의의 하나 이상으로부터 유래되거나 이들을 포함하는 종양 항원을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0173] **[00175]** 항원은 종양 세포로부터 돌연변이된 유전자로부터 또는 정상 세포와 비교하여 종양 세포에서 상이한 수준으로 전사되는 유전자로부터 유래된 에피토프 영역 또는 에피토프 펩타이드, 예를 들어, 텔로머라제 효소, 수르비빈, 메소텔린, 돌연변이된 ras, bcr/abl 재배열, Her2/neu, 돌연변이된 또는 야생형 p53, 시토크롬 P450 1B1, 및 비정상적으로 발현된 인트론 서열, 예를 들어, N-아세틸글루코사미닐트랜스퍼라제-V; 흑색종 및 B-세포 림프종에서 특유의 유전자형을 생성하는 면역글로불린 유전자의 클론 재정렬; 발암바이러스 공정으로부터 유래된 에피토프 영역 또는 에피토프 펩타이드를 포함하는 종양 항원, 예를 들어, 사람 파필로마 바이러스 단백질 E6 및 E7; 엡슈타인 바르 바이러스 단백질 LMP2; 종양-선택적 발현을 갖는 비돌연변이된 발암태아 단백질, 예를 들어, 암배아 항원 및 알파-페토단백질을 포함할 수 있다.

[0174] **[00176]** 다른 구현예에서, 항원은 병원성 미생물로부터 또는 기회주의적 병원성 미생물 (또한 본원에서 감염성 질환 미생물로서 호칭되는), 예를 들어, 바이러스, 진균류, 기생충 및 세균으로부터 수득되거나 유래된다. 특정 구현예에서, 상기 미생물로부터 유래된 항원은 전장 단백질을 포함한다.

[0175] **[00177]** 이의 항원이 본원에 기재된 방법에 사용하기 위해 고려되는 예시적인 병원성 유기체는 사람 면역결핍 바이러스 (HIV), 헤르페스 심플렉스 바이러스(HSV), 호흡기 신시티알 바이러스(respiratory syncytial virus) (RSV), 사이토메갈로바이러스(CMV), 엡슈타인-바르 바이러스(Epstein-Barr virus) (EBV), 인플루엔자 A, B, 및 C, 수포성 구내염 바이러스 (VSV), 수포성 구내염 바이러스 (VSV), 폴리오마바이러스(예를 들어, BK 바이러스 및 JC 바이러스), 아데노바이러스, 메티실린-내성 스타필로코코스 아우레우스(*Staphylococcus aureus* (MRSA))을 포함하는 스타필로코커스 종(*Staphylococcus* species), 및 *스트렙토코커스 뉴모니아 (Streptococcus pneumoniae)를 포함하는 스트렙토코커스 종 (Streptococcus* species)을 포함한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 이들 및 본원에 기재된 바와 같은 항원으로서 사용하기 위한 다른 병원성 병원체로부터 유래된 단백질 및 상기 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 공보 및 GENBANK®, SWISS-PROT®, 및 TREMBL®와 같은 공용 데이터베이스로부터 동정될 수 있다.

[0176] **[00178]** 사람 면역결핍 바이러스 (HIV)로부터 유래된 항원은 임의의 HIV 비리온 구조적 단백질(예를 들어, gp120, gp41, p17, p24), 프로테아제, 역전사효소, 또는 tat, rev, nef, vif, vpr 및 vpu에 으해 암호화된 HIV 단백질을 포함한다.

[0177] **[00179]** 헤르페스 심플렉스 바이러스 (예를 들어, HSV 1 및 HSV2)로부터 유래된 항원은 HSV 후기 유전자로부터 발현된 단백질을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 유전자의 후기 그룹은 우세하게 비리온 입자를 형성하는 단백질을 암호화한다. 상기 단백질은 바이러스 캡시드를 형성하는 (UL): UL6, UL18, UL35, UL38 및 주요 캡시드 단백질 UL19, UL45, 및 UL27로부터의 5개의 단백질을 포함하고, 이들 각각은 본원에 기재된 바와 같은 항원으로서 사용될 수 있다. 본원에 항원으로서 사용하기 위해 고려되는 다른 예시적인 HSV 단백질은 ICP27 (H1, H2), 당단백질 B (gB) 및 당단백질 D (gD) 단백질을 포함한다. HSV 게놈은 적어도 74개 유전자를 포함하고 이들 유전

자 각각은 잠재적으로 항원으로서 사용될 수 있는 단백질을 암호화한다.

[0178] **[00180]** 사이토메갈로바이러스 (CMV)로부터 유래된 항원은 CMV 구조적 단백질, 바이러스 복제의 이메디에이트 어얼리 및 어얼리 단계 동안에 발현되는 바이러스 항원, 당단백질 I 및 III, 캡시드 단백질, 코트 단백질, 보다 낮은 매트릭스 단백질 pp65 (ppUL83), p52 (ppUL44), IE1 및 1E2 (UL123 및 UL122), UL128-UL150로부터의 유전자 클러스터로부터의 단백질 생성물 (Rykman, *et al.*, 2006), 외피 당단백질 B (gB), gH, gN, 및 pp150을 포함한다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 기재된 항원으로서 사용하기 위한 CMV 단백질은 GENBANK®, SWISS-PROT®, 및 TREMBL® (문헌참조: 예를 들어, Bennekov *et al.*, 2004; Loewendorf *et al.*, 2010; Marschall *et al.*, 2009)와 같은 공용 데이터베이스에서 동정될 수 있다.

[0179] **[00181]** 특정 구현예에서 사용하기 위해 고려되는 엡슈타인-반 바이러스(Epstein-Ban virus (EBV))로부터 유래된 항원은 EBV 용해 단백질 gp350 및 gp110, 엡슈타인-반 핵 항원 (EBNA)-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-리더 단백질(EBNA-LP) 및 잠재적 막 단백질 (LMP)-1, LMP-2A 및 LMP-2B를 포함하는 잠재적 사이클 감염 동안에 생성되는 EBV 단백질을 포함한다(문헌참조: 예를 들어, Lockey *et al.*, 2008).

[0180] **[00182]** 본원에 사용하기 위해 고려되는 호흡기 신시티알 바이러스 (RSV)로부터 유래된 항원은 RSV 게놈에 의해 암호화된 임의의 11개 단백질 또는 이의 항원성 단편을 포함한다: NS 1, NS2, N (뉴클레오캡시드 단백질), M (매트릭스 단백질) SH, G 및 F (바이러스 코트 단백질), M2 (제2 매트릭스 단백질), M2-1 (연장 인자), M2-2 (전사 조절), RNA 폴리머라제 및 인단백질 P.

[0181] **[00183]** 사용하기 위해 고려되는 수포성 구내염 바이러스 (VSV)로부터 유래된 항원은 VSV 게놈에 으해 암호화된 5개 주요 단백질, 및 이의 항원성 단편 중 임의의 하나를 포함한다: 대형 단백질 (L), 당단백질 (G), 뉴클레오단백질 (N), 인단백질 (P), 및 매트릭스 단백질 (M) (문헌참조: 예를 들어, Rieder *et al.*, 1999).

[0182] **[00184]** 특정 구현예에서 사용하기 위해 고려되는 인플루엔자 바이러스로부터 유래된 항원은 헤마글루티닌 (HA), 뉴라미니다제 (NA), 뉴클레오단백질 (NP), 매트릭스 단백질 M1 및 M2, NS1, NS2 (NEP), PA, PB1, PB1-F2, 및 PB2를 포함한다.

[0183] **[00185]** 예시적 바이러스 항원은 또한 아데노바이러스 폴리펩타이드, 알파바이러스, 칼리시바이러스 폴리펩타이드(예를 들어, 칼리시바이러스 캡시드 항원), 코로나바이러스 폴리펩타이드, 디스템페르 바이러스 폴리펩타이드, 에볼라 바이러스 폴리펩타이드, 엔테로바이러스 폴리펩타이드, 플라비바이러스 폴리펩타이드, 간염 바이러스 (AE) 폴리펩타이드 (B형 간염 코어 또는 표면 항원, C형 간염 바이러스 E1 또는 E2 당단백질, 코어, 또는 비-구조적 단백질), 헤르페스바이러스 폴리펩타이드 (헤르페스 심플렉스 바이러스 또는 바리셀라 조스터 바이러스 당단백질을 포함하는), 감염성 복막염 바이러스 폴리펩타이드, 백혈병 바이러스 폴리펩타이드, 마르부르크 바이러스 폴리펩타이드, 오르토믹소바이러스 폴리펩타이드, 파필로마 바이러스 폴리펩타이드, 파라인플루엔자 바이러스 폴리펩타이드(*예를 들어,* 헤마글루티닌 및 뉴라미니다제 폴리펩타이드), 파라믹소바이러스 폴리펩타이드, 파르보바이러스 폴리펩타이드, 페스티바이러스 폴리펩타이드, 피코나 바이러스 폴리펩타이드(*예를 들어,* 폴리오바이러스 캡시드 폴리펩타이드), 폭스 바이러스 폴리펩타이드(예를 들어, 백시니아 바이러스 폴리펩타이드), 랍비 바이러스 폴리펩타이드(예를 들어, 랍비 바이러스 당단백질 G), 레오바이러스 폴리펩타이드, 레트로바이러스 폴리펩타이드, 및 로타바이러스 폴리펩타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0184] **[00186]** 특정 구현예에서, 상기 항원은 세균성 항원일 수 있다. 특정 구현예에서, 관심 대상의 세균 항원은 분비된 폴리펩타이드일 수 있다. 다른 특정 구현예에서, 세균 항원은 세균의 외부 세포 표면 상에 노출된 폴리펩타이드 부분 또는 부분들을 갖는 항원을 포함한다.

[0185] **[00187]** 사용하기 위해 고려되는 메티실린-내성 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)(MRSA)를 포함하는 스타필로코커스 종으로부터 유래된 항원은 독성 조절제, 예를 들어, Agr 시스템, Sar 및 Sae, Arl 시스템, Sar 동족체 (Rot, MgrA, SarS, SarR, SarT, SarU, SarV, SarX, SarZ 및 TcaR), Srr 시스템 및 TRAP를 포함한다. 항원으로서 작용할 수 있는 다른 스타필로코커스 단백질은 Clp 단백질, HtrA, MsrR, 아코니타제, CcpA, SvrA, Msa, CfvA 및 CfvB를 포함한다(문헌참조: *예를 들어, Staphylococcus*: Molecular Genetics, 2008 Caister Academic Press, Ed. Jodi Lindsay). 스타필로코커스 아우레우스의 2개의 종 (N315 및 Mu50)에 대한 게놈은 서열분석되었고 예를 들어, PATRIC (PATRIC: The VBI PathoSystems Resource Integration Center, Snyder *et al.*, 2007)에서 공용화되어 있다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 항원으로서 사용하기 위한 스타필로코커스(*Staphylococcus*) 단백질은 또한 GenBank®, Swiss-Prot®, 및 TrEMBL®와 같이 다른 공용의 데이터베이스에서 동정될 수 있다.

[0186] **[00188]** 본원에 기재된 특정 구현예에서 사용하기 위해 고려되는 스트렙토코커스 뉴모니아(*Streptococcus pneumoniae*)로 부터 유래된 항원은 뉴모라이신, PspA, 콜린-결합 단백질 A (CbpA), NanA, NanB, SpnHL, PavA, LytA, Pht, 및 필린 단백질(RrgA; RrgB; RrgC)을 포함한다. 스트렙토코커스 뉴모니아의 항원 단백질은 또한 당업계에 공지되어 있고 일부 구현예에서 항원으로서 사용될 수 있다(문헌참조: 예를 들어, Zysk *et al.*, 2000). 스트렙토코커스 뉴모니아의 독성 균주의 완전한 게놈 서열은 서열분석되었고, 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 사용하기 위한 에스. 뉴모니아 단백질은 또한 GENBANK®, SWISS-PROT®, 및 TREMBL®와 같은 다른 공용의 데이터베이스에서 동정될 수 있다. 본원의 개시내용에 따른 항원에 대한 특정 관심 대상의 단백질은 뉴모코씨의 표면에 노출될 것으로 예측된 독성 인자 및 단백질을 포함한다(문헌참조: 예를 들어, Frolet et al., 2010).

[0187] **[00189]** 항원으로서 사용될 수 있는 세균 항원의 예는 액티노마이세스(*Actinomyces*) 폴리펩타이드, 바실러스(*Bacillus*) 폴리펩타이드, 박테로이데스(*Bacteroides*) 폴리펩타이드, 보르데텔라 (*Bordetella*) 폴리펩타이드, 바르토넬라(*Bartonella*) 폴리펩타이드, 보렐리아(*Borrelia*) 폴리펩타이드 (예를 들어, 비. 부르그도르페리(*B. Burgdorferi*)OspA)), 브루셀라(*Brucella*) 폴리펩타이드, 캠필로박터(*Campylobacter*) 폴리펩타이드, 카프노사이토파가(Capnocytophaga) 폴리펩타이드, 클라미디아(*Chlamydia*) 폴리펩타이드, 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 폴리펩타이드, 콕시엘라(*Coxiella*) 폴리펩타이드, 더마토필러스(*Dermatophilus*) 폴리펩타이드, 엔테로코커스(*Enterococcus*) 폴리펩타이드, 에흐를리키아(*Ehrlichia*) 폴리펩타이드, 에스케리키아(*Escherichia*) 폴리펩타이드, 프란시셀라(*Francisella*) 폴리펩타이드, 푸소박테리움(*Fusobacterium*) 폴리펩타이드, 해모바르토넬라(*Haemobartonella*) 폴리펩타이드, 해모필러스(*Haemophilus*) 폴리펩타이드 (예를 들어, 에이취. 인플루엔자(*H. Influenzae*)) b형 외부 막 단백질), 헬리코박터(*Helicobacter*) 폴리펩타이드, 크렙시엘라(*Klebsiella*) 폴리펩타이드, L-형태 세균 폴리펩타이드, 렙토스피라(*Leptospira*) 폴리펩타이드, 리스테리아(*Listeria*) 폴리펩타이드, 마이코박테리아(*Mycobacteria*) 폴리펩타이드, 마이코플라스마(*Mycoplasma*) 폴리펩타이드, 나이세리아(*Neisseria*) 폴리펩타이드, 네오리케치아(*Neorickettsia*) 폴리펩타이드, 노카디아(*Nocardia*) 폴리펩타이드, 파스퇴렐라(*Pasteurella*) 폴리펩타이드, 펩토코커스(*Peptococcus*) 폴리펩타이드, 펩토스트렙토코커스(*Peptostreptococcus*) 폴리펩타이드, 뉴모코커스(*Pneumococcus*) 폴리펩타이드 (즉, 에스. 뉴모니아(*S. Pneumoniae*)) 폴리펩타이드) (본원의 기재사항을 참조한다), 프로테우스(*Proteus*) 폴리펩타이드, 슈도모나스(*Pseudomonas*) 폴리펩타이드, 리케치아(*Rickettsia*) 폴리펩타이드, 로칼리마에아(*Rochalimaea*) 폴리펩타이드, 살모넬라(*Salmonella*) 폴리펩타이드, 쉬겔라(*Shigella*) 폴리펩타이드, 스타필로코커스(*Staphylococcus*) 폴리펩타이드, 그룹 A 스트렙토코커스(*streptococcus*) 폴리펩타이드 (예를 들어, 에스. 피오게네스(*S. Pyogenes*) M 단백질), 그룹 B 스트렙토코커스(*streptococcus*)(에스. 아갈락티아(*S. agalactiae*)) 폴리펩타이드, 트레포네마(*Treponema*) 폴리펩타이드, 및 예르시니아(*Yersinia*) 폴리펩타이드(예를 들어, 와이 페스티스(*Y pestis*) F1 및 V 항원)을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0188] **[00190]** 진균류 항원의 예는 압시디아(*Absidia*) 폴리펩타이드, 아크레모니움(*Acremonium*) 폴리펩타이드, 알테르나리아(*Alternaria*) 폴리펩타이드, 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 폴리펩타이드, 바시디오볼루스(*Basidiobolus*) 폴리펩타이드, 바이폴라리스(*Bipolaris*) 폴리펩타이드, 블라스토마이세스(*Blastomyces*) 폴리펩타이드, 캔디다(*Candida*) 폴리펩타이드, 코씨디오이데스(*Coccidioides*) 폴리펩타이드, 코니디오볼루스(*Conidiobolus*) 폴리펩타이드, 크립토코커스(*Cryptococcus*) 폴리펩타이드, 쿠르발라리아(*Curvalaria*) 폴리펩타이드, 에피더모피톤(*Epidermophyton*) 폴리펩타이드, 엑소피알라(*Exophiala*) 폴리펩타이드, 게오트리쿰(*Geotrichum*) 폴리펩타이드, 히스토플라스마(*Histoplasma*) 폴리펩타이드, 마두렐라(*Madurella*) 폴리펩타이드, 말라세지아(*Malassezia*) 폴리펩타이드, 마이크로스포룸(*Microsporum*) 폴리펩타이드, 모닐리엘라(*Moniliella*) 폴리펩타이드, 모르티에렐라(*Mortierella*) 폴리펩타이드, 뮤코르(*Mucor*) 폴리펩타이드, 파에실로마이세스(*Paecilomyces*) 폴리펩타이드, 페니실리움(*Penicillium*) 폴리펩타이드, 피알레모니움(*Phialemonium*) 폴리펩타이드, 피알로포라(*Phialophora*) 폴리펩타이드, 프로토테카(*Prototheca*) 폴리펩타이드, 슈달레스케리아(*Pseudallescheria*) 폴리펩타이드, 슈도마이크로도키움(*Pseudomicrodochium*) 폴리펩타이드, 피티움(*Pythium*) 폴리펩타이드, 리노스포리디움(*Rhinosporidium*) 폴리펩타이드, 리조푸스(*Rhizopus*) 폴리펩타이드, 스콜레코바시디움(*Scolecobasidium*) 폴리펩타이드, 스포로트릭스(*Sporothrix*) 폴리펩타이드, 스템필리움(*Stemphylium*) 폴리펩타이드, 트리코피톤(*Trichophyton*) 폴리펩타이드, 트리코스포론(*Trichosporon*) 폴리펩타이드, 및 크실로히파(*Xylohypha*) 폴리펩타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0189] **[00191]** 원생동물 기생충 항원의 예는 바베시아(*Babesia*) 폴리펩타이드, 발란티디움(*Balantidium*) 폴리펩타이드, 베스노이티아(*Besnoitia*) 폴리펩타이드, 크립토스포리디움(*Cryptosporidium*) 폴리펩타이드, 에이

메리아(*Eimeria*) 폴리펩타이드, 엔세팔리토준(*Encephalitozoon*) 폴리펩타이드, 엔타모에바(*Entamoeba*) 폴리펩타이드, 기아르디아(*Giardia*) 폴리펩타이드, 하몬디아(*Hammondia*) 폴리펩타이드, 헤파토준(*Hepatozoon*) 폴리펩타이드, 이소스포라(*Isospora*) 폴리펩타이드, 라이슈마니아(*Leishmania*) 폴리펩타이드, 마이크로스포리디아(*Microsporidia*) 폴리펩타이드, 네오스포라(*Neospora*) 폴리펩타이드, 노세마(*Nosema*) 폴리펩타이드, 펜타트리코모나스(*Pentatrichomonas*) 폴리펩타이드, 플라스모디움(*Plasmodium*) 폴리펩타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 유충 기생충 항원의 예는 아칸토케일로네마(*Acanthocheilonema*) 폴리펩타이드, 아엘루로스트론길러스(*Aelurostrongylus*) 폴리펩타이드, 안실로스토마(*Ancylostoma*) 폴리펩타이드, 안기오스트론길러스(*Angiostrongylus*) 폴리펩타이드, 아스카리스(*Ascaris*) 폴리펩타이드, 브루기아(*Brugia*) 폴리펩타이드, 부노스토뭄(*Bunostomum*) 폴리펩타이드, 카필라리아(*Capillaria*) 폴리펩타이드, 카베르티아(*Chabertia*) 폴리펩타이드, 쿠페리아(*Cooperia*) 폴리펩타이드, 크레노소마(*Crenosoma*) 폴리펩타이드, 딕티오카울루스(*Dictyocaulus*) 폴리펩타이드, 디옥토피메(*Dioctophyme*) 폴리펩타이드, 디페탈로네마(*Dipetalonema*) 폴리펩타이드, 디필로보트리움(*Diphyllobothrium*) 폴리펩타이드, 디플리디움(*Diplydium*) 폴리펩타이드, 디로필라리아(*Dirofilaria*) 폴리펩타이드, 드라쿤쿨러스(*Dracunculus*) 폴리펩타이드, 엔테로비우스(*Enterobius*) 폴리펩타이드, 필라로디에스(*Filaroides*) 폴리펩타이드, 해몬쿠스(*Haemonchus*) 폴리펩타이드, 라고킬라스카리스(*Lagochilascaris*) 폴리펩타이드, 로아(*Loa*) 폴리펩타이드, 만소넬라(*Mansonella*) 폴리펩타이드, 무엘레리우스(*Muellerius*) 폴리펩타이드, 나노피에투스(*Nanophyetus*) 폴리펩타이드, 네카토르(*Necator*) 폴리펩타이드, 네마토디루스(*Nematodirus*) 폴리펩타이드, 오에소파고스토뭄(*Oesophagostomum*) 폴리펩타이드, 온코세르카(*Onchocerca*) 폴리펩타이드, 오피스토르키스(*Opisthorchis*) 폴리펩타이드, 오스테르타기아(*Ostertagia*) 폴리펩타이드, 파라필라리아(*Parafilaria*) 폴리펩타이드, 파라고니무스(*Paragonimus*) 폴리펩타이드, 파라스카리스(*Parascaris*) 폴리펩타이드, 피살로프테라(*Physaloptera*) 폴리펩타이드, 프로토스트론길루스(*Protostrongylus*) 폴리펩타이드, 세타리아(*Setaria*) 폴리펩타이드, 스피로세르카(*Spirocerca*) 폴리펩타이드, 스피로메트라(*Spirometra*) 폴리펩타이드, 스테파노필라리아(*Stephanofilaria*) 폴리펩타이드, 스트론길로이데스(*Strongyloides*) 폴리펩타이드, 스트론길러스(*Strongylus*) 폴리펩타이드, 텔라지아(*Thelazia*) 폴리펩타이드, 톡사스카리스(*Toxascaris*) 폴리펩타이드, 톡소카라(*Toxocara*) 폴리펩타이드, 트리키넬라(*Trichinella*) 폴리펩타이드, 트리코스트론길러스(*Trichostrongylus*) 폴리펩타이드, 트리쿠리스(*Trichuris*) 폴리펩타이드, 운시나리아(*Uncinaria*) 폴리펩타이드, 및 우체레리아(*Wuchereria*) 폴리펩타이드(예를 들어, 피. 팔시파룸(*P. Falciparum*)) 포자소체(circumsporozoite) (PfCSP)), 포자소체 표면 단백질(sporozoite surface protein) 2 (PfSSP2), 간 상태 항원 1의 카복실 말단 (PfLSA1 c-term), 및 배출된 단백질 1 (PfExp-1), *뉴모시스티스(Pneumocystis)* 폴리펩타이드, 사코시스티스(*Sarcocystis*) 폴리펩타이드, 쉬스토소마 (*Schistosoma*) 폴리펩타이드, 테일레리아(*Theileria*) 폴리펩타이드, 톡소플라스마(*Toxoplasma*) 폴리펩타이드 및 트리파노소마 (*Trypanosoma*) 폴리펩타이드를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0190] **[00192]** 체외기생충 항원의 예는 벼룩; 강성 진드기 및 연성 진드기를 포함하는 진드기; 파리, 예를 들어, 미드게스(midges), 모기, 응애, 진딧물, 말파리, 뿔파리, 사슴 파리(deer flies), 체체 파리(tsetse flies), 안정한 파리(stable flies), 승저증 원인 파리 및 깔따구과(biting gnats); 개미; 거미, 이(lice); 진드기(mites); 및 진정한 벌레(true bugs), 예를 들어, 베드 벌레(bed bugs) 및 키싱 벌레(kissing bugs)로부터의 폴리펩타이드 (항원 및 알레르겐을 포함하는)를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0191] **E. 자살 유전자**

[0192] **[00193]** 일부 경우에, 본원 개시내용의 임의의 세포는 이종성 사이토킨, 가공된 수용체 등 이외의 다른 하나 이상의 제제를 생성하도록 변형된다. 특정 구현예에서, NK 세포와 같은 세포는 하나 이상의 자살 유전자를 함유하도록 가공되고, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "자살 유전자"는 프로드럭의 투여시, 유전자 생성물을 숙주 세포를 사멸시키는 화합물로 전환시키는 유전자로서 정의된다. 일부 경우에, NK 세포 치료요법은 NK 세포 치료요법을 받고/받거나 NK 세포 치료요법을 받은 개체가 하나 이상의 부작용의 하나 이상의 증상, 예를 들어, 사이토킨 방출 증후군, 신경독성, 아나필락시스/알레르기, 및/또는 온-표적/오프 종양 독성(예로서)을 나타내는 경우 또는 임박하게를 포함하는 하나 이상의 증상을 가질 위험에 있는 것으로 고려되는 경우 하나 이상의 임의의 종류의 유전자의 활용에 적용될 수 있다. 자살 유전자의 사용은 치료요법에 대한 계획된 프로토콜의 일부일 수 있거나 이를 사용할 필요성이 인지되는 경우에만 사용될 수 있다. 일부 경우에, 세포 치료요법은 치료요법이 더 이상 요구되지 않아서 상기 자살 유전자 또는 이로부터의 유전자 생성물을 표적화하는 제제(들)을 사용하여 종료된다.

[0193] **[00194]** 자살 유전자의 예는 가공된 분비불능 (막 결합된 것을 포함하는) 종양 괴사 인자 (TNF)-알파 돌연변이

체 폴리펩타이드를 포함하고 (문헌참조: PCT/US19/62009, 이는 이의 전문이 본원에 참조로 인용된다) 이들은 TNF-알파 돌연변이체에 결합하는 항체의 전달에 의해 표적화될 수 있다. 사용될 수 있는 자살 유전자/프로드럭 조합의 예는 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes Simplex Virus)-티미딘 키나제(HSV-tk) 및 간시클로비르(ganciclovir), 아시클로비르(acyclovir), 또는 FIAU; 옥시도리덕타제 및 사이클로헥시미드; 사이토신 데아미나제 및 5-플루오로시토신; 티미딘 키나제 티미딜레이트 키나제 (Tdk::Tmk) 및 AZT; 및 데옥시시티딘 키나제 및 시토신 아라비노시드이다. 프로드럭 6-메틸퓨린 데옥시리보사이드를 독성의 퓨린 6-메틸퓨린으로 전환시키는 소위 자살 유전자로 불리우는 이. 콜리 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제가 사용될 수 있다. 다른 자살 유전자들은 예를 들어, CD20, CD52, 유도성 카스파제 9, 퓨린 뉴클레오사이드 포스포릴라제 (PNP), 시토크롬 p450 효소 (CYP), 카복시펩티다제 (CP), 카복실에스테라제 (CE), 니트로리덕타제 (NTR), 구아닌 리보실트랜스퍼라제 (XGRTP), 글리코시다제 효소, 메티오닌-α,γ-리아제 (MET), 및 티미딘 포스포릴라제 (TP)를 포함한다.

[0194] **F. 전달 방법**

[0195] **[00195]** 당업자는 본원 개시내용의 항원 수용체의 발현을 위한 표준 재조합 기술을 통해 벡터를 작제하기 위한 장비를 잘 갖추고 있다(문헌참조: 예를 들어, Sambrook *et al.*, 2001 and Ausubel *et al.*, 1996, 이 둘다는 본원에 참조로 인용된다). 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스 (박테리오파아지, 동물 바이러스, 및 식물 바이러스), 및 인공 염색체(예를 들어, YAC), 예를 들어, 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 몰로니 뮤린 백혈병 바이러스 벡터 (MoMLV), MSCV, SFFV, MPSV, SNV 등으로부터 유래된), 렌티바이러스 벡터(예를 들어, HIV-1, HIV-2, SIV, BIV, FIV 등으로부터 유래된), 복제 컴피턴트, 이의 복제 결핍 및 거트부재 (gutless) 형태를 포함하는 아데노바이러스(Ad) 벡터, 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 시미안 바이러스 40 (SV-40) 벡터, 소 파필로마 바이러스 벡터, 엡슈타인-바르 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 하베이 뮤린 육종 바이러스 벡터, 뮤린 유방 종양 바이러스 벡터, 라우스 육종 바이러스 벡터, 파르보바이러스 벡터, 폴리오바이러스 벡터, 수포성 구내염 바이러스 벡터, 마라바 바이러스 벡터 및 그룹 B 아데노바이러스 에나데노투시레브 벡터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0196] **[00196]** 특정 구현예에서, 벡터는 다중시스트론성 벡터이고, 예를 들어, PCT/US19/62014에 기재되어 있고, 이는 전문이 본원에 참조로 인용된다. 상기 경우에, 단일 벡터는 CAR 또는 TCR (및 CAR 또는 TCR의 일부가 상호 교환될 수 있도록 하는 모듈 포맷으로 구성될 수 있는 발현 작제물), 자살 유전자 및 하나 이상의 사이토킨을 암호화할 수 있다.

[0197] a. 바이러스 벡터

[0198] **[00197]** 항원 수용체를 암호화하는 바이러스 벡터는 본원 개시내용의 특정 양상에서 제공될 수 있다. 재조합 바이러스 벡터를 생성하는데 있어서, 비-피루 유전자는 전형적으로 이종성 (또는 비-고유) 단백질에 대한 유전자 또는 암호화 서열로 대체된다. 바이러스 벡터는 일종의 발현 작제물이고 이는 핵산 및 능히 단백질을 세포로 도입하기 위해 바이러스 서열을 사용한다. 특정 바이러스가 세포를 감염시키거나 수용체-매개된 세포내이입을 통해 세포에 진입하고 숙주 세포 게놈에 통합하고 안정하게 및 효율적으로 바이러스 유전자를 발현시키는 능력은 이들이 외래 핵산의 세포 (예를 들어, 포유동물 세포)로의 전달을 위해 매력적인 후보물이 되게 한다. 본원 발명의 특정 양상의 핵산을 전달하기 위해 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 비제한적인 예는 하기에 기재되어 있다.

[0199] **[00198]** 렌티바이러스는 통상의 레트로바이러스 유전자 *gag, pol*, 및 *env*외에 , 조절 또는 구조적 기능을 갖는 다른 유전자들을 함유하는 복합 레트로바이러스이다. 렌티바이러스 벡터는 당업계에 널리 공지되어 있다(문헌참조: 예를 들어, 미국 특허 제6,013,516호 및 제5,994,136호).

[0200] **[00199]** 재조합 렌티바이러스 벡터는 비-분열 세포를 감염시킬 수 있고 생체내 및 생체외 유전자 전달 및 핵산 서열의 발현 둘다를 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 비-분열 세포-여기서, 적합한 숙주 세포는 팩키징 기능, 즉, gag, pol 및 env, 및 rev 및 tat를 함유하는 2개 이상의 벡터로 형질감염된다—를 감염시킬 수 있는 재조합 렌티바이러스는 본원에 참조로 인용된 미국 특허 제5,994,136호에 기재되어 있다.

[0201] b. 조절 요소들

[0202] **[00200]** 본원의 개시내용에 유용한 벡터에 포함된 발현 카세트는 특히 (5'-에서-3' 방향으로) 단백질 암호화 서열에 작동적으로 연결된 진핵 전사 프로모터, 삽입 서열을 포함하는 스플라이스 신호, 및 전사 종결/폴리아데닐화 서열을 함유한다. 진핵 세포에서 단백질 암호화 유전자의 전사를 제어하는 프로모터 및 인핸서는 다중 유전학적 요소들로 구성된다. 세포 기구는 각각의 요소에 의해 전달되는 조절 정보를 수집하고 통합할 수 있어 상이

한 유전자들이 전사 조절의 별개의 흔한 복합 패턴으로 전개되도록 한다. 본원 개시내용과 관련하여 사용되는 프로모터는 항시성, 유도성 및 조직-특이적 프로모터를 포함한다.

[0203] (i) 프로모터/인핸서

[0204] **[00201]** 본원에 제공된 발현 작제물은 항원 수용체의 발현을 구동시키기 위해 프로모터를 포함한다. 프로모터는 일반적으로 RNA 합성을 위한 개시 부위를 위치시키는 기능을 하는 서열을 포함한다. 이의 최상의 공지된 예는 TATA 박스이지만, 예를 들어, 포유동물 종결 데옥시뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 유전자에 대한 프로모터 및 SV40 레이트 유전자에 대한 프로모터와 같이 TATA 박스가 부재인 일부 프로모터에서, 개시 부위 자체 위에 위치한 구분된 요소는 개시 위치를 고정시키는 것을 도와준다. 추가의 프로모터 요소들은 전사 개시의 빈도를 조절한다. 전형적으로, 이들은 개시 부위의 30-30110 bp 업스트림 영역에 위치하지만, 다수의 프로모터는 또한 개시 부위의 다운스트림에 기능성 요소들을 함유하는 것으로 나타났다. 암호화 서열을 프로모터 "의 제어하에" 있도록 하기 위해, 하나는 선택된 프로모터의 "다운스트림"(즉, 3')에 전사 판독 프레임의 전사 개시 부위의 5' 말단에 위치한다. "업스트림" 프로모터는 DNA의 전사를 자극하고 암호화된 RNA의 발현을 촉진시킨다.

[0205] **[00202]** 프로모터 요소들 사이의 공간은 흔히 가요성이어서 프로모터 기능은 요소들이 서로 상대적으로 역위되거나 이동되는 경우 보존된다. tk 프로모터에서, 프로모터 요소들 간의 공간은 활성이 감소하기 시작하기 전에 50bp 이격으로 증가될 수 있다. 프로모터에 의존하여, 이것은 개별 요소들이 전사를 활성화시키기 위해 협력적으로 또는 독립적으로 기능할 수 있음을 나타낸다. 프로모터는 핵산 서열의 전사 활성화에 관여하는 시스-작용 조절 서열을 언급하는 "인핸서"와 연계하여 사용되거나 사용되지 않을 수 있다.

[0206] **[00203]** 프로모터는 암호화 분절 및/또는 엑손의 업스트림에 위치한 5' 비-암호화 서열을 단리시킴에 의해 수득될 수 있는 바와 같이 핵산 서열과 천연적으로 연합된 것일 수 있다. 상기 프로모터는 "내인성"으로서 언급될 수 있다. 유사하게, 인핸서는 상기 서열의 다운스트림 또는 업스트림에 위치한, 핵산 서열과 천연적으로 연관된 것일 수 있다. 대안적으로, 특정 이점은 정상적으로 이의 천연 환경에서 핵산 서열과 연합되지 않은 프로모터 프로모터를 언급하는, 재조합 또는 이종성 프로모터의 제어하에 암호화 핵산 분절을 위치시킴에 의해 획득될 수 있다. 재조합 또는 이종성 인핸서는 또한 이의 천연 환경에서 핵산 성려과 정상적으로 연합되지 않은 인핸서를 언급한다. 상기 프로모터 또는 인핸서는 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 및 임의의 다른 바이러스, 원핵 세포 또는 진핵 세포로부터 단리된 프로모터 또는 인핸서, 및 "천연적으로 존재"하지 않는, 즉, 발현을 변화시키는 상이한 전사 조절 영역, 및/또는 돌연변이의 상이한 요소들을 함유하는 프로모터 또는 인핸서를 포함할 수 있다. 예를 들어, 재조합 DNA 작제물에서 대부분 통상적으로 사용되는 프로모터는 b-락타마제(페니실리나제), 락토스 및 트립토판 (trp) 프로모터 시스템을 포함한다. 합성적으로 프로모터 및 인핸서의 핵산 서열을 생성하는 것에 추가로, 서열은 본원에 기재된 조성물과 연계하여 PCR™을 포함하는 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 추가로, 미토콘드리아, 엽록체 등과 같은 비-핵 기관 내 서열의 전사 및/또는 발현을 지시하는 제어 서열이 또한 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0207] **[00204]** 천연적으로, 기관(organelle), 세포 유형, 기관(organ), 또는 발현을 위해 선택된 유기체 내에서 DNA 분절의 발현을 효과적으로 지시하는 프로모터 및/또는 인핸서를 사용하는 것이 중요하다. 분자 생물학적 분야의 당업자는 일반적으로 단백질 발현을 위한 프로모터, 인핸서 및 세포 유형 조합의 사용을 알고 있다(문헌참조: 예를 들어, Sambrook *et al.* 1989, 본원에 참조로 인용됨). 사용되는 프로모터는 항상성, 조직-특이적, 유도성일 수 있고/있거나 도입된 DNA 분절의 고수준의 발현을 지시하기 위해 적당한 조건하에서 유용할 수 있고, 예를 들어, 재조합 단백질 및/또는 펩타이드의 대규모 생성에 유리하다. 프로모터는 이종성 또는 내인성일 수 있다.

[0208] **[00205]** 추가로 임의의 프로모터/인핸서 조합(예를 들어, epd.isb-sib.ch/의 월드 와이드 웹을 통해, 진핵 세포 프로모터 데이터 베이스 EPDB 당)은 또한 발현을 구동시키기 위해 사용될 수 있다. T3, T7 또는 SP6 세포질 발현 시스템의 사용은 또 다른 가능한 구현예이다. 진핵 세포는 적당한 세균 폴리머라제가 전달 복합체의 일부로서 또는 추가의 유전학적 발현 작제물의 일부로서 제공된 경우 특정 세균 프로모터로부터의 세포질 전사를 지지할 수 있다.

[0209] **[00206]** 프로모터의 비제한적인 예는 어얼리 또는 레이트 바이러스 프로모터, 예를 들어, SV40 어얼리 또는 레이트 프로모터, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 이메디에이트 어얼리 프로모터, 라우스 육종 바이러스 (RSV) 어얼리 프로모터; 진핵 세포 프로모터, 예를 들어, 베타 액틴 프로모터, GADPH 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터; 및 연결된(concatenated) 반응 요소 프로모터들, 예를 들어, 사이클릭 AMP 반응 요소 프로모터들 (cre), 혈청 반응 요소 프로모터 (sre), 포르볼 (phorbol) 에스테르 프로모터 (TPA) 및 최소 TATA 박스 부근의 반응 요소 프

로모터들 (tre)를 포함한다. 또한 사람 성장 호르몬 프로모터 서열(예를 들어, Genbank®에 기재된 사람 성장 호르몬 최소 프로모터, 승인 번호 X05244, 뉴클레오타이드 283-341) 또는 마우스 유방 종양 프로모터(ATCC, Cat. No. ATCC 45007로부터 가용한)를 사용할 수 있다. 특정 구현예에서, 프로모터는 CMV IE, 덱틴-1, 덱틴-2, 사람 CD11c, F4/80, SM22, RSV, SV40, Ad MLP, 베타-액틴, MHC 부류 I 또는 MHC 부류 II 프로모터이지만 치료학적 유전자의 발현을 구동시키기 위해 유용한 임의의 다른 프로모터는 본원 개시내용의 수행에 적용될 수 있다.

[0210] **[00207]** 특정 양상에서, 본 개시내용의 방법은 또한 인핸서 서열, 즉, 프로모터의 활성을 증가시키고 시스로 작용하고 이들의 배향과 무관하에 심지어 보다 상대적으로 긴 거리 (표적 프로모터로부터 수킬로베이스까지 이격되어 있는)에서 작용할 잠재력을 갖는 핵산 서열에 관한 것이다. 그러나, 인핸서 기능은 이들이 또한 소정의 프로모터에 근접하여 기능할 수 있으므로 필수적으로 상기 긴 거리에 제한되지 않는다.

[0211] (ii) 개시 신호 및 연계된 발현

[0212] **[00208]** 특정 개시 신호는 또한 암호화 서열의 효율적인 해독을 위해 본원의 개시내용에 제공된 발현 작제물에 사용될 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 또는 인접 서열을 포함한다. 외인성 해독 제어 신호는 ATG 개시 코돈을 폼마하고 제공될 필요가 있을 수 있다. 당업자는 이를 용이하게 결정할 수 있고 필요한 신호를 제공할 수 있다. 개시 코돈은 전체 삽입체의 해독을 보장하기 위해 목적하는 암호화 서열의 판독 프레임과 "인 프레임"으로 있어야 한다는 것은 널리 공지되어 있다. 외인성 해독 제어 신호 및 개시 코돈은 천연이거나 합성일 수 있다. 발현 효율은 적당한 전사 인핸서 요소들의 내포에 의해 증진될 수 있다.

[0213] **[00209]** 특정 구현예에서, 내부 리보솜 진입 부위 (IRES) 요소들을 사용하여 다중유전자, 또는 폴리시스트론, 메시지를 생성한다. IRES 요소들은 5' 메틸화된 캡 의존성 해독의 리보솜 스캐닝 모델을 우회할 수 있고 내부 부위에서 해독을 개시할 수 있다. 피코나바이러스 패밀리의 2개의 구성원 (소아마비 및 뇌척수심근염)으로부터의 IRES 요소들은 개시되어 있고, 또한 포유동물 메시지로부터의 IRES가 기재되어 있다. IRES 요소들은 이종성 개방 판독 프레임에 연결될 수 있다. 다중 개방 판독 프레임은 함께 전사될 수 있고 각각은 IRES에 의해 분리되어 있고 폴리시스트론 메시지를 생성한다. IRES 요소에 의해, 각각의 개방 판독 프레임은 효율적인 해독을 위해 리보솜에 접근할 수 있다. 다중 유전자는 단일 메시지를 전사하기 위해 단일 프로모터/인핸서를 사용하여 효율적으로 발현될 수 있다.

[0214] **[00210]** 추가로, 특정 2A 서열 요소들을 사용하여 본원의 개시내용에 제공된 작제물 내 유전자들의 연결되거나 동시 발현을 생성시킬 수 있다. 예를 들어, 절단 서열을 사용하여 단일 시스트론을 형성하기 위해 개방 판독 프레임들을 연결시킴에 의해 유전자들을 동시 발현시킬 수 있다. 예시적 절단 서열은 F2A (구제역 질환 바이러스 2A) 또는 "2A-유사" 서열(예를 들어, 토세아 아시그나(*Thosea asigna*) 바이러스 2A; T2A)이다.

[0215] (iii) 복제 오리진

[0216] 숙주 세포 내 벡터를 증가시키기 위해, 하나 이상의 복제 오리진 부위 (흔히 "ori"로 칭함), 예를 들어, 상기된 바와 같이 EBV의 oriP 또는 프로그래밍에서 유사하거나 상승된 기능을 갖고, 유전학적으로 가공된 oriP에 상응하는 핵산 서열을 함유할 수 있다. 대안적으로, 상기된 바와 같이 다른 염색체외 복제 바이러스의 복제 오리진 또는 자발적으로 복제하는 서열 (ARS)가 사용될 수 있다.

[0217] c. 선택 및 스크리닝 가능한 마커

[0218] **[00211]** 일부 구현예에서, 본원 개시내용의 작제물을 함유하는 세포는 발현 벡터 내 마커를 포함시킴에 의해 시험관내 또는 생체내에서 동정될 수 있다. 상기 마커는 발현 벡터를 함유하는 세포의 용이한 동정을 가능하게 하는 세포에 동정가능한 변화를 부여한다. 일반적으로, 선택 마커는 선택을 가능하게 하는 성질을 부여하는 마커이다. 양성 선택 마커는 마커의 존재가 이의 선택을 가능하게 하는 마커이고 음성 선택 마커는 이의 존재가 이의 선택을 차단시키는 마커이다. 양성 선택 마커의 예는 약물 내성 마커이다.

[0219] **[00212]** 일반적으로, 약물 선택 마커의 내포는 형질전환체의 클로닝 및 동정을 원조하고, 예를 들어, 네오마이신, 푸로마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신 및 히스티디놀에 대한 내성을 부여하는 유전자는 유용한 선택 마커이다. 조건의 수행을 기반으로 하는 형질전환체의 구별을 가능하게 하는 표현형을 부여하는 마커에 추가로, 스크리닝가능한 마커, 예를 들어, 이의 기반이 비색 분석인 GFP를 포함하는 다른 유형의 마커가 또한 고려된다. 대안적으로, 헤르페스 심플렉스 티미딘 키나제 (*tk*) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT)와 같은 음성 선택 마커로서 스크리닝가능한 효소가 사용될 수 있다. 당업자는 또한 능히 FACS 분석과 연계된 면역학적 마커를 사용하는 방법을 알고 있다. 사용되는 마커는 이것이 유전자 생성물을 암호화하는 핵산과 동시

에 발현될 수 있는 한 중요한 것으로 사료되지 않는다. 선택 및 스크리닝 가능한 마커의 추가의 예는 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0220] d. 다른 핵산 전달 방법

[0221] **[00213]** 항원 수용체를 암호화하는 핵산의 바이러스 전달에 추가로, 하기에는 소정의 숙주 세포로의 추가의 재조합 유전자 전달 방법이 있고 따라서 본원 개시내용에서 고려된다.

[0222] **[00214]** 현재 개시내용과 함께 DNA 또는 RNA와 같은 핵산의 면역 세포로의 도입은 본원에 기재된 바와 같이 또는 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이 세포의 형질전환을 위한 핵산 전달을 위해 임의의 적합한 방법을 사용할 수 있다. 상기 방법은 예를 들어, 생체외 형질감염, 미세 주사를 포함하는 주사에 의해; 전기천공에 의해; 인산칼슘 침전에 의해; DEAE-덱스트란에 이어서 폴리에틸렌 글리콜을 사용함에 의해; 직접적인 소닉 로딩에 의해; 리포좀 매개된 형질감염 및 수용체-매개된 형질감염에 의해; 미립자가속 충격에 의해; 탄화규소 섬유와 함께 교반에 의해; 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-매개된 형질전환에 의해; 건조/억제-매개된 DNA 취득 및 상기 방법의 임의의 조합에 의해서와 같이 DNA의 직접적인 전달을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이들과 같은 기술의 적용을 통해, 기관(들), 세포(들), 조직 (들) 또는 유기체(들)은 안정하게 또는 일시적으로 형질전환될 수 있다.

[0223] **II. 치료 방법**

[0224] **[00215]** 본원 개시내용의 구현예는 암, 임의의 종류의 감염 및 임의의 면역 장애에 대해 개체를 치료하는 방법을 포함한다. 상기 개체는 초기 치료로서 또는 또 다른 치료 후 또는 또 다른 치료 동안에 본원 개시내용의 치료 방법을 사용할 수 있다. 면역치료 방법은 암의 유형 또는 단계를 기준으로 암을 갖는 개체의 필요에 따라 조정될 수 있고, 적어도 일부 경우에, 면역치료요법은 개체에 대한 치료 과정 동안에 변형될 수 있다.

[0225] **[00216]** 특정 경우에, 치료 방법은 다음과 같다: 1) 임의의 유형의 혈액학적 악성 종양을 갖는 환자를 치료하기 위한 T 또는 NK 세포를 사용한 입양 세포 치료요법(생체외 확장되거나 CAR 또는 TCR을 발현하는), (2) 임의의 유형의 고형암을 갖는 암 환자를 치료하기 위한 T 또는 NK 세포 (생체외 확장되거나 CAR 또는 TCR을 발현하는)를 사용한 입양 세포 치료요법, (3) 면역 장애를 갖는 환자를 치료하기 위한 Tregs 및 조절 B 세포를 사용한 입양 세포 치료요법 (생체외 확장되거나 CAR 또는 TCR을 발현하는), (4) 감염성 질환을 갖는 환자를 치료하기 위한 T 또는 NK 세포를 사용한 입양 세포 치료요법 (생체외 확장되거나 CAR 또는 TCR을 발현하는). 본원의 개시내용은 사람 NK 세포에서 다중 유전자의 녹킹 다운/아웃이 개선된 기능 및 종양 미세환경에 대한 내성에 기여함을 보여주는 것은 처음이다. 특정 구현예에서, 이것은 환자 자신의 면역 세포 또는 입양적으로 전달된 면역 세포의 기능을 증진시키는 신규 면역치료학적 접근법을 사용한 환자 케어에 대해 직접적인 영향을 미친다. 구현예는 면역치료요법을 위한 고도의 기능성 T, NK 및 B 세포 (생체내 확장되고 CAR 또는 TCR 가공된)를 생성하기 위한 신규 접근법을 제공한다. 이들은 암-혈액학적 및 고형 종양 둘다-(NK 세포 및 T 세포, 또한 CAR T 세포 및 CAR NK 세포), 자가면역 및 동종면역 장애 (B 세포, 조절 B 세포 및 조절 T 세포)를 표적화하고 감염의 치료 (병원체-특이적 T 세포에 대해)를 포함한다.

[0226] **[00217]** 일부 구현예에서, 본원의 개시내용은 본원의 개시내용의 유효량의 면역세포를 투여함을 포함하는 면역치료요법을 위한 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 의학적 질환 또는 장애는 면역 반응을 유발하는 면역 NK 세포 집단의 전달에 의해 치료된다. 본원의 개시내용의 특정 구현예에서, 암 또는 감염은 면역 반응을 유발하는 면역 세포 집단의 전달에 의해 처리된다. 본원에 제공된 것은 유효량의 항원 특이적 세포 치료요법을 개체에게 투여함을 포함하는 개체 내 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키기 위한 방법이다. 본 발명의 방법은 면역 장애, 고형 암, 혈액암 및 바이러스 감염의 치료를 위해 적용될 수 있다.

[0227] **[00218]** 본 발명의 치료 방법이 유용한 종양은 임의의 악성 세포 유형, 예를 들어, 고형 종양 또는 혈액학적 종양에서 발견되는 것들을 포함한다. 예시적인 고형 종양은 췌장, 결장, 맹장, 위, 뇌, 머리, 목, 난소, 신장, 후두, 육종, 폐, 방광, 흑색종, 전립선 및 유방으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 기관의 종양을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 예시적인 혈액학적 종양은 골수의 종양, T 또는 B 세포 악성 종양, 백혈병, 림프종, 모세포종, 골수종 등을 포함한다. 본원에 제공된 방법을 사용하여 치료될 수 있는 암의 추가의 예는 폐암(소세포 폐암, 비-소세포 폐암, 폐의 선암종 및 폐의 편평 암종을 포함하는), 복막, 위장 또는 위암(위장암 및 위장 기질 암을 포함하는), 췌장암, 자궁암, 난소암, 간암, 방광암, 유방암, 결장암, 결장직장암, 자궁내막 또는 자궁 암종, 침샘 암종, 콩팥 또는 신장암, 전립선암, 음경암, 갑상선암, 다양한 유형의 두경부암 및 흑색종을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0228] [00219] 상기 암은 구체적으로 하기의 조직학적 유형을 가질 수 있지만 이들에 제한되지 않는다: 악성 신생물; 암종; 미분화된 암종; 거대 및 스핀들 세포 암종; 소세포 암종; 유두 암종; 편평 세포 암종; 림프구상피 암종; 기저 세포 암종; 섬모기질 암종; 이행 세포 암종; 유두 이행 암종; 선암종; 악성 가스트린종; 담관 암종; 간세포 암종; 조합된 간세포 암종 및 담관암종; 섬유주 선암종; 선낭 암종; 선종폴립 내 선암종; 가족성 폴립증 콜리 선암종; 고형 암종; 악성 카시노이드 종양; 세기관지-폐포 선암종; 유두 선암종; 색소형성 암종; 호산성 암종; 호산소성 선암종(oxyphilic adenocarcinoma); 호염기성 암종; 투명 세포 선암종; 과립 세포 암종; 여포성 선암종; 유두 및 여포성 선암종; 비캡슐화 경화 암종; 부신피질 암종; 자궁내막 암종; 피부 부속 암종 (skin appendage carcinoma); 아포크린 선암종(apocrine adenocarcinoma); 피지 선암종; 귀지 선암종(ceruminous adenocarcinoma); 점막상피 암종; 낭선암종; 유두 낭선암종; 유두 장액성 낭선암종(papillary serous cystadenocarcinoma); 점소양 낭선암종; 점소양 선암종; 시그넷 환 세포 암종(signet ring cell carcinoma); 침윤 도관 암종(infiltrating duct carcinoma); 수질 암종; 소엽 암종; 염증성 암종; 유방 파게트 질환(paget's disease, mammary); 소포 세포 암종; 선편평세포 암종; 선암종 w/편평 상피화생; 악성 흉선종 thymoma; 악성 난소 기질 종양(ovarian stromal tumor, malignant); 악성 포막종(thecoma, malignant); 악성 과립막 세포 종양(granulosa cell tumor, malignant); 악성 암성모세포종; 세르톨리 세포 암종(sertoli cell carcinoma); 악성 라이디히 세포 종양(leydig cell tumor, malignant); 악성 지질 세포 종양; 악성 부신경정종(paraganglioma, malignant); 악성 유선외 부신경정종(extra-mammary paraganglioma, malignant); 크롬친화세포종(pheochromocytoma); 사구체혈관육종(glomangiosarcoma); 악성 흑색종; 무색소성 흑색종; 표재 확장성 흑색종; 흑색점 악성 흑색종(lentigo malignant melanoma); 선단 흑자성 흑색종(acral lentiginous melanomas); 결절성 흑색종; 거대 색소성모반에서 악성 흑색종; 상피모양 세포 흑색종; 악성 청색모반(blue nevus, malignant); 육종; 섬유육종; 악성 섬유 조직구종; 점액육종(myxosarcoma); 지방육종; 평활근육종(leiomyosarcoma); 횡문근육종; 배아 횡문근육종; 폐포 횡문근육종; 기질 육종; 악성 혼합 종양; 뮬러관 혼합 종양; 신아세포종(nephroblastoma); 간아세포종(hepatoblastoma); 암육종; 악성 중간엽종; 악성 브레너 종양(brenner tumor, malignant); 악성 엽상 종양(phyllodes tumor, malignant); 활액 육종; 악성 중피종(mesothelioma, malignant); 미분화배세포종(dysgerminoma); 배아 암종(embryonal carcinoma); 악성 기형종(teratoma, malignant); 악성 난소갑상선종(struma ovarii, malignant); 융모암종; 악성 중신종(mesonephroma, malignant); 혈관육종; 악성 혈관내피종; 카포시 육종; 악성 혈관주위세포종(hemangiopericytoma, malignant); 림프관 육종; 골육종; 피질주위 골육종(juxtacortical osteosarcoma); 연골육종; 악성 연골모세포종; 간엽성 연골육종(mesenchymal chondrosarcoma); 골의 거대 세포 종양; 어윙 육종(ewing's sarcoma); 악성 치원성 종양(odontogenic tumor, malignant); 에나멜아세포 치원서육종(ameloblastic odontosarcoma); 악성 에나멜아세포종(ameloblastoma, malignant); 사기질모세포섬유육종; 악성 송과체부종양; 척색종; 악성 신경교종; 뇌실막세포종(ependymoma); 성상세포종; 원형질 성상세포종; 원섬유 성상세포종; 성상모세포종; 교모세포종; 핍지교종; 핍지교모세포종(oligodendroblastoma); 원시 신경외배엽종양; 소뇌 육종; 신경절아세포종(ganglioneuroblastoma); 신경모세포종; 망막모세포종; 후각 신경성 종양; 악성 뇌수막종(meningioma, malignant); 신경섬유육종(neurofibrosarcoma); 악성 신경초종(neurilemmoma, malignant); 악성 과립 세포 종양; 악성 림프종; 호지킨 질환; 호지킨(hodgkin's); 파라육아종(paragranuloma); 소림프구 악성 림프종(malignant lymphoma, small lymphocytic); 대형 세포 확산 악성 림프종(malignant lymphoma, large cell, diffuse); 여포성 악성 림프종(malignant lymphoma, follicular); 균상식육종(mycosis fungoides); 다른 특정 비-호지킨 림프종; B-세포 림프종; 저급/여포성 비-호지킨 림프종(NHL); 소림프구(SL) NHL; 중간 등급/여포 NHL; 중간 등급 확산 NHL; 고등급 면역아구성 NHL; 고등급 림프아구성 NHL; 고등급 소 비-절단된 세포 NHL; 벌크 질환 NHL; 맨틀 세포 림프종; AIDS-관련 림프종; 발덴스트롬 마크로글로불린혈증(Waldenstrom's macroglobulinemia); 악성 조직구증; 다발성 골수종; 비만 세포 육종; 면역증식성 소장 질환; 백혈병; 림프구 백혈병; 혈장 세포 백혈병; 적백혈병)(erythroleukemia); 림프구육종 세포 백혈병; 골수백혈병; 호염기성 백혈병; 호산성 백혈병; 단핵구 백혈병; 비만 세포 백혈병; 거핵아구 백혈병; 골수 육종; 모발 세포 백혈병; 만성 림프구 백혈병 (CLL); 급성 림프아구성 백혈병 (ALL); 급성 골수 백혈병 (AML); 및 만성 골수아구성 백혈병.

[0229] [00220] 특정 구현예는 백혈병의 치료 방법에 관한 것이다. 백혈병은 혈액암 또는 골수 암이고 혈액 세포, 일반적으로 백혈구 세포 (백혈구)의 비정상적 증식 (증식에 의한 생성)을 특징으로 한다. 이것은 혈액학적 신생물로 불리우는, 광범위한 그룹의 질환의 일부이다. 백혈병은 광범위한 질환을 포괄하는 광범위한 용어이다. 백혈병은 임상적으로 및 병리학적으로 이의 급성 및 만성 형태로 나누어진다.

[0230] [00221] 본원 개시내용의 특정 구현예에서, 면역 세포는 이를 필요로 하는 개체, 예를 들어, 암 또는 감염을 갖는 개체에게 전달된다. 상기 세포는 이어서 각각의 암 또는 병원성 세포를 공격하는 개체의 면역계를 증진시킨

다. 일부 경우에, 상기 개체에는 하나 이상의 용량의 면역 세포가 제공된다. 개체에게 2 이상의 용량의 면역 세포가 제공되는 경우에, 투여 사이의 지속 기간은 개체내 증식을 위한 시간을 허용하기 위해 충분해야만 하고 특정 구현예에서, 투여 사이의 지속 기간은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일 이상이다.

[0231] **[00222]** 본원 개시내용의 특정 구현예는 면역-매개된 장애를 치료하거나 예방하기 위한 방법을 제공한다. 하나의 구현예에서, 대상체는 자가면역 질환을 갖는다. 자가면역 질환의 비제한적인 예는 다음을 포함한다: 원형 탈모증, 강직성 척추염, 항인지질 증후군(antiphospholipid syndrome), 자가면역 애디슨 질환, 부신의 자가면역 질환, 자가면역 용혈성 빈혈, 자가면역 간염, 자가면역 난소염 및 고환염, 자가면역 혈소판감소증, 베체트 질환(Behcet's disease), 수포성 유사천포창, 심근증, 셀리악 스페이트-피부염(celiac spate-dermatitis), 만성 피로 면역 기능부전 증후군(CFIDS), 만성 ○며증 탈수초 다발신경병증, 처그-스트라우스 증후군(Churg-Strauss syndrome), 반흔성 유천포창(cicatrical pemphigoid), CREST 증구훈, 한냉응집질환(cold agglutinin disease), 크론 질환, 원판성 루프스(discoid lupus), 한랭 글로불린혈증(essential mixed cryoglobulinemia), 섬유근통-섬유근염(fibromyalgia-fibromyositis), 사구체신염(glomerulonephritis), 그레이브스 질환(Graves' disease), 길리안-바레(Guillain-Barre), 하시모토 갑상선염(Hashimoto's thyroiditis), 특발성 폐 섬유증, 특발성 혈소판 감소성 자반증(ITP), IgA 신경병증, 소아 관절염, 편평태선, 홍반성 루푸스(lupus erthematosus), 메니어 질환(Meniere's disease), 혼성 연결 조직 질환, 다발성 경화증, 1형 또는 면역-매개된 진성 당뇨병, 중증 근무력증, 신증후군(예를 들어, 최소 변화 질환, 병소 사구체경화증, 또는 막성 신장병증), 심상성천포창(pemphigus vulgaris), 악성 빈혈(pernicious anemia), 결절성 다발동맥염, 다발연골염, 다선성 증후군(polyglandular syndromes), 류마티스성 다발근통, 다발근염 및 피부근염, 1차 무감마글로불린혈증, 1차 담즙성 경변증, 건선, 건선성 관절염, 레이노드 현상(Raynaud's phenomenon), 라이터 증후군(Reiter's syndrome), 류마티스성 관절염, 사르코이드증, 경피증(scleroderma), 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 강직 인간 증후군, 전신 홍반성 낭창, 홍반 루프스, 궤양성 대장염, 포도막염, 맥관염 (예를 들, 결절성 다발관절염(polyarteritis nodosa), 타카야수 관절염(takayasu arteritis), 측두 동맥염(temporal arteritis)/거대 세포 관절염(giant cell arteritis), 또는 피부염 포진 혈관염), 백반증, 및 베게너 육아종증. 본원에 기재된 방법을 사용하여 치료될 수 있는 자가면역 질환의 일부 예는 다발성 경화증, 류마티스성 관절염, 전신 홍반성 낭창, I형 진성 당뇨병, 크론 질환; 궤양성 대장염, 중증 근무력증, 사구체신염, 강직성 척추염, 혈관염 또는 건선을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 대상체는 또한 천식과 같은 알레르기 질환을 가질 수 있다.

[0232] **[00223]** 여전히 또 다른 구현예에서, 대상체는 이식된 기관 또는 줄기 세포의 수용자이고 면역 세포를 사용하여 거부를 예방하고/하거나 치료한다. 특정 구현예에서, 대상체는 이식편 대 숙주 질환을 갖거나 발병할 위험에 처해 있다. GVHD는 관련된 또는 관련되지 않은 공여자로부터 기원하는 줄기 세포를 사용하거나 함유하는 임의의 이식체의 가능한 합병증이다. 급성 및 만성의 2가지 종류의 GVHD가 있다. 급성 GVHD는 이식 후 처음 3개월 이내에 나타난다. 급성 GVHD의 징후에는 손과 발에 붉은 피부 발진이 나타나 피부가 벗겨 지거나 물집이 생겨 퍼지고 더 심해질 수 있다. 급성 GVHD는 또한 위 및 장에 영향을 줄 수 있고 이 경우에 경련, 메스꺼움 및 설사가 나타난다. 피부와 눈의 황변 (황달)은 급성 GVHD가 간에 영향을 미쳤음을 나타낸다. 만성 GVHD는 중증도에 따라 순위가 매겨진다: 1 단계/등급은 약하고; 4 단계/등급은 중증이다. 만성 GVHD는 이식 후 3개월 이후에 나타난다. 만성 GVHD의 증상은 급성 GVHD의 증상과 유사하지만, 추가로 만성 GVHD는 눈의 점액선, 입의 타액선 및 위 내벽과 내장을 윤활하는 샘에도 영향을 줄 수 있다. 본원에 기재된 임의의 면역 세포의 집단이 사용될 수 있다. 이식된 기관의 예는 고체 기관 이식체, 예를 들어, 신장, 간, 피부, 췌장, 폐 및/또는 심장, 또는 세포 이식체, 예를 들어, 섬(islet), 간세포, 근아세포, 골수, 또는 조혈 또는 다른 줄기 세포를 포함한다. 이식체는 복합 이식체, 예를 들어, 얼굴 조직일 수 있다. 면역 세포는 이식 전에 이식과 동시에 또는 이식 후에 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 면역 세포는 이식 전, 예를 들어, 이식 전 적어도 1시간, 적어도 12 시간, 적어도 1일, 적어도 2일, 적어도 3일, 적어도 4일, 적어도 5일, 적어도 6일, 적어도 1주, 적어도 2주, 적어도 3주, 적어도 4주, 또는 적어도 1개월째에 투여된다. 하나의 특정 비제한적인 예에서, 치료학적 유효량의면역 세포의 투여는 이식 전 3 내지 5일째에 일어난다.

[0233] **[00224]** 일부 구현예에서, 대상체에게 면역 세포 치료요법 전에 비골수절제성 림프구고갈 화학치료요법이 투여될 수 있다. 비골수절제성 림프구고갈 화학치료요법은 임의의 적합한 경로에 의해 투여될 수 있는, 임의의 적합한 상기 치료요법일 수 있다. 비골수절제성 림프구고갈 화학치료요법은 예를 들어, 특히 암이 전이성일 수 있는 흑색종인 경우 사이클로포스파미드 및 플루다라빈의 투여를 포함할 수 있다. 사이클로포스파미드 및 플루다라빈의 예시적 경로는 정맥내이다. 또한, 사이클로포스파미드 및 플루다라빈의 임의의 적합한 용량이 투여될 수 있다. 특정 양상에서, 약 60 mg/kg의 사이클로포스파미드가 2일 동안 투여되고 이후 약 25 mg/m^2의 플루다라빈은

5일동안 투여된다.

[0234] **[00225]** 특정 구현예에서, 면역 세포의 성장 및 활성화를 촉진시키는 성장 인자는 면역 세포와 동시에 대상체에게 또는 후속적으로 면역 세포에 투여된다. 면역 세포 성장 인자는 면역 세포의 성장 및 활성화를 촉진시키는 임의의 적합한 성장 인자일 수 있다. 적합한 면역 세포 성장 인자의 예는 인터류킨 (IL)-2, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18 및 IL-21을 포함하고, 이는 단독으로 또는 다양한 조합으로, 예를 들어, IL-2와 IL-7, IL-2와 IL-15, IL-7과 IL-15, IL-2, IL-7와 IL-15, IL-12와 IL-7, IL-12와 IL-15, 또는 IL-12와 IL-2로 사용될 수 있다.

[0235] **[00226]** 치료학적 유효량의 면역 세포는 비경구 투여, 예를 들어, 정맥내, 복막내, 근육내, 흉골하 또는 관절내 주사 또는 주입을 포함하는 다수의 경로에 의해 투여될 수 있다.

[0236] **[00227]** 입양 세포 치료요법에 사용하기 위한 면역 세포의 치료학적 유효량은 치료받는 대상체에서 목적하는 효과를 성취하는 양이다. 예를 들어, 이것은 진행을 억제하거나 자가면역 또는 동종면역 질환의 퇴행을 유발하기 위해 필요하거나 자가면역 질환, 예를 들어, 통증 및 염증에 의해 유발된 증상을 경감시킬 수 있는 면역 세포의 양일 수 있다. 염증, 예를 들어, 암, 부종 및 승온과 같은 염증과 연관된 증상을 경감시키기 위해 필요한 양일 수 있다. 이것은 또한 이식된 기관의 거부를 감소시키거나 방지하는데 필요한 양일 수 있다.

[0237] **[00228]** 면역 세포 집단은 상기 질환에 맞는 치료 용법, 예를 들어, 질환 상태를 개선하기 위해 1일 내지 수일에 걸쳐 단일 용량 또는 수회 용량 또는 질환 진행을 억제하고 질환 재발을 예방하기 위해 연장된 기간 동안 주기적 용량으로 투여될 수 있다. 제형 중에 사용될 정확한 용량은 또한 투여 경로, 및 질환 또는 장애의 중증도에 의존하고 임상의의 판단 및 각각의 환자의 상황에 따라 결정되어야만 한다. 면역 세포의 치료학적 유효량은 치료받는 대상체, 환부의 중증도 및 유형 및 투여 방식에 의존한다. 일부 구현예에서, 사람 대상체의 치료에 사용될 수 있는 용량은 적어도 3.8×10^{4}, 적어도 3.8×10^{5}, 적어도 3.8×10^{6}, 적어도 3.8×10^{7}, 적어도 3.8×10^{8}, 적어도 3.8×10^{9}, 또는 적어도 3.8×10^{10} 면역 세포/m^{2}의 범위이다. 특정 구현예에서, 사람 대상체의 치료에 사용되는 용량은 약 3.8×10^{9} 내지 약 3.8×10^{10} 면역 세포/m^{2}의 범위이다. 추가의 구현예에서, 면역 세포의 치료학적 유효량은 체중 kg 당 약 5×10^{6} 세포 내지 체중 kg 당 약 7.5×10^{8} 세포, 예를 들어, 체중 kg 당 약 2×10^{7} 세포 내지 약 5×10^{8} 세포, 또는 체중 kg 당 약 5×10^{7} 세포 내지 약 2×10^{8} 세포로 다양할 수 있다. 면역 세포의 정확한 양은 대상체의 연령, 체중, 성별 및 생리학적 병태를 기준으로 당업자에 의해 용이하게 결정된다. 유효량은 시험관내 또는 동물 모델 시험 시스템으로부터 유래된 용량-반응 곡선으로부터 외삽될 수 있다.

[0238] **[00229]** 면역 세포는 면역 매개된 장애의 치료를 위해 하나 이상의 다른 치료학적 제제와 조합하여 투여될 수 있다. 조합 치료요법은 하나 이상의 항-미생물 제제(예를 들어, 항생제, 항-바이러스 제제 및 항-진균제), 항-종양 제제(예를 들어, 플루오로우라실, 메토트렉세이트, 파클리탁셀, 플루다라빈, 에토포시드, 독소루비신, 또는 빈크리스틴), 면역-고갈 제제(예를 들어, 플루다라빈, 에토포시드, 독소루비신, 또는 빈크리스틴), 면역억제제 (예를 들어, 아자티오프린, 또는 글루코코르티코이드, 예를 들어, 덱사메타손 또는 프레드니손), 소염제 (예를 들어, 글루코코르티코이드, 예를 들어, 하이드로코르티손, 덱사메타손 또는 프레드니손, 또는 비-스테로이드성 소염제, 예를 들어, 아세틸살리실산, 이부프로펜 또는 나프록센 나트륨), 사이토카인(예를 들어, 인터류킨-10 또는 형질전환 성장 인자-베타), 호르몬(예를 들어, 에스트로겐), 또는 백신을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 추가로, 칼시뉴린 억제제(예를 들어, 사이클로스포린 및 타크롤리무스); mTOR 억제제 (*예르 들어,* 라파마이신); 마이코페놀레이트 모페틸, 항체 (예를 들어, CD3, CD4, CD40, CD154, CD45, IVIG, 또는 B 세포를 인지하는); 화학치료학적 제제(예를 들어, 메토트렉세이트, 트레오설판, 부설판); 조사; 또는 케모킨, 인터류킨 또는 이들의 억제제(예를 들어, BAFF, IL-2, 항-IL-2R, IL-4, JAK 키나제 억제제)를 포함하지만 이에 제한되지 않는 면역억제 또는 관용성 제제가 투여될 수 있다. 상기 추가의 약제학적 제제는 목적하는 효과에 의존하여 면역 세포의 투여 전, 투여 동안에 또는 투여 후 투여될 수 있다. 세포 및 제제는 동일한 경로 또는 상이한 경로에 의해 및 동일 부위에 또는 상이한 부위에 투여될 수 있다.

[0239] **A. 약제학적 조성물**

[0240] **[00230]** 또한 본원에서 면역 세포 (예를 들어, T 세포, B 세포 및 NK 세포) 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물 및 제형이 제공된다.

[0241] **[00231]** 본원에 기재된 바와 같은 약제학적 조성물 및 제형은 동결건조된 제형 또는 수용액 형태로, 하나 이상의 임의의 약제학적으로 허용되는 담체와 목적하는 정도의 순도를 갖는 활성 성분 (예를 들어, 항체 또는 폴리

펩타이드)을 혼합함에 의해 제조할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012). 약제학적으로 허용되는 담체는 일반적으로 사용되는 용량 및 농도에서 수용자에게 비독성이고 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 완충액, 예를 들어, 포스페이트, 시트레이트, 및 다른 유기산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함하는 항산화제; 보존제(예를 들어, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드; 벤즈에토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예를 들어, 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레소르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩타이드; 단백질, 예를 들어, 혈청 알부민, 젤라틴, 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예를 들어, 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예를 들어, 글라이신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 또는 라이신; 모노사카라이드, 디사카라이드, 및 글루코스, 만노스 또는 덱스트린을 포함하는 다른 탄수화물; 킬레이팅 제제, 예를 들어, EDTA; 슈가, 예를 들어, 슈크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염-형성 역이온, 예를 들어, 나트륨; 금속 착물 (예를 들어, Zn- 단백질 착물); 및/또는 비-이온 계면활성제, 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜 (PEG). 본원에서 예시적인 약제학적으로 허용되는 담체는 조직 사이의 약물 분산제, 예를 들어, 가용성 중성 -활성 하이알루로니다제 당단백질 (sHASEGP), 예를 들어, 사람 가용성 PH-20 하이알루로니다제 당단백질, 예를 들어, rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.)을 추가로 포함한다. 특정 예시적인 sHASEGP, 및 rHuPH20을 포함하는 사용 방법은 미국 특허 공개 공보 제2005/0260186호 및 제2006/0104968호에 기재되어 있다. 하나의 양상에서, sHASEGP는 콘드로이티나제와 같은 하나 이상의 추가의 글리코스아미노글리카나제와 조합된다.

[0242] **B. 조합 치료요법**

[0243] **[00232]** 특정 구현예에서, 본 구현예의 조성물 및 방법은 적어도 하나의 추가의 치료요법과 조합된 면역 세포 집단을 포함한다. 추가의 치료요법은 방사선 치료요법, 수술 (예를 들어, 종괴절제술 및 유방절제술), 화학치료요법, 유전자 치료요법, DNA 치료요법, 바이러스 치료요법, RNA 치료요법, 면역치료요법, 골수 이식, 나노치료요법, 모노클로날 항체 치료요법, 또는 이전의 치료 조합일 수 있다. 추가의 치료요법은 보조제 또는 신규보조제 치료요법 형태일 수 있다.

[0244] **[00233]** 일부 구현예에서, 추가의 치료요법은 소분자 효소 억제제 또는 항-전이성 제제의 투여이다. 일부 구현예에서, 추가의 치료요법은 부작용 제한 제제 (예를 들어, 항오심 제제 등과 같은 치료의 부작용의 발병 및/또는 중증도를 감소시키는 것으로 의도된 제제)의 투여이다. 일부 구현예에서, 추가의 치료요법은 방사선 치료요법이다. 일부 구현예에서, 추가의 치료요법은 수술이다. 일부 구현예에서, 추가의 치료요법은 방사선 치료요법과 수술의 조합이다. 일부 구현예에서, 상기 추가의 치료요법은 감마 방사선 조사이다. 일부 구현예에서, 추가의 치료요법은 PBK/AKT/mTOR 경로, HSP90 억제제, 튜불린 억제제, 아폽토시스 억제제, 및/또는 화학예방제를 표적화하는 치료요법이다. 추가의 치료요법은 당업계에 공지된 하나 이상의 화학치료학적 제제일 수 있다.

[0245] **[00234]** 면역 세포 치료요법은 면역 관문 치료요법과 같은 추가의 암 치료요법과 관련하여, 치료요법 전, 치료요법 동안에, 치료요법 후 또는 다양한 조합으로 투여될 수 있다. 투여는 동시 내지 수분 내지 수일 내지 수주 범위의 간격일 수 있다. 면역 세포 치료요법이 추가의 치료학적 제제와는 별도로 환자에게 제공되는 구현예에서, 당업자는 일반적으로 각각의 전달 시간 사이에 충분한 시기가 만료되지 않도록 보장하여 2개의 화합물은 여전히 환자에 대한 유리한 조합 효과를 발휘할 수 있다. 상기 경우에, 당업자는 환자에게 항체 치료요법 및 항암 치료요법이 서로 약 12 내지 24 또는 72 h 내에, 보다 특히 서로 약 6-12 h 내에 항체 치료요법 및 항암 치료요법이 제공될 수 있는 것으로 고려된다. 일부 상황에서, 각각의 투여 사이에 수일 (2, 3, 4, 5, 6 또는 7일) 내지 수주 (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 8주)가 경과하는 경우, 치료를 위한 시기를 유의적으로 연장하는 것이 바람직할 수 있다.

[0246] **[00235]** 다양한 조합이 사용될 수 있다. 하기 예시에 대해, 면역 세포 치료요법은 "A"이고 항암 치료요법은 "B"이다:

[0247] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0248] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0249] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0250] **[00236]** 본 구현예의 임의의 화합물 또는 치료요법의 환자로의 투여는 경우에 따라 제제의 독성을 고려하여 상기 화합물의 투여를 위한 일반 프로토콜에 따른다. 따라서, 일부 구현예에서, 조합 치료요법에 기인할 수 있는 독성을 모니터링하는 단계가 있다.

[0251] **1. 화학치료요법**

[0252] [00237] 광범위한 화학치료학적 제제는 본 발명의 구현예에 따라 사용될 수 있다. 용어 "화학치료요법"은 암을 치료하기 위한 약물의 사용을 언급한다. "화학치료학적 제제"는 암의 치료에 투여되는 화합물 또는 조성물을 함축하기 위해 사용된다. 이들 제제 또는 약물은 이들이 세포 주기에 영향을 미칠지 및 어느 단계에서 영향을 미칠지와 같은 세포 내 이들의 활성 방식에 의해 분류된다. 대안적으로, 제제는 DNA를 직접 가교결합시키거나 DNA에 삽입되거나 핵산 합성에 영향을 미침에 의해 염색체 및 유사분열 일탈을 유도하는 이의 능력을 기준으로 특징 분석될 수 있다.

[0253] [00238] 화학치료학적 제제의 예는 알킬화제, 예를 들어, 티오테파 및 사이클로스포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어, 부설판, 임프로설판, 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들어, 벤조도파, 카보쿠온, 메투레도파, 및 우레도파; 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드,트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸롤로멜라민을 포함하는 에틸렌이민 및 메틸라멜라민; 아세토게닌(특히 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸을 포함하는); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065 (이의 아도젤레신, 카젤레신 및 비젤레신 합성 유사체를 포함하는); 크립토피신(특히, 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 두오카마이신 (합성 유사체 , KW-2189 및 CB1-TM1을 포함하는); 엘레우트레오빈; 판크라티스타틴; 사코딕티인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어, 클로람부실, 클로르나파진, 콜로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로레타민, 메클로레타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벰비킨, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 및 우라실 머스타드; 니트로스우레아, 예를 들어, 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님누스틴; 항생제, 예를 들어, 에네디인 항생제 (예를 들어, 칼리케아마이신, 특히 칼리케아마이신 감몰 및 칼리케아마이신 오메가I1); 디네미신 A를 포함하는 디네미신; 비스포스포네이트, 예를 들어, 클로드로네이트; 에스퍼라미신; 및 네오카지노스타틴 발색단 및 관련 크로모단백질 에네디인 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 액티노마이신, 아우트라르니신, 아자세린, 블레오마이신, 칵티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카지노필린, 크로모마이니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모프폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신을 포함하는), 에피루비신, 에소루비신, 이다루비신, 마셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어, 미토마이신 C, 마이코페놀산, 노갈라르니신, 올리보마이신, 페플로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 튜버시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 및 조루비신; 항대사물, 예를 들어, 메토트렉세이트 및 5-플루오로우라실 (5-FU); 엽산 유사체, 예를 들어, 데노프테린, 프테로프테린, 및 트리메트렉세이트; 퓨린 유사체, 예를 들어, 플루다라빈, 6-머캅토퓨린, 티아미프린, 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어, 안시타빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 에노시타빈, 및 플록스우리딘; 안드로겐, 예를 들어, 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 메피티오스탄, 및 테스톨락톤; 항-부신제(anti-adrenal), 예를 들어, 미토탄 및 트릴로스탄; 엽산 보충제, 예를 들어, 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레불린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트락세이트; 데포파민; 데메콜신; 디아지쿠온; 엘포르미틴; 엘리프티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 갈륨 니트레이트; 하이드록시우레아; 렌티난; 이오니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어, 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단몰; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK폴리사카라이드 복합체; 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지쿠온; 2,2',2"-트리클로로트리에틸아민; 트리코테센(특히, T-2 톡신, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈데신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미토락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노시드 ("Ara-C"); 사이클로포스파미드; 탁소이드, 예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀 겜시타빈; 6-티오구아닌; 머캅토퓨린; 플라티늄 배위 착물, 예를 들어, 시스플라틴, 옥살리플라틴, 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드 (VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 젤로다; 이반드로네이트; 이리노테칸 (예를 들어, CPT-11); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴 (DMFO); 레티노이드, 예를 들어, 레티노산; 카페시타빈; 카보플라틴, 프로카바진, 플리코마이신, 겜시타비엔, 나벨빈, 파네실-단백질 트랜스퍼라제 억제제, 트랜스플라티늄, 및 약제학적으로 허용되는 염, 산, 또는 상기 임의의 유도체를 포함한다.

[0254] **2. 방사선 치료요법**

[0255] [00239] DNA 손상을 유발하고 광범위하게 사용되어온 다른 인자들은 통상적으로 γ-선, X-선, 및/또는 방사성 동위원소의 종양 세포의 직접적인 전달로서 공지된 것을 포함한다. DNA 손상 인자의 다른 형태가 또한 고려되고, 예를 들어, 마이크로파, 양성자 빔 조사, 및 UV-조사가 있다. 모든 이들 인자들은 DNA에 대해, DNA의 전구

체에 대해, DNA의 복제 및 복구에 대해 및 염색체의 어셈블리 및 유지에 대해 광범위한 손상에 영향을 미칠 가능성이 높다. X-선에 대한 용량 범위는 장기간 (3 내지 4주) 동안 하루 50 내지 200 뤈트겐로부터 2000 내지 6000 뤈트겐의 단일 용량의 범위이다. 방사성 동위원소에 대한 용량 범위는 매우 다양하고 동위원소의 반감기, 방출된 방사선 강도 및 유형, 및 신생물 세포에 의한 흡수에 의존한다.

[0256] **3. 면역치료요법**

[0257] **[00240]** 당업자는 추가의 면역치료요법이 구현예의 방법과 조합하거나 연계하여 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 암 치료와 관련하여, 면역치료제는 일반적으로 암 세포를 표적화하고 파괴하기 위한 면역 이펙터 세포 및 분자에 의존한다. 리툭시맙 (RITUXAN®)은 그러한 예이다. 면역 이펙터는 예를 들어, 종양 세포의 표면 상에 일부 마커에 특이적인 항체일 수 있다. 단독의 항체는 치료요법의 이펙터로서 작용할 수 있거나 이것은 실제로 세포 사멸에 영향을 미치는 다른 세포를 동원할 수 있다. 항체는 또한 약물 또는 독소 (화학치료제, 방사성핵종, 리신 A 쇄, 콜레라 독소, 백일해 독소) 등에 접합될 수 있고 표적화제로서 작용할 수 있다. 대안적으로, 이펙터는 직접적으로 또는 간접적으로 종양 세포 표적과 상호작용하는 표면 분자를 함유하는 림프구일 수 있다. 다양한 이펙터 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포를 포함한다.

[0258] **[00241]** 항체-약물 접합체 (ADC)는 세포-사멸 약물에 공유적으로 연결된 모노클로날 항체 (Mab)를 포함하고 조합 치료요법에 사용될 수 있다. 상기 접근법은 이들의 항원 표적에 대한 고특이성의 Mab와 상당히 강력한 세포독성 약물을 조합하여 농축된 수준의 항원과 함께 페이로드 (약물)를 종양 세포에 전달하는 "무장된(armed)" Mab를 유도한다. 약물의 표적화된 전달은 또한 정상 조직에서 이의 노출을 최소화하여 감소된 독성 및 개선된 치료학적 지수를 유도한다. 예시적인 ADC 약물은 ADCETRIS® (브렌툭시맙 베도틴) 및 KADCYLA® (트라스투주맙 엠탄신 또는 T-DM1)을 포함한다.

[0259] **[00242]** 면역치료요법의 하나의 양상에서, 종양 세포는 표적화에 순응할 수 있는, 즉 대다수의 다른 세포 상에 존재하지 않는 일부 마커를 함유해야만 한다. 많은 종양 마커가 존재하고 임의의 이들 마커는 본 발명의 구현예와 관련하여 표적화를 위해 적합할 수 있다. 통상의 종양 마커는 CD20, 암배아 항원, 티로시나제 (p97), gp68, TAG-72, HMFG, 시알릴 루이스 항원(Sialyl Lewis Antigen), MucA, MucB, PLAP, 라미닌 수용체, erb B, 및 p155를 포함한다. 면역치료요법의 대안적 양상은 항암 효과를 면역 자극 효과와 조합하는 것이다. 면역 자극 분자는 또한 다음을 포함한다: 사이토카인, 예를 들어, IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, 감마-IFN, 케모킨, 예를 들어, MIP-1, MCP-1, IL-8, 및 성장 인자, 예를 들어, FLT3 리간드.

[0260] **[00243]** 면역치료요법의 예는 면역 애쥬번트(예를 들어, 마이코박테리움 보비스(Mycobacterium bovis), 플라스모디움 팔시파룸(Plasmodium falciparum), 디니트로클로로벤젠, 및 방향족 화합물); 사이토카인 치료요법, 예를 들어, 인터페론 a, b, 및 g, IL-1, GM-CSF, 및 TNF; 유전자 치료요법, 예를 들어, TNF, IL-1, IL-2, 및 p53; 및 모노클로날 항체, 예를 들어, 항-CD20, 항-강글리오시드 GM2, 및 항-p185를 포함한다. 하나 이상의 항암 치료요법은 본원에 기재된 항체 치료요법과 함께 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0261] **[00244]** 일부 구현예에서, 면역치료요법은 면역 관문 억제제일 수 있다. 면역 관문은 신호 (예를 들어, 동시 자극 분자)를 상향시키거나 신호를 하향시킨다. 면역 관문 차단에 의해 표적화될 수 있는 억제 면역 관문은 아데노신 A2A 수용체 (A2AR), B7-H3 (또한 CD276로서 공지된), B 및 T 림프구 약화인자 (BTLA), 세포독성 T-림프구-연합 단백질 4 (CTLA-4, 또한 CD152로서 공지된), 인돌아민 2,3-디옥시게나제(IDO), 킬러-세포 면역글로불린 (KIR), 림프구 활성화 유전자-3 (LAG3), 프로그래밍된 사멸 1 (PD-1), T-세포 면역글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 3 (TIM-3) 및 T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 서프레서(VISTA)를 포함한다. 특히, 면역 관문 억제제는 PD-1 축 및/또는 CTLA-4를 표적화한다.

[0262] **[00245]** 면역 관문 억제제는 소분자, 재조합 형태의 리간드 또는 수용체와 같은 약물일 수 있거나, 특히 항체, 예를 들어, 사람 항체이다. 면역 관문 단백질 또는 이의 유사체의 공지된 억제제가 사용될 수 있고 특히 키메라화된, 사람화된 또는 사람 형태의 항체가 사용될 수 있다. 당업자가 인지하는 바와 같이, 대안적 및/또는 균등한 명칭이 본원 개시내용에 언급된 특정 항체에 대해 사용될 수 있다. 상기 대안적 및/또는 균등한 명칭은 본원 개시내용과 관련하여 상호교환될 수 있다. 예를 들어, 람브롤리주맙은 대안적 및 균등한 명칭인 MK-3475 및 펨브롤리주맙으로 공지되어 있다.

[0263] **[00246]** 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 이의 리간드 결합 파트너로의 결합을 억제하는 분자이다. 특정 양상에서, PD-1 리간드 결합 파트너는 PDL1 및/또는 PDL2이다. 또 다른 구현예에서, PDL1 결합 길항제는 PDL1의 이의 결합 파트너로의 결합을 억제하는 분자이다. 특정 양상에서, PDL1 결합 파트너는 PD-1 및/또는 B7-

1이다. 또 다른 구현예에서, PDL2 결합 길항제는 PDL2의 이의 결합 파트너로의 결합을 억제하는 분자이다. 특정 양상에서, PDL2 결합 파트너는 PD-1이다. 길항제는 항체, 이의 항원 결합 단편, 면역어드헤신, 융합 단백질 또는 올리고뉴클레오타이드일 수 있다.

[0264] **[00247]** 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체 (예를 들어, 사람 항체, 사람화된 항체 또는 키메라 항체)이다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 및 CT-011로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 면역어드헤신 (예를 들어, 불변 영역 (예를 들어, 면역글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PDL1 또는 PDL2의 세포외 또는 PD-1 결합 부분을 포함하는 면역어드헤신)이다. 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 AMP-224이다. MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558, 및 OPDIVO®로서 공지된 니볼루맙은 사용될 수 있는 항-PD-1 항체이다. MK-3475, Merck 3475, 람브롤리주맙, KEYTRUDA®, 및 SCH-900475로서 또한 공지된 펨브롤리주맙은 예시적인 항-PD-1 항체이다. hBAT 또는 hBAT-1로서 또한 공지된 CT-011은 항-PD-1 항체이다. B7-DCIg로서 또한 공지된 AMP-224는 PDL2-Fc 융합 가용성 수용체이다.

[0265] **[00248]** 본원에 제공된 방법에서 표적화될 수 있는 또 다른 면역 관문은 CD152로서 공지된 세포독성 T-림프구-연합된 단백질 4 (CTLA-4)이다. 사람 CTLA-4의 완전한 cDNA 서열은 Genbank 승인 번호 L15006을 갖는다. CTLA-4는 T 세포의 표면 상에서 발견되고 항원-제공 세포의 표면 상에 CD80 또는 CD86에 결합하는 경우 "오프" 스위치로서 작용한다. CTLA4는 헬퍼 T 세포의 표면상에서 발현되고 억제 신호를 T 세포에 전송하는 면역글로불린 슈퍼패밀리의 구성원이다. CTLA4는 T-세포 동시 자극 단백질 CD28과 유사하고 2개의 분자는 각각 항원-제공 세포 상에서 B7-1 및 B7-2으로 불리우는 CD80 및 CD86에 결합한다. CTLA4는 억제 신호를 T 세포에 전송하는 반면 CD28은 자극 신호를 전송한다. 세포내 CTLA4는 또한 조절 T 세포에서 발견되고 이들의 기능을 위해 중요할 수 있다. T 세포 수용체 및 CD28을 통한 T 세포 활성화는 B7 분자에 대한 억제 수용체인, CTLA-4의 증가된 발현을 유도한다.

[0266] **[00249]** 일부 구현예에서, 면역 관문 억제제는 항-CTLA-4 항체(예를 들어, 사람 항체, 사람화된 항체, 또는 키메라 항체), 이의 항원 결합 단편, 면역어드헤신, 융합 단백질 또는 올리고펩타이드이다.

[0267] **[00250]** 본 발명의 방법에 사용하기 위해 적합한 항-사람-CTLA-4 항체(또는 이로부터 유래된 VH 및/또는 VL 도메인)은 당업계에 널리 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있다. 대안적으로, 당업계에서 인지된 항-CTLA-4 항체가 사용될 수 있다. 예시적인 항-CTLA-4 항체는 이필리무맙(또한 10D1, MDX- 010, MDX- 101, 및 Yervoy®로서 공지된) 또는 이의 항원 결합 단편 및 변이체이다. 다른 구현예에서, 상기 항체는 이필리무맙의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함한다. 따라서, 하나의 구현예에서, 항체는 이필리무맙의 VH 영역의 CDR1, CDR2, 및 CDR3 도메인 및 이필리무맙의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 상기 언급된 항체와 CTLA-4상의 동일한 항체에 결합하는 것에 경쟁하고/하거나 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 상기 언급된 항체와 적어도 약 90%의 가변 영역 아미노산 서열 동일성(예를 들어, 이필리무맙과 적어도 약 90%, 95%, 또는 99% 가변 영역 동일성)을 갖는다.

[0268] **4. 수술**

[0269] **[00251]** 암을 갖는 사람의 대략 60%는 동일한 유형의 수술을 진행하고 이는 예방적, 진단학적 또는 단계 결정, 치유적 및 일시적인 수술을 포함한다. 치유적 수술은 암성 조직의 전부 또는 일부가 물리적으로 제거되고, 절제되고/되거나 파괴된 절제술을 포함하고 본 발명의 구현예의 치료, 화학치료요법, 방사성 치료요법, 호르몬 치료요법, 유전자 치료요법 및/또는 대안적 치료요법과 같은 다른 치료요법과 연계하여 사용될 수 있다. 종양 절제술은 종양의 적어도 일부의 물리적 제거를 언급한다. 종양 절제술에 추가로, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 냉동수술, 전기수술, 및 현미경적으로 제어된 수술(모흐 수술(Mohs' surgery))을 포함한다.

[0270] **[00252]** 암성 세포, 조직 또는 종양의 일부 또는 전부의 절제 시, 공동이 신체에 형성될 수 있다. 치료는 관류, 직접적인 주사 또는 추가의 항암 치료요법을 사용한 영역의 국소 적용에 의해 성취될 수 있다. 상기 치료는 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일 마다, 또는 1, 2, 3, 4, 및 5주 마다, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월 마다 반복될 수 있다. 이들 치료는 또한 다양한 용량일 수 있다.

[0271] **5. 다른 제제**

[0272] **[00253]** 다른 제제는 치료의 치료학적 효능을 개선시키기 위해 본 구현예의 특정 양상과 조합하여 사용될 수 있는 것으로 고려된다. 이들 추가의 제제는 세포 표면 수용체 및 GAP 접속부의 상향 조절에 영향을 미치는 제제, 세포증식 억제 및 분화제, 세포 접착의 억제제, 과증식성 세포의 아폽토시스 유도제에 대한 민감성을 증가시키는 제제 또는 다른 생물학적 제제를 포함한다. GAP 접속부의 수를 상승시킴에 의한 세포내 신호전달의 증가는

이웃하는 과증식성 세포 집단에 대한 항-과증식성 효과를 증가시킨다. 다른 구현예에서, 세포증식억제 또는 분화제는 치료의 항-과증식성 효능을 개선시키기 위해 본 구현예의 특정 양상과 조합하여 사용될 수 있다. 세포 접착의 억제제는 본 구현예의 효능을 개선시키는 것으로 고려된다. 세포 접착 억제제의 예는 병소 접착 키나제 (FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 과증식성 세포의 아폽토시스에 대한 민감성을 증가시키는 다른 제제, 예를 들어, 항체 c225는 치료 효능을 개선하기 위해 본 구현예의 특정 양상과 조합하여 사용될 수 있는 것으로 추가로 고려된다.

[0273] **III. 제품 또는 키트**

[0274] **[00254]** 면역 세포를 포함하는 제품 또는 키트가 또한 본원에 제공된다. 제품 또는 키트는 추가로 개체에서 암을 치료하거나 이의 진행을 지연시키거나 암을 갖는 개체의 면역 기능을 증진시키기 위해 면역 세포를 사용하기 위한 지침서를 포함하는 팩키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다. 본원에 기재된 임의의 항원-특이적 면역 세포는 제품 또는 키트에 포함될 수 있다. 적합한 컨테이너는 예를 들어, 병, 바이알, 백 및 시린지를 포함한다. 컨테이너는 다양한 재료, 예를 들어, 유리, 플라스틱 (예를 들어, 폴리비닐 클로라이드 또는 폴리올레핀), 또는 금속 합금 (예를 들어, 스테인레스강 또는 하스텔로이)으로부터 형성될 수 있다. 일부 구현예에서, 컨테이너는 제형 및 이의 위에 또는 연합된 표지를 보유하고, 상기 컨테이너는 사용 지침을 지적할 수 있다. 제품 또는 키트는 추가로 다른 완충액, 희석제, 충전제, 바늘, 시린지 및 팩키지 삽입물을 사용 지침서와 함께 포함하는, 상업적 및 사용자 견지에서 요구될 수 있는 다른 물질을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 제품은 추가로 하나 이상의 또 다른 제제 (예를 들어, 화학치료학적 제제 및 항-신생물제)를 포함한다. 하나 이상의 제제를 위해 적합한 컨테이너는 예를 들어, 병, 바이알, 백 및 시린지를 포함한다.

[0275] **IV. 실시예**

[0276] **[00255]** 하기의 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 입증하기 위해 포함된다. 당업계의 숙련자라면, 하기의 실시예에 기술된 기법들이 본 발명을 잘 수행하기 위해 본 발명자들에 의해 발견된 기법들을 대표하는 것이기 때문에, 발명의 수행에 대한 바람직한 양태를 구성하는 것으로 간주될 수 있음을 알 수 있을 것이다. 그러나, 당업계의 숙련자라면, 본 명세서의 내용을 고려하여, 개시된 구체적인 구현예에 있어서 본 발명의 개념과 범위를 벗어나지 않으면서 여러가지 변화를 주어도 그와 비슷하거나 유사한 결과를 얻을 수 있다는 사실을 알 수 있을 것이다.

[0277] **실시예 1- 멀티플렉스 유전자 편집**

[0278] **[00256]** 면역 세포, 예를 들어, T 세포 및 NK 세포에서 다중 유전자의 발현을 동시에 파괴하는 효능을 시험하기 위해, 여러 연구를 수행하여 CRISPR을 사용한 유전자의 상이한 조합의 파괴를 시험하였다. 제1 연구에서, CRISPR/Cas9를 사용하여 NK 세포에서 NKG2A, CD47, TGFBR2, 및 CISH의 발현을 파괴하였다. 상기 유전자 세트에서, NKG2A 및 CD47은 제1 라운드의 전기천공 및 제2 라운드의 전기천공에서 녹아웃되고, CISH 및 TGFBR2가 표적화되었다. 녹아웃 효율은 2개 라운드의 전기천공을 위해 PCR 및 유동-세포측정을 사용하여 성공적으로 입증되었다.

[0279] **[00257]** 다중 유전자를 파괴하는 방법은 TIGIT, CD96, CISH, 아데노신 (도 2) 및 NKG2A, CD47, TGFBR2 및 CISH (도 3)을 포함하는 추가의 세트의 유전자에서 입증되었다. 다중 유전자의 파괴는 표적 종양 세포에 대한 기능을 증진시키는 것으로 밝혀졌다. IFN-γ, TNFα 및 CD107 생성의 유동 세포측정 분석은 브레펠딘 A의 존재하에 5시간 동안 표적 세포주로 동시 자극된 다양한 NK 세포 (편집된 것 대 Cas9 단독)를 사용하여 수행하였다. 표적 세포주를 사용한 자극 후 IFN-γ, TNFα 및 CD107 분비가 증진되었다(도 3).

[0280] **[00258]** 상기 증진된 기능은 NK 세포에서 NKG2A, CD47, TGFBR2 및 CISH의 파괴에 의해 확인되었고, 이는 K562 세포에 대한 ^{51}Cr-방출 검정에 의한 측정시 증진된 항종양 세포독성을 보여주었다(도 4a). 추가로, 재조합 TGF-B 처리 (50ng/ml)의 30분 후, pSMAD 활성은 유동 세포측정에 의해 측정하였다(도 4b). 또한 NK 세포는 사이토킨 자극 또는 표적 인지 시 CD16 및 CD62L 발현을 상실하고(도 5) NK 세포에서 ADAM17의 녹아웃은 CD16 및 CD62L의 발산을 방지하고 (도 6), K562 표적에 대해 ADCC 및 세포독성을 개선시킨다(도 7).

[0281] **[00259]** 추가의 연구는 NK 세포에서 SHP1의 파괴가 증진된 항종양 효능을 유도함을 보여주었다(도 9 및 10). NK 세포는 4시간 동안 1:1 비율로 K562/Rji 세포와 함께 동시 배양하였다. 배양 후, 세포는 어넥신 V로 염색시키고 생 세포 및 죽은 세포를 분석하였다. K562 세포는 NK 세포 사멸에 민감성이고 Raji 세포는 NK 세포 사멸에 내성이다. 추가로, NK-CAR 세포에서 NKG2A의 파괴는 Raji 표적에 대해 증진된 항종양 효능을 유도하였다(도 12).

[0282] **[00260]** 본원의 접근법은 추가로 추가 세트의 유전자 - TIGIT, CD96, CISH, 및 아데노신 및 NKG2A, CISH, TGFBRII 및 아데노신으로 입증되었다. NK 세포 기능은 유동 세포측정에 의해 평가하였고, 표적 세포주 자극 시 세포에서 TNFα, IFNɣ, 및 CD107a의 증가가 관찰되었다(도 13-14).

[0283] **[00261]** 따라서, 본 발명의 방법을 사용하여 면역 세포에서 다중 유전자의 발현을 동시에 파괴하여 이들의 기능을 증가시켰다.

[0284] **실시예 2 - 방법**

[0285] **[00262]** sgRNA-Cas9 예비-복합체화 및 전기천공: 인접 영역에 걸친 1 또는 2개의 sgRNA는 각각의 유전자에 대해 디자인하고 사용하였다. 1ug cas9 (PNA Bio) 및 500ng sgRNA (모든 sgRNA의 합) 반응은 각각의 유전자에 대해 수행하였고 20분 동안 빙상에서 항온처리하였다. 20분 후, 250,000개의 NK 세포는 T-완충액* (Neon 전기천공 키트 (Invitrogen)와 함께 포함되고, RNP 복합체 및 세포를 포함하는 총 용적은 14ul이어야만 한다) 중에 재현탁시키고 Neon 형질감염 시스템을 사용하여 10ul 전기천공 팁으로 전기천공하였다. 전기천공 조건은 NK 세포에 대해 1600V, 10ms, 및 3 펄스이다*. 세포는 이어서 APC(1 NK: 2 APC), SCGM 배지 (바람직하게 항생제 부재), 200IU/ml IL2를 갖는 배양 플레이트에 첨가하고 37° C 항온처리기에서 회복되도록 방치하였다.

[0286] **[00263]** crRNA 예비-복합체화 및 전기천공: crRNA 및 tracrRNA 듀플렉스는 피펫 및 원심분리로 혼합하였다. 혼합물은 열순환기에서 5분동안 95° C에서 항온처리하고 이어서 벤치탑(benchtop) 상에서 실온으로 냉각되도록 방치하였다.

[0287] **[00264]** [표 3]

crNRA 및 tracrRNA 듀플렉스.

	용적	농도		용적	농도
crRNA # 1	2.2ul	100uM	crRNA # 2	2.2ul	100uM
tracrRNA	2.2ul	100uM	tracrRNA	2.2ul	100uM
IDTE 완충액	5.6ul		IDTE 완충액	5.6ul	
총 용적	**10ul**	**44uM**	**총 용적**	**10ul**	**44uM**

[0288] crRNA 및 tracrRNA의 출발 농도는 100uM이다. 이들을 동몰 농도로 혼합한 후 최종 농도는 44uM이다.

[0289] **[00265]** [표 4]

Cas9 뉴클레아제.

	용적
Alt-R S.p. Cas9 뉴클레아제 3NLS (61uM)	3ul
T 완충액	7ul
총 용적	**10ul**
최종 농도	**18uM**

[0290]

[0291] [00266] [표 5]

crRNA:tracrRNA 및 Cas9 뉴클레아제 혼합물의 조합.

	용적
crRNA # 1: tracrRNA 듀플렉스 (단계 1)	2ul
Cas9 (Step 2)	2ul
총 용적	**4ul**

[0292]

[0293] [00267] crRNA: tracrRNA 듀플렉스는 피펫으로 Cas9 뉴클레아제 믹스(Mix)와 조합하였고 15분동안 실온에서 항온처리하였다. 상기 혼합물은 이어서 crRNA와 조합하였다.

[0294] [00268] [표 6]

crRNA # 1 및 crRNA # 2.

	용적
crRNA # 1 + tracrRNA + cas9 (단계 3)	2.25ul
crRNA # 2 + tracrRNA + cas9 (단계 3)	2.25ul
총 용적	**4.5ul**

[0295]

[0296] [00269] 전기천공은 먼저 APC (1 NK: 2 APC), SCGM 배지 (바람직하게 항생제 부재), 및 200IU/mL IL-2와 함께 배양 플레이트를 제조함에 의해 수행하였다. 웰 당 250,000 세포를 제조하고 사용 직전에 7.5ul T 완충액 중에 재현탁시켰다. 전기천공 조건은 1600V, 10ms, 및 3 펄스이다*. 세포는 이어서 배양 플레이트에 첨가하고 37° C 항온처리기에서 회복되도록 방치하였다.

[0297] [00270] NK 세포 확장: NK 세포 단리 키트 (제조원: Miltenyi (130-092-657))를 사용하여 제대혈 또는 말초 혈액으로부터 NK 세포를 단리한다. NK 세포를 IL2(200IU/ml)의 존재하에 1:2 비율 (1개 NK 세포 2개 피더 세포)로 피더 세포와 함께 SCGM 배지에 첨가한다. 배지를 격일로 IL2로 갈아준다. 4일째 NK 세포 단리 키트를 사용하여 NK 세포를 재선택하여 피더 세포를 제거하거나 모든 피더 세포가 소실될때까지 7일동안 대기한다. 키메라 항원 수용체로 형질도입하거나 Crispr-Cas9에 대해 전기천공한다.

[0298] * * *

[0299] [00271] 본원에 개시되고 청구된 모든 방법들은 본 명세서의 내용을 고려하여 과도한 실험없이 만들어 수행할 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 구현예의 관점에서 기술되었지만, 본 발명의 당업계의 개념, 의미 및 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변화들을 본원에 기술된 방법들, 상기 방법의 단계들 또는 상기 방법 단계들의 순서에 적용할 수 있다는 사실은 당업계의 숙련자들에게는 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적 및 생리학적으로 모두 관련되어 있는 특정 제제의 경우 이들을 사용하여도 동일하거나 유사한 결과가 달성된다면 본원에 기술된 제제를 대체할 수 있음도 명백할 것이다. 당업계의 숙련자들에게 명백한 이러한 모든 유사한 대체물 및 변형은 첨부된 특허청구범위에 정의된 본 발명의 의미, 범위 및 개념에 속하는 것으로 간주된다.

[0300] **참고문헌**

[0301] 하기의 참고문헌들은, 본원에 기술된 내용에 대하여 예시적인 절차이거나 이를 보충하는 기타 상세한 설명을 제공하는 정도로, 본원에 참고로서 상세하게 포함된다.

Austin-Ward and Villaseca, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

Bennekov *et al., Mt. Sinai J. Med.* 71 (2): 86-93, 2004.

Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.

Camacho *et al. J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206), 2004.

Campbell, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.,* 298: 23-57, 2006.

Chothia *et al.*, *EMBO J.* 7:3745, 1988.

Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.

Cohen *et al. J Immunol.* 175:5799-5808, 2005.

Davidson *et al., J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.

Davila *et al. PLoS ONE* 8(4): e61338, 2013.

Doulatov *et al., Cell Stem Cell.* 10:120-36, 2012.

European patent application number EP2537416

Fedorov *et al.*, *Sci. Transl. Medicine*, 5(215), 2013.

Frolet *et al., BMC Microbiol.* 10:190 (2010).

Gaj *et al., Trends in Biotechnology* 31(7), 397-405, 2013.

Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.

Heemskerk *et al. Hum Gene Ther.* 19:496-510, 2008.

Hellstrand *et al., Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.

Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.

Hubert *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 14523-28, 1999.

Hui and Hashimoto, *Infection Immun.,* 66(11):5329-5336, 1998.

Hurwitz *et al. Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071, 1998.

International Patent Publication No. WO 00/37504

International Patent Publication No. WO 01/14424

International Patent Publication No. WO 2007/069666

International Patent Publication No. WO 2007/069666

[0302]

International Patent Publication No. WO 98/42752
International Patent Publication No. WO/2014055668
International Patent Publication No. WO1995001994
International Patent Publication No. WO1998042752
International Patent Publication No. WO2000037504
International Patent Publication No. WO200014257
International Patent Publication No. WO2001014424
International Patent Publication No. WO2006/121168
International Patent Publication No. WO2007/103009
International Patent Publication No. WO2009/101611
International Patent Publication No. WO2009/114335
International Patent Publication No. WO2010/027827
International Patent Publication No. WO2011/066342
International Patent Publication No. WO2012/129514
International Patent Publication No. WO2013/071154
International Patent Publication No. WO2013/123061
International Patent Publication No. WO2013/166321
International Patent Publication No. WO2013126726
International Patent Publication No. WO2014/055668
International Patent Publication No. WO2014031687
International Patent Publication No. WO2015016718
International Patent Publication No. WO99/40188
Janeway *et al*, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 433, 1997.
Johnson *et al*. *Blood* 114:535-46, 2009.
Jores *et al., PNAS U.S.A*. 87:9138, 1990.
Kim *et al., Nature Biotechnology* 31, 251-258, 2013.
Kirchmaier and Sugden, *J. Virol*., 72(6):4657–4666, 1998.
Leal, M., *Ann N Y Acad Sci* 1321, 41-54, 2014.
Lefranc *et al*., *Dev. Comp. Immunol*. 27:55, 2003.
Li *et al. Nat Biotechnol*. 23:349-354, 2005.
Li *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4275-4279, 1992.
Linnemann, C. *et al. Nat Med* 21, 81–85, 2015.
Lockey *et al., Front. Biosci.* 13:5916-27, 2008.

[0303]

Loewendorf *et al., J. Intern. Med*. 267(5):483-501, 2010.

Ludwig *et al*. *Nature Biotech*., (2):185-187, 2006a.

Ludwig *et al. Nature Methods*, 3(8):637-646, 2006b.

Marschall *et al., Future Microbiol*. 4:731-42, 2009.

Mokyr *et al. Cancer Res* 58:5301-5304, 1998.

Notta *et al.*, *Science*, 218-221, 2011.

Pardoll, *Nat Rev Cancer,* 12(4): 252-64, 2012

Parkhurst *et al*. *Clin Cancer Res*. 15: 169-180, 2009.

Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.

Rieder *et al., J. Interferon Cytokine Res.* (9):499-509, 2009.

Rykman, *et al., J. Virol.* 80(2):710-22, 2006.

Sadelain *et al., Cancer Discov*. 3(4): 388-398, 2013.

Sambrook *et al*., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001.

Shah *et al.*, *PLoS One*, 8:e776781, 2013.

Singh *et al.*, *Cancer Research*, 68:2961-2971, 2008.

Singh *et al.*, *Cancer Research*, 71:3516-3527, 2011.

Takahashi *et al*., *Cell*, 126(4):663-76, 2007.

Terakura *et al*. *Blood*. 1:72- 82, 2012.

Turtle *et al*., *Curr. Opin. Immunol*., 24(5): 633-39, 2012.

U.S. Patent No. 4,870,287

U.S. Patent No. 5,739,169

U.S. Patent No. 5,760,395

U.S. Patent No. 5,801,005

U.S. Patent No. 5,824,311

U.S. Patent No. 5,830,880

U.S. Patent No. 5,844,905

U.S. Patent No. 5,846,945

U.S. Patent No. 5,885,796

U.S. Patent No. 5,994,136

U.S. Patent No. 6,013,516

U.S. Patent No. 6,103,470

U.S. Patent No. 6,207,156

U.S. Patent No. 6,225,042

[0304]

U.S. Patent No. 6,355,479
U.S. Patent No. 6,362,001
U.S. Patent No. 6,410,319
U.S. Patent No. 6,416,998
U.S. Patent No. 6,544,518
U.S. Patent No. 6,790,662
U.S. Patent No. 7,109,304
U.S. Patent No. 7,442,548
U.S. Patent No. 7,446,190
U.S. Patent No. 7,598,364
U.S. Patent No. 7,989,425
U.S. Patent No. 8,008,449
U.S. Patent No. 8,017,114
U.S. Patent No. 8,058,065
U.S. Patent No. 8,071,369
U.S. Patent No. 8,119,129
U.S. Patent No. 8,129,187
U.S. Patent No. 8,183,038
U.S. Patent No. 8,268,620
U.S. Patent No. 8,329,867
U.S. Patent No. 8,354,509
U.S. Patent No. 8,546,140
U.S. Patent No. 8,691,574
U.S. Patent No. 8,735,553
U.S. Patent No. 8,741,648
U.S. Patent No. 8,900,871
U.S. Patent No. 9,175,268
U.S. Patent Publication No. 2010/0210014
U.S. Patent Publication No. 12/478,154
U.S. Patent Publication No. 2002131960
U.S. Patent Publication No. 2003/0211603
U.S. Patent Publication No. 2005/0260186
U.S. Patent Publication No. 2006/0104968
U.S. Patent Publication No. 2009/0004142

[0305]

U.S. Patent Publication No. 2009/0017000

U.S. Patent Publication No. 2009/0246875

U.S. Patent Publication No. 2011/0104125

U.S. Patent Publication No. 2011/0301073

U.S. Patent Publication No. 20110008369

U.S. Patent Publication No. 2012/0276636

U.S. Patent Publication No. 2013/0315884

U.S. Patent Publication No. 20130149337

U.S. Patent Publication No. 2013287748

U.S. Patent Publication No. 2014/0120622

U.S. Patent Publication No. 2014022021

U.S. Patent Publication No. 20140294898

Varela-Rohena *et al*. *Nat Med*. 14: 1390-1395, 2008.

Wang *et al*. *J Immunother*. 35(9):689-701, 2012.

Wu *et al., Adv. Cancer Res.,* 90: 127-56, 2003.

Wu *et al*., *Cancer*, 18(2): 160-75, 2012.

Yamanaka *et al., Cell,* 131(5):861-72, 2007.

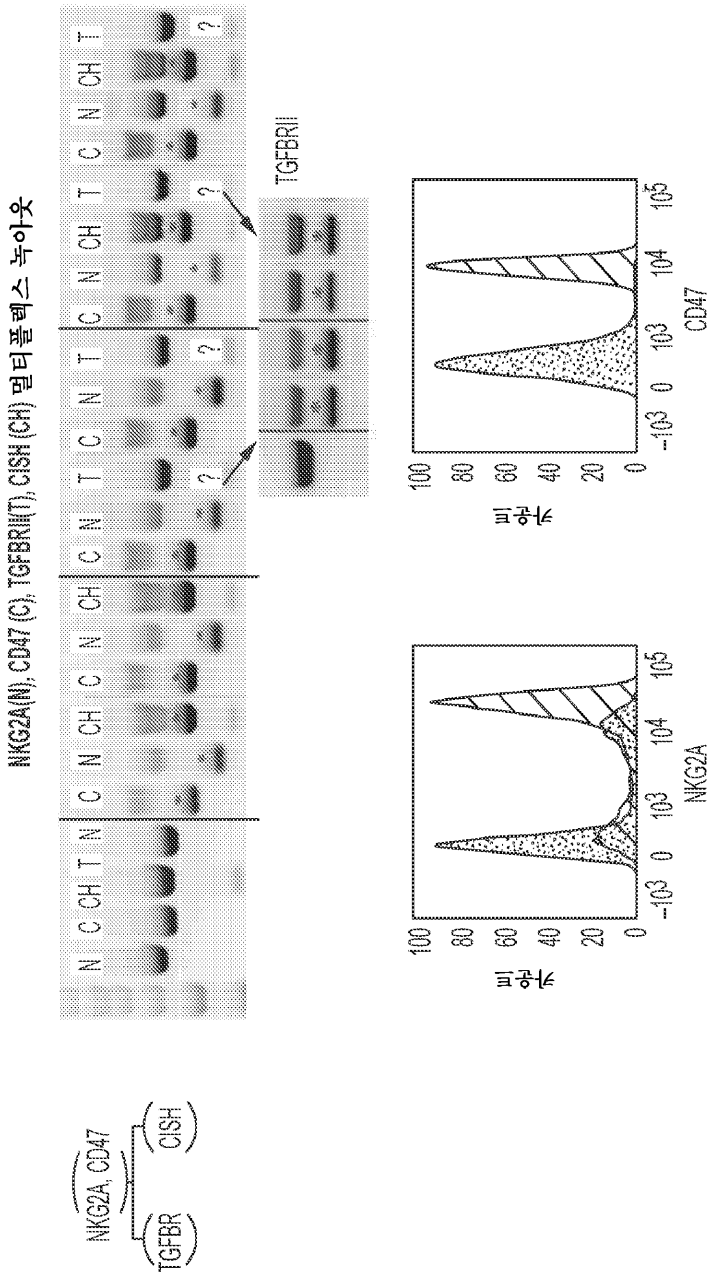
Yu *et al., Science*, 318:1917-1920, 2007.

Zysk *et al., Infect. Immun*. 68(6):3740-43, 2000.

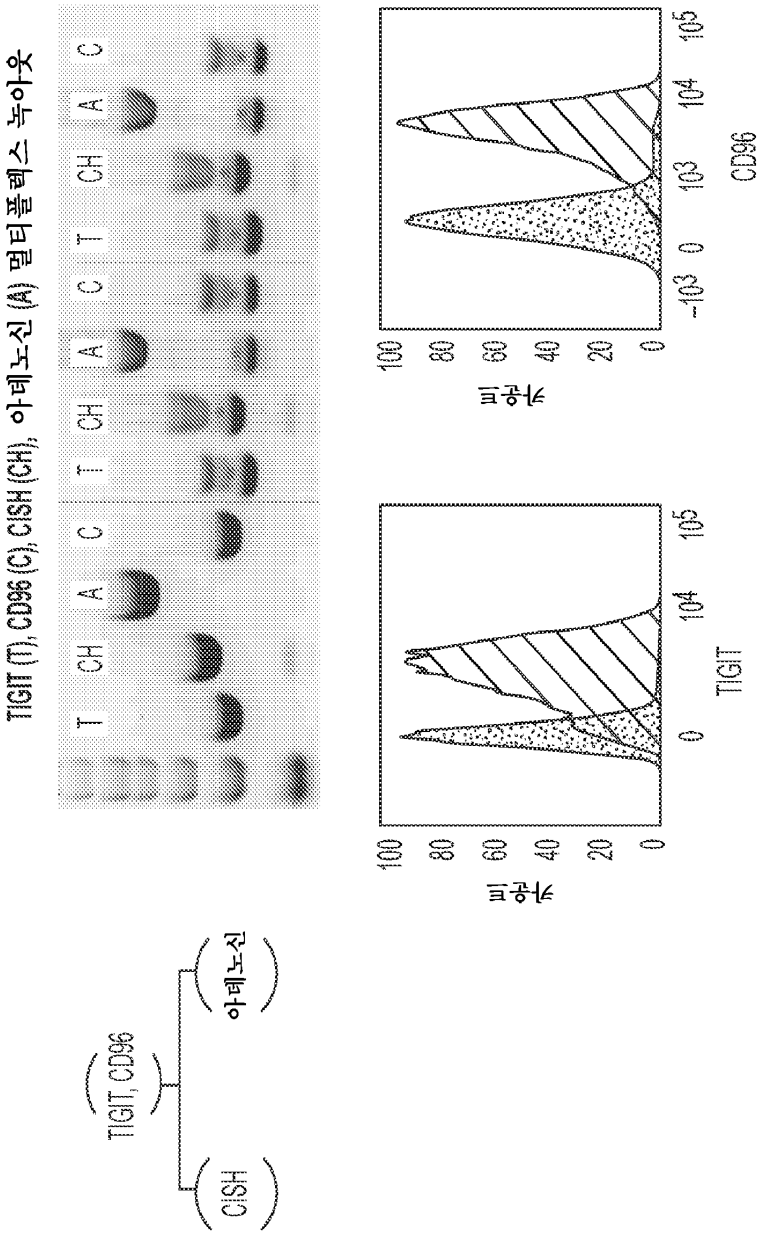
[0306]

도면

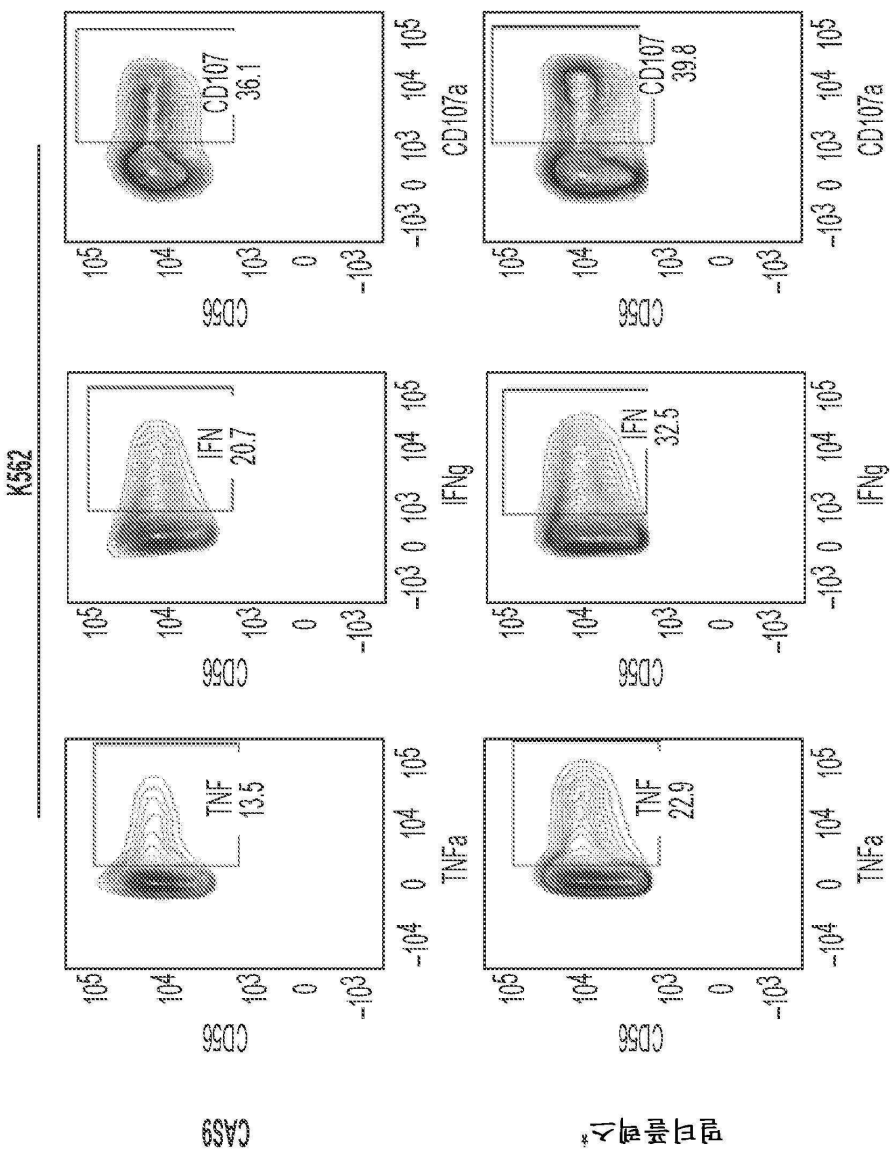
도면1


NKG2A(N), CD47 (C), TGFBRII(T), CISH (CH) 멀티플렉스 녹아웃
N C CH T N C N CH C N CH C N T C N T C N CH T C N CH T
TGFBRII
NKG2A, CD47
CISH
TGFBR
카운트
NKG2A
CD47

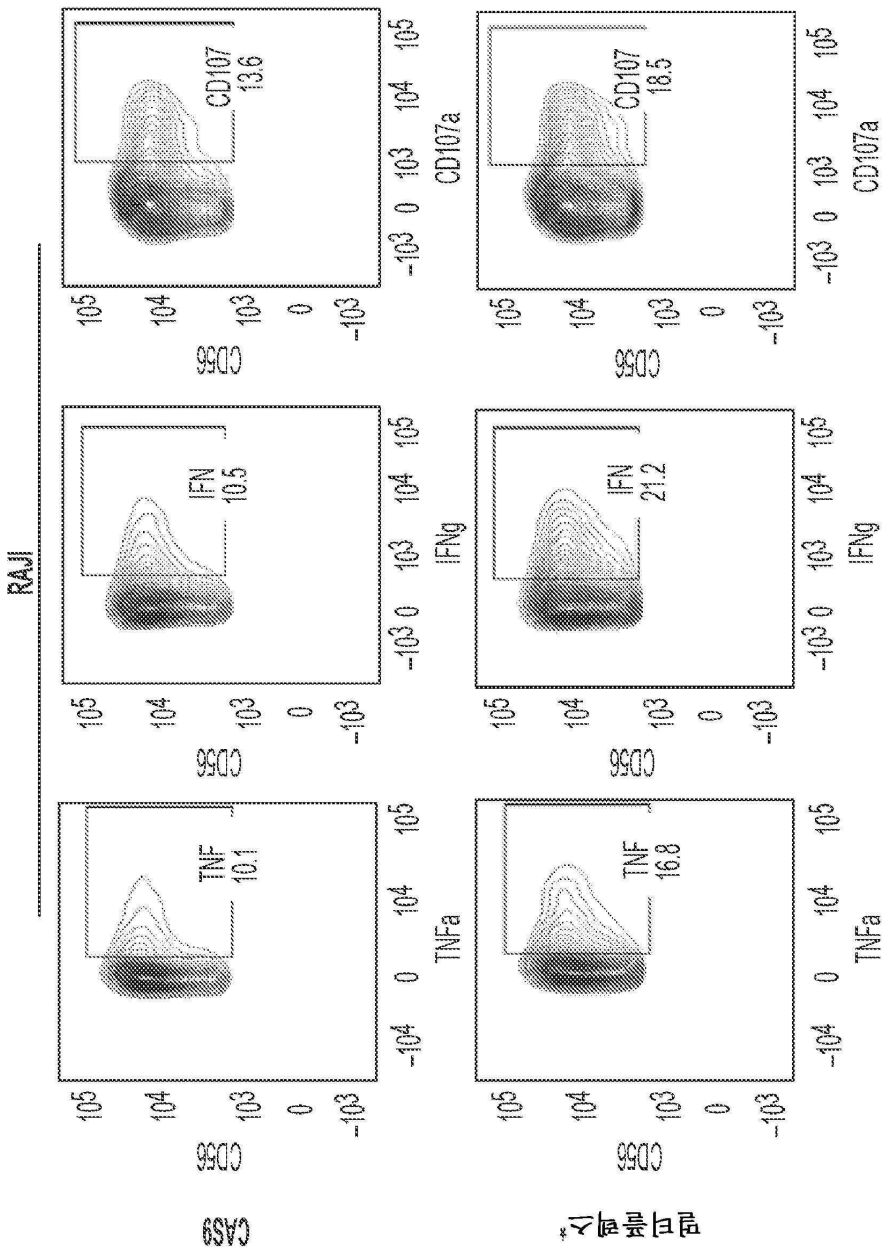
도면2


TIGIT (T), CD96 (C), CISH (CH), 아데노신 (A) 멀티플렉스 녹아웃
T
CH
A
C
T
CH
A
C
T
CH
A
C
T
CH
A
C
TIGIT, CD96
CISH
아데노신
카운트
TIGIT
CD96
0
20
40
60
80
100
-103
0
103
104
105

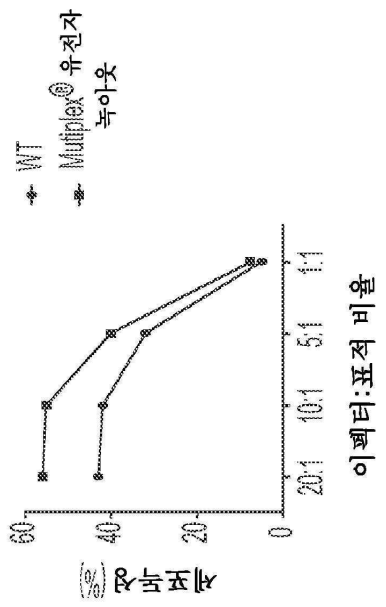
도면3a


K562
CAS9
멀티플렉스*
CD56
CD107a
IFNg
TNFa
CD107
36.1
39.8
IFN
20.7
32.5
TNF
13.5
22.9

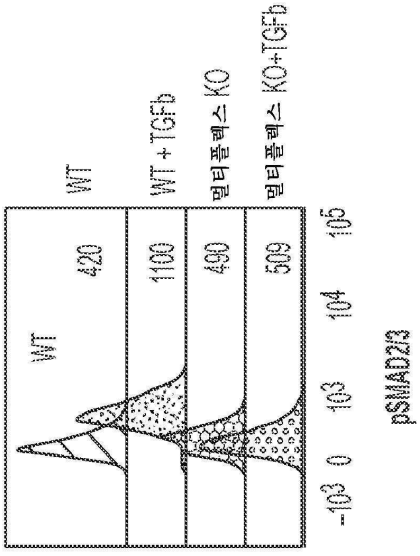
도면3b


RAJI
CAS9
멀티플렉스*
CD56
CD107a
IFNg
TNFa
CD107
13.6
IFN
10.5
TNF
10.1
CD107
18.5
IFN
21.2
TNF
16.8

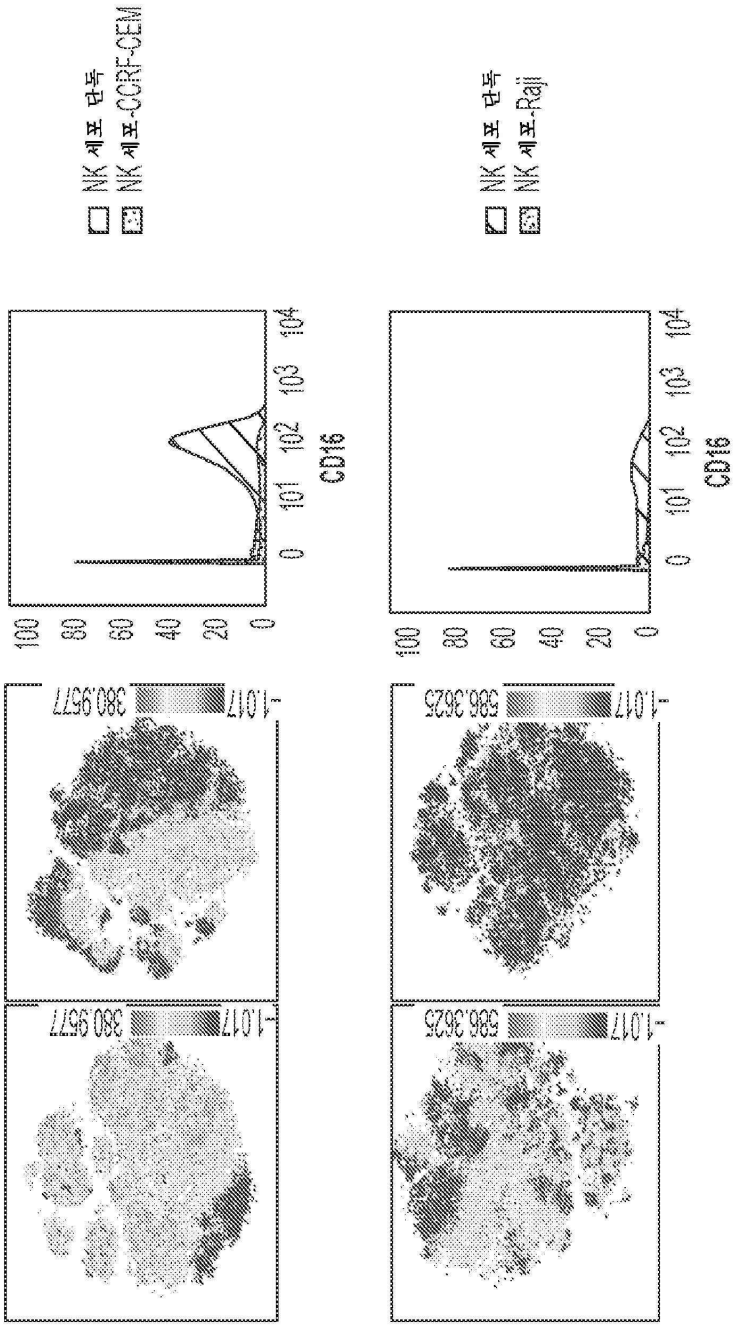
도면4a


WT
Multiplex® 유전자 녹아웃
세포독성 (%)
60
40
20
0
20:1
10:1
5:1
1:1
이펙터:표적 비율

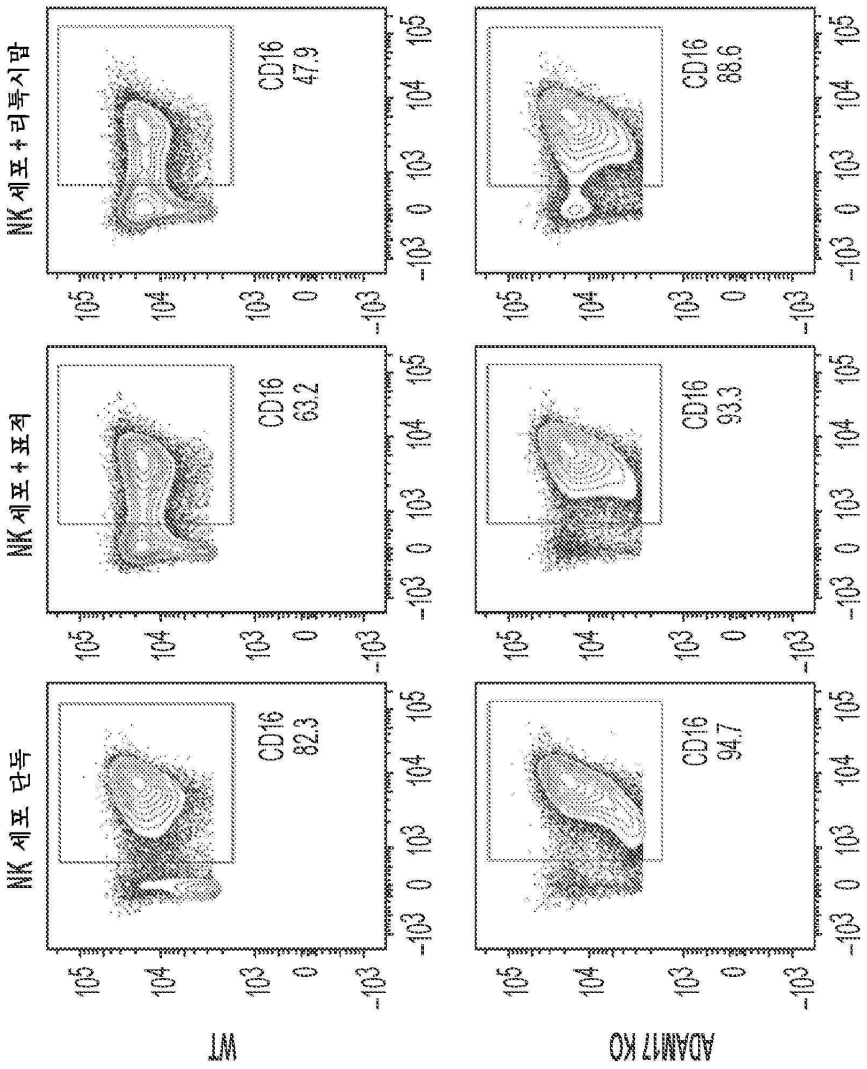
도면4b


WT
420
WT + TGFb
1100
멀티플렉스 KO
490
멀티플렉스 KO+TGFb
509
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
pSMAD2/3

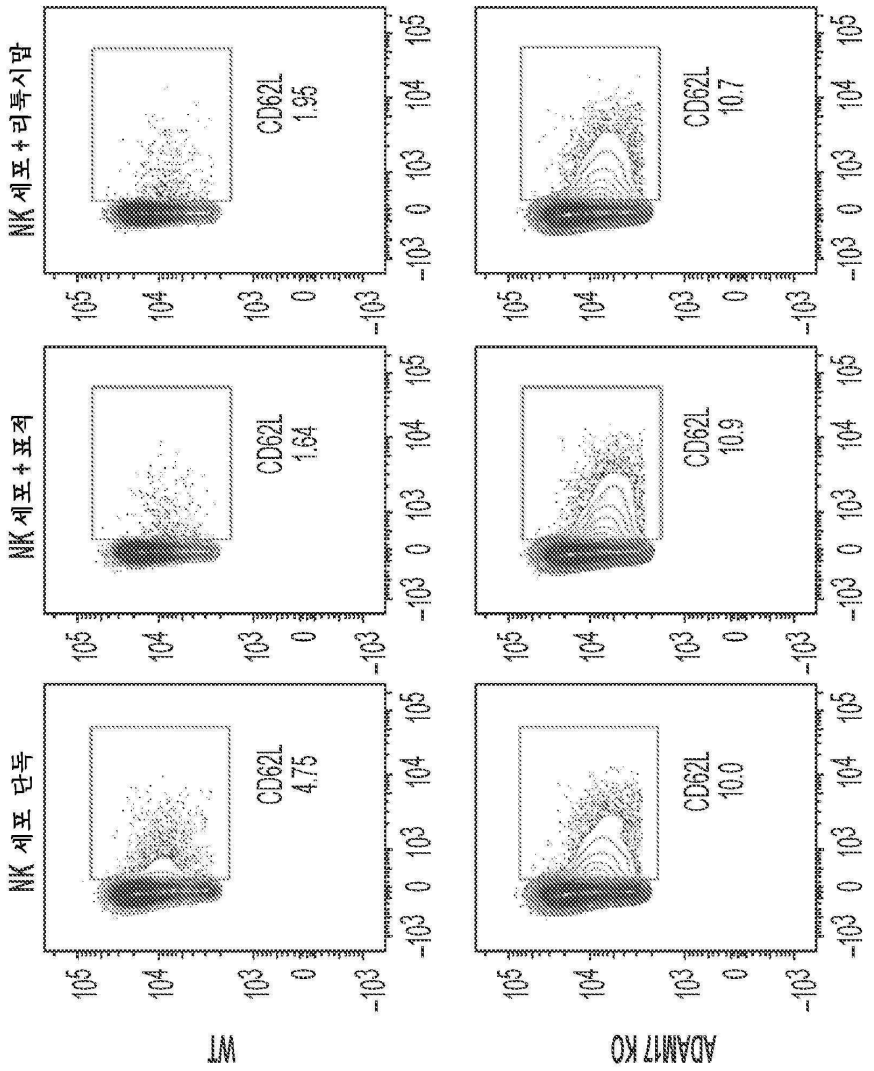
도면5


NK 세포 단독
NK 세포-CCRF-CEM
NK 세포 단독
NK 세포-Raji
CD16
CD16
100
80
60
40
20
0
0
101
102
103
104
-1.017
380.9577
-1.017
380.9577
-1.017
586.3625
-1.017
586.3625

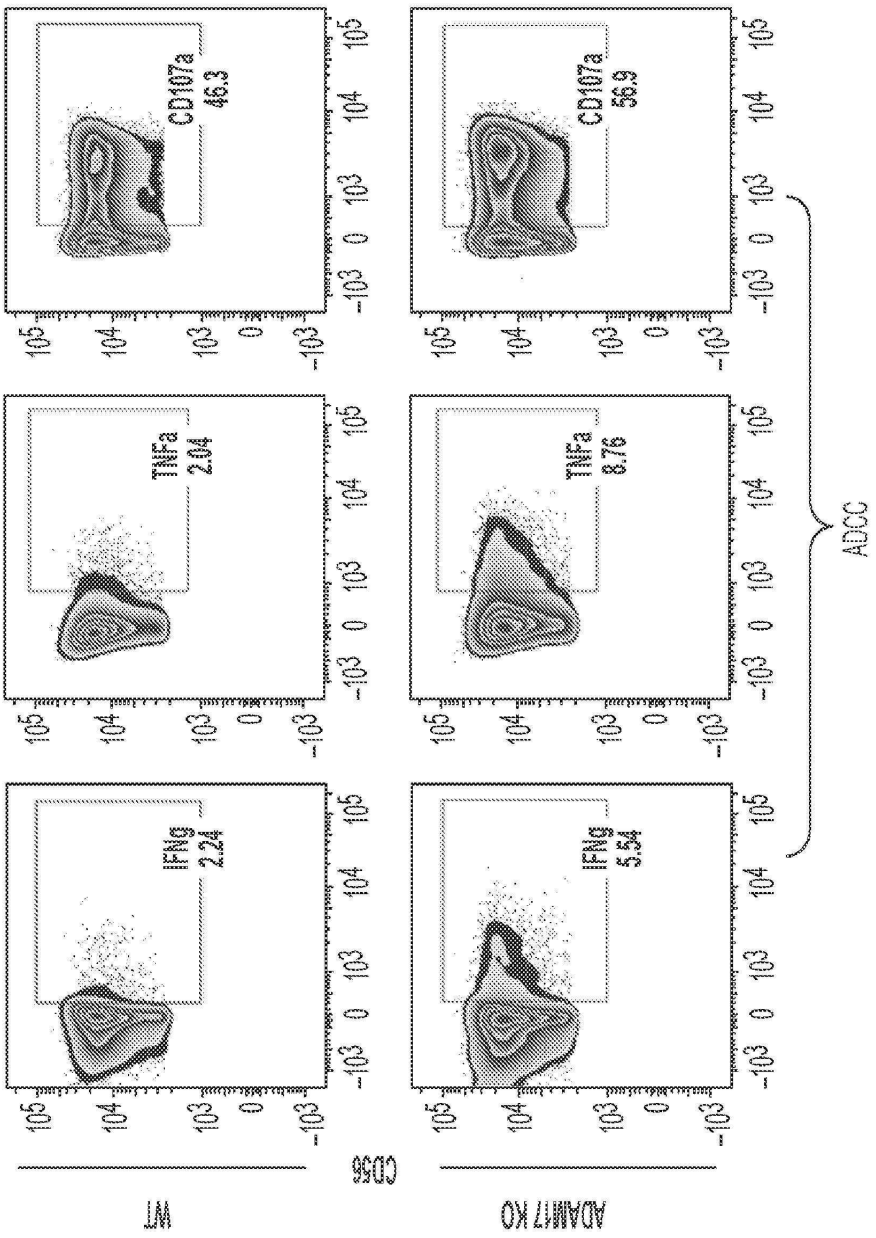
도면6a


NK 세포 단독
NK세포+표적
NK세포+리툭시맙
WT
ADAM17 KO
CD16
82.3
CD16
63.2
CD16
47.9
CD16
94.7
CD16
93.3
CD16
88.6
105
104
103
0
-103
-103
0
103
104
105

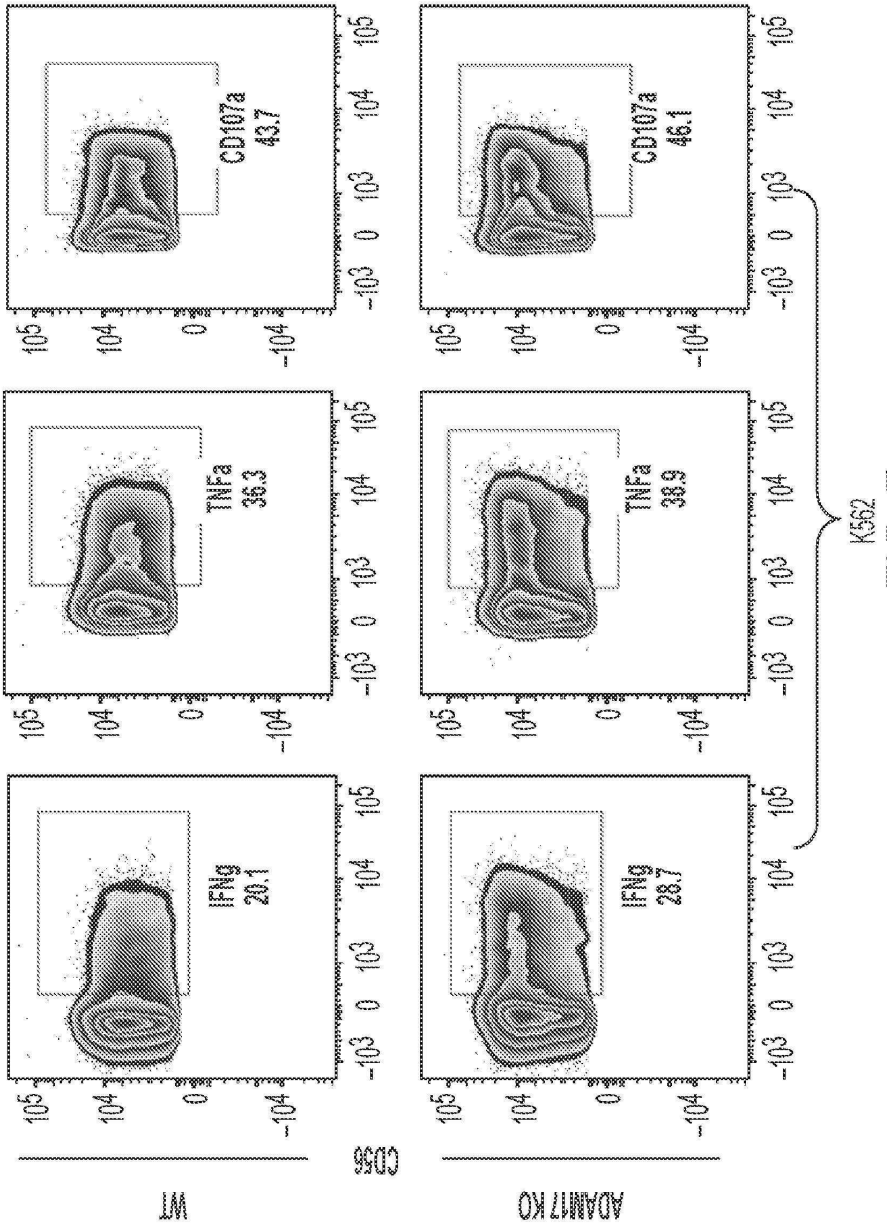
도면6b


NK 세포 단독
NK 세포 + 표적
NK 세포 + 리툭시맙
WT
ADAM17 KO
CD62L
4.75
CD62L
1.64
CD62L
1.95
CD62L
10.0
CD62L
10.9
CD62L
10.7
-10³
0
10³
10⁴
10⁵

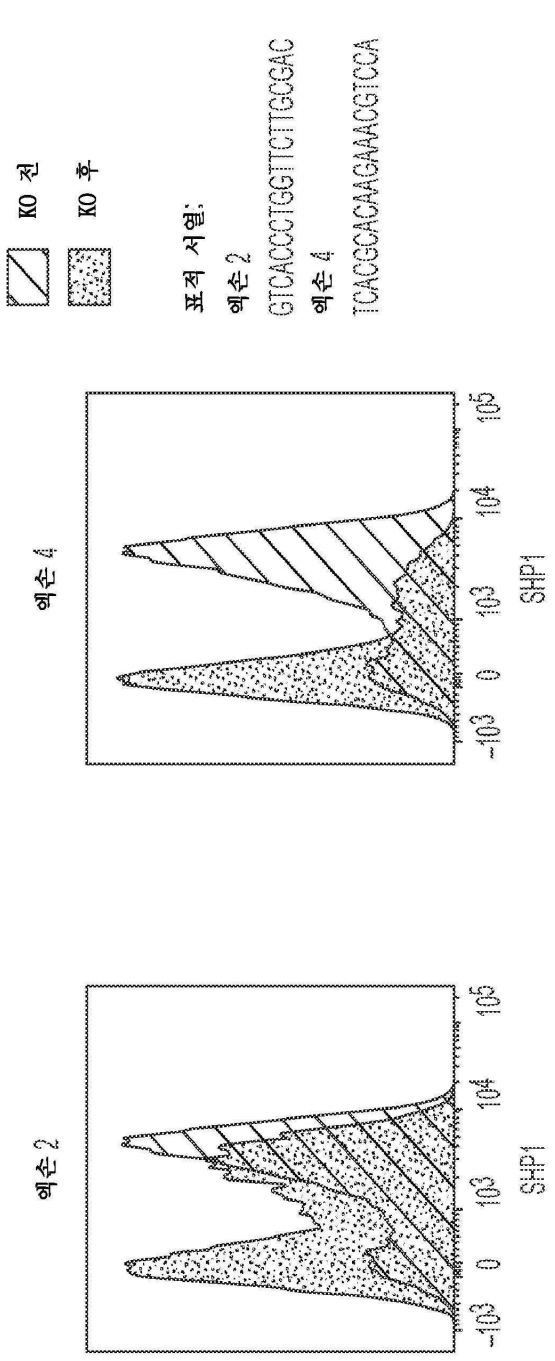
도면7a


WT
ADAM17 KO
CD56
IFNg
2.24
TNFa
2.04
CD107a
46.3
IFNg
5.54
TNFa
8.76
CD107a
56.9
ADCC

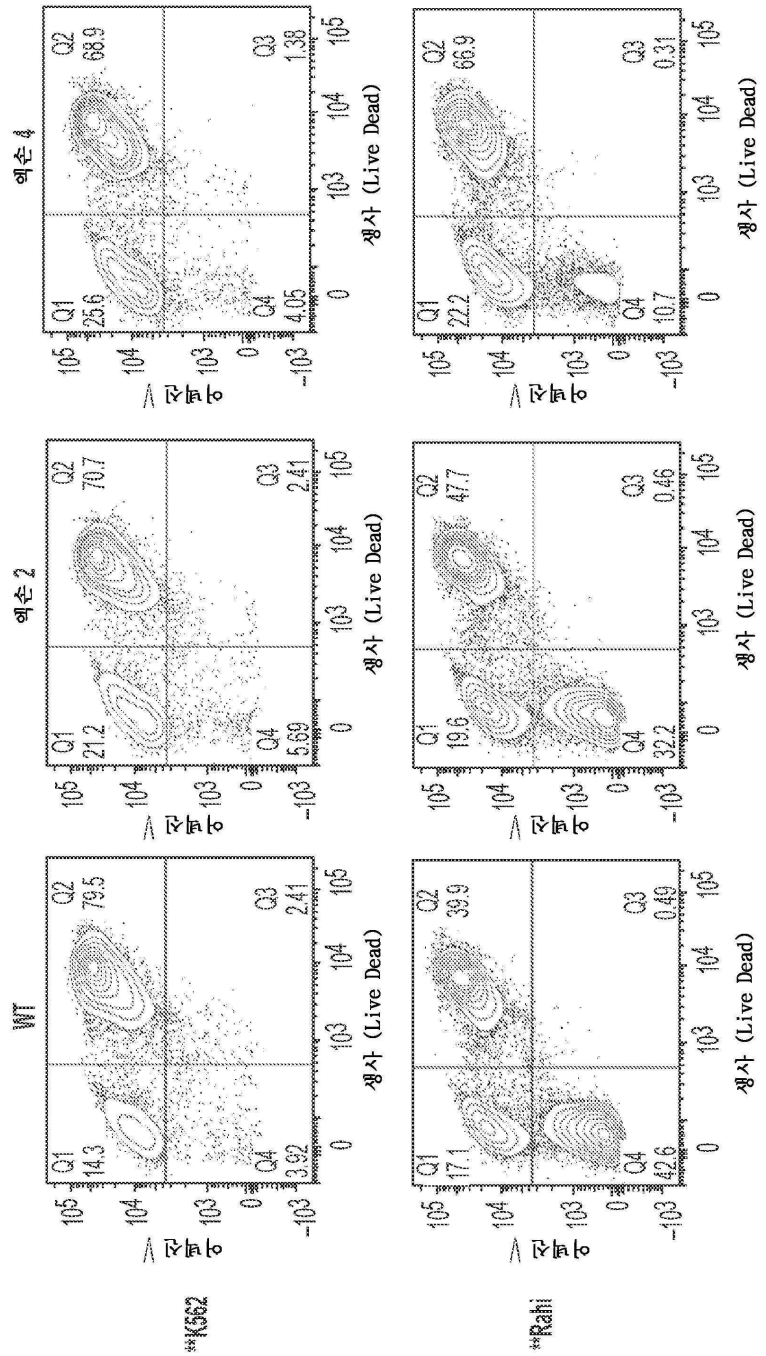
도면7b


WT
ADAM17 KO
CD56
IFNg
20.1
TNFa
36.3
CD107a
43.7
IFNg
28.7
TNFa
38.9
CD107a
46.1
K562

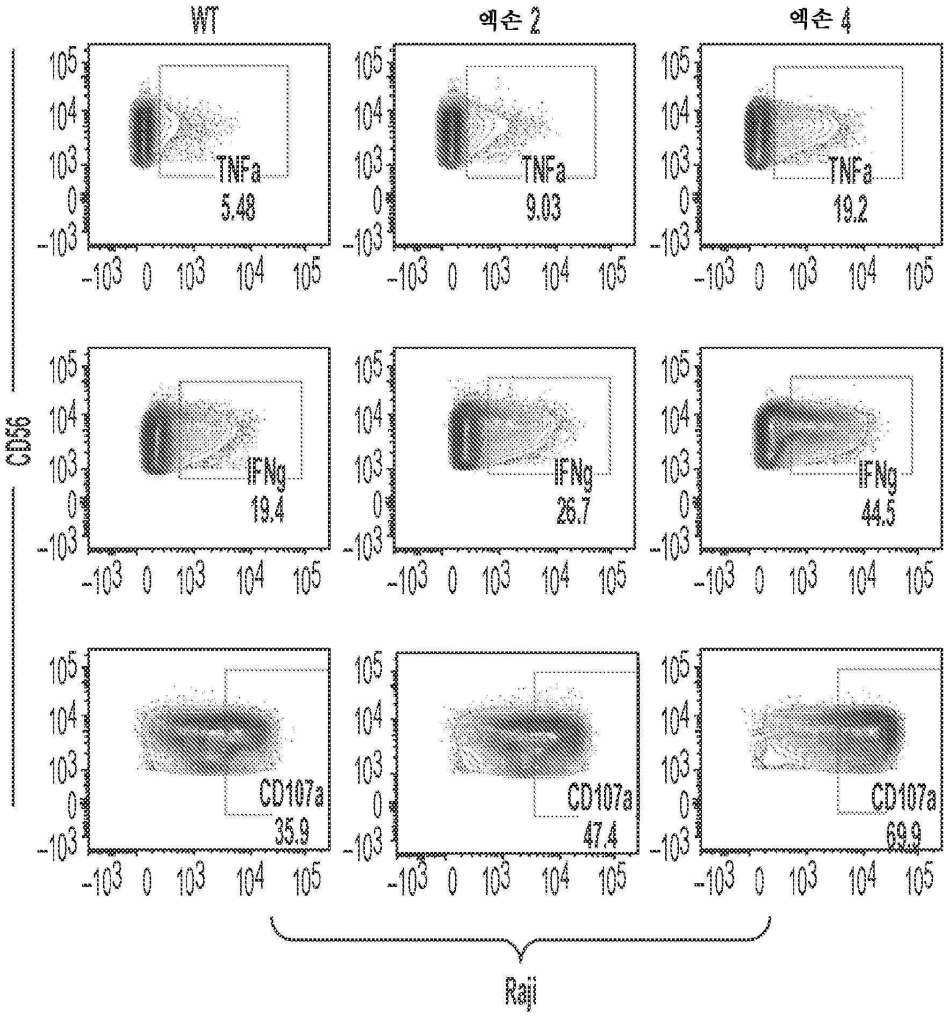
도면8


KO 전
KO 후
표적 서열:
엑손 2
GTCACCCTGGTTCTTGCGAC
엑손 4
TCACGCACAAGAAACGTCCA
엑손 4
엑손 2
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
SHP1

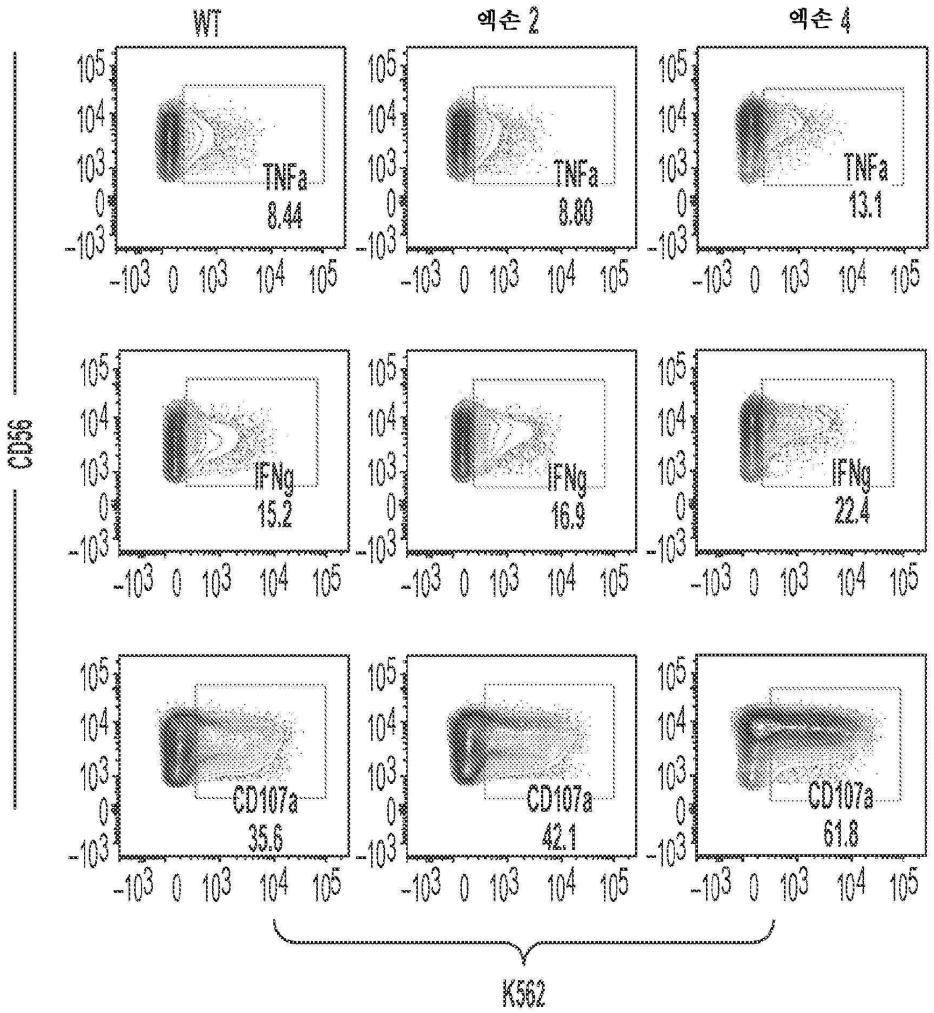
도면9


WT
엑손 2
엑손 4
*K562
*Raji
Q1
Q2
Q3
Q4
14.3
79.5
2.41
3.92
21.2
70.7
2.41
5.69
25.6
68.9
1.38
4.05
17.1
39.9
0.49
42.6
19.6
47.7
0.46
32.2
22.2
66.9
0.31
10.7
생사 (Live Dead)
염색성

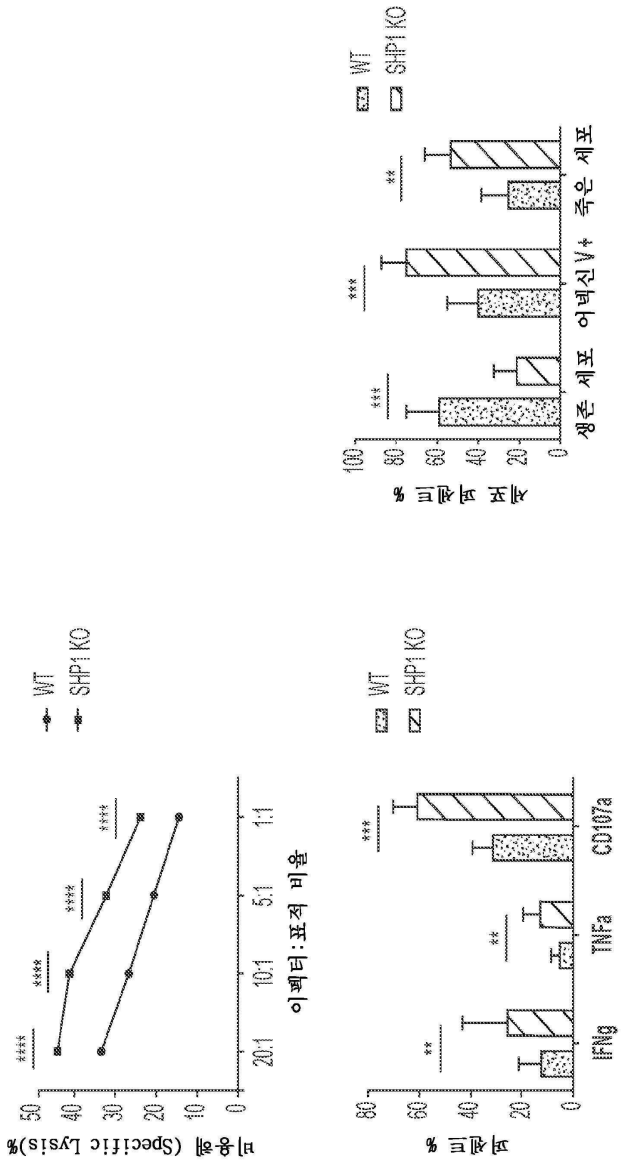
도면10aa


WT
엑손 2
엑손 4
CD56
TNFa
5.48
TNFa
9.03
TNFa
19.2
IFNg
19.4
IFNg
26.7
IFNg
44.5
CD107a
35.9
CD107a
47.4
CD107a
69.9
Raji

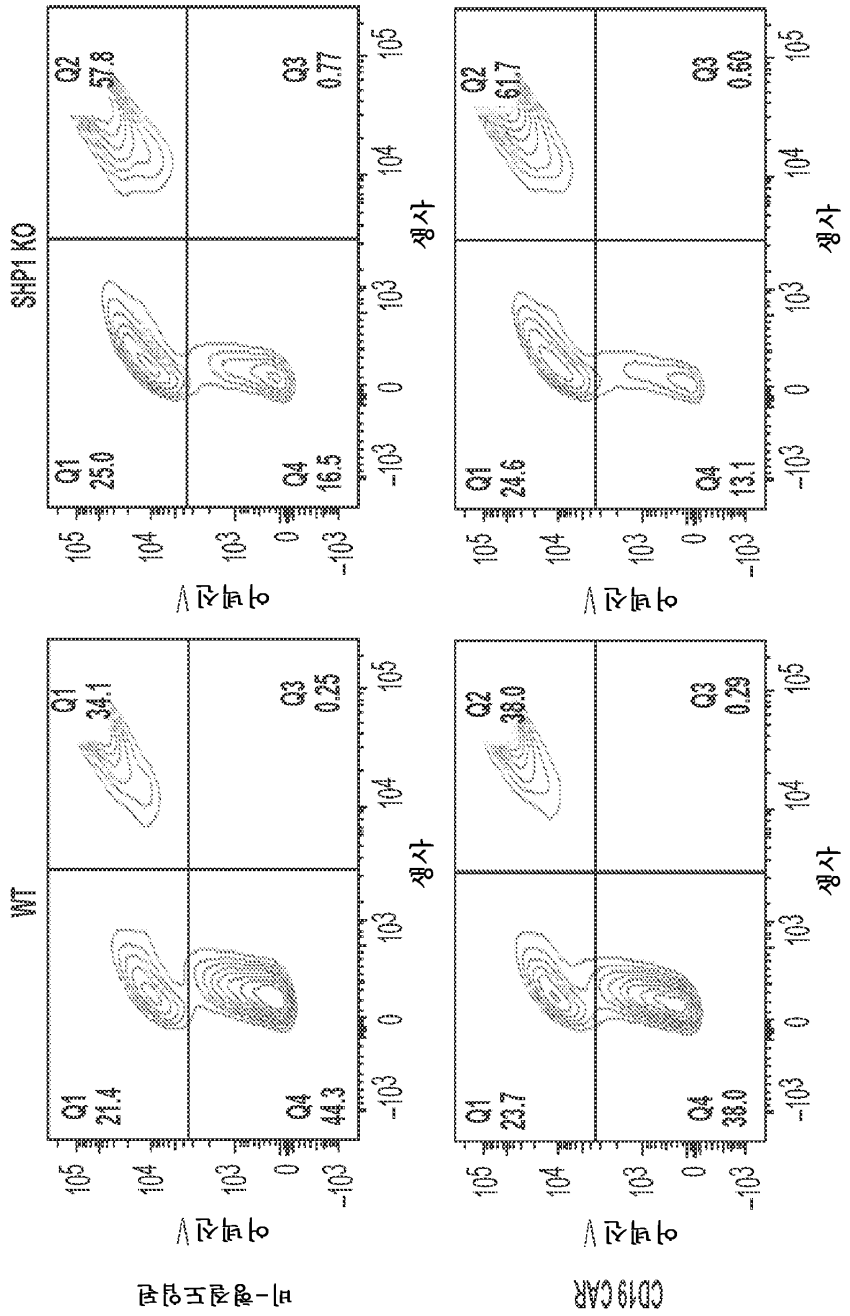
도면10ab


WT
엑손 2
엑손 4
CD56
TNFa
8.44
TNFa
8.80
TNFa
13.1
IFNg
15.2
IFNg
16.9
IFNg
22.4
CD107a
35.6
CD107a
42.1
CD107a
61.8
K562

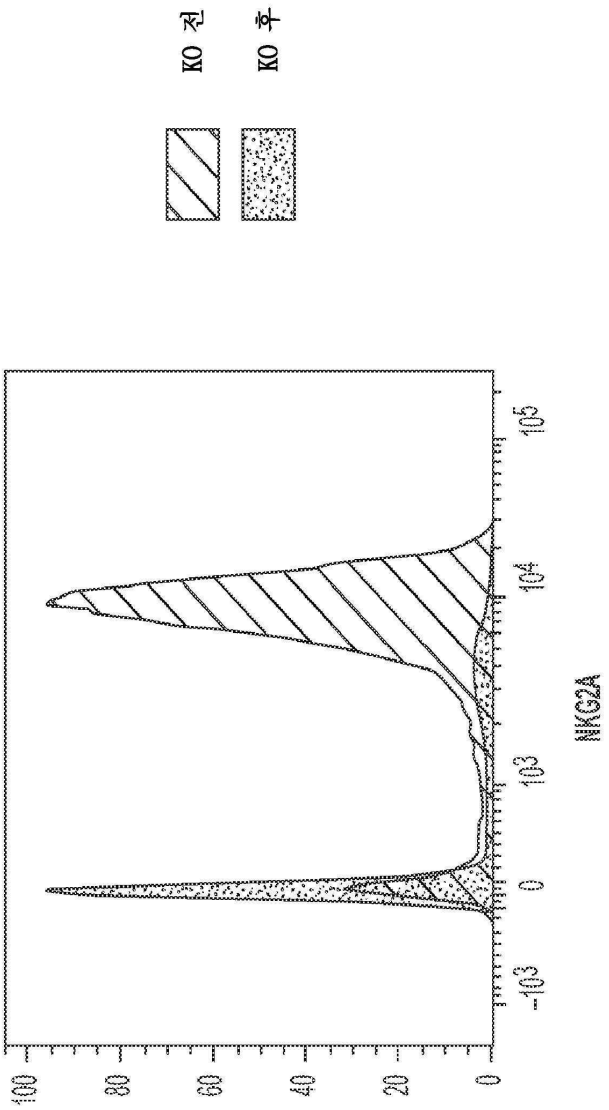
도면10b


WT
SHP1 KO
비용해 (Specific Lysis)%
이펙터:표적 비율
20:1
10:1
5:1
1:1
WT
SHP1 KO
표적 세포 %
IFNg
TNFa
CD107a
WT
SHP1 KO
세포 독성도 %
생존 세포
어넥신 V+ 죽은 세포

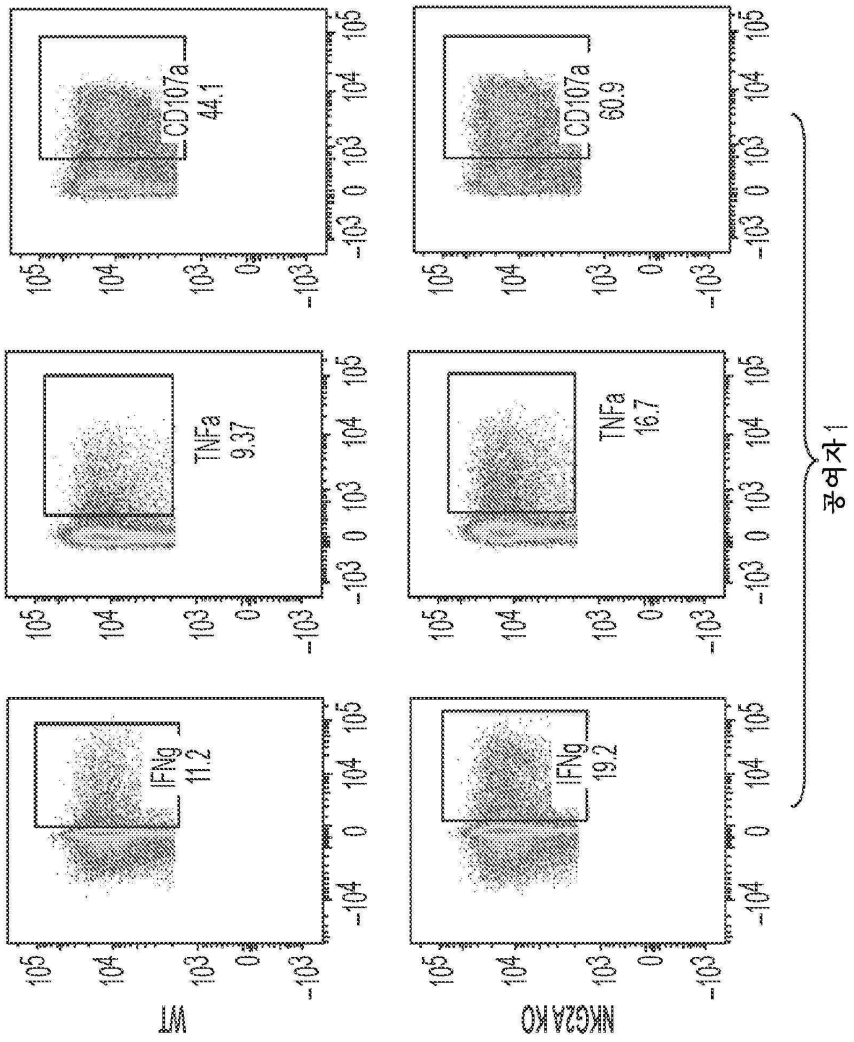
도면11


비-형질도입된
CD19 CAR
WT
SHP1 KO
어넥신 V
생사
Q1
21.4
Q4
44.3
Q3
0.25
Q1
34.1
Q2
38.0
Q4
38.0
Q3
0.29
Q1
23.7
Q2
57.8
Q4
16.5
Q3
0.77
Q1
25.0
Q2
61.7
Q4
13.1
Q3
0.60
Q1
24.6
105
104
103
0
-103

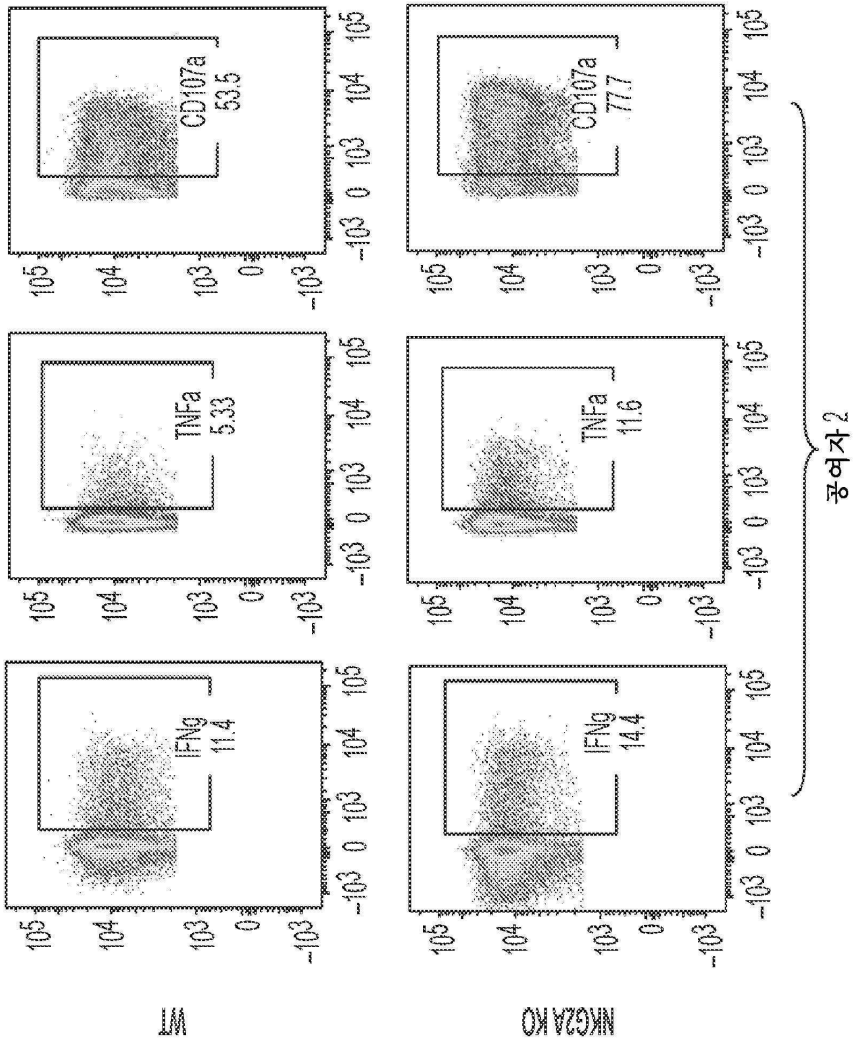
도면12a



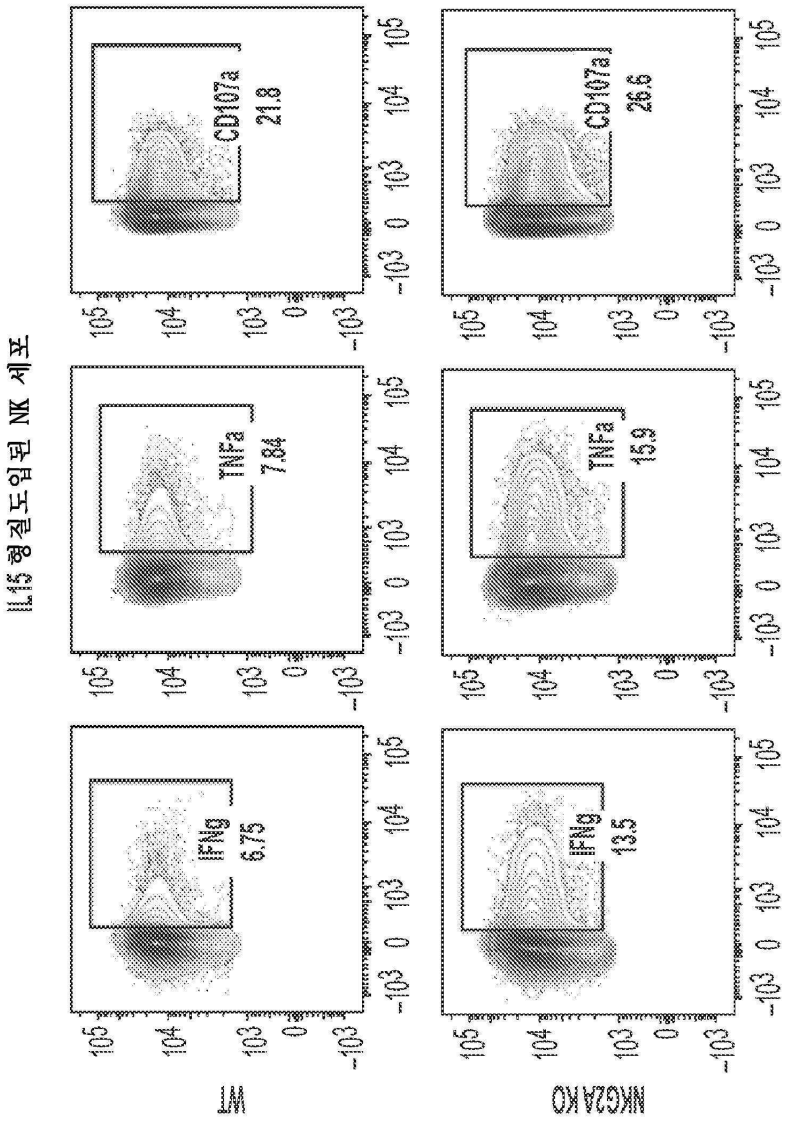
도면12ba


WT
NKG2A KO
IFNg
11.2
TNFa
9.37
CD107a
44.1
IFNg
19.2
TNFa
16.7
CD107a
60.9
공여자 1

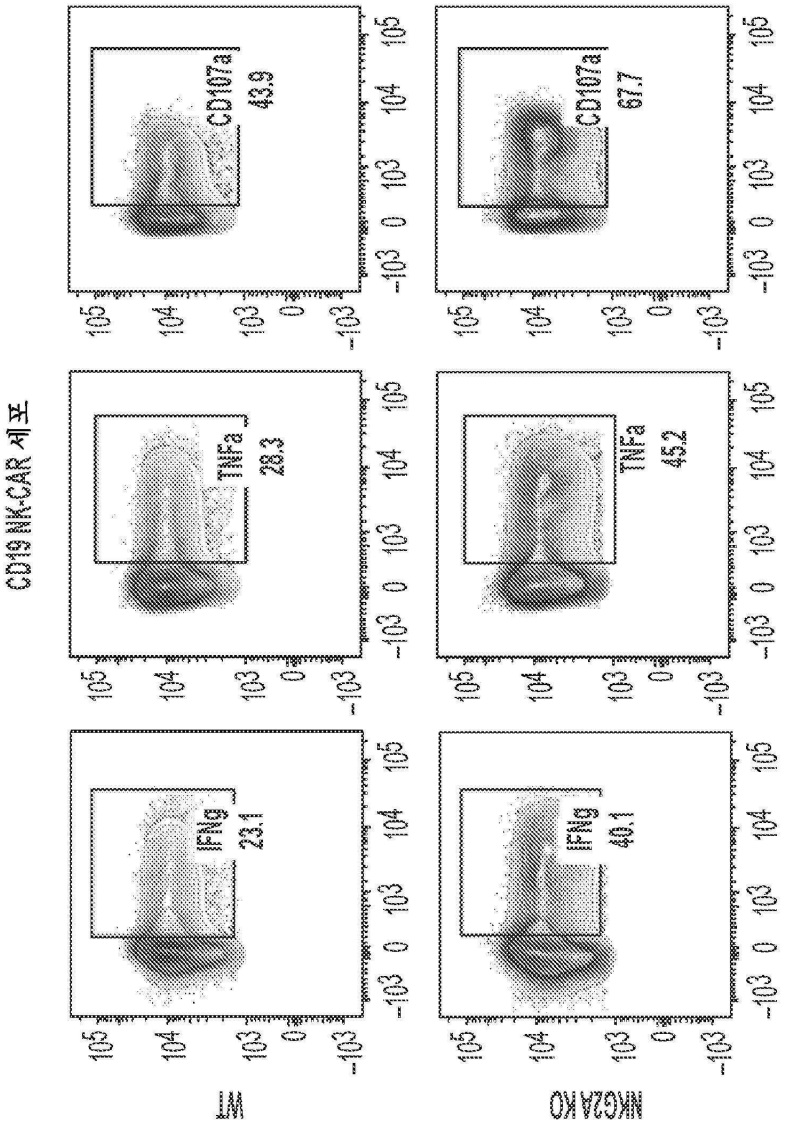
도면12bb


WT
NKG2A KO
IFNg
11.4
TNFa
5.33
CD107a
53.5
IFNg
14.4
TNFa
11.6
CD107a
77.7
공여자 2

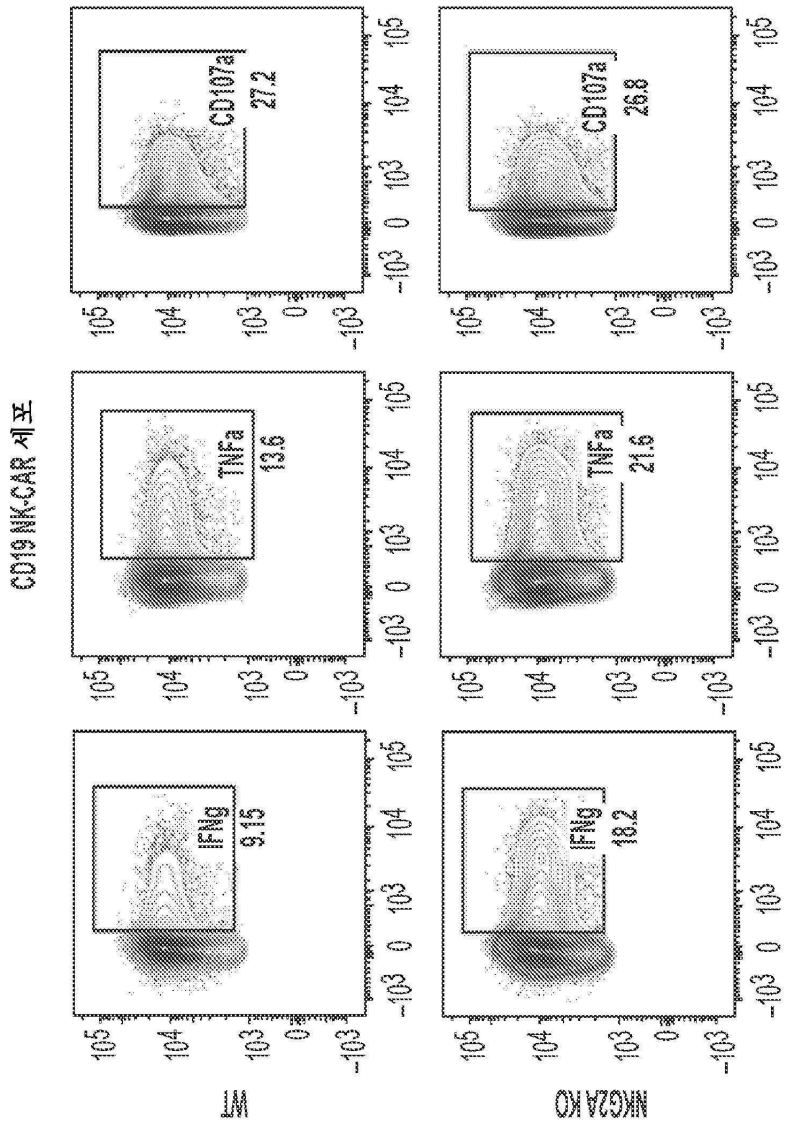
도면12ca


IL15 형질도입된 NK 세포
WT
NKG2AKO
IFNg
6.75
TNFa
7.84
CD107a
21.8
IFNg
13.5
TNFa
15.9
CD107a
26.6

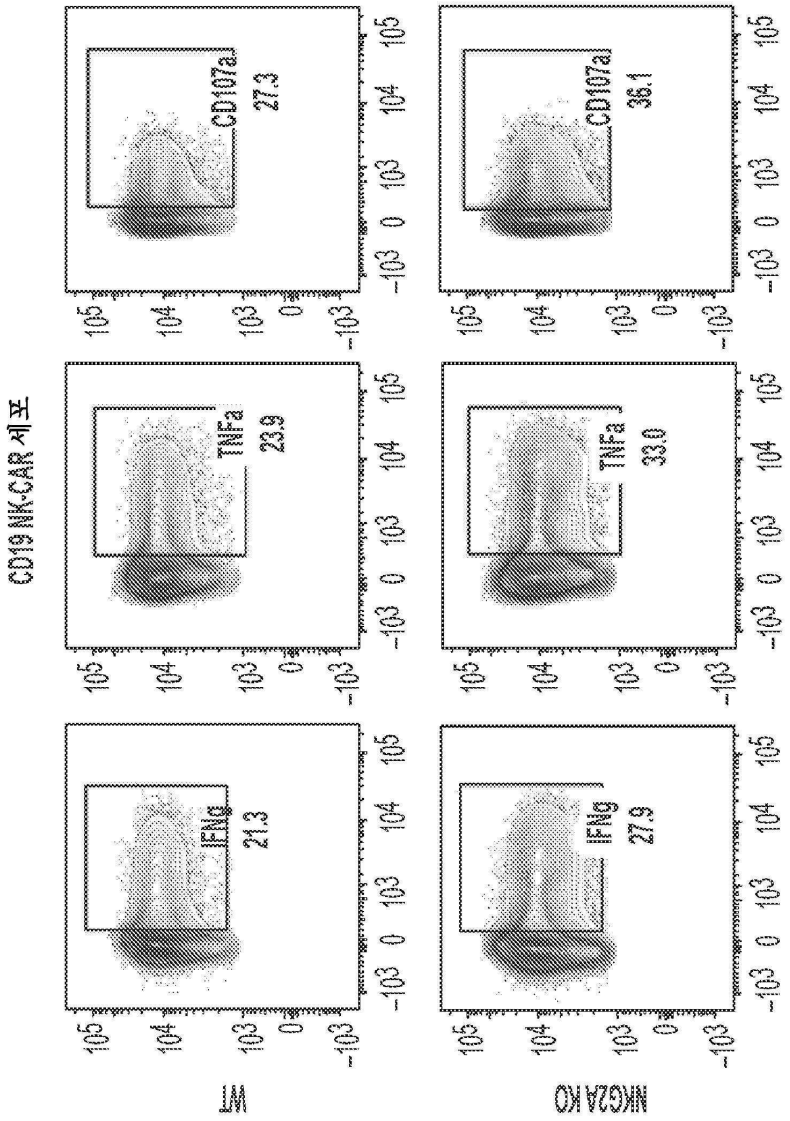
도면12cb


CD19 NK-CAR 세포
WT
NKG2AKO
IFNg
23.1
TNFa
28.3
CD107a
43.9
IFNg
40.1
TNFa
45.2
CD107a
67.7

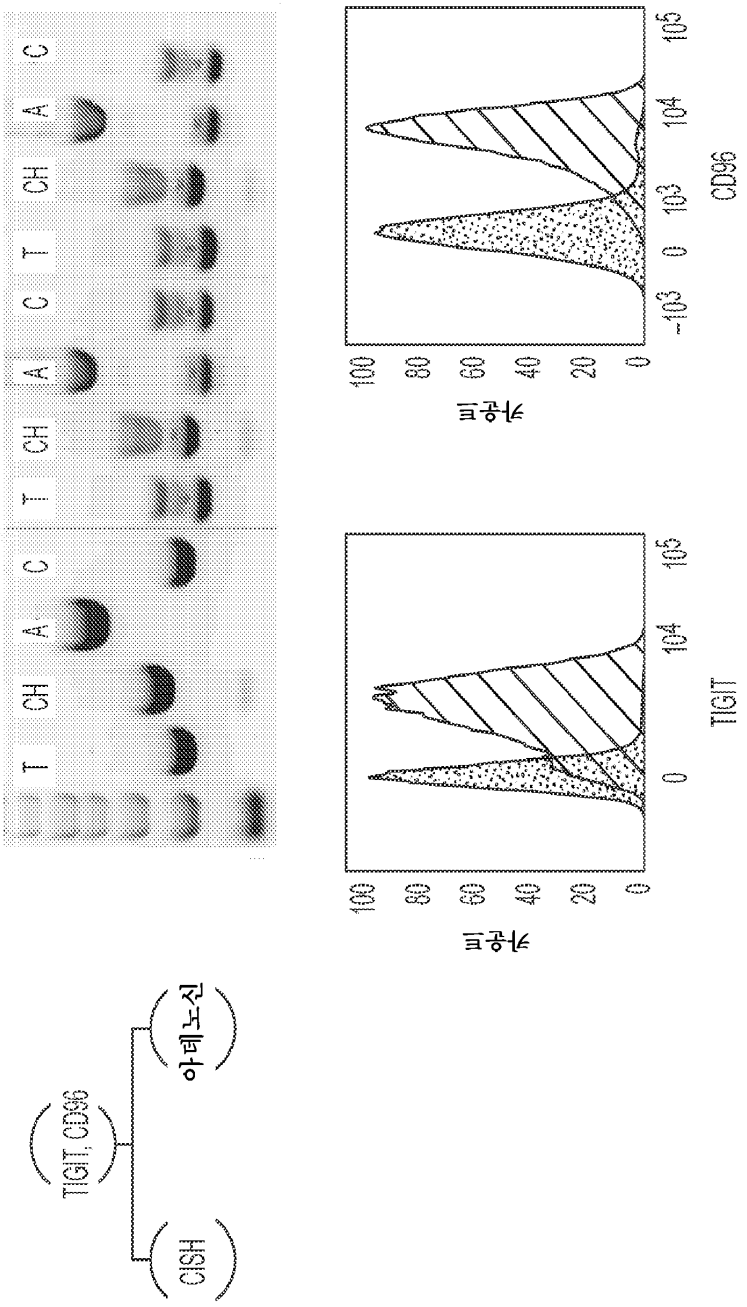
도면12cc


CD19 NK-CAR 세포
WT
NKG2A KO
IFNg
9.15
TNFa
13.6
CD107a
27.2
IFNg
18.2
TNFa
21.6
CD107a
26.8

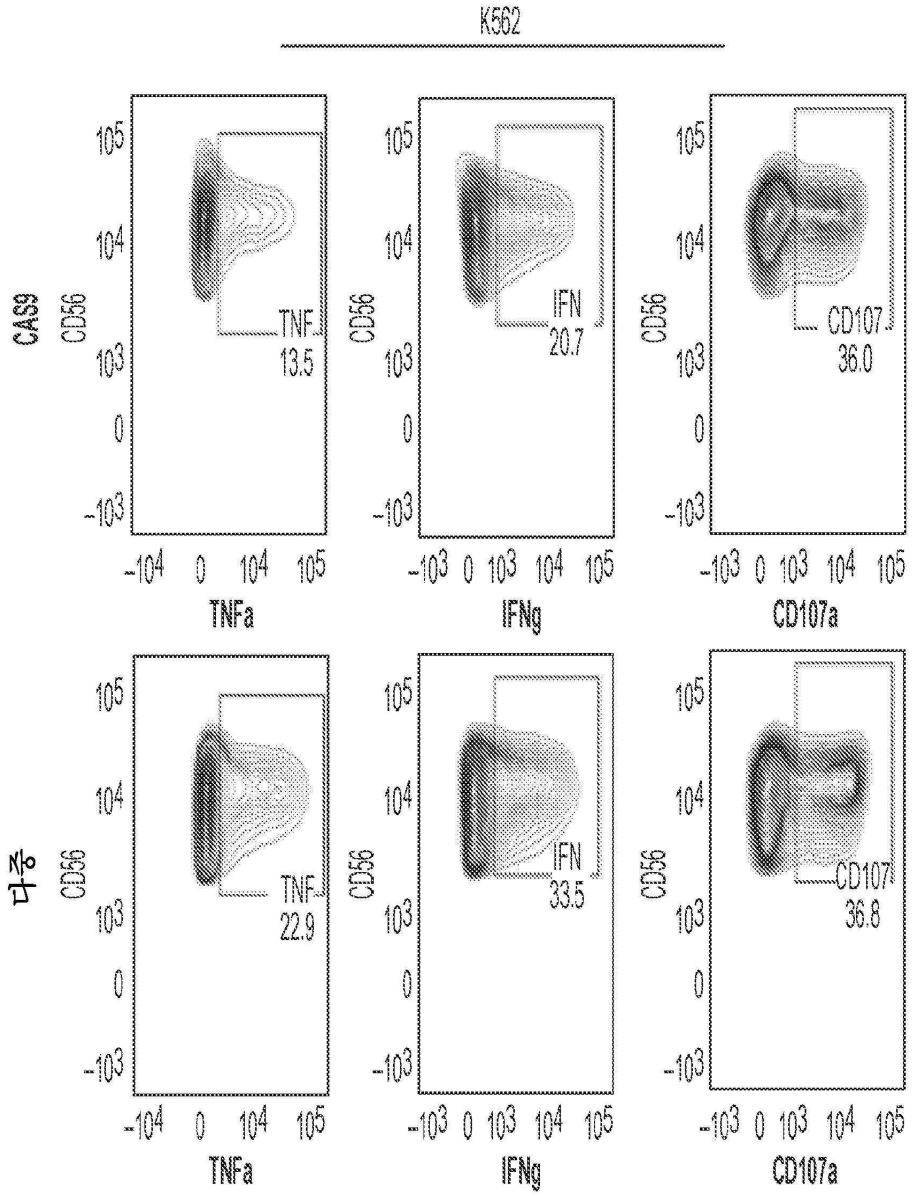
도면12cd


CD19 NK-CAR 세포
WT
NKG2A KO
IFNg
21.3
TNFa
23.9
CD107a
27.3
IFNg
27.9
TNFa
33.0
CD107a
36.1
105
104
103
0
-103
-103
0
103
104
105

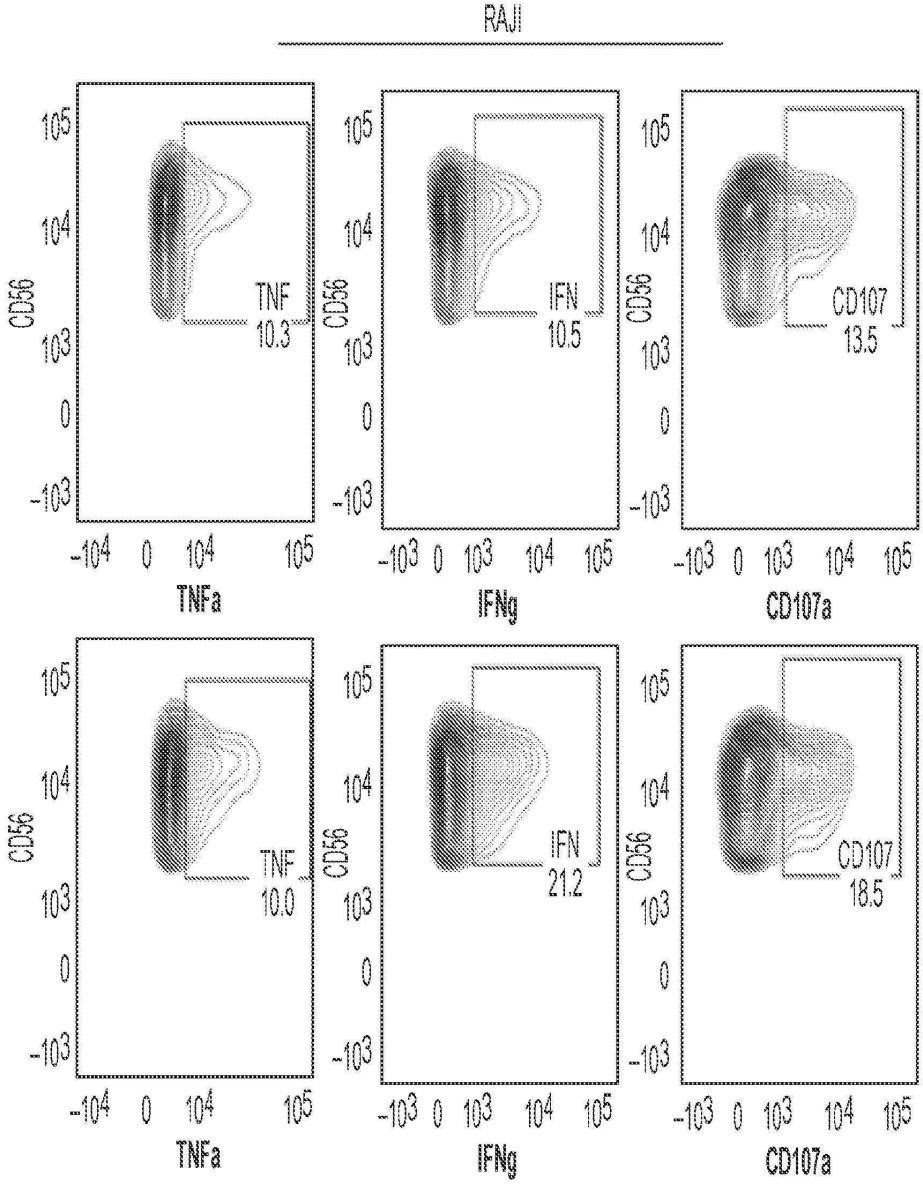
도면13


T
CH
A
C
T
CH
A
C
T
CH
A
C
T
CH
A
C
TIGIT, CD96
CISH
아데노신
카운트
100
80
60
40
20
0
TIGIT
0
104
105
카운트
100
80
60
40
20
0
CD96
-103
0
103
104
105

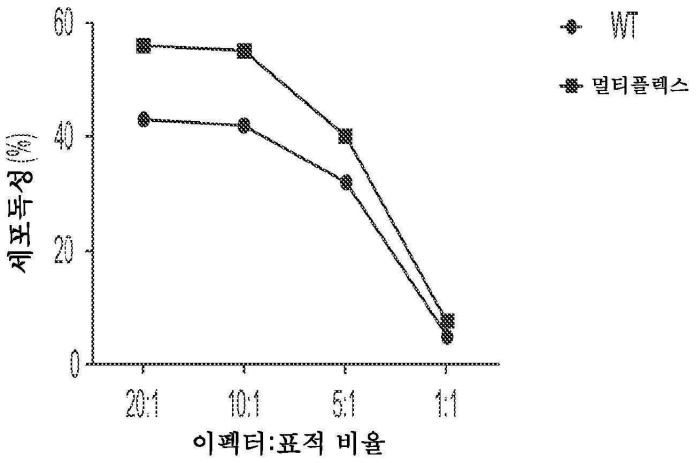
도면14a

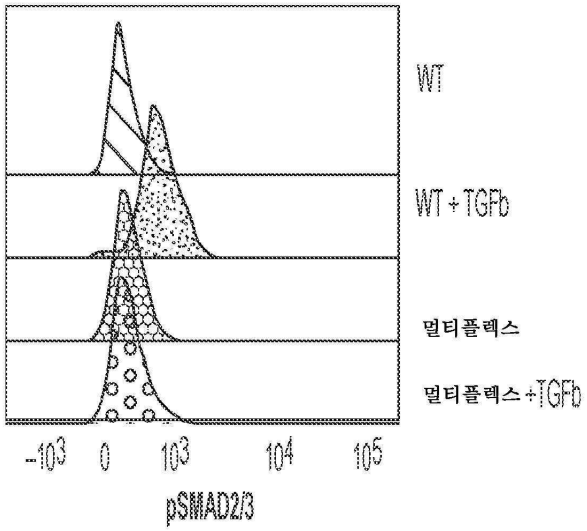

K562
CAS9
CD56
TNF
13.5
IFN
20.7
CD107
36.0
TNFa
IFNg
CD107a
다중
TNF
22.9
IFN
33.5
CD107
36.8

도면14b

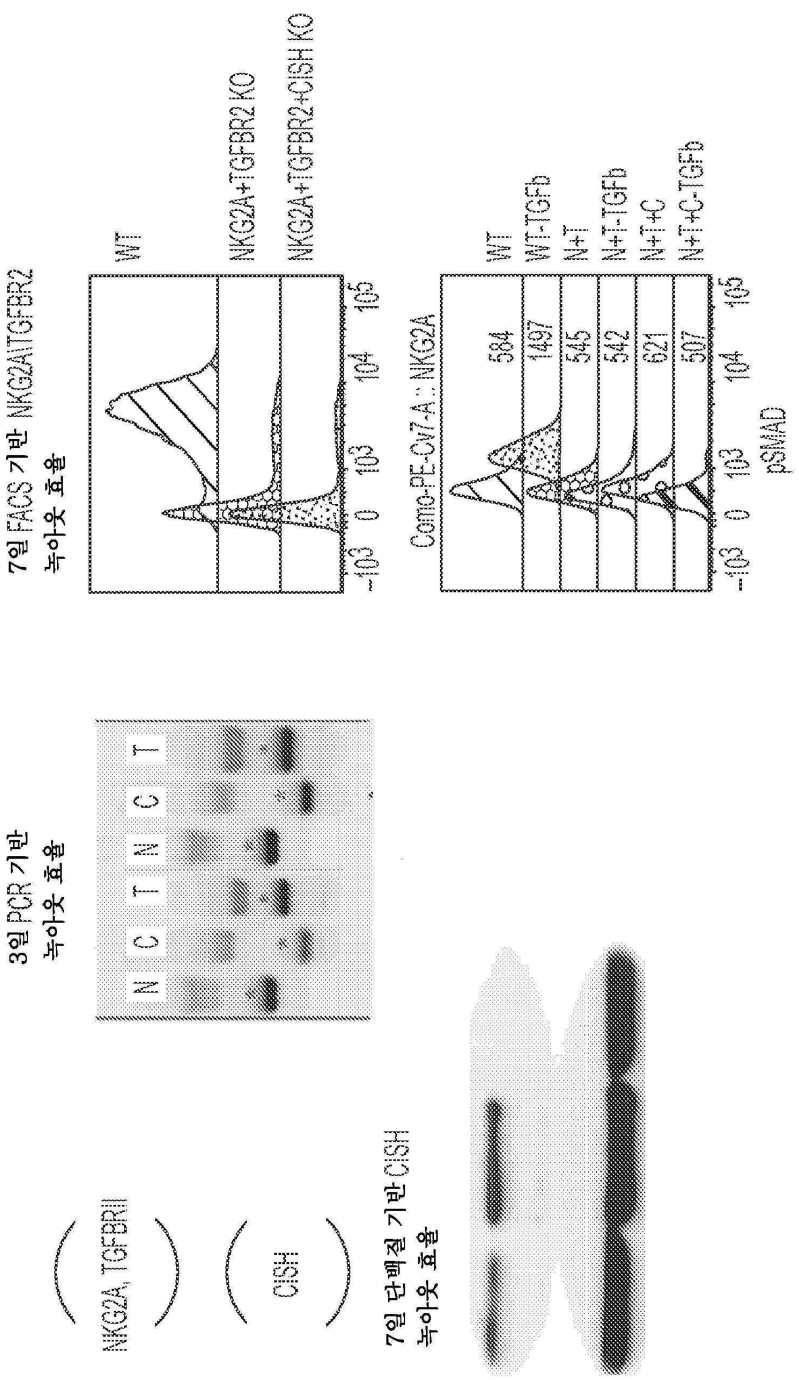

RAJI
CD56
TNF
10.3
TNFa
IFN
10.5
IFNg
CD107
13.5
CD107a
TNF
10.0
IFN
21.2
CD107
18.5

도면14c

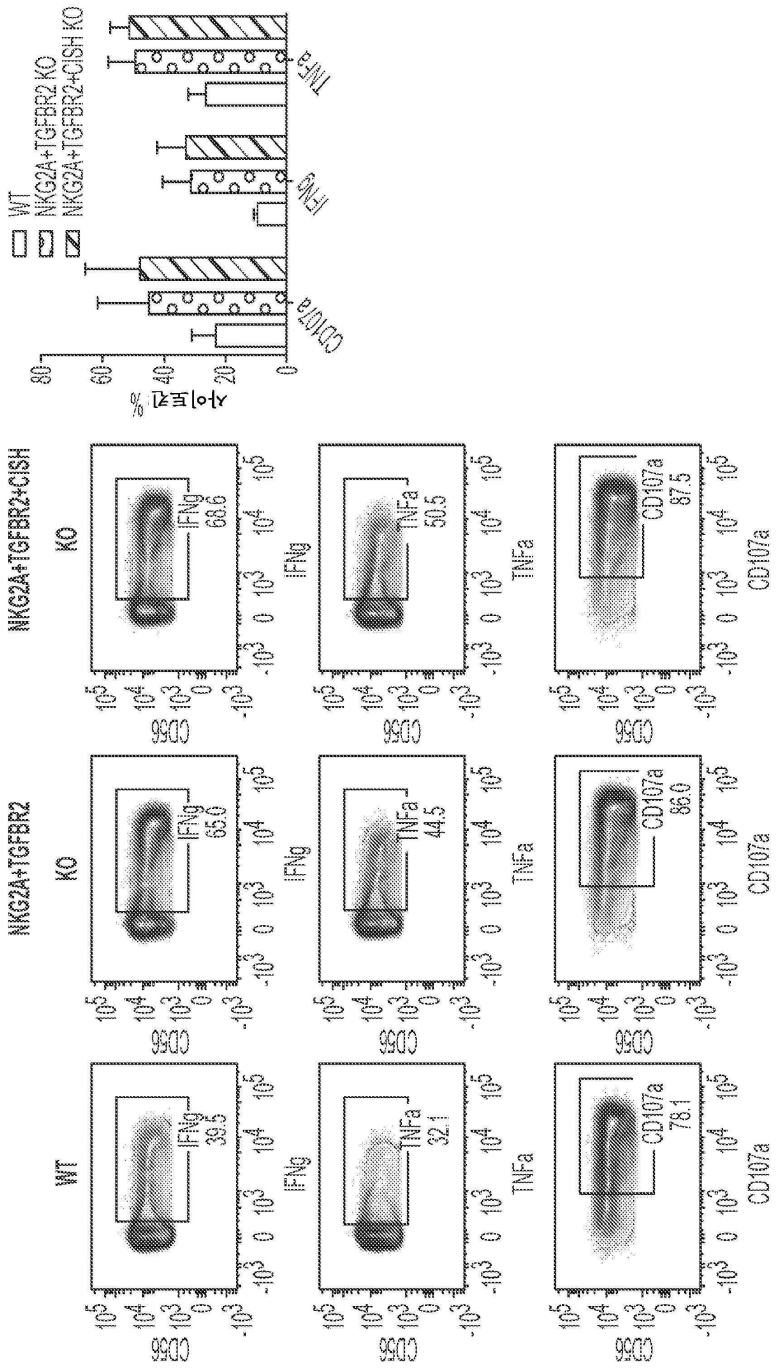

60
40
20
0
세포독성(%)
20:1
10:1
5:1
1:1
이펙터:표적 비율
WT
멀티플렉스


WT
WT + TGFb
멀티플렉스
멀티플렉스 + TGFb
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
pSMAD2/3

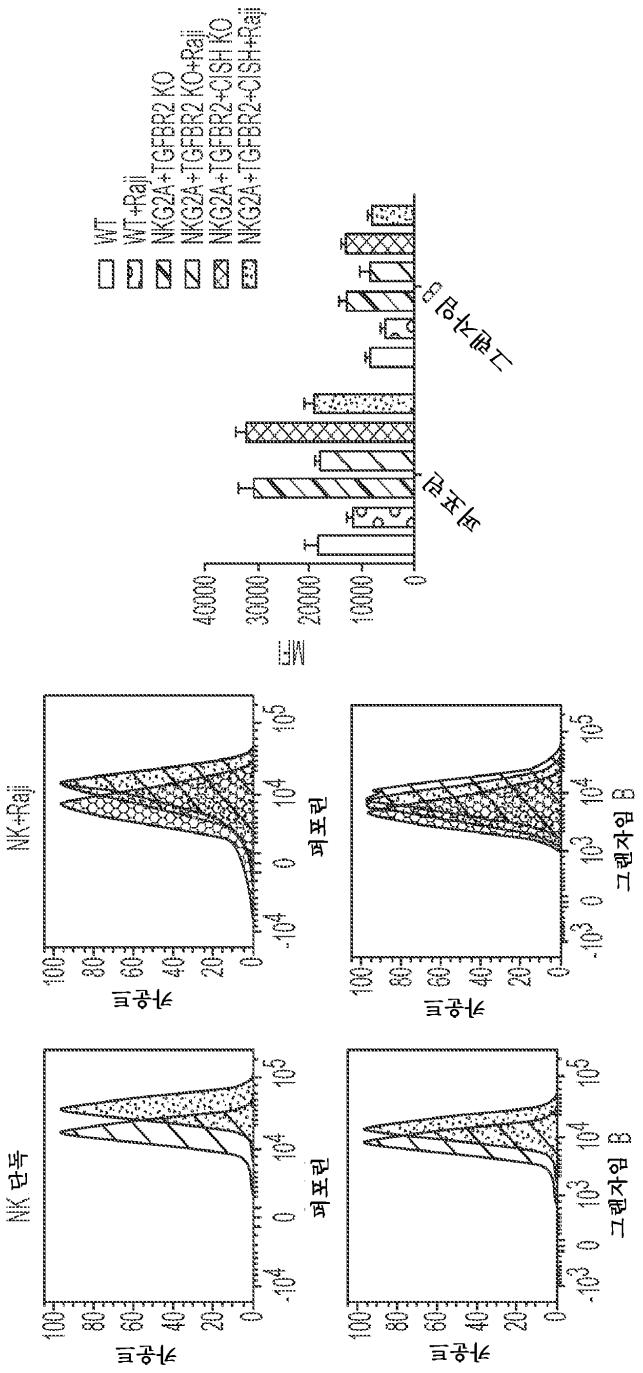
도면15


7일 FACS 기반 NKG2A\TGFBR2
녹아웃 효율
WT
NKG2A+TGFBR2 KO
NKG2A+TGFBR2+CISH KO
-10^3 0 10^3 10^4 10^5
Como-PE-Cy7-A :: NKG2A
584
1497
545
542
621
507
WT
WT-TGFb
N+T
N+T-TGFb
N+T+C
N+T+C-TGFb
pSMAD
3일 PCR 기반
녹아웃 효율
N C T N C T
NKG2A, TGFBRII
CISH
7일 단백질 기반 CISH
녹아웃 효율

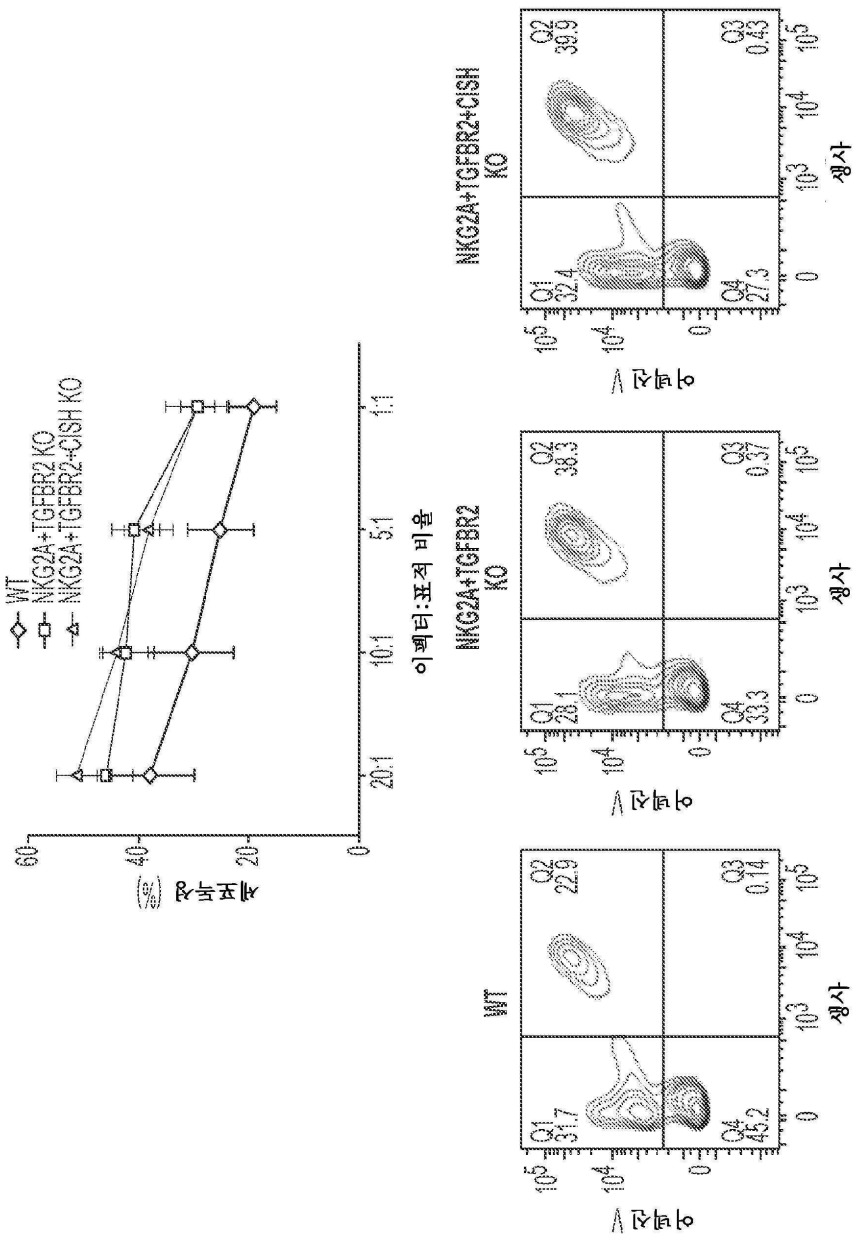
도면16a


WT
NKG2A+TGFBR2 KO
NKG2A+TGFBR2+CISH KO
IFNg
TNFa
CD107a
%
0
20
40
60
80
NKG2A+TGFBR2
NKG2A+TGFBR2+CISH
KO
WT
CD56
IFNg
TNFa
CD107a
IFNg 39.5
IFNg 65.0
IFNg 68.6
TNFa 32.1
TNFa 44.5
TNFa 50.5
CD107a 78.1
CD107a 86.0
CD107a 87.5

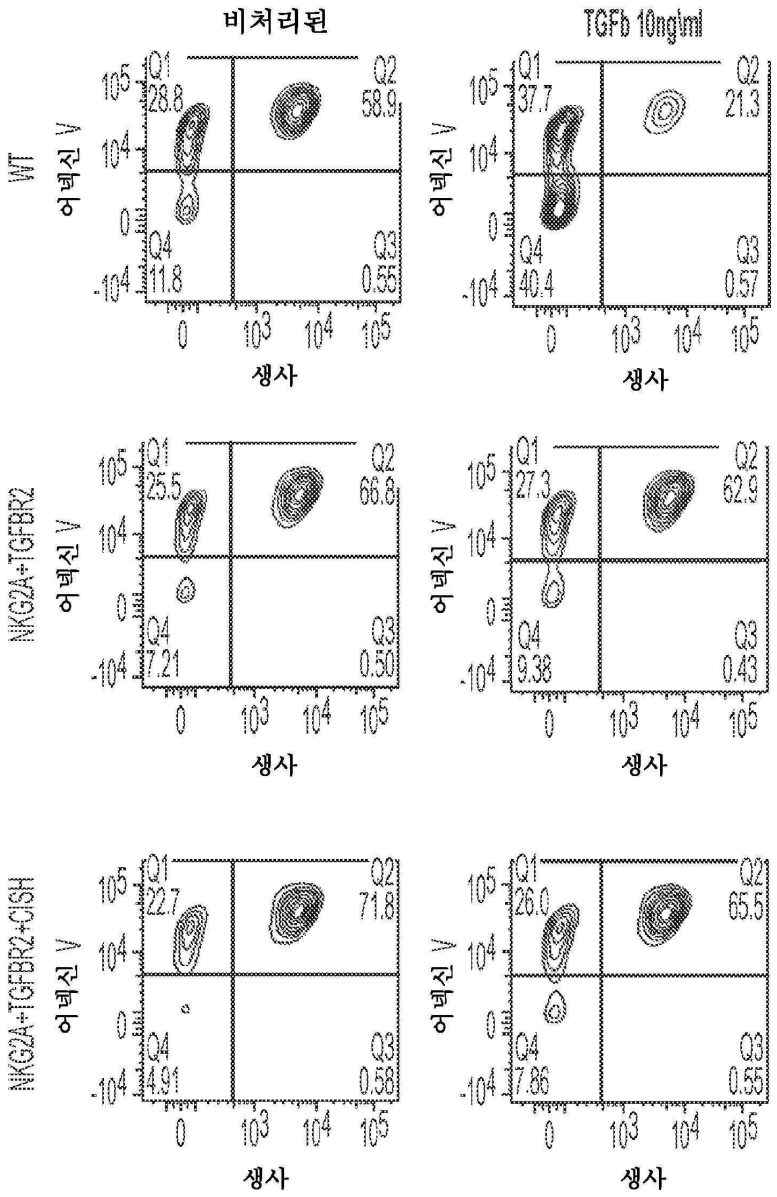
도면16b


WT
WT+Raji
NKG2A+TGFBR2 KO
NKG2A+TGFBR2 KO+Raji
NKG2A+TGFBR2+OSH KO
NKG2A+TGFBR2+OSH+Raji
40000
30000
20000
10000
0
퍼포린
그랜자임 B
NK 단독
NK+Raji
카운트
퍼포린
그랜자임 B

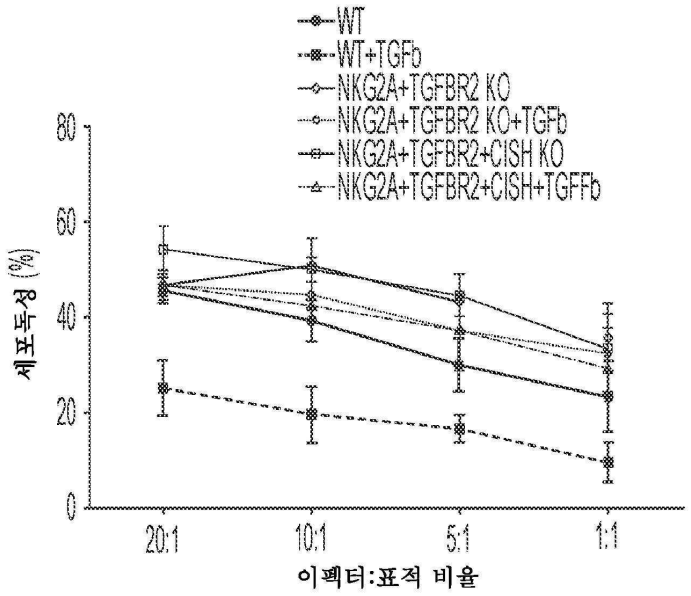
도면16c

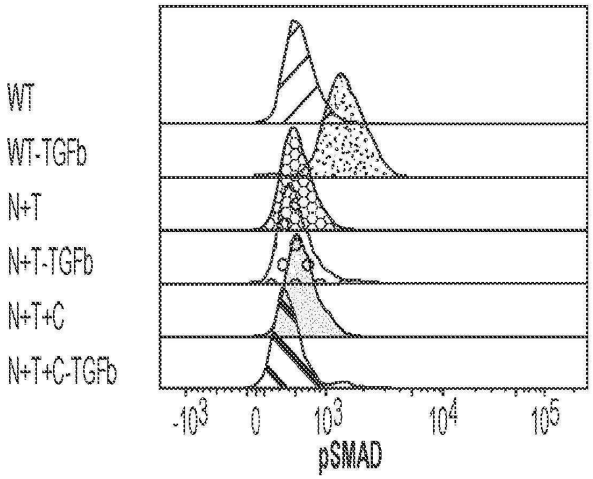

WT
NKG2A+TGFBR2 KO
NKG2A+TGFBR2+CISH KO
세포독성 (%)
60
40
20
0
20:1
10:1
5:1
1:1
이펙터:표적 비율
WT
NKG2A+TGFBR2 KO
NKG2A+TGFBR2+CISH KO
Q1 31.7
Q2 22.9
Q4 45.2
Q3 0.14
Q1 28.1
Q2 38.3
Q4 33.3
Q3 0.37
Q1 32.4
Q2 39.9
Q4 27.3
Q3 0.43
어넥신 V
생사

도면17a

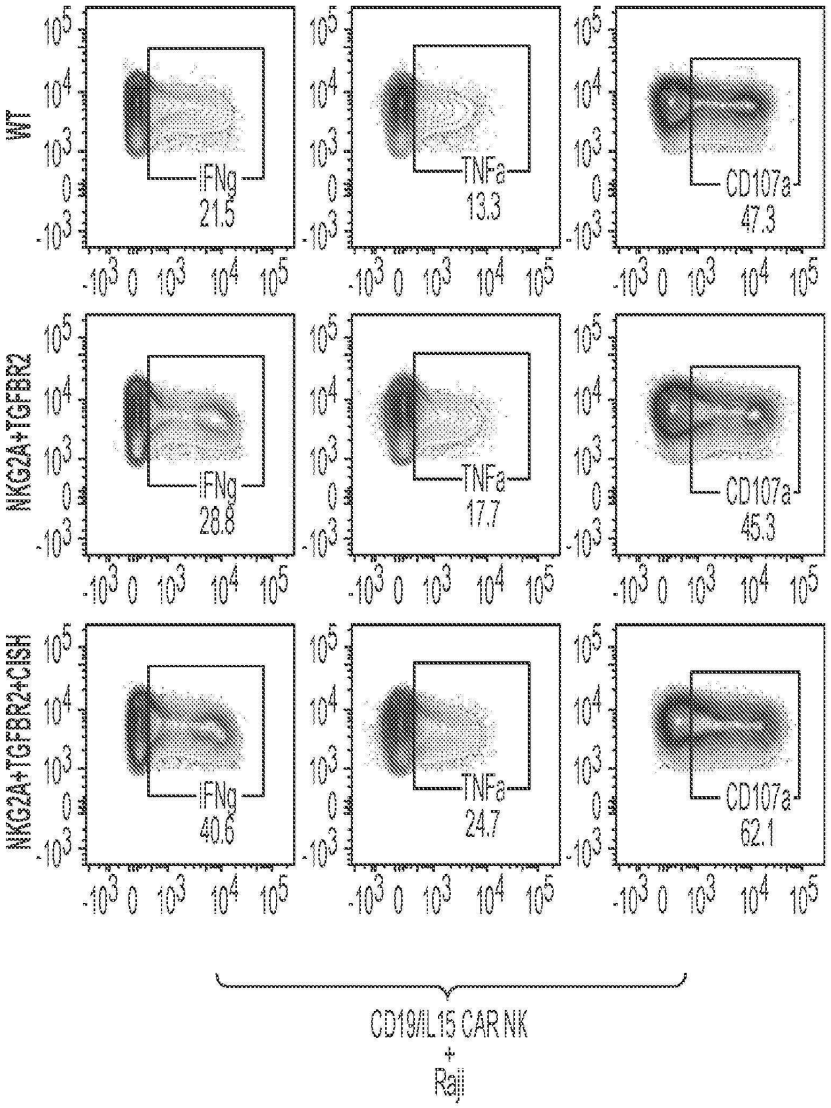

비처리된
TGFb 10ng/ml
WT
NKG2A+TGFBR2
NKG2A+TGFBR2+CISH
어넥신 V
생사
Q1
Q2
Q3
Q4
28.8
58.9
11.8
0.55
37.7
21.3
40.4
0.57
25.5
66.8
7.21
0.50
27.3
62.9
9.38
0.43
22.7
71.8
4.91
0.58
26.0
65.5
7.86
0.55

도면17b

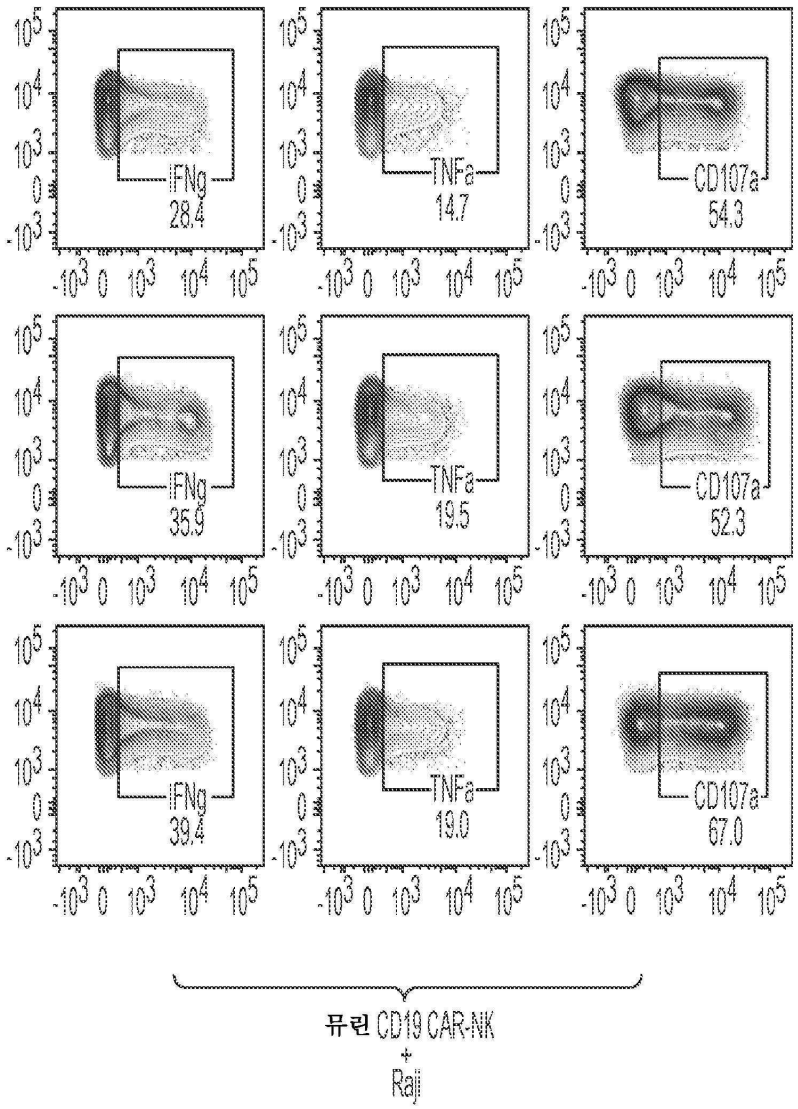

WT
WT+TGFb
NKG2A+TGFBR2 KO
NKG2A+TGFBR2 KO+TGFb
NKG2A+TGFBR2+CISH KO
NKG2A+TGFBR2+CISH+TGFFb
세포독성 (%)
80
60
40
20
0
20:1
10:1
5:1
1:1
이펙터:표적 비율


WT
WT-TGFb
N+T
N+T-TGFb
N+T+C
N+T+C-TGFb
-10^3
0
10^3
10^4
10^5
pSMAD

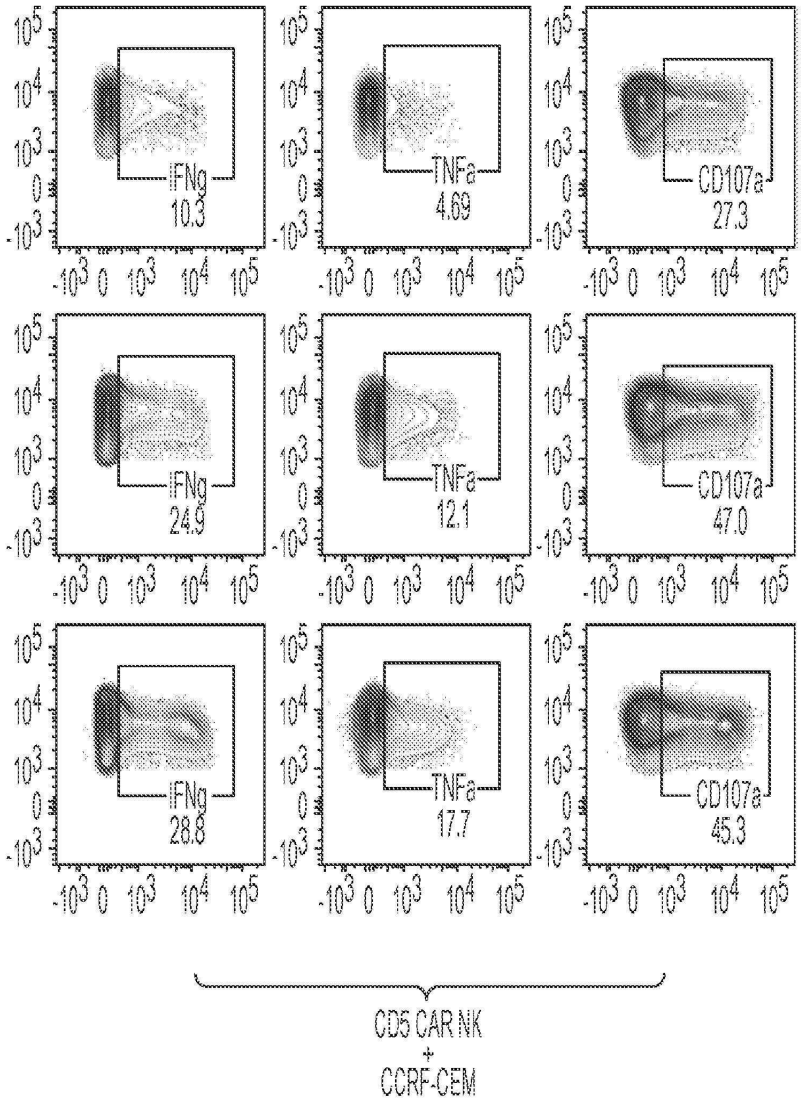
도면18a


WT
NKG2A+TGFBR2
NKG2A+TGFBR2+CISH
IFNg
21.5
TNFa
13.3
CD107a
47.3
IFNg
28.8
TNFa
17.7
CD107a
45.3
IFNg
40.6
TNFa
24.7
CD107a
62.1
CD19/IL15 CAR NK
+
Raji

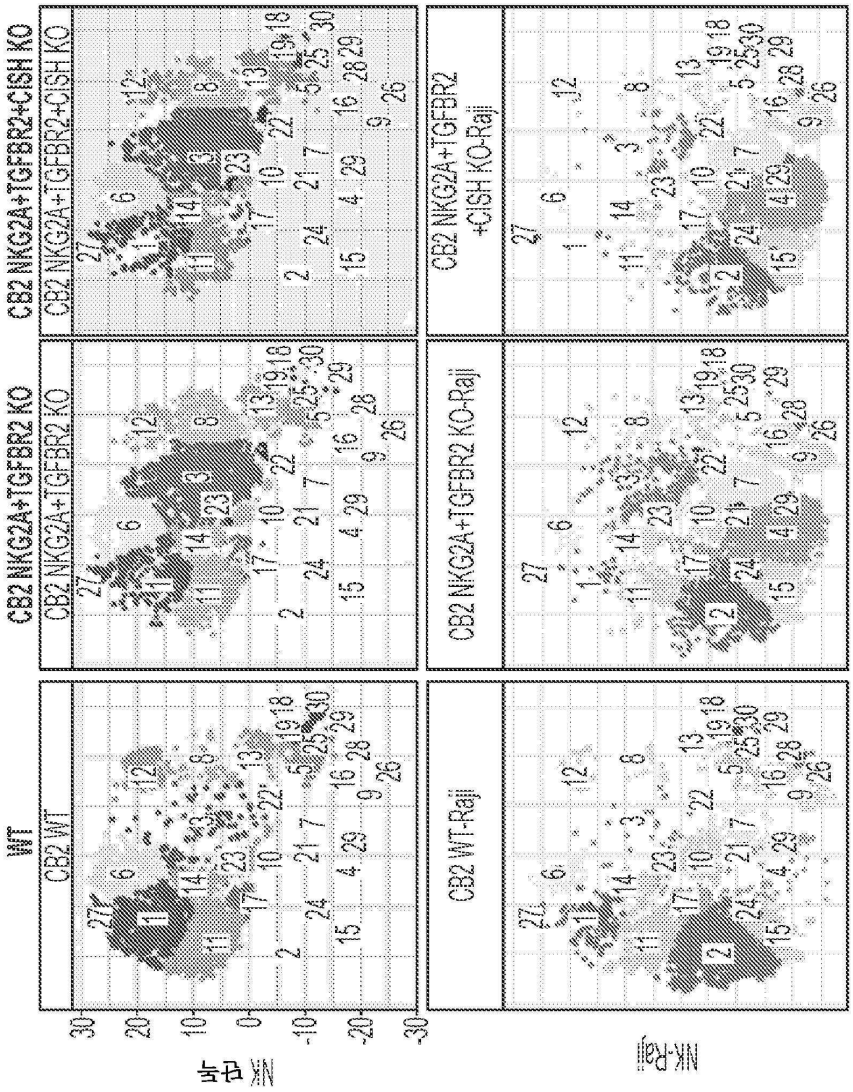
도면18b


IFNg
28.4
TNFa
14.7
CD107a
54.3
IFNg
35.9
TNFa
19.5
CD107a
52.3
IFNg
39.4
TNFa
19.0
CD107a
67.0
뮤린 CD19 CAR-NK
+
Raji

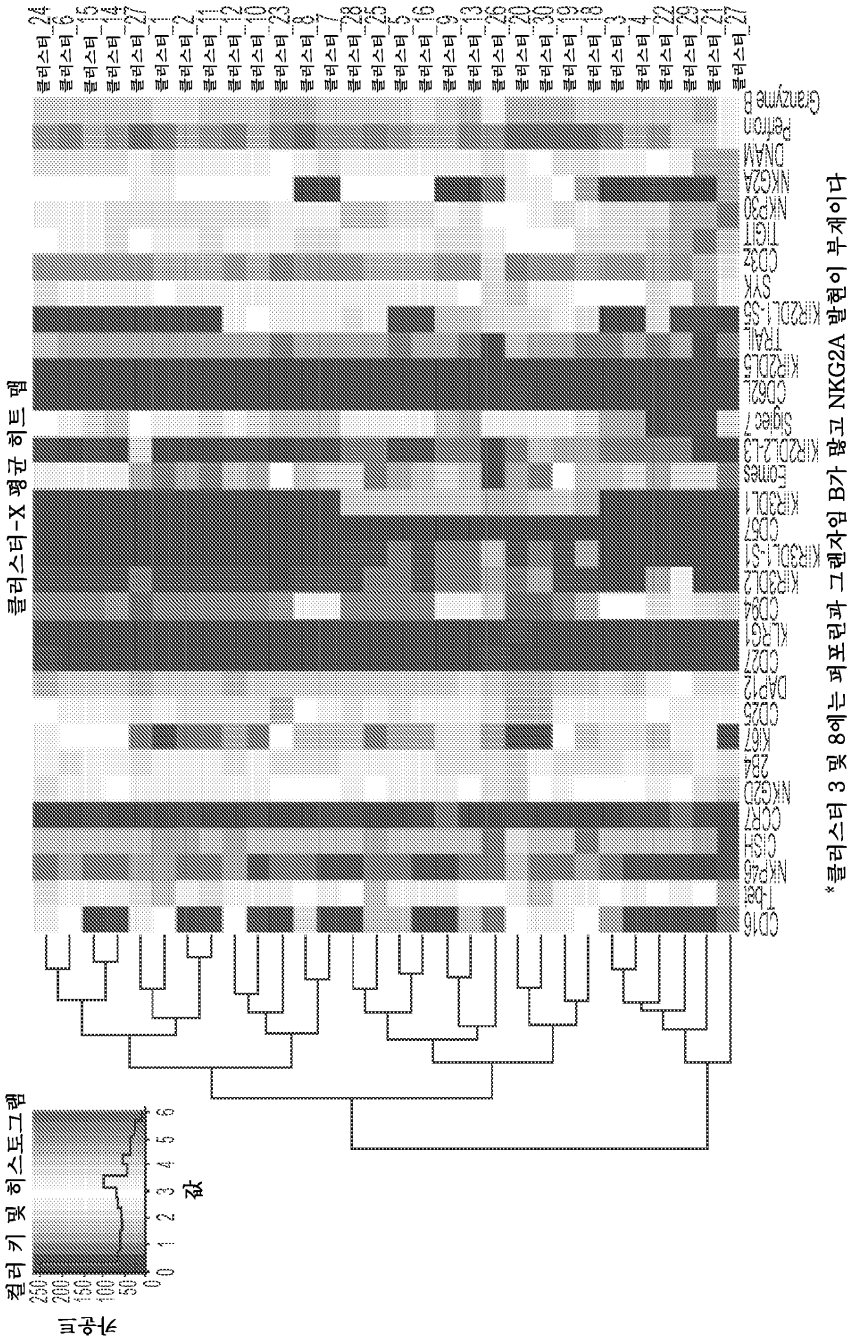
도면18c


IFNg
10.3
TNFa
4.69
CD107a
27.3
IFNg
24.9
TNFa
12.1
CD107a
47.0
IFNg
28.8
TNFa
17.7
CD107a
45.3
CD5 CAR NK
+
CCRF-CEM

도면19a


WT
CB2 NKG2A+TGFBR2 KO
CB2 NKG2A+TGFBR2+CISH KO
CB2 WT
CB2 NKG2A+TGFBR2 KO
CB2 NKG2A+TGFBR2+CISH KO
CB2 WT-Raji
CB2 NKG2A+TGFBR2 KO-Raji
CB2 NKG2A+TGFBR2 +CISH KO-Raji
NK 단독
NK-Raji

도면19b



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> MULTIPLEX GENOME EDITING OF IMMUNE CELLS TO ENHANCE FUNCTIONALITY AND RESISTANCE TO SUPPRESSIVE ENVIRONMENT

<130> UTSC.P1184WO

<140> PCT/US2019/063641

<141> 2019-11-27

<150> 62/772,406

<151> 2018-11-28

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 1

aggccacata gtgctgcaca 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 2

tgtacagcag tggctggtgg 20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400>

3

aacaactatc gttaccacag 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 4

ctcctcggtg tacatcacgg 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 5

agtagttggt gacgttctgc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 6

accctgatgg gacgtacact 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 7

aggcacagta gaagccgtat 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 8

agacgggcac gaggttccct 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 9

tcacgcacaa gaaacgtcca 20

<210>

10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 10

ccccttcggt caccacgagc 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 11

atttactgtc acggttccca 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 12

ccccatagat gattatgcat 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 13

gacggctgag gagcggaaga 20

<210> 14

<

211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 14

tgtggaggtg agcaatcccc 20

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 15

gtcaccctgg ttcttgcgac 20