



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0079312
(43) 공개일자 2020년07월02일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 15/113</i> (2010.01) <i>A61K 31/7088</i> (2006.01)
 <i>A61P 35/00</i> (2006.01) <i>C12N 9/22</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 15/1135</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/7088</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-7016277</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2018년11월05일
 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2020년06월05일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2018/059146</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2019/090202
 국제공개일자 2019년05월09일</p> <p>(30) 우선권주장
 62/582,020 2017년11월06일 미국(US)
 62/582,393 2017년11월07일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인
 에디타스 메디신, 인코퍼레이티드
 미국, 매사추세츠 02141, 캄브리지, 헐리 스트리트 11
 주노 셰러퓨티크스 인코퍼레이티드
 미국 워싱턴 98109 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400</p> <p>(72) 발명자
 코스타, 안드레이아 에스.
 미국 워싱턴 98107 시애틀 노스웨스트 마켓 스트리트 2428
 폰테노, 제이슨 데이비드
 미국 워싱턴 98109 시애틀 스위트 1200 텍스터 애비뉴 노스 400 주노 셰러퓨티크스 인코퍼레이티드 씨/오
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 박장원</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 119 항

(54) 발명의 명칭 **면역요법을 위한 T 세포 내 CBLB의 CRISPR-CAS9 편집 방법, 조성물 및 성분**

(57) 요약

CBLB 유전자좌를 표적화하는 CRISPR/CAS-관련 게놈 편집 시스템, 조성물 및 방법, 뿐만 아니라 이러한 시스템, 조성물 및 방법을 사용하여 편집된 세포가 제공된다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C12N 15/1138 (2013.01)

C12N 9/22 (2013.01)

C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자

하빈스키, 프레드

미국 매사추세츠 02141 캠브리지 헐리 스트리트 11

에디타스 메디신 인코포레이티드 씨/오

웰스테드, 조던, 그랜트

미국 매사추세츠 02141 캠브리지 헐리 스트리트 11

에디타스 메디신 인코포레이티드 씨/오

월슨, 크리스

미국 매사추세츠 02141 캠브리지 헐리 스트리트 11

에디타스 메디신 인코포레이티드 씨/오

명세서

청구범위

청구항 1

다음을 포함하는, 게놈 편집 시스템:

카시타스 B-계통 림프종 원종양 유전자-b (Casitas B-lineage lymphoma proto-oncogene-b, CBLB) 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 가이드 RNA(gRNA); 및

RNA-가이드 뉴클레아제(RNA-guided nuclease).

청구항 2

청구항 1에 있어서, CBLB 유전자의 표적 서열은 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 5의 서열을 포함하는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 3

청구항 1에 있어서, CBLB 유전자의 표적 서열은 서열 번호 88-92로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 표적화 도메인은 CBLB 유전자의 표적 서열에 대해 적어도 85%의 상보성을 가지는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 표적화 도메인은 CBLB 표적 위치의 약 500bp, 약 450bp, 약 400bp, 약 350bp, 약 300bp, 약 250bp, 약 200bp, 약 150bp, 약 100bp, 약 50bp, 약 25bp, 또는 약 10bp 이내의 이중 가닥 파손 또는 단일 가닥 파손을 형성하여, 상기 CBLB 유전자 발현을 변경하도록 구성되는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 6

청구항 5에 있어서, CBLB 유전자 발현은 녹아웃 또는 녹다운인 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 7

청구항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 상기 gRNA는 상기 CBLB 유전자의 코딩 영역 또는 비-코딩 영역을 표적화하도록 구성되고, 상기 비-코딩 영역은 상기 CBLB 유전자의 프로모터 영역, 인핸서 영역, 인트론, 3' UTR, 5' UTR, 또는 폴리아데닐화 신호 영역을 포함하는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 8

청구항 1-7 중 어느 한 항에 있어서, 상기 코딩 영역은 엑손 2, 엑손 4, 및 엑손 5로부터 선택되는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 9

청구항 1-8 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 도메인은 서열 번호 1 내지 14으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 10

청구항 1-9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제는 *S. 피오케네스* Cas9 뉴클레아제이고, 상기 표적화 도메인은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 게놈 편집 시스템:

- (a) 서열 번호 3;
- (b) 서열 번호 4;
- (c) 서열 번호 8;
- (d) 서열 번호 12; 및
- (e) 서열 번호 14.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 *S. 피오케네스* Cas9 뉴클레아제는 NGG의 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM)를 인식하며, 게놈 편집 시스템은 CBLB를 표적화하고, 상기 표적화 도메인은 서열 번호 3, 4, 8, 12, 및 14으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 12

청구항 1-9 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제는 *S. 아우레우스* Cas9 뉴클레아제인 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 *S. 아우레우스* Cas9 뉴클레아제는 NNNRRT 또는 NNNRRV의 PAM을 인식하고, 상기 게놈 편집 시스템은 CBLB를 표적화하는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 14

청구항 1-13 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제는 돌연변이 Cas9 뉴클레아제인 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 15

청구항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 상기 gRNA는 모듈형 gRNA 또는 키메라 gRNA인 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 16

청구항 1-15 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 도메인은 약 16개, 약 17개, 약 18개, 약 19개, 약 20개, 약 21개, 약 22개, 약 23개, 약 24개, 약 25개, 또는 약 26개의 뉴클레오타이드 길이를 가지는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 17

청구항 16에 있어서, 상기 표적화 도메인은 CBLB 유전자에 상보적인 적어도 약 18개의 인접 뉴클레오타이드를 포함하는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 18

청구항 1-17 중 어느 한 항에 있어서, 2, 3 또는 4 개의 별도의 gRNA를 포함하는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 19

청구항 1-18 중 어느 한 항에 있어서, 세포에서 CBLB 유전자 발현을 감소 또는 제거하는데 사용하기 위한 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 20

청구항 19에 있어서, 상기 세포는 암을 앓고 있는 대상체로부터 유래된 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 21

청구항 19에 있어서, CBLB의 발현이 기준선 측정에 비해 30% 이상 감소된 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 22

청구항 21에 있어서, CBLB 단백질의 발현은 웨스턴 블롯 또는 간접적인 세포 내 염색 유세포 분석에 의해 결정되는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 23

청구항 20에 있어서, 프레임-시프트 돌연변이는 CBLB 유전자 내로 도입되는 것인 게놈 편집 시스템.

청구항 24

CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA를 포함하는 조성물.

청구항 25

청구항 24에 있어서, CBLB 유전자의 표적 서열은 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 5의 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 26

청구항 24에 있어서, CBLB 유전자의 표적 서열은 서열 번호 88-92로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 27

청구항 24에 있어서, 표적화 도메인은 CBLB 유전자의 표적 서열에 대해 적어도 85%의 상보성을 가지는 것인 조성물.

청구항 28

청구항 24에 있어서, 상기 표적화 도메인은 약 16개, 약 17개, 약 18개, 약 19개, 약 20개, 약 21개, 약 22개, 약 23개, 약 24개, 약 25개, 또는 약 26개의 뉴클레오타이드 길이를 가지는 것인 조성물.

청구항 29

청구항 28에 있어서, 상기 표적화 도메인은 CBLB 유전자에 상보적인 적어도 약 18개의 인접 뉴클레오타이드인 것인 조성물.

청구항 30

청구항 24에 있어서, 상기 표적화 도메인은 서열 번호 1 내지 14로 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 약 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 31

청구항 24 또는 30에 있어서, 1, 2, 3, 또는 4개의 별도의 gRNA를 포함하는 것인 조성물.

청구항 32

청구항 25-31 중 어느 한 항에 있어서, Cas9 뉴클레아제를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 33

청구항 32에 있어서, 상기 Cas9 뉴클레아제는 *S. 피오케네스* Cas9 분자 또는 *S. 아우레우스* Cas9 뉴클레아제인 것인 조성물.

청구항 34

청구항 32에 있어서, 야생형 Cas9 뉴클레아제 및 돌연변이 Cas9 뉴클레아제 중 하나 또는 둘 모두를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 35

청구항 32에 있어서, 상기 Cas9 뉴클레아제는 *S. 피오제네스* Cas9 뉴클레아제이고, 상기 표적화 도메인은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 조성물:

- (a) 서열 번호 3;
- (b) 서열 번호 4;
- (c) 서열 번호 8;
- (d) 서열 번호 12; 및
- (e) 서열 번호 14.

청구항 36

청구항 35에 있어서, 상기 *S. 피오제네스* Cas9 뉴클레아제는 NGG의 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM)를 인식하고, 상기 조성물은 CBLB를 표적화하고, 상기 표적화 도메인은 서열 번호 3, 4, 8, 12, 및 14으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 약 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 37

청구항 33에 있어서, 상기 *S. 아우레우스* Cas9 뉴클레아제는 NNNRRT 또는 NNNRRV의 PAM을 인식하고, 상기 조성물은 CBLB를 표적화하는 것인 조성물.

청구항 38

청구항 24-37 중 어느 한 항에 있어서, 세포에서 CBLB 유전자 발현을 감소 또는 제거하는데 사용하기 위한 것인 조성물.

청구항 39

청구항 38에 있어서, 상기 세포는 암을 앓고 있는 대상체로부터 유래된 것인 조성물.

청구항 40

CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 41

청구항 40에 있어서, 상기 표적화 도메인은 서열 번호 1 내지 14으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 약 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 42

청구항 40 또는 41에 있어서, Cas9 뉴클레아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것인 벡터.

청구항 43

청구항 42에 있어서, 상기 Cas9 뉴클레아제는 *S. 피오제네스* Cas9 뉴클레아제 또는 *S. 아우레우스* Cas9 뉴클레아제인 것인 벡터.

청구항 44

청구항 42에 있어서, 야생형 Cas9 뉴클레아제 및 돌연변이 Cas9 뉴클레아제 중 하나 또는 둘 모두를 추가로 포함하는 것인 벡터.

청구항 45

청구항 42에 있어서, 상기 Cas9 뉴클라아제는 *S. 피오게네스* Cas9 뉴클라아제이고, 상기 표적화 도메인은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 벡터:

- (a) 서열 번호 3;
- (b) 서열 번호 4;
- (c) 서열 번호 8;
- (d) 서열 번호 12; 및
- (e) 서열 번호 14.

청구항 46

청구항 45에 있어서, 상기 *S. 피오게네스* Cas9 뉴클라아제는 NGG의 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM)를 인식하며, 벡터는 CBLB를 표적화하는 gRNA에 대해 인코딩하고, 상기 표적화 도메인은 서열 번호 3, 4, 8, 12, 14로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 약 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 조성물.

청구항 47

청구항 43에 있어서, 상기 *S. 아우레우스* Cas9 뉴클라아제는 NNNRRT 또는 NNNRRV의 PAM을 인식하고, 상기 벡터는 CBLB를 표적화하는 gRNA에 대해 인코딩하는 것인 벡터.

청구항 48

청구항 40-47 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터는 바이러스 벡터인 것인 벡터.

청구항 49

청구항 48에 있어서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 또는 렌티바이러스 (LV) 벡터인 것인 벡터.

청구항 50

청구항 40-49 중 어느 한 항에 있어서, 세포에서 CBLB 유전자 발현을 감소 또는 제거하는데 사용하기 위한 것인 벡터.

청구항 51

청구항 50에 있어서, 상기 세포는 암을 앓고 있는 대상체로부터 유래된 것인 벡터.

청구항 52

세포에서 CBLB 유전자 발현을 변경시키는 방법으로서, 상기 세포에 다음 중 하나를 투여하는 것을 포함하는 방법:

- (i) 상기 CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA, 및 RNA-가이드 뉴클레아제를 포함하는 게놈 편집 시스템; 또는
- (ii) 상기 CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 및 RNA-가이드 뉴클레아제를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 53

청구항 52에 있어서, CBLB 유전자 발현은 녹아웃 또는 녹다운인 것인 방법.

청구항 54

청구항 52 또는 53에 있어서, 상기 세포는 암을 앓고 있는 대상체로부터 유래된 것인 방법.

청구항 55

청구항 52에 있어서, gRNA 및 RNA-가이드 뉴클레아제는 리보핵단백질 (RNP) 복합체를 포함하는 것인 방법.

청구항 56

청구항 55에 있어서, 별도의 gRNA를 포함하는 2개 이상의 RNP 복합체를 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 57

청구항 55에 있어서, RNP 복합체는 효소적 활성 Cas9 (eaCas9) 뉴클레아제를 포함하는 것인 방법.

청구항 58

청구항 57에 있어서, RNP 복합체는 표적 핵산에서 이중 가닥 파손을 형성하거나, 표적 핵산에서 단일 가닥 파손을 형성하는 eaCas9 뉴클레아제를 포함하는 것인 방법.

청구항 59

청구항 56에 있어서, 별도의 gRNA를 포함하는 2개의 RNP 복합체는 세포에서 CBLB 유전자에서 오프셋 단일 가닥 파손을 형성하기 위해 사용되는 것인 방법.

청구항 60

청구항 1-23 중 어느 한 항의 게놈 편집 시스템, 청구항 23-39 중 어느 한 항의 조성물, 또는 청구항 40-51 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 것인 세포.

청구항 61

청구항 60에 있어서, 상기 세포는 CBLB를 발현하는 것인 세포.

청구항 62

청구항 60 또는 61 또는 청구항 112-114 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 T 세포 또는 자연 살해 (NK) 세포인 것인 세포.

청구항 63

청구항 62 또는 청구항 112-114 중 어느 한 항에 있어서, 조작된 T 세포 수용체 (eTCR), 키메라 항원 수용체 (CAR), 또는 재조합 또는 조작된 항원 수용체를 추가로 포함하는 것인 세포.

청구항 64

청구항 52-59 중 어느 한 항의 방법에 따라 변경된 세포.

청구항 65

다음의 단계를 포함하는, 세포에서 CBLB 유전자 발현을 변경하는 RNA-가이드 뉴클레아제-매개 방법:

- CBLB 및 RNA-가이드 뉴클레아제를 표적화하는 충분한 양의 gRNA와 세포를 접촉시키는 단계; 및
- 세포의 CBLB 유전자 내 CBLB 표적 위치 또는 그 근처에 제1 DNA 이중 가닥 파손을 형성하는 단계로서, 제1 DNA 이중 가닥 파손은 NHEJ에 의해 복구되며, 상기 복구는 CBLB 유전자의 발현을 변경시키는 것인 단계.

청구항 66

청구항 65에 있어서, CBLB 표적 위치 또는 그 근처에서 제2 DNA 이중 가닥 파손을 형성하는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 67

청구항 66에 있어서, 제1 이중 가닥 파손은 CBLB 표적 위치의 약 500bp, 약 450bp, 약 400bp, 약 350bp, 약 300bp, 약 250bp, 약 200bp, 약 150bp, 약 100bp, 약 50bp, 약 25bp, 또는 약 10bp 이내로 형성되는 것인

방법.

청구항 68

청구항 66에 있어서, 제1 및 제2 이중 가닥 파손은 CBLB 표적 위치의 약 500bp, 약 450bp, 약 400bp, 약 350bp, 약 300bp, 약 250bp, 약 200bp, 약 150bp, 약 100bp, 약 50bp, 약 25bp, 또는 약 10bp 이내로 형성되는 것인 방법.

청구항 69

청구항 66에 있어서, 제1 이중 가닥 파손은 상기 CBLB 유전자의 코딩 영역 또는 비-코딩 영역에 형성되고, 상기 비-코딩 영역은 상기 CBLB 유전자의 프로모터 영역, 인핸서 영역, 인트론, 3' UTR, 5' UTR, 또는 폴리아데닐화 신호 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 70

청구항 66에 있어서, 제1 및 제2 이중 가닥 파손은 상기 CBLB 유전자의 코딩 영역 또는 비-코딩 영역에 형성되고, 상기 비-코딩 영역은 상기 CBLB 유전자의 프로모터 영역, 인핸서 영역, 인트론, 3' UTR, 5' UTR, 또는 폴리아데닐화 신호 영역을 포함하는 것인 방법.

청구항 71

청구항 65-70 중 어느 한 항에 있어서, 상기 코딩 영역은 엑손 2, 엑손 4, 및 엑손 5로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 72

청구항 65-71 중 어느 한 항에 있어서, 상기 표적화 도메인은 서열 번호 1 내지 14로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 약 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 73

청구항 65-72 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제는 *S. 피오케네스* Cas9 뉴클레아제이고, 상기 표적화 도메인은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 방법:

- (a) 서열 번호 3;
- (b) 서열 번호 4;
- (c) 서열 번호 8;
- (d) 서열 번호 12; 및
- (e) 서열 번호 14.

청구항 74

청구항 65-72 중 어느 한 항에 있어서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제는 *S. 아우레우스* Cas9 뉴클레아제인 것인 방법.

청구항 75

청구항 73 또는 74에 있어서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제는 돌연변이 Cas9 뉴클레아제인 것인 방법.

청구항 76

청구항 65에 있어서, NHEJ 복구는 20% 이상의 빈도로 삽입 또는 결실을 생성하는 것인 방법.

청구항 77

청구항 76에 있어서, 삽입 또는 결실 빈도는 이상 30%, 40%, 또는 50% 이상인 것인 방법.

청구항 78

CBLB 유전자의 표적 위치 근처에 또는 그 위치에 삽입 또는 결실을 포함하는 게놈 조작된 세포로서, 상기 표적 위치는 서열 번호 1 내지 14로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 상보적이거나, 또는 약 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 세포.

청구항 79

청구항 78에 있어서, 삽입 또는 결실은 CBLB 표적 위치의 약 500bp, 약 450bp, 약 400bp, 약 350bp, 약 300bp, 약 250bp, 약 200bp, 약 150bp, 약 100bp, 약 50bp, 약 25bp, 또는 약 10bp 이내인 것인 세포.

청구항 80

청구항 78에 있어서, 상기 세포는 T 세포 또는 NK 세포인 세포.

청구항 81

청구항 80에 있어서, eTCR 또는 CAR를 추가로 포함하는 것인 세포.

청구항 82

다음을 포함하는 조성물:

- a. CBLB 유전자의 표적 위치 근처에 또는 그 위치에 삽입 또는 결실을 포함하는 CBLB 유전자를 포함하는 세포의 집단으로서, 상기 표적 위치는 서열 번호 1 내지 14로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 상보적이거나, 또는 약 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 세포 집단; 및
- b. 저장 완충액.

청구항 83

청구항 82에 있어서, 세포 집단은 T 세포 또는 NK 세포를 포함하는 것인 조성물.

청구항 84

청구항 83에 있어서, T 세포 또는 NK 세포는 eTCR 또는 a CAR를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 85

대상체에게 조작된 면역 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 조작된 면역 세포는 CBLB 유전자, 선택적으로 조작된 T 세포 수용체 (eTCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)의 발현이 감소되며, 이러한 조작된 면역 세포는 CBLB 유전자의 근처에 삽입 또는 결실을 가지는 것인 방법.

청구항 86

청구항 88에 있어서, 조작된 면역 세포는 T 세포 또는 NK 세포를 포함하는 것인 방법.

청구항 87

청구항 88에 있어서, eTCR 또는 CAR은 암 세포에 대해 항원 특이성을 가지는 것인 방법.

청구항 88

청구항 85에 있어서, 조작된 면역 세포에서의 CBLB 발현은 상기 CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA, 및 RNA-가이드 뉴클라아제를 포함하는 게놈 편집 시스템을 면역 세포에 도입함으로써 감소되는 것인 방법.

청구항 89

청구항 85에 있어서, T 세포는 CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포인 것인 방법.

청구항 90

청구항 85에 있어서, 조작된 면역 세포는 비-조작된 면역 세포에 비해 CD28 공동-자극의 부재하에 증식이 유지되거나, 또는 향상되는 것인 방법.

청구항 91

청구항 85에 있어서, 조작된 면역 세포는 비-조작된 면역 세포에 비해 사이토카인의 부재하에 증식이 유지되거나, 또는 향상되는 것인 방법.

청구항 92

청구항 85에 있어서, 조작된 면역 세포는 비-조작된 면역 세포에 비해 IFN-감마, IL-2, 및 TNF-알파의 발현이 유지되거나 또는 증가되는 것인 방법.

청구항 93

청구항 85에 있어서, 조작된 면역 세포는 비-조작된 면역 세포에 비해 표적 세포 사멸 능력이 유지하거나 또는 증가되는 것인 방법.

청구항 94

CD28 공동-자극이 감소되거나 부재하는 면역 세포의 증식을 향상시키는 방법으로서, 상기 방법은 상기 CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA 분자, 및 RNA-가이드 뉴클라아제를 포함하는 게놈 편집 시스템을 면역 세포 내로 도입하는 단계, 및 면역 세포에서 CBLB 발현을 감소시키는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 95

청구항 94에 있어서, 사이토카인의 부재 또는 감소에서 증식을 향상시키는 단계를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 96

청구항 95에 있어서, 사이토카인 IL-2, IL-7, 및 IL-15의 부재 또는 감소가 존재하는 것인 방법.

청구항 97

복수의 조작된 T 세포를 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 T 세포는 비-조작된 T 세포에 비해 감소된 CBLB 유전자 발현을 나타내는 것인 조성물.

청구항 98

청구항 97에 있어서, 조작된 T 세포는 비-조작된 T 세포에서의 CBLB 발현 수준의 약 50%, 약 40%, 약 30%, 약 20%, 약 10% 또는 약 5%인 CBLB 유전자 발현 수준을 나타내는 것인 조성물.

청구항 99

청구항 97에 있어서, 조작된 T 세포는 eTCR 또는 a CAR의 발현을 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 100

청구항 97에 있어서, T 세포는 CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포인 것인 조성물.

청구항 101

청구항 97에 있어서, 조작된 T 세포는 추가로 다음 중 하나 이상을 보유하는 것을 특징으로 하는 것인 조성물:

- a) CD28 공동-자극의 부재하에 증식 유지 또는 증가;
- b) CD28 공동-자극의 부재하에 표적 세포 사멸 유지 또는 증가;
- c) 표적 항원에 대한 더 큰 민감성;

- d) 감소된 표적 항원의 존재하에 표적 세포 사멸 유지 또는 증가; 및
- e) 사이토카인 생산 능력 증가.

청구항 102

복수의 조작된 T 세포를 포함하는 조성물로서, 상기 조작된 T 세포는 비-조작된 T 세포에 비해 감소된 CBLB 유전자 발현을 나타내고, 상기 조작된 T 세포는 다음을 포함하는 게놈 편집 시스템과 비-조작된 T 세포를 접촉시킴으로써 생성되는 것인 조성물:

CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA; 및
RNA-가이드 뉴클레아제(RNA-가이드 뉴클레아제).

청구항 103

청구항 102에 있어서, 조작된 T 세포는 eTCR 또는 CAR를 발현하는 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드를 추가로 포함하는 것인 조성물.

청구항 104

청구항 103에 있어서, 벡터는 바이러스 벡터이고 및/또는 폴리뉴클레오타이드는 T 세포의 게놈 내로 통합된 것인 조성물.

청구항 105

청구항 103 또는 104에 있어서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터 또는 렌티바이러스(LV) 벡터인 것인 조성물.

청구항 106

청구항 102-105에 있어서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제는 *S. 피오케네스* Cas9 뉴클레아제이고, 상기 표적화 도메인은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 조성물:

- (a) 서열 번호 3;
- (b) 서열 번호 4;
- (c) 서열 번호 8;
- (d) 서열 번호 12; 및
- (e) 서열 번호 14.

청구항 107

다음을 포함하는, 게놈 편집 시스템:

카시타스 B-계통 림프종 원종양 유전자-b(CBLB) 유전자를 표적화하는 제1 gRNA;

T 세포 수용체 알파 불변(TRAC) 유전자를 표적화하는 제2 gRNA;

T 세포 수용체 베타 불변(TRBC) 유전자를 표적화하는 제3 gRNA; 및

RNA-가이드 뉴클레아제.

청구항 108

다음을 포함하는 조성물:

CBLB 유전자를 표적화하는 제1 gRNA;

TRAC 유전자를 표적화하는 제2 gRNA; 및

TRBC 유전자를 표적화하는 제3 gRNA.

청구항 109

대상체에서 암을 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 대상체에게 면역 세포를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 면역 세포는 감소된 CBLB 유전자 발현, 감소된 TRAC 유전자 발현, 및 감소된 TRBC 발현을 가지는 것인 방법.

청구항 110

청구항 109에 있어서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포 수용체 (eTCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현하는 것인 방법.

청구항 111

청구항 110에 있어서, eTCR 또는 CAR은 암 항원에 대해 특이성을 가지는 것인 방법.

청구항 112

다음을 포함하는, 조작된 면역 세포:

CBLB 유전자 녹아웃;

TRAC 유전자 녹아웃; 및

TRBC 유전자 녹아웃.

청구항 113

다음을 포함하는, 조작된 면역 세포:

CBLB 유전자 녹다운;

TRAC 유전자 녹다운; 및

TRBC 유전자 녹다운.

청구항 114

다음을 포함하는, 조작된 면역 세포:

CBLB 유전자 녹아웃 또는 녹다운;

TRAC 유전자 녹아웃 또는 녹다운; 및

TRBC 유전자 녹아웃 또는 녹다운.

청구항 115

다음의 단계를 포함하는, CBLB 유전자, TRAC 유전자, 및 TRBC 유전자를 파괴하는 삽입 또는 결실을 가지는 조작된 면역 세포를 생산하는 방법:

i) 면역 세포를 분리하는 단계; 및

ii) CBLB 유전자를 표적화하는 제1 gRNA, TRAC 유전자를 표적화하는 제2 gRNA, TRBC 유전자를 표적화하는 제3 gRNA, 및 RNA-가이드 뉴클레아제를 포함하는 게놈 편집 시스템과 면역 세포를 접촉시켜, 조작된 면역 세포를 생성하는 단계.

청구항 116

청구항 115에 있어서, 상기 세포는 조작된 T 세포 수용체 (eTCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 추가로 포함하는 것인 방법.

청구항 117

다음은 포함하는, 조작된 면역 세포:

(a) 항원에 특이적으로 결합하는 재조합 수용체 및

(b) CBLB 유전자의 유전자 파괴로서, 상기 유전자 파괴는 CBLB 폴리펩타이드의 발현을 방지 또는 감소시키는 파괴이며, 여기서:

조성물 내 세포의 적어도 약 70 %, 적어도 약 75 %, 또는 적어도 약 80 % 또는 적어도 약 90 %는 유전자 파괴를 포함하고; 외인성 CBLB 폴리펩타이드를 발현하지 않고; 인접(contiguous) CBLB 유전자를 포함하지 않고, CBLB 유전자를 포함하지 않고, 및/또는 기능성 CBLB 유전자를 포함하지 않고; 및/또는 CBLB 폴리펩타이드를 발현하지 않고; 및/또는

재조합 수용체를 발현하는 조성물 내 세포의 적어도 약 70 %, 적어도 약 75 %, 또는 적어도 약 80 % 또는 적어도 약 90 %는 유전자 파괴를 포함하고, 외인성 CBLB 폴리펩타이드를 발현하지 않고, 및/또는 CBLB 폴리펩타이드를 발현하지 않는 것인 세포.

청구항 118

청구항 117에 있어서, 상기 조작된 면역 세포는 T 세포 또는 자연 살해 (NK) 세포인 것인 조작된 면역 세포.

청구항 119

청구항 117에 있어서, 재조합 수용체는 재조합 또는 조작된 항원 수용체, 선택적으로 재조합 TCR 또는 조작된 T 세포 수용체 (eTCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 포함하는 것인 조작된 면역 세포.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원의 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017 11월 6일자 미국 가특허출원 제62/582,020호, 및 2017년 11월 7일자 미국 가특허출원 제62/582,393의 이익을 주장하며, 상기 출원 각각은 그 전체가 본 출원에 참조로 포함된다.

[0003] 분야

[0004] [1]본 발명은 표적 핵산 서열을 편집하기 위한, 또는 표적 핵산 서열의 발현을 조절하기 위한 CRISPR/Cas9-관련 방법 및 성분에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] [2]입양 세포 요법, 예컨대 유전적으로 변형된 T 세포를 사용하는 입양 T 세포 요법은 고형 및 혈액 악성종양에 대한 임상 시험을 시작하였다. 혈액 악성종양 (예를 들어, 림프종, 만성 림프구성 백혈병 (CLL) 및 급성 림프구성 백혈병 (ALL))을 수반하는 1기 및 2기 시험에서, 많은 환자들은 적어도 부분적인 반응을 나타내며, 일부는 완전한 반응을 나타냈다 (Kochenderfer, J. N. et al., 2012 Blood 119, 2709-2720). 그러나, 고형 종양 유형, 예컨대 흑색종, 신장 세포 암종 및 결장암에서의 사용을 포함하여, 개선된 방법 및 요법이 필요하다. [Johnson, L. A. et al., 2009 Blood 114, 535-546; Lamers, C. H. et al., 2013 Mol. Ther. 21, 904-912; Warren, R. S. et al., 1998 Cancer Gene Ther. 5, S1-S2] 참조). 제공된 구현예 중에는 이러한 요구를 해결하는 것이 있다.

발명의 내용

[0006] [3]CBLB의 핵산 서열의 표적화된 편집을 위한 게놈 편집 시스템 및 관련 조성물 및 방법이 본 명세서에 제공된다. 특정 구현예에서, 이러한 표적화된 편집은 CBLB 발현의 변경을 초래한다. 특정 구현예에서, 이러한 발현의 변경은 T 세포에서 발생한다. 특정 구현예에서, T 세포 내 CBLB 발현 변경은 CBLB 유전자를 표적화하는 gRNA와 복합체화된 RNA-가이드 뉴클레아제 단백질(RNA-guided nuclease protein)을 포함하는 게놈 편집 시스템으로서 리보핵단백질 (RNP) 복합체의 사용을 포함한다. 특정 구현예에서, CBLB 발현 변경은 RNP에 의해 유도된 이중 가닥 파손 및 후속의 불완전한 복구의 결과로서 발생하여, 표적화된 CBLB 서열에 및/또는 이러한 서열에 인접하여 인델(indel)을 초래한다.

- [0007] [4]특정 구현예에서, 본 개시는 CBLB 유전자의 표적 서열에 상보적인 표적화 도메인을 가지는 가이드 RNA를 포함하며, 여기서 RNA-가이드 뉴클레아제는 Cas9 뉴클레아제인 게놈 편집 시스템에 관한 것이다. 표적화 도메인은 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 상보적일 수 있다.
- [0008] [5]특정 구현예에서, CBLB 유전자의 표적 서열은 엑손 2, 엑손 4, 또는 엑손 5의 서열을 포함한다.
- [0009] [6]특정 구현예에 있어서, CBLB 유전자의 표적 서열은 서열 번호 88-92로 구성된 군으로부터 선택된 서열을 포함한다.
- [0010] [7]특정 구현예에서, 표적화 도메인은 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 또는 26개의 뉴클레오타이드 길이를 가진다.
- [0011] [8]특정 구현예에서, 표적화 도메인은 CBLB 유전자에 상보적인 적어도 18개의 인접 뉴클레오타이드를 가진다.
- [0012] [9]특정 구현예에서, 표적화 도메인은 서열 번호 1 내지 14로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 표적화 도메인은 CBLB 표적 위치의 약 500bp, 약 450bp, 약 400bp, 약 350bp, 약 300bp, 약 250bp, 약 200bp, 약 150bp, 약 100bp, 약 50bp, 약 25bp, 또는 약 10bp 내의 이중 가닥 파손 또는 단일 가닥 파손을 형성하도록 구성된다.
- [0013] [10]본 명세서에 개시된 특정 구현예에서, 게놈 편집 시스템은 CBLB 유전자의 발현을 녹아웃(knocking out)하거나, 또는 CBLB 유전자의 발현을 녹다운(knocking down)함으로써 CBLB 유전자를 변경할 수 있다.
- [0014] [11]특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 게놈 편집 시스템은 CBLB 유전자의 코딩 영역 또는 비-코딩 영역을 표적화하도록 구성된 표적화 도메인을 포함하는 gRNA를 포함하며, 상기 비-코딩 영역은 상기 CBLB 유전자의 프로모터 영역, 인핸서 영역, 인트론, 3' UTR, 5' UTR, 또는 폴리아데닐화 신호 영역을 포함하고; 코딩 영역은, 예를 들어, 상기 CBLB 유전자의 초기 코딩 영역을 포함한다.
- [0015] [12]특정 구현예에서, 본 명세서에 개시된 게놈 편집 시스템은 서열 번호 1-14로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 표적화 도메인을 포함한다. 특정 구현예에서, 표적화 도메인은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다: (a) 서열 번호 3; (b) 서열 번호 4; (c) 서열 번호 8; (d) 서열 번호 12; 및 (e) 서열 번호 14.
- [0016] [13]특정 구현예에서, 본 발명은 CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA 분자를 포함하는 조성물에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 조성물은 1, 2, 3, 또는 4개의 gRNA 분자를 포함한다. 특정 구현예에서, 조성물은 RNA-가이드 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9 분자를 추가로 포함한다. 특정 구현예에서, 이러한 조성물 내에 혼입된 표적화 도메인은 서열 번호 1-14로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 표적화 도메인은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다: (a) 서열 번호 3; (b) 서열 번호 4; (c) 서열 번호 8; (d) 서열 번호 12; 및 (e) 서열 번호 14.
- [0017] [14]특정 구현예에서, 본 개시는 CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA 분자를 인코딩하는 벡터에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 벡터는 RNA-가이드 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9 분자를 추가로 인코딩한다. 특정 구현예에서, 벡터에 의해 인코딩되는 gRNA의 표적화 도메인은 서열 번호 1-14로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 표적화 도메인은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다: (a) 서열 번호 3; (b) 서열 번호 4; (c) 서열 번호 8; (d) 서열 번호 12; 및 (e) 서열 번호 14. 특정 구현예에서 벡터는 바이러스 벡터이다. 특정 구현예에서, 벡터는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 또는 렌티바이러스 (LV) 벡터이다.
- [0018] [15]특정 구현예에서, 본 발명은 세포에서 CBLB 유전자를 변경하는 방법에 관한 것이며, 이러한 방법은 상기 세포에 다음 중 하나를 투여하는 것을 포함한다: (i) 상기 CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA 분자, 및 Cas9 분자를 포함하는 게놈 편집 시스템; (ii) 상기 CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 및 Cas9 분자를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터; 또는 (iii) 상기 CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA 분자, 및 Cas9 분자를 포함하는 조성물.

- [0019] [16]특정 구현예에서, 본 발명은 본 명세서에 기재된 게놈 편집 시스템, 본 명세서에 기재된 gRNA 조성물, 또는 본 명세서에 기재된 벡터를 포함하는 세포에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 세포는 CBLB를 발현한다. 특정 구현예에서, 세포는 T 세포이다.
- [0020] [17]특정 구현예에서, gRNA 및 RNA-가이드 뉴클레아제는 리보핵단백질 (RNP) 복합체를 포함한다.
- [0021] [18]특정 구현예에서, 상기 방법은 별도의 gRNA를 포함하는 2개 이상의 RNP 복합체를 투여하는 것을 포함한다.
- [0022] [19]특정 구현예에서, RNP 복합체는 효소적 활성 Cas9 (eaCas9) 뉴클레아제를 포함한다.
- [0023] [20]특정 구현예에서, RNP 복합체는 표적 핵산에서 이중 가닥 파손을 형성하거나, 표적 핵산에서 단일 가닥 파손을 형성하는 eaCas9 뉴클레아제를 포함한다.
- [0024] [21]특정 구현예에서, 별도의 gRNA를 포함하는 2개의 RNP 복합체는 세포에서 CBLB 유전자에서 오프셋 단일 가닥 파손을 형성하기 위해 사용된다.
- [0025] [22]특정 구현예에서, 본 발명은 세포에서 CBLB 유전자 발현을 변경시키는 RNA-가이드 뉴클레아제-매개 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다: a) 세포와 CBLB를 표적화하는 충분한 양의 gRNA 및 RNA-가이드 뉴클레아제와 접촉시키는 단계; 및 b) 세포의 CBLB 유전자 내 CBLB 표적 위치 또는 그 근처에 제1 DNA 이중 가닥 파손을 형성하는 단계로서, 제1 DNA 이중 가닥 파손은 NHEJ에 의해 복구되며, 상기 복구는 CBLB 유전자의 발현을 변경시키는 것인 단계.
- [0026] [23]특정 구현예에서, CBLB 표적 위치 또는 그 근처에서 제2 DNA 이중 가닥 파손을 형성하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0027] [24]특정 구현예에서, 제1 이중 가닥 파손은 CBLB 표적 위치의 약 500bp, 약 450bp, 약 400bp, 약 350bp, 약 300bp, 약 250bp, 약 200bp, 약 150bp, 약 100bp, 약 50bp, 약 25bp, 또는 약 10bp 이내에서 형성된다.
- [0028] [25]특정 구현예에서, 제1 및 제2 이중 가닥 파손은 CBLB 표적 위치의 약 500bp, 약 450bp, 약 400bp, 약 350bp, 약 300bp, 약 250bp, 약 200bp, 약 150bp, 약 100bp, 약 50bp, 약 25bp, 또는 약 10bp 이내에서 형성된다.
- [0029] [26]특정 구현예에서, 제1 이중 가닥 파손은 상기 CBLB 유전자의 코딩 영역 또는 비-코딩 영역에서 형성되며, 상기 비-코딩 영역은 상기 CBLB 유전자의 프로모터 영역, 인핸서 영역, 인트론, 3' UTR, 5' UTR, 또는 폴리아데닐화 신호 영역을 포함한다.
- [0030] [27]특정 구현예에서 제1 및 제2 이중 가닥 파손은 상기 CBLB 유전자의 코딩 영역 또는 비-코딩 영역에서 형성되며, 상기 비-코딩 영역은 상기 CBLB 유전자의 프로모터 영역, 인핸서 영역, 인트론, 3' UTR, 5' UTR, 또는 폴리아데닐화 신호 영역을 포함한다.
- [0031] [28]특정 구현예에서, 상기 코딩 영역은 엑손 2, 엑손 4, 및 엑손 5로부터 선택된다.
- [0032] [29]특정 구현예에서, 상기 표적화 도메인은 서열 번호 1 내지 14로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 약 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0033] [30]특정 구현예에서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제는 S. 피오게네스 Cas9(S. pyogenes Cas9) 뉴클레아제이며, 상기 표적화 도메인은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 약 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다: (a) 서열 번호 3; (b) 서열 번호 4; (c) 서열 번호 8; (d) 서열 번호 12; 및 (e) 서열 번호 14.
- [0034] [31]특정 구현예에서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제는 S. 아우레우스 Cas9(S. aureus Cas9) 뉴클레아제이다.
- [0035] [32]특정 구현예에서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제는 돌연변이 Cas9 뉴클레아제이다.
- [0036] [33]특정 구현예에서, NHEJ 복구는 20% 이상의 빈도로 삽입 또는 결실을 생성한다.
- [0037] [34]특정 구현예에서, 삽입 또는 결실 빈도는 30%, 40%, 또는 50% 이상이다.
- [0038] [35]특정 구현예에서, 본 발명은 CBLB 유전자의 표적 위치 근처에 또는 그 위치에 삽입 또는 결실을 포함하는 게놈 조작된 세포에 관한 것이며, 상기 표적 위치는 서열 번호 1 내지 14로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 상보적이거나, 또는 약 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

- [0039] [36]특정 구현예에서, 삽입 또는 결실은 CBLB 표적 위치의 약 500bp, 약 450bp, 약 400bp, 약 350bp, 약 300bp, 약 250bp, 약 200bp, 약 150bp, 약 100bp, 약 50bp, 약 25bp, 또는 약 10bp 이내이다.
- [0040] [37]특정 구현예에서, 세포는 T 세포 또는 NK 세포이다.
- [0041] [38]특정 구현예에서, 세포는 eTCR 또는 CAR를 추가로 포함한다.
- [0042] [39]특정 구현예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 조성물에 관한 것이다: a) CBLB 유전자의 표적 위치 근처에 또는 그 위치에 삽입 또는 결실을 포함하는 CBLB 유전자를 포함하는 세포의 집단으로서, 상기 표적 위치는 서열 번호 1 내지 14로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 상보적이거나, 또는 약 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인 세포 집단; 및 b) 저장 완충액.
- [0043] [40]특정 구현예에서, 세포 집단은 T 세포 또는 NK 세포를 포함한다.
- [0044] [41]특정 구현예에서, T 세포 또는 NK 세포는 eTCR 또는 CAR를 추가로 포함한다.
- [0045] [42]특정 구현예에서, 본 발명은 대상체에게 조작된 면역 세포를 투여하는 것을 포함하는, 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기 조작된 면역 세포는 CBLB 유전자, 선택적으로 조작된 T 세포 수용체 (eTCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)의 발현이 감소되며, 이러한 조작된 면역 세포는 CBLB 유전자의 근처에 삽입 또는 결실을 가진다.
- [0046] [43]특정 구현예에서, 조작된 면역 세포는 T 세포 또는 NK 세포를 포함한다.
- [0047] [44]특정 구현예에서, eTCR 또는 CAR은 암 세포에 대해 항원 특이성을 가진다.
- [0048] [45]특정 구현예에서, 조작된 면역 세포에서의 CBLB 발현은 상기 CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA, 및 RNA-가이드 뉴클라아제를 포함하는 게놈 편집 시스템을 면역 세포에 도입함으로써 감소된다.
- [0049] [46]특정 구현예에서, 상기 T 세포는 CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포이다.
- [0050] [47]특정 구현예에서, 조작된 면역 세포는 비-조작된 면역 세포에 비해 CD28 공동-자극의 부재하에 증식이 유지되거나, 또는 향상된다.
- [0051] [48]특정 구현예에서, 조작된 면역 세포는 비-조작된 면역 세포에 비해 사이토카인의 부재하에 증식이 유지되거나, 또는 향상된다.
- [0052] [49]특정 구현예에서, 조작된 면역 세포는 비-조작된 면역 세포에 비해 IFN-감마, IL-2, 및 TNF-알파의 발현이 유지되거나 또는 증가된다.
- [0053] [50]특정 구현예에서, 조작된 면역 세포는 비-조작된 면역 세포에 비해 표적 세포 사멸 능력이 유지하거나 또는 증가된다.
- [0054] [51]특정 구현예에서, 본 발명은 CD28 공동-자극이 감소되거나 부재하는 면역 세포의 증식을 향상시키는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 상기 CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA 분자, 및 RNA-가이드 뉴클라아제를 포함하는 게놈 편집 시스템을 면역 세포 내로 도입하는 단계, 및 면역 세포에서 CBLB 발현을 감소시키는 단계를 포함한다.
- [0055] [52]특정 구현예에서, 상기 방법은 사이토카인의 부재 또는 감소에서 증식을 향상시키는 단계를 추가로 포함한다.
- [0056] [53]특정 구현예에서, 사이토카인 IL-2, IL-7, 및 IL-15의 부재 또는 감소가 존재한다.
- [0057] [54]특정 구현예에서, 본 발명은 복수의 조작된 T 세포를 포함하는 조성물에 관한 것이며, 상기 조작된 T 세포는 비-조작된 T 세포에 비해 감소된 CBLB 유전자 발현을 나타낸다.
- [0058] [55]특정 구현예에서, 조작된 T 세포는 비-조작된 T 세포에서의 CBLB 발현 수준의 약 50%, 약 40%, 약 30%, 약 20%, 약 10% 또는 약 5%인 CBLB 유전자 발현 수준을 나타낸다.
- [0059] [56]특정 구현예에서, 조작된 T 세포는 eTCR 또는 CAR의 발현을 추가로 포함한다.
- [0060] [57]특정 구현예에서, 상기 T 세포는 CD4+ T 세포 및/또는 CD8+ T 세포이다.

- [0061] [58]특정 구현예에서, 조작된 T 세포는 다음 중 하나 이상을 보유하는 것을 특징으로 한다: a) CD28 공동-자극의 부재하에 증식 유지 또는 증가; b) CD28 공동-자극의 부재하에 표적 세포 사멸 유지 또는 증가; c) 표적 항원에 대한 민감성 증가; d) 감소된 표적 항원의 존재하에 표적 세포 사멸 유지 또는 증가; 및 e) 사이토카인 생성 능력 증가.
- [0062] [59]특정 구현예에서, 본 발명은 복수의 조작된 T 세포를 포함하는 조성물에 관한 것이며, 상기 조작된 T 세포는 비-조작된 T 세포에 비해 감소된 CBLB 유전자 발현을 나타내고, 상기 조작된 T 세포는 비-조작된 T 세포와 다음을 포함하는 게놈 편집 시스템을 접촉시킴으로써 제조된다: CBLB 유전자의 표적 서열과 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 gRNA; 및 RNA-가이드 뉴클레아제.
- [0063] [60]특정 구현예에서, 조작된 T 세포는 eTCR 또는 CAR를 발현하는 벡터로 추가로 형질도입된다.
- [0064] [61]특정 구현예에서 벡터는 바이러스 벡터이다.
- [0065] [62]특정 구현예에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 또는 렌티바이러스 (LV) 벡터이다.
- [0066] [63]특정 구현예에서, 상기 RNA-가이드 뉴클레아제는 S. 피오게네스 Cas9(S. pyogenes Cas9) 뉴클레아제이며, 상기 표적화 도메인은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 약 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함한다: (a) 서열 번호 3; (b) 서열 번호 4; (c) 서열 번호 8; (d) 서열 번호 12; 및 (e) 서열 번호 14.
- [0067] [64]특정 구현예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 게놈 편집 시스템에 관한 것이다: 카시타스(casitas) B-계통 림프종 원종양 유전자-b (CBLB) 유전자를 표적화하는 제1 gRNA; T 세포 수용체 알파 불변 (TRAC) 유전자를 표적화하는 제2 gRNA; T 세포 수용체 베타 불변 (TRBC) 유전자를 표적화하는 제3 gRNA; 및 RNA-가이드 뉴클레아제.
- [0068] [65]특정 구현예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 조성물에 관한 것이다: CBLB 유전자를 표적화하는 제1 gRNA; TRAC 유전자를 표적화하는 제2 gRNA; 및 TRBC 유전자를 표적화하는 제3 gRNA.
- [0069] [66]특정 구현예에서, 본 발명은 대상체에서 암을 치료하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 대상체에게 면역 세포를 투여하는 것을 포함하고, 여기서 조작된 면역 세포는 감소된 CBLB 유전자 발현, 감소된 TRAC 유전자 발현, 및 감소된 TRBC 발현을 가진다.
- [0070] [67]특정 구현예에서, 조작된 면역 세포는 조작된 T 세포 수용체 (eTCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 발현한다.
- [0071] [68]특정 구현예에서, eTCR 또는 CAR는 암 항원에 대해 특이성을 가진다.
- [0072] [69]특정 구현예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 조작된 면역 세포에 관한 것이다: CBLB 유전자 녹아웃; TRAC 유전자 녹아웃; 및 TRBC 유전자 녹아웃.
- [0073] [70]특정 구현예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 조작된 면역 세포에 관한 것이다: CBLB 유전자 녹다운; TRAC 유전자 녹다운; 및 TRBC 유전자 녹다운.
- [0074] [71]특정 구현예에서, 본 발명은 다음을 포함하는 조작된 면역 세포에 관한 것이다: CBLB 유전자 녹아웃 또는 녹다운; TRAC 유전자 녹아웃 또는 녹다운; 및 TRBC 유전자 녹아웃 또는 녹다운.
- [0075] [72]특정 구현예에서, 본 발명은 CBLB 유전자, TRAC 유전자, 및 TRBC 유전자를 파괴하는 삽입 또는 결실을 가지는 조작된 면역 세포를 생산하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 다음의 단계를 포함한다: i) 면역 세포를 분리하는 단계; 및 ii) CBLB 유전자를 표적화하는 제1 gRNA, TRAC 유전자를 표적화하는 제2 gRNA, TRBC 유전자를 표적화하는 제3 gRNA, 및 RNA-가이드 뉴클레아제를 포함하는 게놈 편집 시스템과 면역 세포를 접촉시켜, 조작된 면역 세포를 생성하는 단계.
- [0076] [73]특정 구현예에서, 세포는 조작된 T 세포 수용체 (eTCR) 또는 키메라 항원 수용체 (CAR)를 추가로 포함한다.
- [0077] [74]특정 구현예에서, 본 발명은 (a) 항원에 특이적으로 결합하는 재조합 수용체 및 (b) CBLB 유전자의 유전자 파괴를 포함하는 조작된 면역 세포에 관한 것이며, 상기 유전자 파괴는 CBLB 폴리펩타이드의 발현을 예방 또는 감소시키고, 상기 세포는 조성물 내 세포의 적어도 약 70 %, 적어도 약 75 %, 또는 적어도 약 80 % 또는 적어도 약 90 %는 유전자 파괴를 포함하고; 외인성 CBLB 폴리펩타이드를 발현하지 않고; 인접(contiguous) CBLB 유전자를 포함하지 않고, CBLB 유전자를 포함하지 않고, 및/또는 기능성 CBLB 유전자를 포함하지 않고; 및/또는 CBLB 폴리펩타이드를 발현하지 않고; 및/또는 재조합 수용체를 발현하는 조성물 내 세포의 적어도 약 70 %, 적어도

약 75 %, 또는 적어도 약 80 % 또는 적어도 약 90 %는 유전자 파괴를 포함하고, 외인성 CBLB 폴리펩타이드를 발현하지 않고, 및/또는 CBLB 폴리펩타이드를 발현하지 않는다.

[0078] [75]달리 정의되지 않는 한, 본 출원에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 해당 분야의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 방법 및 재료와 유사하거나 이에 상응하는 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있으나, 하기에는 적절한 방법 및 재료가 기재된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허, 및 다른 참고 문헌은 그 전체가 참조로서 포함된다. 또한, 재료, 방법, 및 예시는 단지 예시적인 것이며 제한하고자 의도되지 않는다.

[0079] [76]숫자 및 알파벳의 머리글 및 소제목을 포함한 머리글은 구성 및 표시를 위한 것이며, 제한하도록 의도된 것이 아니다.

[0080] [77]본 발명의 다른 특징 및 이점은 상세한 설명, 도면, 그리고 청구범위로부터 명확해 질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0081] [78]첨부하는 도면은 본 발명의 특정 양태 및 구현예의 포괄적인 예시보다는, 예시적이고 개략적인 예시를 제공하도록 의도된다. 도면은 임의의 특정 이론 또는 모델에 제한되거나 구속되고자 의도된 것이 아니며, 반드시 비례하는 것은 아니다. 전술한 설명을 제한하지 않으면서, 핵산 및 폴리펩타이드는 선형 서열로서, 또는 개략적인 2차원 또는 3차원 구조로 묘사될 수 있으며; 이러한 묘사는 이의 구조에 관한 임의의 특정 모델 또는 이론을 제한하거나 구속하기 보다는 예시적인 것으로 의도된다. 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작성된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)과 함께 공개된 본 특허 또는 특허 출원의 사본은 특허청에 요청 및 필요한 요금 지불시 제공될 것이다.

[79]도 1은 CBLB의 엑손 2-5를 표적으로하는 예시적인 *S. 피오네케스* Cas9 gRNA의 1차 스크리닝 데이터 및 관련된 % 인텔 또는 % 프레임시프트 빈도를 도시한다.

[80]도 2는 CBLB의 엑손 2-5를 표적으로하는 예시적인 *S. 아우레우스* Cas9 gRNA의 1차 스크리닝 데이터 및 관련된 % 인텔 또는 % 프레임시프트 빈도를 도시한다.

[81]도 3은 Cas9/gRNA RNP 및 관련 평균 인텔 분획에 대해 0.23, 0.72 및 2.27 μ M의 농도로 사용된 예시적인 *S. 피오네케스* Cas9 gRNA의 2차 확인 스크리닝을 도시한다.

[82]도 4는 2-파트 형식 또는 단일 gRNA 분자에 사용되는 2 개의 선택된 gRNA를 도시한다. RNP의 다양한 nM의 농도에서 % 인텔 빈도가 도시된다.

[83]도 5는 μ M에서 증가하는 RNP 농도에서 몇몇 예시적인 gRNA의 시험관 내 CBLB 주형의 % 절단을 도시한다.

[84]도 6A-도 6C는 몇몇 예시적인 gRNA에 의한 녹다운 및 편집 효율을 도시한다. CBLB 단백질의 녹다운을 웨스턴 블롯으로 평가하고 (도 6A) CBLB 발현의 % 감소를 측정하였다 (도 6B). 동일한 gRNA의 % 인텔 분획 및 % 프레임시프트 분획을 나타내는 NGS 데이터가 도시된다 (도 6C).

[85]도 7A-도 7B는 유세포 분석에 의해 분석된 CBLB의 세포 내 염색을 도시한다. 그래프의 왼쪽으로의 이동은 CBLB의 세포 내 염색 감소를 나타낸다. 여러 예시적인 gRNA를 사용하여 CD4+ (도 7A) 및 CD8+ (도 7B) T 세포에서 유전자 편집을 수행하였다.

[86]도 8A-도 8B는 CD4+ (도 8A) 및 CD8+ (도 8B) T 세포에서 CBLB 유전자-편집된 백그라운드에서 세포 증식의 세포 추적 바이올렛 (CTV) FACS 분석을 도시한다. 항-CD28의 부재하에, 사이토카인을 첨가하지 않고, 플레이트-결합된 차선의 항-CD3 항체 농도 이하 (1.0 μ g/ml)로 세포를 성장시켰다.

[87]도 9A-도 9B는 CBLB 유전자-편집된 백그라운드에서 CD4+ (도 9A) 및 CD8+ (도 9B) T 세포의 증식을 도시한다. 가용성 항-CD28 항체 (1.0 μ g/ml)의 존재하에, 사이토카인을 첨가하거나 또는 첨가하지 않고, 플레이트-결합된 항-CD3 항체의 증가하는 농도의 존재하에서 세포를 성장시켰다.

[88]도 10A-도 10B는 CBLB 유전자-편집된 백그라운드에서 CD4+ (도 10A) 및 CD8+ (도 10B) T 세포의 증식을 도시한다. 항-CD28 항체의 부재하에, 사이토카인을 첨가하거나 또는 첨가하지 않고, 플레이트-결합된 항-CD3 항체의 증가하는 농도의 존재하에서 세포를 성장시켰다.

[89]도 11A-도 11C는 CBLB 유전자-편집된 백그라운드에서 CD8+ T 세포에서의 INF γ (도 11A), IL-2 (도 11B) 및 TNF- α (도 11C) 수준을 도시한다. 항-CD28 공동-자극의 부재하에, 사이토카인을 첨가하지 않고, 플레이트-결합

된 항-CD3 항체의 감소하는 농도의 존재하에서 세포를 배양하였다.

[90]도 12A-도 12C는 CBLB 유전자-편집된 백그라운드에서 CD4⁺ T 세포에서의 INF γ (도 12A), IL-2 (도 12B) 및 TNF- α (도 12C) 수준을 도시한다. 공동-자극의 부재하에, 사이토카인을 첨가하지 않고, 플레이트-결합된 항-CD3 항체의 감소하는 농도의 존재하에서 세포를 배양하였다.

[91]도 13은 편집되지 않은 대조군과 비교하여 CBLB 유전자-편집된 백그라운드를 가지는 조작된 (eTCR) 형질도입된 T 세포에서의 CBLB 단백질 수준의 웨스턴 블롯 분석을 도시한다.

[92]도 14는 형질도입 11 일 후 T 세포에서 사랑체 결합에 대한 유세포 분석 결과 및 HPV E7 특이적 TCR 발현에 대한 대리 마커를 도시한다.

[93]도 15는 CBLB 유전자-편집된 HPV E7 eTCR 형질도입된 T 세포와의 인큐베이션 후 % 카스파제 양성 펩타이드 펄스된 T2 세포를 도시한다. 증가하는 HPV E7 펩타이드 농도를 사용하였다.

[94]도 16은 CBLB 유전자-편집된 HPV E7 eTCR 형질도입된 T 세포에 의한 펩타이드 펄스된 T2 세포 표적 사멸을 도시한다. 1000nM, 10nM 및 0.1nM의 HPV E7 펩타이드를 사용하였다. CTLA4-Ig (2.2 μ g/ml)와 함께 또는 없이 세포를 인큐베이션하였다.

[95]도 17는 CBLB 유전자-편집된 HPV E7 eTCR 형질도입된 T 세포에 의한 INF γ 생산을 도시한다. 1000nM, 10nM 및 0.1nM의 HPV E7 펩타이드를 사용하였다. CTLA4-Ig (2.2 μ g/ml)와 함께 또는 없이 세포를 인큐베이션하였다.

[96]도 18은 CBLB 유전자-편집된 HPV E7 eTCR 형질도입된 T 세포에 의한 SCC152 세포 표적 사멸을 도시한다. T 세포 : SCC152의 비율(이펙터: 표적 세포 비율)을 5:1, 2.5:1 및 1.25:1로 사용하였다.

[97]도 19는 SCC152 세포의 존재하에 CBLB 유전자-편집된 HPV E7 eTCR 형질도입된 T 세포에 의한 INF γ 생산을 도시한다. 다양한 T 세포 : SCC152의 비율을 사용하였다.

[98]도 20은 HPV E7 항원과의 인큐베이션한 후 6 일째에 FACS에 의해 분석된 CBLB 유전자-편집된 HPV E7 eTCR 형질도입된 T 세포 증식을 도시한다. CD86 공동-자극의 유무에 관계없이 세포를 인큐베이션하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082]

[99]고체 종양에서와 같은 입양 T 세포 요법과 관련된 반응 속도 및 치료적 결과는 여러 요인에 의해 영향을 받을 수 있으나, 임의의 특정 이론에 구속되고자 하는 것은 아니다. 이러한 여러 요인으로는 다음을 포함할 수 있다: (1) 입양 전달 이후 T 세포 증식; (2) 종양 환경 요인에 의해 손상될 수 있는 생존과 같은 T 세포 생존, 예컨대 종양 환경 요인에 의한 암 세포와 같은 표적 세포 환경에서 인자에 의한 T 세포의 세포사멸 유도; 및 (3) 다양한 요인에 의해 손상될 수 있는 기능과 같이 T 세포 기능을 나타내는 속성, 예컨대 숙주 면역 세포 및/또는 표적 세포, 예컨대, 암 세포의 분비에 의한 억제 요인에 의한 세포독성 T 세포 기능의 억제. 이러한 하나 이상의 요인은, 결과적으로, E3 유비퀴틴 리가아제인 카시타스 B-계통 림프종 원종양 유전자-b (CBLB)의 활성화에 의해 영향을 받을 수 있다.

[0083]

[100]CBLB는 일반적으로 T 세포, NK 세포, B 세포 및 골수 세포를 비롯한 다수의 신호전달 경로를 조절할 수 있는 백혈구에서 편재적으로 발현되는 것으로 여겨진다. CBLB의 주요 기능은 일반적으로 공동-자극 수용체를 통한 면역 세포 공동 자극 신호를 음성으로 조절하는 것이다. 공동-자극의 부재하에 TCR 자극은 CBLB의 상향 조절로 이어질 수 있으며, 이는 결국 다운스트림 신호전달 사건을 억제할 수 있다 [(Ltz-Nicolandoni et al. Frontiers in oncology. Vol 5. Article 58. 2015)]. 마우스에서, CBLB 결실은 자가 면역을 유도하고 자연발생 및 이식된 종양의 거부를 강화시키는 것으로 보고되어 있다 [(Stromnes et al. J. Clin Invest 120 : 3722-3734. 2010)]. 이러한 결과에 기초하여, 추가의 연구는 면역 체크포인트 조절에서 CBLB의 역할을 입증하였다 [(Zhou et al. Nature. 506: 52-57. 2014)].

[0084]

[101]CTLA-4 및 PD-1과 같은 다른 면역 체크포인트 조절제를 표적화하기 위한 예시적인 전략은 표적-특이적 억제 항체에 의존한다. 이러한 전략은 막에 결합된 표적의 맥락에서 효과적이지만 CBLB와 같은 세포 내 표적에는 덜 효과적이다. 치료 목적으로 CBLB를 표적화하는 현재의 전략은 CBLB 발현 또는 활성을 일시적으로 억제하는 제한된 방법이었다. 예를 들어 siRNA 형질감염을 통한 CBLB 발현을 감소시켜 RNA 간섭 반응을 유도하는 전략이 존재한다 [(Sachet et al. J Immunother Cancer. 3 (Suppl. 2): P172. 2015)]. 다른 접근법은 CBLB의 소분자 억제제를 사용하는 것이다 [(Agarwal et al. AACR; Cancer Res 2016; 76 (14 Suppl.): Abstract nr 2228)]. 이러한 방법은 CBLB 활성을 효과적으로 억제하는 반면, 일시적 특성은 치료 시간 경과에 걸쳐 안정한 억제가 유지

되어야 하는 입양 T 세포 치료 상황에서 효과적이지 않을 것이다. 현재 CBLB 기능을 억제하는 영구적인 방법은 없다. 유전자 편집은 CBLB 및 다운스트림 경로의 안정적이고 장기적인 억제를 생성하기 때문에 매력적인 대안을 제공한다.

- [0085] [102]CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, 규칙적인 간격을 갖는 짧은 회문 구조 반복단위의 배열)은 박테리아 및 고세균에서 바이러스 공격으로부터 방어하기 위해 적응 면역 시스템으로서 진화하였다. 바이러스에 노출되면, 바이러스 DNA의 짧은 세그먼트가 CRISPR 유전자와 내로 통합된다. 바이러스 서열을 포함하는 CRISPR 유전자와의 일부로부터 RNA가 전사된다. 바이러스 게놈에 상보적인 서열을 함유하는 이러한 RNA는, 바이러스 게놈의 표적 서열에 대한 RNA-가이드 뉴클레아제의 표적화를 매개한다. RNA-가이드 뉴클레아제는, 결과적으로, 바이러스 표적을 절단하여 침묵시킨다.
- [0086] [103]최근, CRISPR/Cas9 시스템은 진핵 세포의 게놈 편집에 대해 각색되었다. 부위-특이적 이중 가닥 파손(DSB)의 도입은 내인성 DNA 복구 메커니즘, 예를 들어 비-상동 말단-연결 (NHEJ) 또는 상동-직접 복구 (HDR)을 통해 표적 서열 변경을 가능하게 한다. CRISPR/Cas9는 종양 요법의 맥락에서 T-세포의 CBLB-매개 억제를 해결하기 위한 유망한 방법을 나타내지만, 종양 요법에 사용하기 위해 T-세포에서 이러한 문제를 해결하기 위한 실행 가능한 접근법은 현재까지 확인되지 않았다.
- [0087] 정의 및 약어
- [0088] [104]달리 명시되지 않는 한, 다음의 용어 각각은 본 섹션에서 관련된 의미를 가진다.
- [0089] [105]부정 관사 (“a” 및 “an” 는 관련된 명사 중 적어도 하나를 지칭하며, “적어도 하나” 및 “하나 이상”이라는 용어와 상호교환적으로 사용된다. 예를 들어, “모듈”은 적어도 하나의 모듈, 또는 하나 이상의 모듈을 의미한다.
- [0090] [106]연언 “또는” 과 “및/또는”은 비-배타적 분립사로서 상호교환적으로 사용된다.
- [0091] [107] “본질적으로 구성된”이라는 문구는, 언급된 종이 우세한 종이지만 다른 종이 대상 조성물의 구조, 기능 또는 거동에 영향을 미치지 않는 미량 또는 양으로 존재할 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 특정 종으로 본질적으로 구성된 조성물은 일반적으로 그 종의 90%, 95%, 96% 이상을 포함할 것이다.
- [0092] [108] “도메인”은 단백질 또는 핵산의 세그먼트를 설명하는데 사용된다. 달리 지시되지 않는 한, 도메인은 특정한 기능적 특성을 가질 필요는 없다.
- [0093] [109] “인텔”은 핵산 서열에서의 삽입 및/또는 결실이다. 인텔은 본 명세서의 게놈 편집 시스템에 의해 형성된 이중 가닥 파손과 같은 DNA 이중 가닥 파손의 복구의 생성물 일 수 있다. 인텔은 “오류가 발생하기 쉬운(error prone)” 복구 경로, 예컨대 하기 설명된 NHEJ 경로에 의해 파손이 복구될 때, 가장 일반적으로 형성된다. 인텔은 표적 서열에서 프레임-내 또는 프레임-외 돌연변이를 생성하는 삽입 또는 결실을 생성할 수 있다.
- [0094] [110] “유전자 전환”은 내인성 상동 서열 (예를 들어, 유전자 어레이 내 상동 서열)의 혼입에 의한 DNA 서열의 변경을 지칭한다. “유전자 교정”은 외인성 상동 서열, 예컨대 외인성 단일 또는 이중 가닥 공여자 주형 DNA의 혼입에 의한 DNA 서열의 변경을 지칭한다. 유전자 전환 및 유전자 교정은 하기 기재된 것과 같은 HDR 경로에 의한 DNA 이중 가닥 파손의 복구 결과물이다.
- [0095] [111]인텔, 유전자 전환, 유전자 교정, 및 다른 게놈 편집 결과물은 일반적으로 시퀀싱에 의해 (가장 일반적으로는 “차세대” 또는 “합성을 통한 시퀀싱(sequencing-by-synthesis)” 방법이지만, Sanger 시퀀싱도 사용될 수 있음) 평가되고, 모든 시퀀싱 관독 중 관심 부위에서 수치적 변화 (예를 들어, ± 1 , ± 2 이상의 염기)의 상대 빈도에 의해 정량화된다. 시퀀싱을 위한 DNA 샘플은 기술 분야 내 공지된 다양한 방법에 의해 제조될 수 있으며, 증합효소 사슬 반응 (PCR)에 의한 관심 부위의 증폭, 문헌 [Tsai et al. (Nat. Biotechnol. 34(5): 483 (2016), 본 명세서에 참조로 포함)]에 기재된 GUIDEseq 공정에서와 같이 이중 가닥 파손에 의해, 또는 기술 분야 내 공지된 다른 수단에 의해 생성된 DNA 말단 포획을 포함할 수 있다. 게놈 편집 결과물은 또한 인 시튜(in situ) 혼성화 방법, 예컨대 Genomic Vision (Bagnex, France)에 의해 상용화된 FiberComb™ 시스템에 의해, 및 기술 분야 내 공지된 임의의 다른 적합한 방법에 의해 평가될 수 있다.
- [0096] [112] “Alt-HDR” “대안 상동-지정 복구”, 또는 “대안 HDR”은 상동성 핵산 (예를 들어, 내인성 상동 서열, 예를 들어, 자매 염색체, 또는 외인성 핵산, 예를 들어, 주형 핵산)을 사용하여 DNA 손상을 복구하는 공정을 지칭하도록 상호교환적으로 사용된다. Alt-HDR은, 공정이 정준 HDR(canonical HDR)과는 다른 경로를 사용하고 정준 HDR 조정자인 RAD51 및 BRCA2에 의해 억제될 수 있다는 점에서 정준 HDR과는 상이하다. Alt-HDR은 또한 단일

가닥 또는 닉(nicked) 상동성 핵산 주형의 관여로 구별되는 반면, 정준 HDR은 일반적으로 이중 가닥 상동 주형을 포함한다.

- [0097] [113] “정준 HDR” “정준 상동-지정 복구” 또는 “cHDR”은 상동성 핵산 (예를 들어, 내인성 상동 서열, 예를 들어, 자매 염색체, 또는 외인성 핵산, 예를 들어, 주형 핵산)을 사용하여 DNA 손상을 복구하는 공정을 지칭한다. 정준 HDR은 이중 가닥 파손에서 상당한 절제가 있었을 때 작용하여, DNA의 적어도 하나의 단일 가닥 부분을 형성한다. 정상 세포에서, cHDR은 전형적으로 절단의 인식, 파손의 안정화, 절제, 단일 가닥 DNA의 안정화, DNA 교차 중간체의 형성, 교차 중간체의 분해 및 결합과 같은 일련의 단계를 포함한다. 상기 공정에는 RAD51 및 BRCA2가 필요하며 상동성 핵산은 일반적으로 이중 가닥이다.
- [0098] [114] 달리 지시되지 않는 한, 용어 “HDR”는 본 명세서에서 사용 시 정준 HDR 및 alt-HDR 모두를 포함한다.
- [0099] [115] “비 동종 말단 결합” 또는 “NHEJ”는 정식 NHEJ (cNHEJ) 및 대안적 NHEJ (altNHEJ)를 포함하는 결합 매개 복구 및/또는 비 템플릿 중재 수리를 의미하며, 이는 결과적으로, 미세 상동성 매개 단부 결합 (MMEJ), 단일 가닥 어닐링 (SSA) 및 합성-의존적 미세 상동성-매개 말단 결합 (SD-MMEJ)을 포함한다.
- [0100] [116] “대체” 또는 “대체된”은, 분자 (예를 들어, 핵산 또는 단백질)의 변형과 관련하여 사용될 때, 공정 제한을 요구하지 않고 단지 대체 개체가 존재한다는 것을 나타낸다.
- [0101] [117] “대상체”는 인간 또는 비인간 동물을 의미한다. 인간 대상체는 임의의 연령 (예를 들어, 유아, 어린이, 청년, 또는 성인)일 수 있고, 질병으로 고통받을 수 있거나, 유전자 변경을 필요로 할 수 있다. 태일적으로, 대상체는 포유 동물, 조류, 어류, 파충류, 양서류 및 보다 구체적으로 비인간 영장류, 설치류 (예컨대 마우스, 랫트, 햄스터 등), 토끼, 기니피그, 개, 고양이 등을 포함하지만, 이에 제한되지 않는 동물일 수 있다. 본 명세서의 특정 구현예에서, 대상체는 가축, 예를 들어, 소, 말, 양 또는 염소이다. 특정 구현예에서, 대상체는 가금류이다.
- [0102] [118] “치료하다”, “치료하는”, 및 “치료”는 대상체 (예를 들어, 인간 대상체)에서 질병을 치료하는 것을 의미하며, 이는 질병의 억제, 즉, 질병의 발병 또는 진행 저지 또는 예방; 질병의 완화, 즉, 질병 상태의 퇴행 유발; 질병의 하나 이상의 증상을 완화; 및 질병의 치유 중 하나 이상을 포함한다.
- [0103] [119] “예방하다” “예방하는” 및 “예방”은 포유동물에서, 예를 들어, 인간에서 질병을 예방하는 것을 지칭하며, 이는 (a) 질병을 방지 또는 배제하거나; (b) 질병에 대한 소인에 영향을 미치거나; 또는 (c) 질병의 적어도 하나의 증상의 발병을 예방 또는 지연시키는 것을 포함한다.
- [0104] [120] “키트”는 특정 목적을 위해 사용될 수 있는 기능적 유닛을 함께 구성하는 둘 이상의 성분의 임의의 집합을 지칭한다. 예시로서 (이에 제한되지 않고), 본 명세서에 따른 하나의 키트는 RNA-가이드 뉴클레아제와 복합체화되거나 복합체화될 수 있고, 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 (예를 들어, 현탁되거나 현탁될 수 있는) 가이드 RNA를 포함할 수 있다. 키트는 이러한 세포 또는 대상체에서 원하는 게놈 변경을 야기하기 위해, 예를 들어 세포 또는 대상체 내로 복합체를 도입하는데 사용될 수 있다. 키트의 성분은 함께 포장되거나 별도로 포장될 수 있습니다. 본 명세서에 따른 키트는 또한 예를 들어 본 개시의 방법에 따라 키트의 사용을 설명하는 사용 지침 (DFU)을 선택적으로 포함한다. DFU는 키트와 함께 물리적으로 포장되거나, 키트의 사용자에게 전자 수단 등으로 제공될 수 있다.
- [0105] [121] 용어 “폴리뉴클레오타이드”, “뉴클레오타이드 서열”, “핵산”, “핵산 분자”, “핵산 서열”, 및 “올리고뉴클레오타이드”는 DNA 및 RNA에서 일련의 뉴클레오타이드 염기 (또한 “뉴클레오타이드”)를 지칭하며, 2개 이상의 뉴클레오타이드의 임의의 사슬을 의미한다. 폴리뉴클레오타이드, 뉴클레오타이드 서열, 핵산 등은 키메라 혼합물 또는 이의 유도체 또는 변형된 형태, 단일-가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 예를 들어, 분자의 안정성, 혼성화 파라미터 등을 개선하기 위해, 염기 모이어티, 당 모이어티 또는 포스페이트 골격에서 변형될 수 있다. 뉴클레오타이드 서열은 일반적으로 단백질 및 효소를 제조하기 위해 세포 기계 장치에 의해 사용되는 정보를 포함하지만 이에 제한되지 않는 유전자 정보를 운반한다. 상기 용어는 이중 가닥 또는 단일 가닥 게놈 DNA, RNA, 임의의 합성 및 유전자 조작된 폴리뉴클레오타이드, 및 센스 및 안티센스 폴리뉴클레오타이드 둘 모두를 포함한다. 상기 용어는 또한 변형된 염기를 함유하는 핵산을 포함한다.
- [0106] [122] 종래의 IUPAC 표기법은 하기 표 1에 나타난 바와 같이 본 명세서에 제시된 뉴클레오타이드 서열에 사용된다 (또한 Cornish-Bowden A, Nucleic Acids Res. 1985 May 10; 13(9):3021-30 참조, 본 명세서에 참조로 포함). 그러나, “T”는 예를 들어 gRNA 표적화 도메인에서 DNA 또는 RNA에 의해 서열이 인코딩될 수 있는 경우 “티

민 또는 우라실"을 나타낸다는 점에 유의해야 한다.

표 1: IUPAC 핵산 표기법

표 1

문자	염기
A	아데닌
T	타이민 또는 우라실
G	구아닌
C	사이토신
U	우라실
K	G 또는 T/U
M	A 또는 C
R	A 또는 G
Y	C 또는 T/U
S	C 또는 G
W	A 또는 T/U
B	C, G 또는 T/U
V	A, C 또는 G
H	A, C 또는 T/U
D	A, G 또는 T/U
N	A, C, G 또는 T/U

[123]용어 “단백질”, “펩타이드” 및 “폴리펩타이드”는 펩타이드 결합을 통해 함께 연결된 아미노산의 순차적인 사슬을 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 이러한 단백질의 단편 또는 부분, 변이체, 유도체 및 유사체, 뿐만 아니라 함께 결합된 개별 단백질, 그룹 또는 단백질의 복합체를 포함한다. 본 명세서에서 펩타이드 서열은 좌측의 아미노 또는 N-말단으로 시작하고, 우측의 카복실 또는 C-말단으로 진행되는 통상적인 표기법을 사용하여 제시된다. 표준 1-문자 또는 3-문자 약어가 사용될 수 있다.

[124]용어 “변이체”는 기준 실체(entity)와 유의한 구조적 동일성을 나타내지만, 기준 실체와 비교하여 하나 이상의 화학적 모이어티의 존재 오는 수준에서 기준 실체와 구조적으로 상이한 실체, 예컨대 폴리 펩타이드, 폴리뉴클레오타이드 또는 소분자를 지칭한다. 많은 구현예에서, 변이체는 또한 이의 기준 실체와 기능적으로 상이하다. 일반적으로, 특정 실체가 기준 실체의 "변이체"로 적절하게 고려되는지 여부는 기준 실체와의 구조적 동일성 정도에 기초한다.

개요

[125]본 명세서에 기재된 게놈 편집 시스템은 일반적으로 하나 이상의 CBLB 표적 서열에 상보적인 표적화 도메인을 포함하는 하나 이상의 gRNA를 포함하며, 이러한 표적 서열은, 결과적으로, 하나 이상의 RNA-가이드 뉴클레아제에 의해 인식되는 프로토스페이서 인접 모티프 (PAM) 서열을 포함하거나, 또는 이에 인접하여, 하나 이상의 gRNA가 이에 결합 (예를 들어, 복합체화)된다. 따라서, 본 명세서의 게놈 편집 시스템은, 부위-특이적 방식으로, 하나 이상의 CBLB 표적 서열에 관한 것이며, 이러한 CBLB 표적 서열 내에서 또는 이러한 서열에 근접하여 변형을 도입하도록 작동한다.

[126]본 명세서의 게놈 편집 시스템에 의해 CBLB 표적 부위 내로, 또는 이에 근접하여 도입되는 변형은, 가장 일반적으로, DNA 단일 가닥 파손 (SSB 또는 “닉(nick)” 및/또는 이중 가닥 파손 (DSB)을 포함할 것이다. 닉(nick) 및 DSB은, 결과적으로, 세포에 의해, 하나 이상의 CBLB 표적 부위에서 작은 인델의 도입 또는 더 큰 삽입 또는 결실, 2개의 CBLB 표적 부위 사이의 서열의 결실, 및/또는 CBLB 부위, 서열 (구체적으로공여체 주형 올리고뉴클레오타이드를 통한 세포 내로 도입되는 외인성 서열)의 삽입을 초래할 수 있는 방식으로, 또는 2개의 CBLB 표적 부위 사이 내로 이러한 표적 부위 사이의 내인성 세포 DNA 서열을 대체하는 방식으로 복구된다. 그러나, 일부 경우에, 게놈 편집 시스템은 점 돌연변이 (예를 들어, 시스템인 탈아미노화를 통해), DNA 마킹의 변화 (예를 들어, DNA 메틸화, 히스톤 아세틸화 또는 탈아세틸화, 또는 다른 염색질 변형), 및/또는 전사 인자와 같은 트랜스-작용 인자의 모집 중 하나 이상을 도입한다. 택일적으로, 본 발명의 게놈 편집 시스템은 하나 이상의

CBLB 표적 서열과, 지속적 (예를 들어, 몇 주, 몇 개월 이상에 걸친 간격) 또는 일시적 (초, 분, 시간, 또는 일 에 걸친 간격) 방식으로 결합시킬 수 있으며, 따라서 CBLB 표적 서열과 다른 요인 (구체적으로 RNA 폴리머라제, 그러나 또한 DNA 폴리머라제, 전사 인자, 및/또는 유전자 발현에 영향을 미치는 다른 시스- 또는 트랜스-작용 인자)의 결합을 방지한다. 상기 게놈 편집 시스템 및 이의 성분의 작용 모드 및 다른 모드는 “가이드 뉴클레아 제” 및 “가이드 뉴클레아제의 변형”의 표제하에 하기에 상세히 설명된다.

[0114] [127]CBLB 표적 서열 및 상응하는 gRNA 표적화 도메인 서열은 반드시 그런 것은 아니지만 일반적으로 엑손에 위치하며, 여기서 작은 인델의 도입, 또는 더 큰 삽입 또는 결실은 CBLB 단백질의 기능을 감소 또는 제거하는 하나 이상의 돌연변이 (예를 들어, 프레임시프트 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 주변 단백질의 구조를 방해하는 아미노산에 대한 코돈 도입, 및/또는 단백질 활성화에 필요한 아미노산에 대한 코돈의 제거)을 초래할 수 있다. 도 1은 CBLB 유전자의 엑손 구조 내에서 표적화하는 위치에 대한 다양한 S. 피오케네스 가이드 RNA에 대한 절단 활성의 맵핑을 도시한다. 이러한 돌연변이는 본 명세서 전반에 걸쳐 “녹아웃” 돌연변이로 지칭되며, 이의 기능적 효과는 CBLB 단백질 기능의 “녹아웃”이다.

[0115] [128]특정 CBLB 표적 서열은 gRNA 표적화 도메인 서열에 대한 “핫 스팟” 표적 부위로 간주될 수 있다. 이는 CBLB 유전자의 높은 % 인델 빈도, 또는 효과적인 녹다운 또는 녹아웃을 생성함에 따라 우선적으로 표적화되는 부위이다. 이러한 바람직한 부위를 표적화하는 gRNA는 30% 이상의 % 인델 빈도를 생성할 수 있다. 예를 들어, CBLB 유전자 내 바람직한 표적 부위는 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 이상의 % 인델 빈도를 생성하는 상보적인 gRNA 표적화 도메인을 가질 수 있다. 유전자 내의 핫 스팟 표적 부위는 쉽게 보이지 않을 수 있으며, 이를 식별하기 위해 스크리닝이 필요하다. TGFBR2 유전자 내의 핫 스팟 표적 부위가 본 명세서에 기재되어 있다.

표 2

[0116]

CBLB 표적 핫스팟	서열
서열 번호 88	AAGCAAGCTGCCGCAGATCG
서열 번호 89	TAAGCAAGCTGCCGCAGATC
서열 번호 90	CTAAGCAAGCTGCCGCAGAT
서열 번호 91	TGGAATTGACCATTTGGGAAA
서열 번호 92	TCATGAGGTCCACCAGATTA

[0117] [129] CBLB 표적 서열은, 예를 들어, CBLB 유전자의 엑손 2, 4, 또는 5에 위치할 수 있다. 예를 들어, 비제한적으로, 이러한 예시적인 표적화 도메인은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열과 동일하거나, 또는 3개 이하의 뉴클레오타이드가 상이한 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다:

[0118] (a) 서열 번호 3;

[0119] (b) 서열 번호 4;

[0120] (c) 서열 번호 8;

[0121] (d) 서열 번호 12; 및

[0122] (e) 서열 번호 14.

[0123] [130]CBLB 발현을 녹아웃시키는 것에 대한 대안으로서, 전사 조절 영역, 예를 들어, 프로모터 영역 (예를 들어, CBLB 유전자의 전사를 제어하는 프로모터 영역)이 유전자의 발현을 변경 (예를 들어, 녹다운)하도록 표적화될 수 있다. 표적화된 녹다운 접근법은 본 명세서에 기재된 바와 같이 효소적으로 불활성인 Cas9 (eiCas9) 분자 또는 융합 단백질 (예를 들어, 전사 억제제 도메인 또는 염색질 변형 단백질에 접합된 eiCas9)을 포함하는 CRISPR/Cas 시스템에 의해 매개될 수 있다. 예를 들어, 표적화 도메인을 포함하는 하나 이상의 gRNA 분자는 표적 전사 조절 영역, 예를 들어, 프로모터 영역 (예를 들어, CBLB 유전자의 전사를 제어하는 프로모터 영역)에 충분히 가까운 eiCas9 분자 또는 eiCas9 융합 단백질을 표적화하여 CBLB 유전자의 전사가 감소 및/또는 제거되도록 구성될 수 있다. 특정 구현예에서, eiCas9 또는 eiCas9 융합 단백질은 T 세포, 예를 들어, 인간 T 세포에서 CBLB 발현을 녹다운시키는데 사용될 수 있다.

[0124] [131]CBLB 녹아웃 및/또는 녹다운은 임의의 적합한 방법에 의해 평가될 수 있으며, 이러한 방법으로는 비제한적으로, CBLB 유전자의 서열 검사, 세포 표면 상의 CBLB 단백질 발현 평가 (예를 들어, 면역염색 및 세포 분류에

의해, 구체적으로 형광 활성화된 세포 분류 또는 간접적 세포 내 염색 유세포 분석을 비롯한 FACS에 의해), CBLB에 의해 매개된 세포 또는 분자 변화 검출, 또는 CBLB 단백질 수준을 검출하기 위한 웨스턴 블롯에 의한 방법을 포함한다. T 세포와 관련하여, 특히, CBLB 녹아웃은 (a) CBLB 유전자좌의 시퀀싱 또는 T7E1 프리미어 연장 분석, 및/또는 (b) CBLB 단백질의 세포 내 FACS 평가에 의해 확인될 수 있다. 시퀀싱 및 T7E1은 하기에 더욱 상세하게 기재되어 있다.

[0125] [132]CBLB의 녹아웃 및/또는 녹다운은 기준선 측정 또는 야생형 세포에 대한 CBLB 발현에서 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 감소에 해당할 수 있다.

[0126] [133]일부 양태에서, 제공되는 조성물 및 방법은 다음을 포함한다: CBLB 유전자의 녹아웃 또는 유전자 파괴를 위한 시제 (예를 들어 gRNA/Cas9)가 도입된 세포의 조성물 내 적어도 약 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 세포는 유전자 파괴를 포함하고; 내인성 CBLB 폴리펩타이드를 발현하지 않고; 인접 CBLB 유전자, CBLB 유전자, 및/또는 기능성 CBLB 유전자를 포함하지 않는 조성물 및 방법. 일부 구현예에서, 본 발명에 따른 방법, 조성물 및 세포는 CBLB 유전자의 녹아웃 또는 유전자 파괴를 위한 시제 (예를 들어 gRNA/Cas9)가 도입된 세포의 조성물 내 약 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 세포는 예컨대 세포 표면 상에서 CBLB 폴리펩타이드를 발현시키지 않는 방법, 조성물 및 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 조성물 내 약 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 세포는 CBLB 유전자의 녹아웃 또는 유전자 파괴를 위한 시제 (예를 들어 gRNA/Cas9)가 도입된 세포는 대립 유전자 모두에서 녹아웃되며, 즉 이러한 비율의 세포에서 이중대립 결실을 포함한다.

[0127] [134]CBLB를 표적화하는 게놈 편집 시스템은 다양한 방식으로 구현될 수 있고, 이러한 구현은 세포가 편집될 환경에 맞춤화될 수 있다. 본 발명의 특정 구현예는 전기천공법에 의해, 예를 들어, MaxCyte (Gaithersburg, MD) 또는 Lonza (Basel, 스위스)와 같은 상업적 공급업체로부터 수득가능한 전기천공기 및 큐벳을 사용하여 RNA-가이드 뉴클레아제 및 CBLB를 표적화하는 가이드 RNA를 리보핵단백질 (RNP) 복합체의 형태로 생체 외 세포에 전달하는 것을 포함한다. 그러나, 다른 구현예는 생체 내 또는 생체 외 편집을 위해, 생체 내 핵산 벡터, 예컨대 바이러스 벡터 또는 지질 나노입자를 구현할 수 있다. 이러한 구현에 대한 자세한 내용은 하기 "게놈 편집 시스템의 구현"이라는 제목 아래에 자세히 설명되어 있다.

[0128] [135]CBLB의 녹아웃 및/또는 녹다운은, 비제한적으로, 입양 T-세포 요법의 맥락을 비롯한 다양한 환경에서 유용할 수 있다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, CBLB는 요법에서 사용될 면역 세포, 예컨대 T-세포에서 녹아웃된다. 하나의 예시로서, T-세포는 조작된 수용체 예컨대 키메라 항원 수용체 (CAR) 또는 이중성 T-세포 수용체 (TCR)를 발현할 수 있으며, 이러한 수용체는 종양 세포와 같은 병리학과 관련된 세포 또는 조직의 항원을 인식하도록 구성될 수 있다. 조작된 수용체를 발현하는지 여부와 관계없이, 본 발명에 따른 CBLB 녹아웃 T-세포는 공동 자극 신호 전달이 제한되거나 부재하는 조직 또는 기관의 표적화에 사용될 수 있고, 여기서 T 세포 성장-촉진 사이토카인은 제한되거나 부재하고, 및/또는 TCR 신호전달은 차선적이다.

[0129] [136]CBLB 녹아웃 및/또는 녹다운 세포는 “자가” 세포 요법에 사용되어, 이러한 요법에서 세포가 대상체로부터 수확되고, CBLB 발현을 녹아웃 또는 녹다운하도록 변경된 후, 동일한 대상체로 복귀되고; 택일적으로, 이러한 세포는 “동종” 세포 요법에서 상이한 대상체에게 투여될 수 있다. 어느 접근법에서든, 수확 및 투여 사이에 본 발명의 CBLB 세포는 다양한 방식으로 조작, 예컨대 팽창, 자극, 정제 또는 저장, 도입 유전자로 형질도입, 동결 및/또는 해동될 수 있다.

[0130] [137]본 명세서에 기재된 바와 같이 CBLB 유전자의 녹아웃 또는 녹다운은: (1) T 세포 증식을 개선; (2) T 세포 생존을 개선; 및/또는 (3) T 세포 기능을 개선할 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같이 CBLB 유전자 발현의 녹다운은, 유사하게: (1) T 세포 증식을 개선; (2) T 세포 생존을 개선; 및/또는 (3) T 세포 기능을 개선할 수 있다. CBLB를 녹아웃 또는 녹다운시키는 것은 특히 공동-자극 및 사이토카인 수준이 감소되거나 부재하는 경우 이러한 T 세포 파라미터를 개선시킬 수 있다.

[0131] 게놈 편집 시스템

[0132] [138]용어 “게놈 편집 시스템”은 RNA-가이드 DNA 편집 활성을 가지는 임의의 시스템을 지칭한다. 본 발명의 게놈 편집 시스템은 천연 유래의 CRISPR 시스템으로부터 적응된 다음의 적어도 2가지 성분을 포함한다: 가이드 RNA (gRNA) 및 RNA-가이드 뉴클레아제. 이러한 2가지 성분은 특정 핵산 서열과 결합할 수 있으며, 예를 들어 단일 가닥 파손 (SSB 또는 닉), 이중 가닥 파손 (DSB) 및/또는 점 돌연변이 중 하나 이상을 제조함으로써 핵산 서열 내 또는 주변에서 DNA를 편집할 수 있는, 복합체를 형성한다. 특정 구현예에서, 이중 가닥 또는 단일 가닥

파손은 CBLB 표적 위치의 약 500bp, 약 450bp, 약 400bp, 약 350bp, 약 300bp, 약 250bp, 약 200bp, 약 150bp, 약 100bp, 약 50bp, 약 25bp, 또는 약 10bp 이내이며, 이에 따라 CBLB 유전자 발현의 변경을 유도한다.

- [0133] [139] 천연 유래의 CRISPR 시스템은 진화적으로 2개의 클래스와 5개의 유형으로 조직화되고 (Makarova et al. Nat Rev Microbiol. 2011 Jun; 9(6): 467-477 (Makarova), 본 명세서에 참조로 포함), 반면에 본 발명의 게놈 편집 시스템은 천연 유래의 CRISPR 시스템의 임의의 유형 또는 클래스의 성분을 적응시킬 수 있으며, 본 명세서에 제시된 구현에는 일반적으로 클래스 2, 및 유형 II 또는 V CRISPR 시스템으로부터 적응된다. 유형 II 및 V를 포함하는 클래스 2 시스템은 상대적으로 큰, 다중도메인 RNA-가이드 뉴클레아제 단백질 (예를 들어, Cas9 또는 Cpf1) 및 하나 이상의 가이드 RNA (예를 들어, crRNA 및, 선택적으로, tracrRNA)를 특징으로 하며, 이러한 시스템은 crRNA의 표적화 (또는 스페이서) 서열에 상보적인 특정 유전자좌와 결합(즉, 표적화)하고 이를 절단하는 리보핵단백질 (RNP) 복합체를 형성한다. 본 발명에 따른 게놈 편집 시스템은 유사하게 세포 DNA 서열을 표적화하고 편집하지만, 천연에 존재하는 CRISPR 시스템과는 상당히 상이하다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 단분자 가이드 RNA는 천연에 존재하지 않으며, 본 발명에 따른 가이드 RNA 및 RNA-가이드 뉴클레아제 둘 모두 임의의 개수의 비-천연 유래의 변형체를 포함할 수 있다.
- [0134] [140] 게놈 편집 시스템은 다양한 방식으로 구현 (예를 들어, 세포 또는 대상체에게 투여 또는 전달)될 수 있고, 상이한 구현은 별도의 응용에 적합할 수 있다. 예를 들어, 게놈 편집 시스템은, 특정 구현예에서, 단백질/RNA 복합체 (리보핵단백질, 또는 RNP)로서 구현되며, 이는 선택적으로 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 캡슐화제, 예컨대 지질 또는 중합체 마이크로- 또는 나노-입자, 미셀, 리포솜, 등을 포함하는 약제학적 조성물에 포함될 수 있다. 특정 구현예에서, 게놈 편집 시스템은 RNA-가이드 뉴클레아제 및 상기 기재된 가이드 RNA 성분 (과 함께 선택적으로 하나 이상의 추가적인 성분)을 인코딩하는 하나 이상의 핵산으로서 구현되며; 특정 구현예에서, 게놈 편집 시스템은 이러한 핵산을 포함하는 하나 이상의 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터 예컨대 아데노-연관 바이러스로서 구현되고; 특정 구현예에서, 게놈 편집 시스템은 전술한 것들 중 임의의 조합으로서 구현된다. 본 명세서에 설명된 원리에 따라 작동하는 추가의 또는 변형된 구현은 당업자에게 명백할 것이며, 본 개시의 범위 내에 있다.
- [0135] [141] 본 발명의 게놈 편집 시스템이 단일 특이적 뉴클레오타이드 서열에 대해 표적화될 수 있거나, 또는 둘 이상의 가이드 RNA의 사용을 통해 둘 이상의 특이적 뉴클레오타이드 서열에 대해 표적화될 수 있으며 동시에 편집할 수 있다는 점에 유의해야 한다. 다수의 gRNA 사용은 본 명세서에 걸쳐 “멀티플렉싱(multiplexing)”으로 지칭되며, 다수의, 관련되지 않은 관심의 표적 서열을 표적화하거나, 또는 단일 표적 도메인 내에 다수의 SSB 또는 DSB를 형성하도록, 그리고 일부 경우에는, 이러한 표적 도메인 내에 특정 편집을 생성하도록 사용될 수 있다. 예를 들어, Maeder 등 (Maeder)의 국제 특허 공개번호 WO 2015/138510 (본 명세서에 참조로 포함)은 인간 CEP290 유전자에서 점 돌연변이 (C.2991+1655A에서 G로의) 교정하기 위한 게놈 편집 시스템을 기재하며, 이러한 시스템은 암호화된(cryptic) 스플라이스 부위를 생성하고, 결과적으로 유전자의 기능을 감소 또는 제거한다. Maeder의 게놈 편집 시스템은 점 돌연변이의 어느 한 쪽 상의 (즉, 측면을 접하는(flanking)) 서열에 표적화된 2개의 가이드 RNA를 활용하여, 돌연변이와 측면을 접하는 DSB를 형성한다. 이는, 결과적으로, 돌연변이를 비롯한 개재 서열의 결실을 촉진하여, 암호화된 스플라이스 부위를 제거하고 정상적인 유전자 기능을 회복시킨다.
- [0136] [142] 또 다른 예시로서, Cotta-Ramusino 등 (“”에 의한 WO 2016/073990 (본 명세서에 참조로 포함)은 “이중-니카제(dual-nickase) 시스템”으로 불리는 배열인, Cas9 니카제 (*S. 피오케네스* D10A와 같은 단일 가닥 닉을 만드는 Cas9)와의 조합으로 2개의 gRNA를 활용하는 게놈 편집 시스템을 기재한다. [Cotta-Ramusino]의 이중-니카제 시스템은 하나 이상의 뉴클레오타이드에 의해 상쇄되는(offset) 관심 서열의 반대 가닥에 2개의 닉을 형성하도록 구성되며, 닉은 결합하여 돌출부 (Cotta-Ramusino의 경우에는 5'이지만, 3' 돌출부가 또한 가능)를 가지는 이중 가닥 파손을 생성한다. 결과적으로, 돌출부는 일부 상황에서 지정 복구 이벤트를 용이하게 할 수 있다. 또 다른 예시로서, Palestrant et al.의 WO 2015/070083 (“nt” 본 명세서에 참조로 포함)은 Cas9를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 대해 표적화된 gRNA (“지배적인 RNA”로서 지칭)을 기재하며, 이는, 예를 들어, 일부 바이러스 형질도입된 세포에서, 구성적으로 발현될 수 있는 Cas9의 일시적 발현을 허용하는 하나 이상의 추가적인 gRNA를 포함하는 게놈 편집 시스템에 포함될 수 있다. 이들 멀티플렉싱 응용은 제한적인 것이 아니라 예시적인 것으로 의도되며, 당업자는 멀티플렉싱의 다른 응용이 일반적으로 본 명세서에 설명된 게놈 편집 시스템과 호환 가능하다는 것을 이해할 것이다.
- [0137] [143] 게놈 편집 시스템은, 경우에 따라, NHEJ 또는 HDR과 같은 세포 DNA 이중 가닥 파손 메커니즘에 의해 복구되는 이중 가닥 파손을 형성할 수 있다. 이러한 메커니즘은 문헌, 예를 들어 Davis & Maizels, PNAS,

111(10):E924-932, March 11, 2014 (Davis) (describing Alt-HDR); Frit et al. DNA Repair 17(2014) 81-97 (Frit) (describing Alt-NHEJ); 및 Iyama and Wilson III, DNA Repair (Amst.) 2013-Aug; 12(8): 620-636 (Iyama) (일반적으로 정준 HDR 및 NHEJ 경로 기제)를 통해 설명된다.

[0138] [144] 게놈 편집 시스템이 DSB를 형성함으로써 작동하는 경우, 이러한 시스템은 특정 형태의 이중 가닥 파손 복구 또는 특정 복구 결과를 촉진 또는 용이하게 하는 하나 이상의 성분을 선택적으로 포함한다. 예를 들어, [Cotta-Ramusino]는 또한 단일 가닥의 올리고뉴클레오타이드 “공여체 주형”이 첨가되고; 공여체 주형은 게놈 편집 시스템에 의해 절단되는 세포 DNA의 표적 영역 내로 혼입되고, 표적 서열의 변화를 초래할 수 있는 게놈 편집 시스템을 기재한다.

[0139] [145] 특정 구현예에서, 게놈 편집 시스템은 단일 또는 이중 가닥 파손을 유발하지 않으면서 표적 서열을 변형시키거나 표적 서열 내 또는 부근에서 유전자의 발현을 변형시킨다. 예를 들어, 게놈 편집 시스템은 DNA에 작용하는 기능성 도메인에 융합된 RNA-가이드 뉴클레아제를 포함하여 표적 서열 또는 이의 발현을 변형시킬 수 있다. 하나의 예시로서, RNA-가이드 뉴클레아제는 시티딘 디아미나제 기능성 도메인에 연결 (예를 들어, 접합)될 수 있고, 표적화된 C로부터 A의 치환을 생성함으로써 작용할 수 있다. 예시적인 뉴클레아제/디아미나제 융합은 문헌 [Komor et al. Nature 533, 420-424 (19 May 2016) (“”에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 참조로 포함된다. 택일적으로, 게놈 편집 시스템은 절단-불활성화 (즉, “사멸(dead)” 뉴클레아제, 예컨대 사멸 Cas9 (dCas9)을 활용할 수 있고, 세포 DNA의 하나 이상의 표적화된 영역에 안정한 복합체를 형성함으로써 작동하여, 비제한적으로, mRNA 전사, 염색질 리모델링, 등을 포함하는 표적화된 영역(들)을 수반하는 기능을 방해할 수 있다.

[0140] 가이드 RNA (gRNA) 분자

[0141] [146] 용어 “가이드 RNA” 및 “”는 세포에서 게놈 또는 에피솜 서열과 같은 표적 서열에 대한 RNA-가이드 뉴클레아제, 예컨대 Cas9 또는 Cpf1의 특이적 결합 (또는 “표적화”)를 촉진하는 임의의 핵산을 지칭한다. gRNA는 can be 단분자 (단일 RNA 분자를 포함, 택일적으로 키메라로서 지칭), 또는 모듈식 (하나 이상의, 일반적으로 2 개의, 별도의 RNA 분자, 예컨대 crRNA 및 tracrRNA를 포함하며, 예를 들어 이중나선화(duplexing)에 의해 서로 결합)일 수 있다. gRNA 및 이의 성분은 문헌, 예를 들어 [Briner et al. (Molecular Cell 56(2), 333-339, October 23, 2014 (Briner), 참조로 포함), 및 Cotta-Ramusino]에 기재되어 있다.

[0142] [147] 박테리아 및 고세균에서, 유형 II CRISPR 시스템은 일반적으로 RNA-가이드 뉴클레아제 단백질 예컨대 Cas9, 외래 서열에 상보적인 5' 영역을 포함하는 CRISPR RNA (crRNA), 및 crRNA의 3' 영역에 상보적이며, 이와 이중가닥을 형성하는 5' 영역을 포함하는 트랜스-활성화 crRNA (tracrRNA)를 포함한다. 이러한 이중가닥은 Cas9/gRNA 복합체의 형성을 용이하게 하며 이의 활성화에 필수적인 것으로 고려되지만, 이러한 이론에 구속되고자 하는 것은 아니다. 유형 II CRISPR 시스템이 유전자 편집에 사용되기 위해 적합화됨에 따라, 하나의 비제한적인 예시에서, crRNA (3' 말단) 및 tracrRNA (5' 말단)의 상보적인 영역을 가교하는 4개의 뉴클레오타이드 (예를 들어, GAAA) “테트라루프” 또는 “링커”를 통해, 단일 단분자 또는 키메라 가이드 RNA 내로 결합될 수 있는 것이 발견되었다. (Mali et al. Science. 2013 Feb 15; 339(6121): 823-826 (“” Jiang et al. Nat Biotechnol. 2013 Mar; 31(3): 233-239 (“” 및 Jinek et al., 2012 Science Aug. 17; 337(6096): 816-821 (“” 상기 문헌 모두 본 명세서에 참조로 포함.)

[0143] [148] 가이드 RNA는 단분자형 또는 모듈형 여부에 관계없이 편집이 요구되는 세포의 게놈에서 DNA 서열과 같은 표적 서열 내 표적 도메인에 완전히 또는 부분적으로 상보적인 “표적화 도메인”을 포함한다. 표적화 도메인은 문헌에서 다양한 명칭으로 지칭되며, 이러한 명칭으로는 비제한적으로 “가이드 서열” (Hsu et al., Nat Biotechnol. 2013 Sep; 31(9): 827-832, (“” 본 명세서에 참조로 포함), “상보적 영역” (Cotta-Ramusino), “스페이서” (Briner) 및 일반적으로 “” (Jiang)을 포함한다. 주어진 명칭과 관계없이, 표적화 도메인은 일반적으로 10-30개의 뉴클레오타이드 길이이며, 특정 구현예에서 16-24개의 뉴클레오타이드 길이 (예를 들어, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 또는 24개의 뉴클레오타이드 길이)이고, Cas9 gRNA의 경우 5' 말단 또는 그 근처, 및 또는 Cpf1 gRNA의 경우 3' 말단 또는 그 근처에 있다.

[0144] [149] 표적화 도메인 이외에, gRNA는 일반적으로 (후술되는 바와 같이, 반드시 그런 것은 아님) gRNA/Cas9 복합체의 형성 또는 활성화에 영향을 줄 수 있는 복수의 도메인을 포함한다. 예를 들어, 상기 언급된 바와 같이, gRNA의 제1 및 제2 상보성 도메인 (또한 반복부:안티-반복부 이중가닥으로도 지칭)에 의해 형성된 이중화된 구조는 Cas9의 인식 (REC) 로브와 상호 작용을 하며, Cas9/gRNA 복합체의 형성을 매개할 수 있다. (Nishimasu et al., Cell 156, 935-949, February 27, 2014 (Nishimasu 2014) 및 Nishimasu et al., Cell 162, 1113-1126, August

27, 2015 (Nishimasu 2015), 상기 문헌 모두 본 명세서에 참조로 포함). 제1 및/또는 제2 상보성 도메인은 하나 이상의 폴리-A 트랙을 함유할 수 있으며, 이는 RNA 폴리머라제에 의해 종결 신호로서 인식될 수 있다. 이에 따라 제1 및 제2 상보성 도메인의 서열은 상기 트랙을 제거하고, 예를 들어 Briner에 기재된 바와 같은 A-G 스왑 또는 A-U 스왑을 사용하여 gRNA의 완전한 시험관 내 전사를 촉진하도록 선택적으로 변형된다. 제1 및 제2 상보성 도메인에 대한 상기 및 다른 유사한 변형은 본 개시의 범위 내에 있다.

[0145] [150] 제1 및 제2 상보성 도메인과 함께, Cas9 gRNA는 일반적으로 생체 내 뉴클레아제 활성화에 관여하지만 반드시 시험관 내일 필요는 없는, 2 개 이상의 추가의 이중화된 영역을 포함한다 (Nishimasu 2015). 제2 상보성 도메인의 3' 부분 근처의 제1 줄기-루프는 "근위 도메인" (Cotta-Ramusino) "줄기 루프 1" (Nishimasu 2014 및 2015) 및 "넥서스" (Briner)로 다양하게 지칭된다. 하나 이상의 추가적인 줄기 루프 구조는 일반적으로 gRNA의 3' 말단 근처에 존재하며, 개수는 종에 따라 다양하다: *s. 피오케네스* gRNA 일반적으로 2개의 3' 줄기 루프 (반복부: 안티-반복부 이중가닥을 포함하는 총 4개 줄기 루프 구조)를 포함하는 반면, *s. 아우레우스* 다른 종은 오직 하나의 줄기 루프 (총 3개의 줄기 루프 구조)를 포함한다. 종에 의해 조직된, 보존된 줄기 루프 구조 (및 더욱 일반적으로 gRNA 구조)에 대한 설명은 Briner에 제공되어 있다.

[0146] [151] 상기 설명은 Cas9와 함께 사용하기 위한 gRNA에 초점을 맞추고 있지만, 현재까지 기술된 것과는 다른 방식으로 gRNA를 이용하는 다른 RNA-가이드 뉴클레아제가 발견되거나 발명되었다는 것을 이해해야 한다. 예를 들어, Cpf1 ("및 Franciscella 1로부터의 CRISPR")는 tracrRNA가 기능할 필요가 없는, 최근에 발견된 RNA-가이드 뉴클레아제이다. (Zetsche et al., 2015, Cell 163, 759-771 October 22, 2015 (Zetsche I), 본 명세서에 참조로 포함). Cpf1 게놈 편집 시스템에 사용하기 위한 gRNA는 일반적으로 표적화 도메인 및 상보성 도메인 (또는 "핸들"로 지칭됨)을 포함한다. 또한, Cpf1과 함께 사용하기 위한 gRNA에서, 표적화 도메인 일반적으로 Cas9 gRNA와 관련하여 상기 기재된 바와 같이 5' 말단보다는 3' 말단 또는 그 근처에 존재 (핸들은 Cpf1 gRNA의 5' 말단 또는 그 근처에 존재)한다는 것에 유의해야 한다.

[0147] [152] 당업자는 상이한 원핵 생물 종으로부터의 gRNA 사이, 또는 Cpf1 및 Cas9 gRNA 사이에 구조적 차이가 존재할 수 있지만, gRNA가 작동하는 원리는 일반적으로 일치한다는 것을 이해할 것이다. 이러한 작동의 일관성으로 인해, gRNA는, 넓은 의미에서, 이의 표적화 도메인 서열에 의해 정의될 수 있고, 당업자는 주어진 표적화 도메인 서열이 단분자 또는 키메라 gRNA, 또는 하나 이상의 화학적 변형 및/또는 순차적인 변형 (치환, 추가의 뉴클레오타이드, 절단, 등)을 포함하는 gRNA를 비롯한, 임의의 적합한 gRNA에 혼입될 수 있음을 이해할 것이다. 따라서, 본 개시에서 제시의 경제성을 위해, gRNA는 이의 표적화 도메인 서열의 관점에서만 설명될 수 있다.

[0148] [153] 보다 일반적으로, 당업자는 본 개시의 일부 양태가 다중 RNA-가이드 뉴클레아제를 사용하여 구현될 수 있는 시스템, 방법 및 조성물에 관한 것임을 이해할 것이다. 이러한 이유로, 달리 명시되지 않는 한, gRNA라는 용어는 Cas9 또는 Cpf1의 특정 종과 양립할 수 있는 gRNA, 뿐만 아니라 임의의 RNA 유도 뉴클레아제와 함께 사용될 수 있는 임의의 적합한 gRNA를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 예로서, gRNA라는 용어는, 특정 구현예에서, 클래스 2 CRISPR 시스템, 예컨대 유형 II 또는 유형 V 또는 CRISPR 시스템에서 발생하는 임의의 RNA-가이드 뉴클레아제, 또는 이로부터 유도 또는 적응된 RNA-가이드 뉴클레아제와 함께 사용하기 위한 gRNA를 포함한다.

[0149] [154] 하기 표 2는 *S. 피오케네스* Cas9로 CBLB를 표적화하기 위한 예시적인 gRNA를 제공한다.

[0150] 표 2 - *S. 피오케네스* gRNA

표 3

서열 번호	서열
서열 번호 1	AGCAAGCTGCCGAGATCGC
서열 번호 2	TACCCAAAATTCGACCTTTT
서열 번호 3	CGATCTGCGGCAGCTTGCTT
서열 번호 4	GATCTGCGGCAGCTTGCTTA
서열 번호 5	GGCAGAAACCCTGGTGGTCG
서열 번호 6	GGATTTCCTCCTCGACCACC
서열 번호 7	GGGTATTATTGATGCTATTC
서열 번호 8	ATCTGCGGCAGCTTGCTTAG
서열 번호 9	CGTAAATGCTGATATGTATC
서열 번호 10	CCCGTTTGGACTTTTTCATA
서열 번호 11	TGATACGAAAGTTATCTCCC
서열 번호 12	TTTCCCAATGGTCAATTCCA

서열 번호 13	CCACCAGATTAGCTCTGGCC
서열 번호 14	TAATCTGGTGGACCTCATGA

[0152] [155]하기 표 3은 *S. 아우레우스* Cas9로 CBLB를 표적화하기 위한 예시적인 gRNA를 제공한다.

[0153] 표 3 - *S. 아우레우스* gRNA

표 4

서열 번호	서열	서열 번호	서열
서열 번호 15	TGGCAGAAACCCTGGTGGTCG	서열 번호 44	ATTCTCTCCTTGCCTCTCTTA
서열 번호 16	ATGGCAGAAACCCTGGTGGTC	서열 번호 45	AGAATGTATGAAGAACAGTCA
서열 번호 17	GGGGATTTCCTCCTCGACCAC	서열 번호 46	ACTCTTTAAAGAAGGCAAGGA
서열 번호 18	AATCCCGAAAAGGTCGAATT	서열 번호 47	TAAGACTCTTTAAAGAAGGCA
서열 번호 19	CGATCTGCGGCAGCTTGCTTA	서열 번호 48	GCAAAATATCAAGTATATATG
서열 번호 20	ATACCCAAAATTCGACCTTTT	서열 번호 49	AAAATCTACATTGATAGCCTT
서열 번호 21	CTTAGGGGGTCCAACCTGCATC	서열 번호 50	AACGGGCAATAAGACTCTTTA
서열 번호 22	TCGCAGGACCGTGGAGAAGAC	서열 번호 51	TATCAGCATTTACGACTTATA
서열 번호 23	GCAGAAACCCTGGTGGTCGAG	서열 번호 52	ATATGGTGGGCTATTTTCAA
서열 번호 24	TGGTGGTCGAGGAGGAAATCC	서열 번호 53	AGACTCTTTAAAGAAGGCAAG
서열 번호 25	GCTGCCGAGATCGCAGGACC	서열 번호 54	TGCCAAAATCCAAACTTCAG
서열 번호 26	AGGAGGAAATCCCGAAAAGG	서열 번호 55	ATTTAAAGTACTCATTCTCA
서열 번호 27	TGCGATCTGCGGCAGCTTGCT	서열 번호 56	TTGATTTCTGCCAGCATGTGA
서열 번호 28	GCCGAGATCGCAGGACCGTG	서열 번호 57	GTGATACGAAAGTTATCTCCC
서열 번호 29	GCCATTCATTGAGTTTGCCAT	서열 번호 58	TATCTCCCTGGAATTGACCAT
서열 번호 30	GTGGAGAAGACTTGGAAGCTC	서열 번호 59	CTGAAGATAAGGGACAGTTTT
서열 번호 31	CAGAAACCCTGGTGGTCGAGG	서열 번호 60	TGTGATACGAAAGTTATCTCC
서열 번호 32	CTGCCGAGATCGCAGGACCG	서열 번호 61	TTGTCTCCAAAAAACTTTCTC
서열 번호 33	CACCAGGGTTTCTGCCATTCA	서열 번호 62	GTATCACAAAAGCAGATGCTG
서열 번호 34	TACCCAAAATTCGACCTTTTC	서열 번호 63	ATCTTTCCCAATGGTCAATTC
서열 번호 35	TTGATGCTATTAGGATGCAG	서열 번호 64	TTATCTCCCTGGAATTGACCA
서열 번호 36	TAAGCAAGCTGCCGAGATCG	서열 번호 65	CTTTCCCAATGGTCAATTCCA
서열 번호 37	CGCAGGACCGTGGAGAAGACT	서열 번호 66	ATCTCCCTGGAATTGACCATT
서열 번호 38	TTGGGTATTATTGATGCTATT	서열 번호 67	GTCCACCAGATTAGCTCTGGC
서열 번호 39	GCGATCTGCGGCAGCTTGCTT	서열 번호 68	TCCACCAGATTAGCTCTGGCC
서열 번호 40	AAATTCCAGATGGCAAATCA	서열 번호 69	TGGACCTCATGAAGGCAGTGT
서열 번호 41	AATACCCAAAATTCGACCTTT	서열 번호 70	AGAGCTAATCTGGTGGACCTC
서열 번호 42	AACCTGCCCAACTCAGTGAGA	서열 번호 71	TTAGAGCCATTGCTTCCAGGC
서열 번호 43	AAAGTACTCATTCTCACTGAG	서열 번호 72	AAGTATTGACAGTGCCTTC

[0155] [156]암 면역 요법 목적을 위한 가이드 RNA 설계 및 표적-특이적 서열은 W02015161276에 보다 상세히 기재되어 있으며, 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0156] gRNA 설계

[0157] [157]표적 서열의 선택 및 검증, 뿐만 아니라 비표적 분석 방법이, 예를 들어, 문헌 [Mali; Hsu; Fu et al., 2014 Nat Biotechnol 32(3): 279-84, Heigwer et al., 2014 Nat methods 11(2):122-3; Bae et al. (2014) Bioinformatics 30(10): 1473-5; 및 Xiao A et al. (2014) Bioinformatics 30(8): 1180-1182]에 기재되어 있다. 상기 참조는 각각 본 명세서에 참조로 포함된다. 비제한적인 예시로서, gRNA 설계는, 예를 들어, 게놈에 걸친 전체 표적-의 활성을 최소화하기 위해, 사용자의 표적 서열에 상응하는 잠재적 표적 서열의 선택을 최적화하기 위한 소프트웨어 툴의 사용을 포함할 수 있다. 비표적 활성이 절단에 제한되지는 않지만, 각각의 비표적 서열에서의 절단 효율은, 예를 들어, 실험적으로 유래한 가중치법(weighting scheme)을 사용하여 예상될 수 있다. 상기 및 다른 가이드 선택 방법은 [Maeder] 및 [Cotta-Ramusino]에 상세히 설명되어 있다.

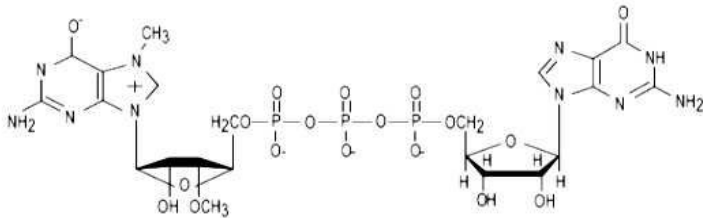
[0158] gRNA 변형

[0159] [158]gRNA의 활성, 안정성, 또는 다른 특성은 특정 변형의 통합을 통해 변경될 수 있다. 하나의 예시로서, 일시

적으로 발현 또는 전달된 핵산은, 예를 들어, 세포 뉴클레아제에 의해 분해되기 쉽다. 따라서, 본 명세서에 기재된 gRNA는 뉴클레아제에 대한 안정성을 도입하는 하나 이상의 변형된 뉴클레오사이드 또는 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 본 명세서에 기재된 특정 변형된 gRNA는 세포 내로 도입될 때 감소된 선천성 면역 반응을 나타낼 수 있는 것으로 여겨지지만, 이러한 이론에 구속되고자 하는 것은 아니다. 당업자는 외인성 핵산, 특히 바이러스 또는 박테리아 기원의 것에 반응하여 세포, 예를 들어 포유 동물 세포에서 일반적으로 관찰되는 특정 세포 반응을 인식할 것이다. 사이토카인 발현과 방출 및 세포 사멸의 유도를 포함할 수 있는 이러한 반응은, 본 명세서에 제시된 변형에 의해 감소되거나 제거될 수 있다.

[0160] [159]본 섹션에서 논의되는 특정 예시적인 변형은 gRNA 서열 내, 비제한적으로 5' 말단 또는 그 근처 (예를 들어, 5' 말단의 1-10, 1-5, 또는 1-2개 뉴클레오타이드 이내) 및/또는 3' 말단 또는 그 근처 (예를 들어, 3' 말단의 1-10, 1-5, 또는 1-2개의 뉴클레오타이드 이내) 포함하는 임의의 위치에 포함될 수 있다. 일부 경우에, 변형은 기능적 모티프 내, 예컨대 Cas9 gRNA의 반복-안티-반복 이중가닥, Cas9 또는 Cpf1 gRNA의 줄기 루프 구조 및/또는 gRNA의 표적화 도메인에 위치된다.

[0161] [160]하나의 예시로서, gRNA의 5' 말단은 진행 mRNA 캡 구조 또는 캡 유사체 (예를 들어, $G(5')ppp(5')G$ 캡 유사체, $m7G(5')ppp(5')G$ 캡 유사체, 또는 $3'-O-Me-m7G(5')ppp(5')G$ 안티 역 캡 유사체 (ARCA))를 포함할 수 있으며, 하기 도시된 바와 같다:



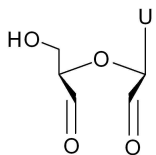
[0162] 캡 또는 캡 유사체는 gRNA의 화학적 합성 또는 시험관 내 전사 동안 포함될 수 있다.

[0164] [161]선을 따라, gRNA의 5' 말단은 5' 트라이포스페이트 그룹이 절여될 수 있다. 예를 들어, 시험관내 전사된 gRNA는 5' 트라이포스페이트 그룹을 제거하기 위해 (예를 들어, 송아지 장의 알칼리 포스파타제를 사용하여) 포스파타제-처리될 수 있다.

[0165] [162]다른 일반적인 변형은 gRNA의 3' 말단에서, 폴리A트랙으로 지칭되는 복수 (예를 들어, 1-10, 10-20 또는 25-200개)의 아데닌 (A) 잔기를 첨가하는 것을 포함한다. 폴리아데노신 폴리머라제 (예를 들어, *E. coli* 폴리(A)폴리머라제)를 사용하여 시험관 내 전사한 후, 또는 Maeder에 기재된 바와 같이 폴리아데닐화 서열에 의해 생체 내 전사한 후, 화학적 합성 동안 폴리A트랙을 gRNA에 첨가할 수 있다.

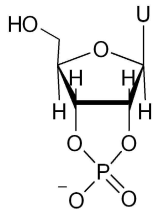
[0166] [163]본 명세서에 기재된 변형은 DNA 벡터로부터 생체 내 전사되거나 시험관 내 전사된 gRNA에 관계없이, 임의의 적합한 방식으로, 예를 들어 gRNA로 조합될 수 있으며, 5' 캡 구조 또는 캡 유사체 및 3' 폴리A트랙 중 하나 또는 둘 모두를 포함할 수 있음에 유의해야한다.

[0167] [164]가이드 RNA는 3' 말단 U 리보스에서 변형될 수 있다. 예를 들어, U 리보스의 2개의 말단 하이드록실 그룹은 알데하이드 그룹, 및 리보스 고리의 수반되는 개구부로 산화되어, 하기 도시된 바와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 수득할 수 있다:



[0168] 여기서 “U” 는 변형되지 않은 또는 변형된 우리딘일 수 있다.

[0170] [165] 3' 말단 U 리보스는 하기 도시된 바와 같이 2'3' 사이클릭 포스페이트로 변형될 수 있다:



[0171]

[0172] 여기서 “U” 는 변형되지 않은 또는 변형된 우리딘일 수 있다.

[0173] [166] 가이드 RNA는, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 혼입함으로써, 분해에 대해 안정화될 수 있는 3' 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 우리딘은 변형된 우리딘, 예를 들어, 5-(2-아미노)프로필 우리딘, 및 5-브로모 우리딘으로, 또는 본 명세서에 기재된 임의의 변형된 우리딘으로 대체될 수 있고; 아데노신 및 구아노신은 예를 들어, 8-위치에 변형을 가지는 변형된 아데노신 및 구아노신으로, 예를 들어, 8-브로모 구아노신, 또는 본 명세서에 기재된 임의의 변형된 아데노신 또는 구아노신으로 대체될 수 있다.

[0174] [167] 특정 구현예에서, 당-변형된 리보뉴클레오타이드는 gRNA내로 혼입될 수 있으며, 예를 들어, 2' OH-그룹은 H, -또는, -R (R은, 예를 들어, 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴 또는 당일 수 있음), 할로, -SH, -SR (R은 예를 들어, 알킬, 사이클로알킬, 아릴, 아랄킬, 헤테로아릴 또는 당일 수 있음), 아미노 (아미노는, 예를 들어, NH₂; 알킬아미노, 다이알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 다이아릴아미노, 헤테로아릴아미노, 다이헤테로아릴아미노, 또는 아미노산일 수 있음); 또는 사이아노 (-CN)로부터 선택되는 그룹으로 대체된다. 특정 구현예에서, 포스페이트 백본은 본 명세서에 기재된 바와 같이, 예를 들어, 포스포싸이오에이트 (PhTx) 그룹으로 변형될 수 있다. 특정 구현예에서, gRNA의 뉴클레오타이드 중 하나 이상은 각각 독립적으로 변형된 또는 변형되지 않은 뉴클레오타이드일 수 있으며, 이러한 변형으로는, 비제한적으로, 2'-당 변형, 예컨대, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸, 또는 2'-플루오로 변형, 예를 들어, 2'-F 또는 2'-O-메틸, 아데노신 (A), 2'-F 또는 2'-O-메틸, 시티딘 (C), 2'-F 또는 2'-O-메틸, 우리딘 (U), 2'-F 또는 2'-O-메틸, 티미딘 (T), 2'-F 또는 2'-O-메틸, 구아노신 (G), 2'-O-메톡시에틸-5-메틸우리딘 (Teo), 2'-O-메톡시에틸아데노신 (Aeo), 2'-O-메톡시에틸-5-메틸시티딘 (m5Ceo), 및 임의의 이의 조합을 포함한다.

[0175] [168] 가이드 RNA는 또한 “잠긴” 핵산 (LNA)을 포함할 수 있으며, 여기서 2' OH-그룹은, 예를 들어, C1-6 알킬렌 또는 C1-6 헤테로알킬렌 가교에 의해, 동일한 리보스 당의 4' 탄소에 연결될 수 있다. 임의의 적합한 모이어티가 이러한 가교를 제공하도록 사용될 수 있으며, 이러한 모이어티로는, 비제한적으로 메틸렌, 프로필렌, 에터, 또는 아미노 가교; 0-아미노 (아미노는, 예를 들어, NH₂; 알킬아미노, 다이알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 다이아릴아미노, 헤테로아릴아미노, 또는 다이헤테로아릴아미노, 에틸렌다이아민, 또는 폴리아미노일 수 있음) 및 아미노알콕시 또는 O(CH₂)_n-아미노 (아미노는, 예를 들어, NH₂; 알킬아미노, 다이알킬아미노, 헤테로사이클릴, 아릴아미노, 다이아릴아미노, 헤테로아릴아미노, 또는 다이헤테로아릴아미노, 에틸렌다이아민, 또는 폴리아미노일 수 있음)를 포함한다.

[0176] [169] 특정 구현예에서, gRNA는 다중사이클릭 (예를 들어, 트라이사이클로; 및 “잠기지 않은” 형태, 예컨대 글리콜 핵산 (GNA) (예를 들어, R-GNA 또는 S-GNA, 여기서 리보스는 포스포다이에스터 결합에 부착된 글리콜 단위에 의해 대체됨), 또는 트레오스 핵산 (TNA, 여기서 리보스는 α-L-트레오피라노실-(3'→2')로 대체됨)인 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0177] [170] 일반적으로, gRNA는 산소를 가지는 5-원 고리인 당 그룹 리보스를 포함한다. 예시적인 변형된 gRNA는, 비제한적으로, 리보스 내 산소의 치환 (예를 들어, 황 (S), 셀레늄 (Se), 또는 알킬렌, 예컨대, 예를 들어, 메틸렌 또는 에틸렌으로의 치환); 이중 결합의 첨가 (예를 들어, 사이클로펜텐일 또는 사이클로헥센일로의 리보스 치환); 리보스의 고리 축소 (예를 들어, 사이클로뷰탄 또는 옥세테인의 4-원 고리를 형성); 리보스의 고리 확장 (예를 들어, 추가의 탄소 또는 헤테로원자를 가지는 6- 또는 7-원 고리, 예를 들어, 무수헥시톨, 알트리톨, 만니톨, 사이클로헥센일, 사이클로헥센일, 및 또한 포스포아미데이트 백본을 가지는 모폴리노의 형성)을 포함할 수 있다. 대부분의 당 유사체 변경이 2' 위치에 국한되지만, 4' 위치를 비롯한 다른 부위를 변형할 수 있다. 특정 구현예에서, gRNA는 4'-S, 4'-Se 또는 4'-C-아미노메틸-2'-O-Me 변형을 포함한다.

- [0178] [171]특정 구현예에서, 데아자 뉴클레오타이드, 예를 들어, 7-데아자-아데노신이 gRNA 내로 혼입될 수 있다. 특정 구현예에서, O- 및 N-알킬화 뉴클레오타이드, 예를 들어, N6-메틸 아데노신이 gRNA 내로 혼입될 수 있다. 특정 구현예에서, gRNA 내 뉴클레오타이드의 하나 이상 또는 전체는 데옥시뉴클레오타이드이다.
- [0179] RNA-가이드 뉴클레아제
- [0180] [172]본 발명의 RNA-가이드 뉴클레아제는 천연 유래의 클래스 2 CRISPR 뉴클레아제 예컨대 Cas9, 및 Cpf1, 뿐만 아니라 이로부터 유도 또는 수득된 다른 뉴클레아제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 기능적인 측면에서, RNA-가이드 뉴클레아제는 다음과 같은 뉴클레아제로 정의된다: (a) gRNA와 상호작용 (예를 들어, 복합체화)하며; (b) gRNA와 함께, (i) gRNA의 표적화 도메인에 상보적인 서열 및, 선택적으로, (ii) “프로토스페이서 인접 모티프”, 또는 “M” (하기에서 더욱 상세히 설명)로서 지칭되는 추가의 서열을 포함하는 DNA의 표적 영역과 결합, 및 선택적으로 절단 또는 변형시키는 뉴클레아제. 하기 예시가 예시하는 바와 같이, RNA-가이드 뉴클레아제는 동일한 PAM 특이성 또는 절단 활성을 공유하는 개별 RNA-가이드 뉴클레아제 사이에서 변이가 존재할 수 있더라도, 넓은 의미에서 이의 PAM 특이성 및 절단 활성에 의해 정의될 수 있다. 당업자는 본 발명의 일부 양태가 특정 PAM 특이성 및/또는 절단 활성을 가지는 임의의 적합한 RNA-가이드 뉴클레아제를 사용하여 구현될 수 있는 시스템, 방법 및 조성물에 관한 것임을 이해할 것이다. 이러한 이유로, 달리 명시되지 않는 한, 용어 RNA-가이드 뉴클레아제는 일반적인 용어로서 이해되어야 하며, RNA-가이드 뉴클레아제의 임의의 구체적인 유형 (예를 들어, Cas9 대 Cpf1), 종 (예를 들어, *S. 피오케네스* 대 *S. 아우레우스*) 또는 변이 (예를 들어, 전장 대 절단 또는 분할; 천연 유래의 PAM 특이성 대 조작된 PAM 특이성, 등)에 제한되지 않아야 한다.
- [0181] [173]PAM 서열은 gRNA 표적화 도메인 (또는 “스페이서”)에 상보적인 “프로토스페이서” 서열과 순차적인 관계로부터 명칭을 갖는다. 프로토스페이서 서열과 함께, PAM 서열은 특이적 RNA-가이드 뉴클레아제 / gRNA 조합에 대한 표적 영역 또는 서열을 정의한다.
- [0182] [174]다양한 RNA-가이드 뉴클레아제는 PAM와 프로토스페이서 사이이 상이한 순차적인 관계를 필요로 할 수 있다.
- [0183] [175]PAM 및 프로토스페이서의 특이적인 순차적 배향을 인식하는 것 이외에도, RNA-가이드 뉴클레아제는 또한 특이적 PAM 서열을 인식할 수 있다. *S. 아우레우스* Cas9는, 예를 들어, NNGRRT 또는 NNGRRV의 PAM 서열을 인식하며, N 잔기는 gRNA 표적화 도메인에 의해 인식되는 영역의 바로 옆의 3'이다. *S. 피오케네스* Cas9는 NGG PAM 서열을 인식한다. 그리고 *F. 노비시다* Cpf1는 TTN PAM 서열을 인식한다. PAM 서열은 다양한 RNA-가이드 뉴클레아제에 의해 식별되어 있으며, 및 신규의 PAM 서열을 식별하기 위한 전략은 문헌 [Shmakov et al., 2015, Molecular Cell 60, 385-397, November 5, 2015]에 기재되어 있다. 또한 조작된 RNA-가이드 뉴클레아제는 기준 분자의 PAM 특이성과는 상이한 PAM 특이성을 가질 수 있음에 유의해야 한다 (예를 들어, 조작된 RNA-가이드 뉴클레아제의 경우, 기준 분자는 RNA-가이드 뉴클레아제가 유도되는 천연 유래의 변이체, 또는 조작된 RNA-가이드 뉴클레아제에 대해 상동성을 가지는 가장 큰 아미노산 서열을 가지는 천연 유래의 변이체일 수 있다).
- [0184] [176]PAM 특이성 이외에도, RNA-가이드 뉴클레아제는 DNA 절단 활성을 특징으로 할 수 있다: 천연 유래의 RNA-가이드 뉴클레아제는 일반적으로 표적 핵산에서 DSB를 형성하지만, SSB만을 생성하거나 (상기 논의) [Ran & Hsu, et al., Cell 154(6), 1380-1389, September 12, 2013 (Ran), 본 명세서에 참조로 포함], 또는 전혀 절단하지 않는 조작된 변이체가 생성되었다.
- [0185] Cas9
- [0186] [177]결정 구조는 *S. 피오케네스* Cas9에 대해 (Jinek 2014), 및 단분자 가이드 RNA 및 표적 DNA와의 복합체로의 *S. 아우레우스* Cas9에 대해 결정되었다 (Nishimasu 2014; Anders 2014; 및 Nishimasu 2015).
- [0187] [178]천연 유래의 Cas9 단백질은 2개의 로브인, 인식 (REC) 로브 및 뉴클레아제 (NUC) 로브를 포함하며; 상기 각각은 구체적인 구조적 및/또는 기능성 도메인을 포함한다. REC 로브는 아르기닌-풍부의 브릿지 나선 (BH) 도메인, 및 적어도 하나의 REC 도메인 (예를 들어, REC1 도메인 및, 선택적으로, REC2 도메인)을 포함한다. REC 로브는 다른 공지된 단백질과의 구조적 유사성을 공유하지 않는데, 이는 이러한 로브가 특이적 기능성 도메인임을 나타낸다. 이러한 이론에 구속되고자 하는 것은 아니다, 돌연변이 분석은 특이적 기능성 로브 BH 및 REC 도메인에 대한 특이적 기능성 로브를 제안한다: BH 도메인은 gRNA:DNA 인식에서 역할을 하는 것으로 나타나는 반면, REC 도메인은 gRNA의 반복부:안티-반복부 이중나선과 상호작용을 하며 Cas9/gRNA 복합체 형성을 매개하는 것으로 고려된다.

- [0188] [179]NUC 로브는 RuvC 도메인, HNH 도메인, 및 PAM-상호작용 (PI) 도메인을 포함한다. RuvC 도메인은 레트로바 이러스 인테그라제와 상과 구성원에 대해 구조적 유사성을 공유하며 표적 핵산의 비-상보적인 (즉, 하부) 가닥을 절단한다. 2개 이상의 분할된 RuvC 모티프 (예컨대 *S. 피오케네스* 및 *S. 아우레우스*에서 RuvC I, RuvCII, 및 RuvCIII)로부터 형성될 수 있다. 한편, HNH 도메인은 HNN 엔도뉴클라아제 모티프에 대해 구조적으로 유사하며, 표적 핵산의 상보적인 (즉, 상부) 가닥을 절단한다. PI 도메인은, 이름에서 알 수 있듯이, PAM 특이성에 기여한다.
- [0189] [180]Cas9의 특정 기능이 상기 기재된 특정 도메인에 연결되어 있지만 (반드시 이에 의해 결정되는 것은 아님), 상기 및 다른 기능은 다른 Cas9 도메인에 의해, 또는 어느 로브 상의 다중 도메인에 의해 매개되거나 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, *S. 피오케네스* Cas9에서, Nishimasu 2014에 기재된 바와 같이, gRNA의 반복부:안티 반복부 이중가닥은 REC와 NUC 로브 사이의 그루브에 떨어지고, 이중가닥의 뉴클레오타이드는 BH, PI, 및 REC 도메인의 아미노산과 상호작용한다. 제1 줄기 루프 구조의 일부 뉴클레오타이드는 또한 다중 도메인 (PI, BH 및 REC1)의 아미노산과 상호작용을 하며, 제2 및 제3 줄기 루프 (RuvC 및 PI 도메인)의 일부 뉴클레오타이드와도 상호작용을 한다.
- [0190] Cpf1
- [0191] [181] TTTN PAM 서열을 포함하여 crRNA 및 이중 가닥 (ds) DNA 표적과의 복합체에서의 *아시다미노코커스* (*Acidaminococcus sp.*) Cpf1의 결정 구조는 Yamano et al. [Cell. 2016 May 5; 165(4): 949-962 (Yamano), 본 명세서에 참조로 포함]에 의해 해석되었다. Cas9와 같이, Cpf1는 2개의 로브인, REC (인식) 로브, 및 NUC (뉴클레아제) 로브를 가진다. REC 로브는 REC1 및 REC2 도메인을 포함하며, 이는 공지된 단백질 구조와 유사성은 없다. 반면에, NUC 로브는 3 개의 RuvC 도메인 (RuvC-1, -II 및 -III) 및 BH 도메인을 포함한다. 그러나, Cas9와는 대조적으로, Cpf1 REC 로브 lacks HNH 도메인을 가지지 않고, 공지된 단백질 구조에 유사성도 가지지 않는 다른 도메인: 구조적으로 독특한 PI 도메인, 3개의 웨지 (WED) 도메인 (WED-I, -II 및 -III), 및 뉴클레아제 (Nuc) 도메인을 포함한다.
- [0192] [182]Cas9 및 Cpf1가 구조 및 기능에서 유사성을 공유하지만, 특정 Cpf1 활성은 임의의 Cas9 도메인과 유사하지 않은 구조적 도메인에 의해 매개된다는 것을 이해해야 한다. 예를 들어, 표적 DNA의 상보적 가닥의 절단은 Cas9의 HNH 도메인과 순차적으로 및 공간적으로 상이한 Nuc 도메인에 의해 매개되는 것으로 나타난다. 또한, Cpf1 gRNA (핸들)의 비-표적화 부분은 Cas9 gRNA에서 반복부 :안티 반복부 이중나선에 의해 형성된 줄기 루프 구조보다는, 슈도 노트(pseudoknot) 구조를 채택한다.
- [0193] RNA-가이드 뉴클레아제의 변형
- [0194] [183]상기 기재된 RNA-가이드 뉴클레아제는 다양한 응용에 유용할 수 있는 활성 및 성질을 가지지만, 당업자는 특정한 경우에 절단 활성, PAM 특이성, 또는 다른 구조적 또는 기능적 특징을 변경시키기 위해 RNA-가이드 뉴클레아제가 변형될 수 있음을 이해할 것이다.
- [0195] [184]절단 활성을 변경하는 변형으로 돌아가서, NUC 로브 내 도메인의 활성을 감소 또는 제거하는 돌연변이가 상기 기재되어 있다. RuvC 도메인, Cas9 HNH 도메인, 또는 Cpf1 Nuc 도메인에서 일어날 수 있는 예시적인 돌연변이가 [Ran] 및 [Yamano], 뿐만 아니라 [Cotta-Ramusino]에 기재되어 있다. 일반적으로, 2개의 뉴클레아제 도메인 중 하나에서 활성을 감소 또는 제거하는 돌연변이는 Nickase 활성을 가지는 RNA-가이드 뉴클레아제를 초래하지만, Nickase 활성 유형은 어느 도메인이 불활성화되는지에 따라 달라진다는 것에 유의해야 한다. 하나의 예시로서, Cas9의 RuvC 도메인의 불활성화는 상보적인 또는 상부 가닥을 절단하는 Nickase를 야기할 것이다. 한편, Cas9 HNH 도메인의 불활성화는 하부 또는 비-상보적 가닥을 절단하는 Nickase를 야기한다.
- [0196] [185]천연 유래의 Cas9 기준 분자에 대한 PAM 특이성이 변형은 Kleinstiver et al.에 의해 *S. 피오케네스* (Kleinstiver et al., Nature. 2015 Jul 23;523(7561):481-5 (Kleinstiver I) 및 *S. 아우레우스* (Kleinstiver et al., Nat Biotechnol. 2015 Dec; 33(12): 1293-1298 (Kleinstiver II)) 둘 모두에 대해 기재되어 있다. Kleinstiver et al.는 또한 Cas9의 표적 충실도를 개선하는 변형을 기재하였다 (Nature, 2016 January 28; 529, 490-495 (Kleinstiver III)). 상기 참조는 각각 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0197] [186]RNA-가이드 뉴클레아제는 둘 이상의 부분으로 분할되며, 이는 Zetsche et al. (Nat Biotechnol. 2015 Feb;33(2):139-42 (Zetsche II), 참조로 포함), 및 Fine et al. (Sci Rep. 2015 Jul 1;5:10777 (Fine), 참조로 포함)에 의해 기재되어 있다.

- [0198] [187]RNA-가이드 뉴클레아제는, 특정 구현예에서, gRNA 결합, 표적 및 PAM 인식, 및 절단 활성을 유지하면서, 예를 들어 뉴클레아제의 크기를 감소시키는 하나 이상의 결실을 통해, 크기-최적화 또는 절단될 수 있다. 특정 구현예에서, RNA 가이드 뉴클레아제는 선택적으로 링커에 의해, 또 다른 폴리펩타이드, 뉴클레오타이드, 또는 다른 구조에 결합, 공유 또는 비공유적으로 결합된다. 예시적인 결합된 뉴클레아제 및 링커는 Guilinger et al., Nature Biotechnology 32, 577-582 (2014)에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 모든 목적을 위해 본 명세서에 참조로 포함된다.
- [0199] [188]RNA-가이드 뉴클레아제는 또한 선택적으로 태그, 예컨대, 비제한적으로, RNA-가이드 뉴클레아제 단백질의 핵으로의 이동을 용이하게 하는 핵 정위 신호(nuclear localization signal)와 같은 태그를 포함한다. 특정 구현예에서, RNA-가이드 뉴클레아제는 C- 및/또는 N-말단 핵 정위 신호를 포함할 수 있다. 핵 정위 서열은 기술 분야 내에 공지되어 있으며 Maeder 등에 기재되어 있다.
- [0200] [189]전술한 변형의 목록은 본질적으로 예시적인 것으로 의도되며, 당업자는 본 명세서를 고려하여, 특정 응용에서 다른 변형이 가능하거나 바람직할 수 있음을 이해할 것이다. 간결성을 위해, 본 발명의 예시적인 시스템, 방법 및 조성물은 특정 RNA-가이드 뉴클레아제를 참조하여 제시되지만, 사용된 RNA-가이드 뉴클레아제는 이의 작동 원리를 변경하지 않는 방식으로 변형될 수 있음을 이해해야 한다. 이러한 변형은 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0201] RNA-가이드 뉴클레아제를 인코딩하는 핵산
- [0202] [190]RNA-가이드 뉴클레아제, 예를 들어, Cas9, Cpf1 또는 이의 기능적 단편을 인코딩하는 핵산이 본 명세서에 제공된다. RNA-가이드 뉴클레아제를 인코딩하는 예시적인 핵산은 사전에 기재되어 있다(예를 들어, Cong 2013; Wang 2013; Mali 2013; Jinek 2012 참조).
- [0203] [191]일부 경우에, RNA-가이드 뉴클레아제를 인코딩하는 핵산은 합성 핵산 서열일 수 있다. 예를 들어, 합성 핵산 분자는 화학적으로 변형될 수 있다. 특정 구현예에서, RNA-가이드 뉴클레아제를 인코딩하는 mRNA는 다음의 성질 중 하나 이상 (예를 들어, 모든) 성질을 가질 것이다 : 캡핑될 수 있고; 폴리아데닐화될 수 있고; 5-메틸 시티딘 및/또는 슈도우리딘으로 치환될 수 있음.
- [0204] [192]합성 핵산 서열은 또한 코돈 최적화될 수 있으며, 예를 들어, 적어도 하나의 비-통상적인 코돈 또는 덜-통상적인 코돈통상적인 코돈에 의해 대체되었다. 예를 들어, 합성 핵산은 최적화된 메신저 mRNA, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 포유 동물 발현 시스템에서의 발현에 최적화된 메신저 mRNA의 합성을 지시할 수 있다. 코돈 최적화된 Cas9 코딩 서열의 예는 [Cotta-Ramusino]에 제시되어 있다.
- [0205] [193]추가로, 또는 택일적으로, RNA-가이드 뉴클레아제를 인코딩하는 핵산은 핵 정위 서열 (NLS)을 포함할 수 있다. 핵 정위 서열은 기술 분야 내에 공지되어 있다.
- [0206] 후보 분자의 기능 분석
- [0207] [194]후보 RNA-가이드 뉴클레아제, gRNA, 및 이의 복합체는 기술 분야 내 공지된 표준 방법에 의해 평가될 수 있다. 예를 들어, [Cotta-Ramusino]를 참조한다. RNP 복합체의 안정성은 하기 기재된 바와 같이 시차 주사 형광 측정법에 의해 평가될 수 있다.
- [0208] 시차 주사 형광측정법 (DSF)
- [0209] [195]gRNA 및 RNA-가이드 뉴클레아제를 포함하는 리보핵단백질 (RNP) 복합체의 열안정성은 DSF를 통해 측정될 수 있다. DSF 기법은 결합 RNA 분자, 예를 들어, gRNA의 첨가와 같은 바람직한 조건하에서 증가하는 단백질의 열안정성을 측정할 수 있다.
- [0210] [196]DSF 분석은 임의의 적합한 프로토콜에 따라 수행될 수 있으며, 임의의 적합한 환경에서 사용될 수 있고, 이러한 환경으로는 비제한적으로 (a) RNP 형성을 위한 최적의 조건을 식별하기 위한 상이한 조건 (예를 들어, gRNA:RNA-가이드 뉴클레아제 단백질의 상이한 화학량론적 비율, 상이한 완충 용액, 등)의 시험; 및 (b) RNP 형성 또는 안정성을 개선하는 이러한 변형을 식별하기 위한 RNA-가이드 뉴클레아제 및/또는 gRNA의 변형 (예를 들어, 화학적 변형, 서열 변경, 등)의 시험을 포함한다. DSF 분석의 한 가지 판독은 RNP 복합체의 용융 온도의 변화이다; 상대적으로 높은 시프트는 RNP 복합체가 더욱 낮은 시프트를 특징으로 하는 기준 RNP 복합체에 비해 보다 안정하고 (따라서 더욱 큰 활성 또는 더욱 우수한 형성 동역학, 분해 동역학 또는 다른 기능적 특성을 가질 수 있는) 것을 시사한다. DSF 분석이 스크리닝 도구로서 배치될 때, 임계 용융 온도 변화가 특정 될 수 있으며, 이에 따라 출력은 임계 온도 이상에서 용융 온도 변화를 갖는 하나 이상의 RNP이다. 예를 들어, 임계값은 5-10

℃ (예를 들어, 5°, 6°, 7°, 8°, 9°, 10°) 이상일 수 있고, 출력은 임계값 이상의 용융 온도 시프트를 특징으로 하는 하나 이상의 RNP일 수 있다.

[0211] [197]DSF 분석 조건의 2 가지 비제한적인 예시는 다음과 같다:

[0212] [198]RNP 복합체를 형성하기 위한 최적의 용액을 결정하기 위해, 물+10x SYPRO Orange®(Technologies cat#S-6650) 중의 Cas9의 고정된 농축액 (예를 들어, 2 μM)을 384 웰 플레이트에 분주한다. 이어서, 다양한 pH 및 염을 지니는 용액 중에 희석시킨 등몰량의 gRNA를 첨가한다. 실온에서 10 초 동안 인큐베이션하고, 잠시 동안 원심분리하여, 임의의 거품을 제거한 후에, Bio-Rad CFX 매니저 소프트웨어를 이용하는 Bio-Rad CFX384™실시간 시스템 C1000 Touch™유전자 증폭기(Thermal Cycler)를 사용하여 10초마다 온도를 1° 증가시키면서, 20℃내지 90℃의 구배로 구동시킨다.

[0213] [199]제2 분석은 상기 분석 1로부터의 최적의 완충액 중의 고정된 농축액의 (예를 들어, 2 μM) Cas9와 다양한 농도의 gRNA를 혼합하는 단계 및 384 웰 플레이트에서 인큐베이션 (예를 들어, 실온에서 10')시키는 단계로 이루어진다. 동일한 부피의 최적 완충액+ 10x SYPRO Orange®(Life Technologies cat#S-6650)를 첨가하고 플레이트를 Microseal®B 접착제 (MSB-1001)로 밀봉한다. 잠시 동안 원심분리하여, 임의의 거품을 제거한 후에, Bio-Rad CFX Manager 소프트웨어를 이용하는 Bio-Rad CFX384™실시간 시스템 C1000 Touch™유전자 증폭기를 사용하여 10초마다 온도를 1° 증가시키면서, 20℃내지 90℃의 구배로 구동시킨다.

[0214] 게놈 편집 전략

[0215] [200]상기 기재된 게놈 편집 시스템은, 본 발명의 다양한 구현예에서, 세포 내에서 또는 이로부터 획득된 DNA의 표적화된 영역에서 편집을 생성 (즉, 변경)하기 위해 사용된다. 특정 편집을 생성하기 위한 다양한 전략이 본 명세서에 기재되어 있으며, 이러한 전략은 일반적으로 원하는 복구 결과물, 개별적인 편집 (예를 들어, SSB 또는 DSB)의 개수 및 위치, 및 이러한 편집의 표적 부위와 관련하여 기재된다.

[0216] [201]SSB 또는 DSB의 형성을 수반하는 게놈 편집 전략은 다음을 포함하는 복구 결과물을 특징으로 한다: (a) 표적화된 영역 전체 또는 일부의 결실; (b) 표적화된 영역 전체 또는 일부 내로의 삽입 또는 대체; 또는 (c) 표적화된 영역 전체 또는 일부의 중단. 이러한 그룹화는 특정 이론이나 모델을 제한하거나 구속하려는 것이 아니며 설명의 경제성을 경제성을 위해서만 제공된다. 당업자는 나열된 결과가 상호배타적이지 않으며 일부 복구로 인해 다른 결과물이 발생할 수 있음을 이해할 것이다. 특정 편집 전략 또는 방법에 대한 설명은 달리 명시되지 않는 한 특정 복구 결과물을 요구하는 것으로 이해되어서는 안된다.

[0217] [202]표적화된 영역의 대체는 일반적으로 표적화된 영역 내에 기존 서열의 전체 또는 일부를, 예를 들어 HDR 경로에 의해 매개되는 2가지 복구 결과인 유전자 교정 또는 유전자 전환을 통해, 상동 서열로 대체하는 것을 포함한다. HDR은 공여체 주형의 사용에 의해 촉진되는데, 이는 하기에 더욱 상세히 설명되는 바와 같이 단일-가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 단일 또는 이중 가닥 주형은 외인성일 수 있으며, 이러한 경우 유전자 교정을 촉진시키거나 유전자 전환을 촉진하기 위해 내인성 (예를 들어, 세포 게놈 내 상동성 서열)일 수 있다. 외인성 주형은 비대칭 돌출부를 가질 수 있고 (즉, DSB 부위에 상보적인 주형의 일부는 공여체 주형 내의 중앙에 위치하기 보다는 3' 또는 5' 방향으로 오프셋될 수 있고), 이는 예를 들어 [Richardson et al. (Nature Biotechnology 34, 339-344 (2016), (Richardson), 참조로 포함)]에 기재되어 있다. 주형이 단일 가닥인 경우, 표적 영역의 상보적 (상단) 또는 비-상보적 (하단) 가닥에 해당할 수 있다.

[0218] [203][Ran] 및 [Cotta-Ramusino]에 기술된 바와 같이, 일부 경우에, 표적 영역 내에 또는 주위에 하나 이상의 닉 (nick)의 형성에 의해 유전자 전환 및 유전자 교정이 촉진된다. 일부 경우에, 이중 닉카제 전략은 두 개의 오프셋 SSB를 형성하는데 사용되며, 이는 결과적으로 돌출부 (예를 들어, 5' 돌출부)를 가지는 단일 DSB를 형성한다.

[0219] [204]표적화된 서열 전체 또는 일부의 중단 및/또는 결실은 다양한 수리 결과물에 의해 달성될 수 있다. 하나의 예시로서, LCA10 돌연변이에 대한 Maeder에 기재된 바와 같이, 표적화된 영역 옆에 있는 2 개 이상의 DSB를 동시에 생성함으로써 서열이 결실될 수 있으며, 이는 DSB가 복구될 때 절체된다. 다른 예시로서, 단일 가닥 돌출부 이중 가닥 파손을 형성함으로써 생성된 결실에 의해 서열이 중단될 수 있고, 이후 복구 이전에 돌출부의 엑소뉴클레오타이드 처리가 이어진다.

[0220] [205]표적 서열 중단의 하나의 특정 서브 세트는 표적화된 서열 내에서 인텔의 형성에 의해 매개되며, 여기서 복구 결과물은 일반적으로 NHEJ 경로 (Alt-NHEJ 포함)에 의해 매개된다. NHEJ는 인텔 돌연변이와의 연관성으로 인해 "오류가 발생하기 쉬운"복구 경로로 지칭된다. 그러나, 일부 경우에, DSB는 NHEJ에 의해 이의 주변 서열을

변경하지 않고 복구되며 (소위 "완벽한" 또는 "무한" 복구); 이를 위해서는 일반적으로 DSB의 두 말단이 완벽하게 결합되어야 한다. 한편, 인텔은 유리 말단 중 하나 또는 둘 모두에서 하나 또는 양쪽 가닥으로부터 뉴클레오타이드를 첨가 및/또는 제거하는 결합 전에 유리 DNA 말단의 효소적 처리로부터 발생하는 것으로 고려된다.

[0221] [206] 유리 DSB 말단의 효소적 처리는 본질적으로 확률론적일 수 있기 때문에, 인텔 돌연변이는 분포를 따라 발생하는 가변적 경향이 있으며, 이는 특정 표적 부위, 사용된 세포 유형, 사용된 게놈 편집 전략 등을 비롯한 다양한 요인에 의해 영향을 받을 수 있다. 그럼에도 불구하고, 인텔 형성에 대한 제한된 일반화를 그릴 수 있다: 단일 DSB의 복구에 의해 형성된 결실은 가장 일반적으로 1-50 bp 범위이지만 100-200 bp보다 큰 범위에 도달할 수 있다. 단일 DSB의 복구에 의해 형성된 삽입물은 더 짧은 경향이 있으며, 종종 파손 부위 바로 근처를 둘러싸는 서열의 짧은 복제를 포함한다. 그러나, 큰 삽입물을 얻는 것이 가능하며, 이 경우 삽입된 서열은 종종 게놈의 다른 영역 또는 세포에 존재하는 플라스미드 DNA에서 추적되었다.

[0222] [207] 인텔 돌연변이 및 인텔을 생성하도록 구성된 게놈 편집 시스템은 예를 들어 특정 최종 서열의 생성이 필요하지 않은 경우 및/또는 프레임시프트 돌연변이가 허용되는 경우에 표적 서열을 차단하는데 유용하다. 이들은 또한 특정 서열이 바람직한 위치에서, 소정의 서열이 주어진 부위에서 SSB 또는 DSB의 복구로부터 우선적으로 발생하는 경향이 있는 한 유용할 수 있다. 인텔 돌연변이는 또한 특정 게놈 편집 시스템 및 이의 성분의 활성을 평가하거나 스크리닝하는데 유용한 도구이다. 상기 및 다른 환경에서, 인텔은 (a) 게놈 편집 시스템과 접촉된 세포의 게놈에서의 상대 및 절대 빈도 및 (b) 편집되지 않은 서열에 대한 수치 차이, 예를 들어 ± 1 , ± 2 , ± 3 의 분포 등을 특징으로 할 수 있다. 하나의 예시로서, 단서-발견 설정에서, 다수의 gRNA가 스크리닝되어 제어된 조건하에서 인텔 관독에 기초하여 표적 부위에서 절단을 가장 효율적으로 구동하는 gRNA를 식별할 수 있다. 임계 빈도 또는 그 이상에서 인텔을 생성하거나 특정 분포의 인텔을 생성하는 가이드는 추가의 연구 및 개발을 위해 선택할 수 있다. 인텔 빈도 및 분포는 또한, 예를 들어, gRNA를 일정하게 유지하고 특정 다른 반응 조건 또는 전달 방법을 변화시킴으로써, 상이한 게놈 편집 시스템 구현 또는 제제화 및 전달 방법을 평가하기 위한 관독 값으로서 유용할 수 있다.

[0223] 멀티플렉스 전략

[0224] [208] 상기 논의된 예시적인 전략은 단일 DSB에 의해 매개된 복구 결과물에 초점을 두었지만, 본 발명에 따른 게놈 편집 시스템은 또한 동일한 유전자좌 또는 상이한 유전자좌에서 둘 이상의 DSB를 생성하기 위해 사용될 수 있다. 여러 DSB 또는 SSB의 형성을 포함하는 편집 전략은 [Cotta-Ramusino]에 설명되어 있다.

[0225] 공여체 주형 설계

[0226] [209] 공여체 주형 설계는 문헌, 예를 들어 [Cotta-Ramusino]에 상세하게 기재되어 있다. DNA 올리고머 공여체 주형 (올리고데옥시뉴클레오타이드 또는 ODN)은 단일 가닥 (ssODN) 또는 이중 가닥 (dsODN)일 수 있으며, DSB의 HDR-기반 복구를 용이하게 하도록 사용될 수 있고, 유용한 for 표적 DNA 서열 내로의 변경 도입, 표적 서열 내로 새로운 서열 삽입, 또는 표적 서열과 완전히 대체하는데 특히 유용하다.

[0227] [210] 단일 가닥 또는 이중 가닥 여부와 관계없이, 공여체 주형은 일반적으로 절단될 표적 서열 내 또는 근처 (예를 들어, 측면 또는 인접)의 DNA 영역에 상동인 영역을 포함한다. 이러한 상동성 영역은 본 명세서에서 "상동성 아암(homology arm)"으로 지칭되며, 하기에 개략적으로 설명된다.

[0228] [5' 상동성 아암] — [대체 서열] — [3' 상동성 아암].

[0229] [211] 상동성 아암은 임의의 적합한 길이를 가질 수 있으며 (하나의 상동성 아암만 사용되는 경우 0 개의 뉴클레오타이드 포함), 3' 및 5' 상동성 아암은 동일한 길이를 가지거나 길이가 상이할 수 있다. 적절한 상동성 아암 길이의 선별은 Alu 반복부 또는 다른 매우 일반적인 요소와 같은 특정 서열을 갖는 상동성 또는 미세-상동성을 피하려는 요구와 같은 다양한 요인에 의해 영향을 받을 수 있다. 예를 들어, 5' 상동성 아암은 서열 반복 요소를 피하기 위해 단축될 수 있다. 다른 구현예에서, 3' 상동성 아암은 서열 반복 요소를 피하기 위해 단축될 수 있다. 일부 구현예에서, 5' 및 3' 상동성 아암 둘 모두는 특정 서열 반복 요소를 포함하지 않도록 단축될 수 있다. 또한, 일부 상동성 아암 설계는 편집 효율을 향상시키거나 원하는 수리 결과물의 빈도를 증가시킬 수 있다. 예를 들어, [Richardson et al. Nature Biotechnology 34, 339-344 (2016) (Richardson), (참조로 포함)]은 단일 가닥 공여체 주형의 3' 및 5' 상동성 아암의 상대적인 비대칭이 복구 비율 및/또는 결과물에 영향을 미치는 것을 발견하였다.

[0230] [212] 공여체 주형에서의 대체 서열은 [Cotta-Ramusino et al.] 등을 비롯한 기타 문헌에 기재되어 있다. 대체 서열은 임의의 적합한 길이일 수 있으며 (원하는 복구 결과가 결실인 0 개의 뉴클레오타이드 포함), 일반적으로 편

집이 요구되는 세포 내에서 천연 유래의 서열에 비해 1, 2, 3 개 이상의 서열 변형을 포함한다. 하나의 일반적인 서열 변형은 치료가 필요한 질환 또는 상태와 관련된 돌연변이를 복구하기 위해 천연 유래의 서열의 변형을 포함한다. 다른 일반적인 서열 변형은, 교체 서열이 표적 부위에 혼입된 후 표적 부위의 반복 절단을 감소 시키거나 제거하기 위해, RNA-가이드 뉴클레아제의 PAM 서열 또는 SSB 또는 DSB를 생성하기 위해 사용되는 gRNA (들)의 표적화 도메인에 상보적이거나 이를 코딩하는 하나 이상의 서열의 변경을 포함한다.

[0231] [213]선형 ssODN이 사용되는 경우, 이는 (i) 표적 핵산의 Nick 가닥에 어닐링, (ii) 표적 핵산의 온전한 가닥에 어닐링, (iii) 표적 핵산의 플러스 가닥에 어닐링, 및/또는 (iv) 표적 핵산의 마이너스 가닥에 어닐링하도록 구성될 수 있다. ssODN는 임의의 적절한 길이, 예를 들어, 약, 적어도, 150-200 이하의 뉴클레오타이드 (예를 들어, 150, 160, 170, 180, 190, 또는 200개의 뉴클레오타이드)를 가질 수 있다.

[0232] [214]주형 핵산은 또한 바이러스 게놈 또는 원형 이중 가닥 DNA, 예를 들어 플라스미드와 같은 핵산 벡터일 수 있음에 유의해야 한다. 공여체 주형을-포함하는 핵산 벡터는 다른 코딩 또는 비 코딩 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 주형 핵산은 바이러스 게놈의 일부 (예를 들어, AAV 또는 렌티바이러스 게놈)으로 전달될 수 있으며, 이러한 게놈은 특정 게놈 백본 요소 (예를 들어, AAV 게놈의 경우, 역말단 반복부)를 포함하며, 선택적으로 gRNA 및/또는 RNA-가이드 뉴클레아제의 추가적인 서열 코딩을 포함한다. 특정 구현예에서, 공여체 주형은, 공여체 주형의 말단 중 하나 또는 둘 모두에 유리 DSB의 형성을 용이하게 하기 위해, 하나 이상의 gRNA에 의해 인식되는 표적 부위에 인접하게, 또는 측면에 위치할 수 있으며, 이는 동일한 gRNA를 사용하여 세포 DNA에 형성된 상응하는 SSB 또는 DSB의 복구에 참여할 수 있다. 공여체 주형으로서 사용하기에 적합한 예시적인 핵산 벡터는 [Cotta-Ramusino]에 기재되어 있다.

[0233] [215]어떤 형식이 사용되든지, 주형 핵산은 바람직하지 않은 서열을 피하도록 설계될 수 있다. 특정 구현예에서, 특정 서열 반복 요소, 예를 들어 Alu 반복부, LINE 요소 등과의 중첩을 피하기 위해 상동성 아암 중 하나 또는 둘 모두가 단축될 수 있다.

[0234] 표적 세포

[0235] [216]본 발명에 따른 게놈 편집 시스템은 세포를 조작 또는 변경, 예를 들어 표적 핵산을 편집 또는 변경하는데 사용될 수 있다. 다양한 구현예에서, 조작은 *생체 내* 또는 *생체 외*에서 일어날 수 있다.

[0236] [217]다양한 세포 유형이 본 발명의 구현예에 따라 조작 또는 변경될 수 있으며, 일부 경우에, 예컨대 *생체 내* 적용에서, 복수의 세포 유형이, 예를 들어 본 발명에 따른 게놈 편집 시스템을 복수의 세포 유형에 전달함으로써, 변경 또는 조작된다. 그러나, 다른 경우에, 조작 또는 변경을 특정 세포 유형으로 제한하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 일부 경우에, 유전자형의 변형이 세포 표현형에서의 변화를 초래할 것으로 예상되는, 제한된 분화 능력을 가지는 세포 또는 말단 분화된 세포, 예컨대 [Maeder]의 경우에서 광수용기 세포를 편집하는 것이 바람직할 수 있다. 그러나, 다른 경우에는 덜 분화된 다능성(multipotent) 또는 만능성(pluripotent), 줄기 또는 전구 세포를 편집하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 세포는 배아 줄기 세포, 유도 만능 줄기 세포 (iPSC), 조혈모 줄기/전구 세포 (HSPC), 또는 주어진 용도 또는 또는 표식에 대해 관련이 있는 세포 유형으로 분화하는 다른 줄기 또는 전구 세포 유형일 수 있다. 특정 구현예에서, 세포는 T 세포이다. 특정 구현예에서, 세포는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포이다. 추가의 구현예에서, 세포는 조작된 TCR (eTCR)을 발현하는 T 세포이다.

[0237] [218]추론으로서, 변경 또는 조작되는 세포는, 표적화되는 세포 유형(들) 및/또는 원하는 편집 결과물에 따라, 다양하게, 분할 세포 또는 비-분할 세포이다.

[0238] [219]세포가 생체 외에서 조작되거나 변경될 때, 세포는 즉시 사용 (예를 들어, 대상체에게 투여)될 수 있거나, 나중에 사용하기 위해 유지 또는 저장될 수 있다. 당업자는 세포가 기술 분야에 공지된 임의의 적절한 방법을 사용하여 배양물에 유지 또는 저장 (예를 들어, 액체 질소에서 동결)될 수 있음을 이해할 것이다.

[0239] 게놈 편집 시스템의 구현: 전달, 제제 및 투여 경로

[0240] [220]상기 논의된 바와 같이, 본 발명의 게놈 편집 시스템은 임의의 적절한 방식으로 구현될 수 있으며, 비제한적으로 RNA-가이드 뉴클레아제, gRNA, 및 선택적인 공여체 주형 핵산을 포함하는 이러한 시스템의 성분, 임의의 적절한 형태로 또는 게놈 편집 시스템의 형질전환, 발현 또는 도입을 초래하는 및/또는 세포, 조직 또는 대상체에 원하는 복구 결과물을 야기하는 형태의 조합으로 전달, 제제화, 또는 투여될 수 있음을 의미한다. **표 4** 및 **5**는 게놈 편집 시스템 구현의 몇 가지 비제한적인 예를 제시한다. 그러나, 당업자는 이러한 목록이 포괄적이지 않으며, 다른 구현이 가능하다는 것을 이해할 것이다. 특히 **표 4**를 참조하면, 표는 단일 gRNA 및 선택적인 공여체 주형을 포함하는 게놈 편집 시스템의 몇 가지 예시적인 구현을 열거한다. 그러나, 본 발명에 따른 게놈

편집 시스템은 다수의 gRNA, 다수의 RNA-가이드 뉴클레아제, 및 다른 성분 예컨대 단백질을 포함할 수 있으며, 다양한 구현은 표에 예시된 원리에 기초하여 당업자에게 명백할 것이다. 표에서, [N/A]는 게놈 편집 시스템이 표시된 성분을 포함하지 않음을 나타낸다.

표 4

표 5

[0242]

게놈 편집 시스템 성분			
RNA-가이드 뉴클레아제	Grna	공여체 주형	설명
단백질	RNA	[N/A]	gRNA 분자와 복합체화된 RNA-가이드 뉴클레아제 단백질 (RNP 복합체)
단백질	RNA	DNA	상기 기재된 RNP 복합체 + 단일-가닥 또는 이중 가닥공여체 주형.
단백질	DNA	[N/A]	RNA-가이드 뉴클레아제 단백질 + DNA로부터 전사된 gRNA.
단백질	DNA	DNA	RNA-가이드 뉴클레아제 단백질 + gRNA-인코딩 DNA 및 별도의 DNA 공여체 주형.
단백질	DNA		RNA-가이드 뉴클레아제 단백질 그리고 gRNA 및 공여체 주형을 인코딩하는 단일 DNA.
DNA			RNA-가이드 뉴클레아제, gRNA 및 공여체 주형을 인코딩하는 DNA 또는 DNA 벡터.
DNA	DNA	[N/A]	각각, RNA-가이드 뉴클레아제 및 gRNA를 인코딩하는 2개의 별도의 DNA, 또는 2개의 별도의 DNA 벡터.
DNA	DNA	DNA	각각, RNA-가이드 뉴클레아제, gRNA 및 공여체 주형을 인코딩하는 3개의 별도의 DNA, 또는 3개의 별도의 DNA 벡터.
DNA		[N/A]	RNA-가이드 뉴클레아제 및 gRNA를 인코딩하는 DNA 또는 DNA 벡터
DNA		DNA	RNA-가이드 뉴클레아제 및 gRNA를 인코딩하는 제1 DNA 또는 DNA 벡터, 및 공여체 주형을 인코딩하는 제2 DNA 또는 DNA 벡터.
DNA	DNA		RNA-가이드 뉴클레아제를 인코딩하는 제1 DNA 또는 DNA 벡터, 및 gRNA 및 공여체 주형을 인코딩하는 제2 DNA 또는 DNA 벡터.
DNA			RNA-가이드 뉴클레아제 및 공여체 주형을 인코딩하는 제1 DNA 또는 DNA 벡터, 및 gRNA를 인코딩하는 제2 DNA 또는 DNA 벡터.
	DNA		
	DNA		
	RNA		RNA-가이드 뉴클레아제 및 공여체 주형을 인코딩하는 DNA 또는 DNA 벡터, 및 gRNA
	RNA		
RNA		[N/A]	RNA-가이드 뉴클레아제를 인코딩하고 gRNA를 포함하는 RNA 또는 RNA 벡터
RNA		DNA	RNA-가이드 뉴클레아제를 인코딩하고 gRNA를 포함하는 RNA 또는 RNA 벡터, 및 공여체 주형을 인코딩하는 DNA 또는 DNA 벡터.

[221]표 5는 본 명세서에 기재된 게놈 편집 시스템의 성분에 대한 다양한 전달 방법을 요약한다. 또한, 목록은 제한적인 것이 아니라 예시적인 것으로 의도된다.

표 5

표 6

전달 벡터/모드	비-분할 세포로의 전달	발현 기간	게놈 통합	전달되는 분자 유형
물리적 (예를 들어, 전기천공, 입자 총, 칼슘 포스페이트 형질감염, 세포 압축 또는 압착)	가능	일시적	불가능	핵산 및 단백질
바이러스	레트로바이러스	불가능	안정적	가능
				RNA

	렌티바이러스	가능	안정적	변형에 따라 가능/불가능	RNA
	아데노바이러스	가능	일시적	불가능	DNA
	아데노-연관 바이러스 (AAV)	가능	안정적	불가능	DNA
	백시니아 바이러스	가능	매우 일시적	불가능	DNA
	단순 포진 바이러스	가능	안정적	불가능	DNA
비-바이러스	양이온 리포솜	가능	일시적	전달되는 물질에 의존	핵산 및 단백질
	고분자 나노입자	가능	일시적	전달되는 물질에 의존	핵산 및 단백질
생물학적 비-바이러스 전달 비하클	약화된 박테리아	가능	일시적	불가능	핵산
	조작된 박테리오파지	가능	일시적	불가능	핵산
	포유동물 바이러스-유사 입자	가능	일시적	불가능	핵산
	생물학적 리포솜: 파열 적혈구 및 엑소솜	가능	일시적	불가능	핵산

[0246] 게놈 편집 시스템의 핵산-기반 전달

[222] 본 발명에 따른 게놈 편집 시스템의 다양한 구성요소를 인코딩하는 핵산은 공지된 방법에 의해 또는 본 명세서에 기재된 바와 같이 대상체에게 투여되거나 세포로 전달될 수 있다. 예를 들어, RNA-가이드 뉴클레아제-인코딩 및/또는 gRNA-인코딩 DNA, 뿐만 아니라 공여체 주형 핵산은, 예를 들어, 벡터 (예를 들어, 바이러스 또는 비-바이러스 벡터), 비-벡터 기반의 방법 (예를 들어, 네이키드 DNA 또는 DNA 복합체 사용), 또는 이의 조합에 의해 전달될 수 있다.

[223] 게놈 편집 시스템의 요소를 인코딩하는 핵산은 1, 2, 3, 4개 이상의 gRNA를 인코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 핵산은 제1 및 제2 gRNA 분자 둘 모두를 인코딩할 수 있으며, 예를 들어, 제2 gRNA는 CBLB 유전자의 제2 표적 서열에 상보적인 제2 표적화 도메인을 가진다. 본 명세서에 개시된 핵산은 CBLB 유전자의 제3 표적 서열에 상보적인 제3 표적화 도메인을 가지는 제3 gRNA 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 핵산 조성물은 CBLB 유전자의 제4 표적 서열에 상보적인 제4 표적화 도메인을 가지는 본 명세서에 기재된 제4 gRNA 분자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[224] 게놈 편집 시스템 또는 이의 성분을 인코딩하는 핵산은 네이키드 DNA 또는 RNA로서, 예를 들어 형질감염 또는 전기천공을 통해 직접적으로 세포로 전달될 수 있거나, 또는 표적 세포 (예를 들어, 적혈구, HSC)에 의해 흡수를 촉진하는 분자 (예를 들어, N-아세틸갈락토사민)에 컨쥬게이트될 수 있다. **표 5**에 요약된 벡터와 같은 핵산 벡터가 또한 사용될 수 있다.

[225] 핵산 벡터는 게놈 편집 시스템 성분, 예컨대 RNA-가이드 뉴클레아제, gRNA 및/또는 공여체 주형을 인코딩하는 하나 이상의 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 또한 단백질을 코딩하는 서열과 결합 (예를 들어, 삽입 또는 융합된)되거나, 신호 펩타이드 (예를 들어, 핵 정위, 핵소체 정위, 또는 미토콘드리아 정위)를 인코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 하나의 예시로서, 핵산 벡터는 하나 이상의 핵 정위 서열 (예를 들어, SV40의 핵 정위 서열)을 포함하는 Cas9 코딩 서열을 포함할 수 있다.

[226] 핵산 벡터는 또한 임의의 적합한 개수의 조절/제어 요소, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 인트론, 폴리아데닐화 신호, Kozak 컨센스 서열, 또는 내부 리솜 진입 부위 (IRES)를 포함할 수 있다. 이러한 요소는 기술 분야 내 잘 알려져 있으며, [Cotta-Ramusino]에 기재되어 있다.

[227] 본 발명에 따른 핵산 벡터는 재조합 바이러스 벡터를 포함한다. 예시적인 바이러스 벡터가 **표 5**에 제시되며, 추가적인 적합한 바이러스 벡터 및 이들의 사용 및 생산이 [Cotta-Ramusino]에 기재되어 있다. 특정 구현예에서, 벡터는 바이러스 벡터, 예를 들어, 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 또는 렌티바이러스 (LV) 벡터이다. 기술 분야 내 공지된 다른 바이러스 벡터가 또한 사용될 수 있다. 또한, 바이러스 입자는 게놈 편집 시스템 성분을 핵산 및/또는 펩타이드 형태로 전달하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, “빈” 바이러스 입자가 임의의 적합한 한 화물을 함유하도록 조립될 수 있다. 바이러스 벡터 및 바이러스 입자는 또한 표적 조직 특이성을 변경시키기

위해 표적화 리간드를 포함하도록 조작될 수 있다.

[0253] [228]바이러스 벡터 이외에, 비-바이러스 벡터는 본 발명에 따른 게놈 편집 시스템을 인코딩하는 핵산을 전달하는데 사용될 수 있다. 비-바이러스 핵산 벡터의 하나의 중요한 카테고리는 유기 또는 무기일 수 있는 나노 입자이다. 나노 입자는 기술 분야 내 잘 알려져 있으며, [Cotta-Ramusino]에 요약되어 있다. 임의의 적합한 나노 입자 설계가 게놈 편집 시스템 성분 또는 이러한 성분을 인코딩하는 핵산을 전달하기 위해 사용될 수 있다. 예를 들어, 유기 (예를 들어, 지질 및/또는 중합체) 나노 입자는 본 발명의 특정 구현예에서 전달 비히클로 사용하기에 적합할 수 있다. 나노 입자 제제 및/또는 유전자 전달에 사용하기 위한 예시적인 지질이 표 6에 나타나며, 표 7은 유전자 전달 및/또는 나노 입자 제제에 사용하기 위한 예시적인 중합체를 열거한다.

[0254] 표 6: 유전자 전달에 사용되는 지질

표 7

지질	약어	특징
1,2-다이올레일-sn-글리세로-3-포스파티딜콜린	DOPC	헬퍼
1,2-다이올레일-sn-글리세로-3-포스파티딜에탄올아민	DOPE	헬퍼
콜레스테롤		헬퍼
N-[1-(2,3-다이올레일옥시)프로필]N,N,N'-트라이메틸암모늄 클로라이드	DOTMA	양이온성
1,2-다이올레일옥시-3-트라이메틸암모늄-프로페인	DOTAP	양이온성
다이옥타데실아미도글리실스페르민	DOGS	양이온성
N-(3-아미노프로필)-N,N'-다이메틸-2,3-비스(도데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드	GAP-DLRIE	양이온성
세틸트라이메틸암모늄 브로마이드	CTAB	양이온성
6-라우록시헥실 오르티니네이트	LHON	양이온성
1-(2,3-다이올레일옥시프로필)-2,4,6-트라이메틸피리디늄	20c	양이온성
2,3-다이올레일옥시-N-[2(스페르민카복사아미도-에틸)-N,N'-다이메틸-1-프로판아미늄 트라이플루오로아세테이트	DOSPA	양이온성
1,2-다이올레일-3-트라이메틸암모늄-프로페인	DOPA	양이온성
N-(2-하이드록시에틸)-N,N'-다이메틸-2,3-비스(테트라데실옥시)-1-프로판아미늄 브로마이드	MDRIE	양이온성
다이미리스토옥시프로필 다이메틸 하이드록시에틸 암모늄 브로마이드	DMRI	양이온성
3β N-(N', N'-다이메틸아미노에탄)-카바모일]콜레스테롤	DC-Chol	양이온성
비스-구아니듐-트렌-콜레스테롤	BGTC	양이온성
1,3-다이올레일옥시-2-(6-카복시-스페르밀)-프로필아미드	DOSPER	양이온성
다이메틸옥타데실암모늄 브로마이드	DDAB	양이온성
다이옥타데실아미도글리실스페르민	DSL	양이온성
rac-[(2,3-다이옥타데실옥시프로필)(2-하이드록시에틸)]-다이메틸암모늄 클로라이드	CLIP-1	양이온성
rac-[2(2,3-다이헥사데실옥시프로필-옥시메틸옥시)에틸]트라이메틸암모늄 브로마이드	CLIP-6	양이온성
에틸다이미리스토일포스파티딜콜린	EDMPC	양이온성
1,2-다이스테아릴옥시-N,N'-다이메틸-3-아미노프로판	DSDMA	양이온성
1,2-다이미리스토일-트라이메틸암모늄 프로페인	DMTAP	양이온성
0,0'-다이미리스틸-N-리실 아스파테이트	DMKE	양이온성
1,2-다이스테아로일-sn-글리세로-3-에틸포스포콜린	DSEPC	양이온성
N-팔미토일 D-에리트로-스핑고실 카바모일-스페르민	CCS	양이온성
N-t-뷰틸-MO-테트라데실-3-테트라데실아미노프로피온아미딘	diC14-아미딘	양이온성
옥타데세노일옥시[에틸-2-헵타데세닐-3 하이드록시에틸] 이미다졸리늄 클로라이드	DOTIM	양이온성
M-콜레스테릴옥시카보닐-3,7-다이아자노난-1,9-다이아민	CDAN	양이온성
2-(3-[비스(3-아미노-프로필)-아미노]프로필아미노)-N-다이테트라데실카바모일-에틸-아세트아마이드	RPR209120	양이온성
1,2- 다이리놀레일-3-다이메틸아미노프로판	DLinDMA	양이온성
2,2-다이리놀레일-4-다이메틸아미노에틸-[1,3]-다이옥솔란	DLin-KC2-DMA	양이온성
다이리놀레일- 메틸-4-다이메틸아미노뷰티레이트	DLin-MC3-DMA	양이온성

[0256] 표 7: 유전자 전달에 사용되는 중합체

표 8

[0257]

중합체	약어
폴리(에틸렌)글리콜	PEG
폴리에틸렌이민	PEI
다이싸이오비스(석신이미딜프로피오네이트)	DSP
다이메틸-3,3'-다이싸이오비스프로피온이미데이트	DTBP
폴리(에틸렌 이민) 비스카바메이트	PEIC
폴리(L-라이신)	PLL
히스티딘 변형된 PLL	
폴리(N-비닐프롤리돈)	PVP
폴리(프로필렌이민)	PPI
폴리(아미도아민)	PAMAM
폴리(아미도 에틸렌이민)	SS-PAEI
트라이에틸렌테트라아민	TETA
폴리(β 아미노에스터)	
폴리(4-하이드록시-L-프롤린 에스터)	PHP
폴리(알릴아민)	
폴리(α -[4-아미노뷰틸]-L-글리콜산)	PAGA
폴리(D,L-락틱-co-글리콜산)	PLGA
폴리(N-에틸-4-비닐피리디늄 브로마이드)	
폴리(포스파젠)	PPZ
폴리(포스포에스터)	PPE
폴리(포스포르아미데이트)	PPA
폴리(N-2-하이드록시프로필메타크릴아마이드)	pHPMA
폴리(2-(다이메틸아미노)에틸 메타크릴레이트)	pDMAEMA
폴리(2-아미노에틸 프로필렌 포스페이트)	PPE-EA
키토산	
갈락토실화 키토산	
N-도다실화 키토산	
히스톤	
콜라겐	
텍스트란-스페르민	D-SPM

[0258]

[229]비-바이러스 벡터는 선택적으로 흡수를 개선하고 및/또는 특정 세포 유형을 선별적으로 표적화하기 위해 표적화 변형을 포함한다. 이러한 표적화 변형으로는 예를 들어, 세포 특이적 항원, 단클론성 항체, 단일 사슬 항체, 압타머, 중합체, 당 (예를 들어, N-아세틸갈락토사민 (GalNAc)), 및 세포 침투 펩타이드를 포함할 수 있다. 이러한 벡터는 또한 선택적으로 융합생성 및 엔도솜-탈안정화 펩타이드/중합체를 사용하고, 산-촉발 입체구조적 변화 (예를 들어, 화물의 엔도솜 탈출 가속화)를 겪고, 및/또는, 예를 들어, 세포의 격박에서의 방출을 위해 자극-절단성 중합체의 혼입한다. 예를 들어, 환원성 세포 환경에서 절단되는 이황화-기반 양이온성 중합체가 사용될 수 있다.

[0259]

[230]특정 구현예에서, 게놈 편집 시스템의 성분, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 RNA-가이드 뉴클레아제 성분 및/또는 gRNA 성분이 아닌, 하나 이상의 핵산 분자 (예를 들어, DNA 분자)가 전달된다. 특정 구현예에서, 핵산 분자는 게놈 편집 시스템의 하나 이상의 성분과 동시에 전달된다. 특정 구현예에서, 핵산 분자는 게놈 편집 시스템의 하나 이상의 성분이 전달되기 이전 또는 이후 (예를 들어, 미만 약 30 분, 1 시간, 2 시간, 3 시간, 6 시간, 9 시간, 12 시간, 1 일, 2 일, 3 일, 1 주, 2 주, 또는 4 주 미만)에 전달된다. 특정 구현예에서, 핵산 분자는 게놈 편집 시스템의 하나 이상의 성분, 예를 들어, RNA-가이드 뉴클레아제 성분 및/또는 gRNA 성분이 전달되는 수단과 상이한 수단에 의해 전달된다. 핵산 분자는 본 명세서에 임의의 기재된 전달 방법에 의해 전달될 수 있다. 예를 들어, 핵산 분자는 바이러스 벡터, 예를 들어, 통합-결핍 렌티바이러스에 의해 전달될 수 있고, RNA-가이드 뉴클레아제 분자 성분 및/또는 gRNA 성분은 전기천공에 의해 전달되어, 예를 들어, 핵산 (예를 들어, DNA)에 의해 야기되는 독성이 감소될 수 있다. 특정 구현예에서, 핵산 분자 치료학적 단백질, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 단백질을 인코딩한다. 특정 구현예에서, 핵산 분자는 RNA 분자, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 RNA 분자를 인코딩한다.

- [0260] 게놈 편집 시스템 구성요소를 인코딩하는 RNP 및/또는 RNA의 전달
- [0261] [231]RNP (gRNA 및 RNA-가이드 뉴클레아제의 복합체, 즉, 리보핵단백질 복합체) 및/또는 RNA 인코딩 RNA-가이드 뉴클레아제 및/또는 gRNA는 기술 분야 내 공지된 방법에 의해 세포 내로 전달되거나 대상체에게 투여될 수 있으며, 이러한 방법 중 일부는 [Cotta-Ramusino]에 기재되어 있다. 시험관 내에서, RNA-가이드 뉴클레아제-인코딩 및/또는 gRNA-인코딩 RNA는, 예를 들어, 미량주사법, 전기천공법, 일시적 세포 압축 또는 압착에 의해 전달될 수 있다 (예를 들어, [Lee 2012] 참조). 지질-매개 형질감염, 펩타이드-매개 전달, GalNAC- 또는 다른 컨쥬게이트-매개 전달, 및 이의 조합이 또한 전달 시험관 내 및 생체 내 전달을 위해 사용될 수 있다.
- [0262] [232] 시험관 내에서, 전기천공법을 통한 전달은 카트리지, 챔버 또는 큐벳에서, 공여체 주형 핵산 분자의 존재 또는 부재하에, 세포와 RNA 인코딩 RNA-가이드 뉴클레아제 및/또는 gRNA를 혼합하고, 정해진 기간 및 진폭의 하나 이상의 전기적 임펄스를 적용하는 것을 포함한다. 전기천공법을 위한 시스템 및 프로토콜은 기술 분야 내 공지되어 있으며, 임의의 적합한 전기천공 도구 및/또는 프로토콜은 본 발명의 다양한 구현예와 관련하여 사용될 수 있다.
- [0263] [233]특정 구현예에서, 본 발명의 RNP 복합체, 예를 들어, RNP 억제학적 조성물은 다음을 위해 사용될 수 있다: (1) T 세포 증식을 개선; (2) T 세포 생존을 개선; 및/또는 (3) T 세포 기능을 개선. 예를 들어, 별개의 gRNA를 포함하는 2개 이상의 RNP 복합체는 세포, 예를 들어 T 세포에서 CBLB 유전자 발현을 변경하기 위해 동시에 또는 순차적으로 사용될 수 있지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 이러한 RNP 복합체는 별개의 CBLB 유전자 서열을 표적화하는 별개의 gRNA를 포함할 수 있다. RNP 복합체는 특정 경우에 파손 이벤트, 예를 들어 이중 가닥 또는 단일 가닥 파손을 유도할 수 있다. 예를 들어, RNP 복합체는 표적 핵산에서 이중 가닥 파손을 형성하는 효소 활성 Cas9 (eaCas9) 분자 또는 표적 핵산에서 단일 가닥 파괴를 형성하는 eaCas9 분자 (예를 들어, 니카제 분자)를 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 이중-니카제 RNP 전략은 2개의 오프셋 단일 가닥 파손을 형성하도록 사용되어, 결과적으로, 돌출부 (예를 들어, 5' 돌출부)를 가지는 단일 이중 가닥 파손을 형성할 수 있다.
- [0264] 투여 경로
- [0265] [234]게놈 편집 시스템, 또는 이러한 시스템을 사용하여 변경 또는 조작된 세포는 임의의 적합한 방식 또는 경로에 의해, 국부적으로든 또는 전신적으로든 대상체에게 투여될 수 있다. 전신 투여 방식은 경구 및 비경구 경로를 포함한다. 비경구 경로는 예를 들어 정맥 내, 골수 내, 근육 내, 근육 내, 경피 내, 피하, 비강 내 및 복강 내 경로를 포함한다. 전신 투여되는 성분은 예를 들어 HSC, 조혈모 줄기/ 전구 세포, 또는 적혈구 전구체 또는 전구체 세포를 표적으로하도록 변형되거나 제제화될 수 있다.
- [0266] [235]국소 투여 방식은, 예를 들어, 골수 내로의 골수 내 주사 또는 골수 공간으로의 대퇴 내 주사, 및 문맥으로의 주입을 포함한다. 특정 구현예에서, (전신적 접근과 비교하여) 상당히 적은 양의 성분은, 전신적으로 (예를 들어, 정맥으로) 투여될 때와 비교하여 국소적으로 (예를 들어, 골수로 직접) 투여될 때 효과를 발휘할 수 있다. 국소 투여 방식은 치료적 유효량의 성분이 전신 투여될 때 발생할 수 있는 잠재적 독성 부작용의 발생을 감소시키거나 제거할 수 있다.
- [0267] [236]투여는 주기적 볼루스 (예를 들어, 정맥 내) 또는 내부 저장소로부터 또는 외부 저장소 (예를 들어, 정맥 내 백(bag) 또는 이식가능한 펌프)로부터 연속 주입으로서 제공될 수 있다. 성분은 예를 들어 지속적 방출 약물 전달 장치로부터 연속 방출에 의해 국소적으로 투여될 수 있다.
- [0268] [237]또한, 성분은 장기간에 걸쳐 방출되도록 제제화될 수 있다. 방출 시스템은 생분해성 물질의 매트릭스 또는 확산에 의해 혼입된 성분을 방출하는 물질을 포함할 수 있다. 성분은 방출 시스템 내에 동종으로 또는 이종으로 분포될 수 있다. 다양한 방출 시스템이 유용할 수 있지만, 적절한 시스템의 선택은 특정 적용에 필요한 방출 속도에 의존할 것이다. 비-분해성 및 분해성 방출 시스템 모두 사용될 수 있다. 적합한 방출 시스템은 중합체 및 중합체 매트릭스, 비-중합체 매트릭스, 또는 무기 및 유기 부형제 및 희석제, 예컨대 탄산 칼슘 및 당 (예를 들어, 트레할로스)을 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. 방출 시스템은 자연적이거나 합성적일 수 있다. 그러나, 합성 방출 시스템은 일반적으로 보다 신뢰성 있고, 재현성이 높으며, 보다 명확한 방출 프로파일을 생성하기 때문에 바람직하다. 방출 시스템 재료는 상이한 분자량을 갖는 성분이 재료를 통한 확산 또는 이의 분해에 의해 방출되도록 선택될 수 있다.
- [0269] [238]대표적인 합성의, 생분해성 중합체로는 예를 들어 다음을 포함한다: 폴리아마이드 예컨대 폴리(아미노산) 및 폴리(펩타이드); 폴리(락탄산), 폴리에스터 예컨대 폴리(글리콜산), 폴리(락탄산-co-글리콜산) 및 폴리(카프로락톤); 폴리(무수물); 폴리옥소에스터; 폴리카보네이트; 및 이의 화학적 유도체 (치환, 화학적 그룹 예를

들어 알킬, 알킬렌의 첨가, 하이드록실화, 산화 및 당업자에 의해 일상적으로 수행되는 다른 변형), 이의 공중합체 및 혼합물. 대표적인 합성의, 비-생분해성 중합체로는, 예를 들어 다음을 포함한다: 폴리에터 에컨대 폴리(에틸렌 옥사이드), 폴리(에틸렌 글리콜), 및 폴리(테트라메틸렌 옥사이드); 비닐 중합체-폴리아크릴레이트 및 폴리메타크릴레이트 에컨대 메틸, 에틸, 다른 알킬, 하이드록시에틸 메타크릴레이트, 아크릴산 및 메타크릴산, 및 기타 에컨대 폴리(비닐 알코올), 폴리(비닐 피롤리돈), 및 폴리(비닐 아세테이트); 폴리(우레탄); 셀룰로스 및 이의 유도체 에컨대 알킬, 하이드록시알킬, 에터, 에스터, 나이트로셀룰로스, 및 다양한 셀룰로스 아세테이트; 폴리실록산; 및 이의 임의의 화학적 유도체 (치환, 화학적 그룹, 예를 들어, 알킬, 알킬렌의 첨가, 하이드록실화, 산화, 및 당업자에 의해 일상적으로 수행되는 다른 변형), 이의 공중합체 및 혼합물.

[0270] [239]폴리(락타이드-co-글리콜라이드) 미소 구체(microsphere)가 또한 사용될 수 있다. 전형적으로, 미소 구체는 중공 구체를 형성하도록 구조화된 락트산 및 글리콜산의 중합체로 구성된다. 구체는 직경이 대략 15 내지 30 마이크론일 수 있고, 본 명세서에 기재된 성분로 로딩될 수 있다.

[0271] 성분의 다중모드 또는 차등 전달

[0272] [240]당업자는 본 발명의 관점에서, 본 명세서에 개시된 게놈 편집 시스템의 상이한 성분이 함께 또는 개별적으로 그리고 동시적으로 또는 비동시적으로 전달될 수 있다는 것을 이해할 것이다. 게놈 편집 시스템 성분의 개별적 및/또는 비동기적 전달은 게놈 편집 시스템의 기능에 대한 시간적 또는 공간적 제어를 제공하고, 이들의 활동에 의해 야기되는 특정 효과를 제한하기 위해 특히 바람직할 수 있다.

[0273] [241]본 명세서에 사용되는 상이한 또는 차등적 방식은 대상 성분 분자, 예를 들어 RNA-가이드 뉴클레아제 분자, gRNA, 주형 핵산 또는 페이로드에 상이한 약력학적 또는 약동학적 특성을 부여하는 전달 방식을 지칭한다. 예를 들어, 전달 방식은 예를 들어 선택된 구획, 조직 또는 기관에서 상이한 조직 분포, 상이한 반감기 또는 상이한 시간적 분포를 초래할 수 있다.

[0274] [242]일부 전달 방식, 예를 들어, 세포에서 또는 세포의 후대에서 지속되는 핵산 벡터에 의한 전달, 예를 들어, 자율 복제 또는 세포 핵산으로의 삽입에 의한 전달은 성분의 더욱 지속적인 발현 및 존재를 초래한다. 예시로 바이러스, 예를 들어, AAV 또는 렌티바이러스, 전달을 포함한다.

[0275] [243]예시로서, 게놈 편집 시스템의 성분, 예를 들어, RNA-가이드 뉴클레아제 및 gRNA는, 신체 또는 특정 구획, 조직 또는 기관에서 결과적인 반감기 또는 전달되는 성분의 지속성 측면에서 상이한 방식으로 전달될 수 있다. 특정 구현예에서, gRNA는 이러한 방식에 의해 전달될 수 있다. RNA-가이드 뉴클레아제 분자 성분은, 신체 또는 특정 구획 또는 조직 또는 기관에 대해 지속성이 낮거나 덜 노출되는 방식으로 전달될 수 있다.

[0276] [244]보다 일반적으로, 특정 구현예에서, 제1 전달 방식은 제1 성분을 전달하도록 사용되고, 제2 전달 방식은 제2 성분을 전달하도록 사용된다. 제1 전달 방식은 제1 약력학적 또는 약동학적 특성을 부여한다. 제1 약력학적 특성은, 예를 들어, 성분, 또는 성분을 인코딩하는 핵산의 신체, 구획, 조직 또는 기관 내 분포, 지속성, 또는 노출일 수 있다. 제2 전달 방식은 제2 약력학적 또는 약동학적 특성을 부여한다. 제2 약력학적 특성은, 예를 들어, 성분, 또는 성분을 인코딩하는 핵산의 신체, 구획, 조직 또는 기관 내 분포, 지속성, 또는 노출일 수 있다.

[0277] [245]특정 구현예에서, 제1 약력학적 또는 약동학적 특성, 예를 들어 분포, 지속성 또는 노출은 제2 약력학적 또는 약동학적 특성보다 더욱 제한된다.

[0278] [246]특정 구현예에서, 제1 전달 방식은 예를 들어, 약력학적 또는 약동학적 특성, 예를 들어, 분포, 지속성 또는 노출을 최적화, 예를 들어 최소화하도록 선택된다.

[0279] [247]특정 구현예에서, 제2 전달 방식은 예를 들어, 약력학적 또는 약동학적 특성, 예를 들어, 분포, 지속성 또는 노출을 최적화, 예를 들어 최대화하도록 선택된다.

[0280] [248]특정 구현예에서, 제1 전달 방식은 비교적 지속적인 요소, 예를 들어, 핵산, 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 예를 들어, AAV 또는 렌티바이러스의 사용을 포함한다. 이러한 벡터는 비교적 영구적이므로, 이로부터 전사된 생성물은 비교적 영구적이다.

[0281] [249]특정 구현예에서, 제2 전달 방식은 비교적 일시적인 요소, 예를 들어, RNA 또는 단백질을 포함한다.

[0282] [250]특정 구현예에서, 제1 성분은 gRNA를 포함하고, 전달 방식은 비교적 영구적이며, 예를 들어 gRNA는 플라스미드 또는 바이러스 벡터, 예를 들어 AAV 또는 렌티바이러스로부터 전사된다. 상기 유전자의 전사는 유전자가 단백질 생성물을 인코딩하지 않고, gRNA가 단리에서 작용할 수 없기 때문에 생리학적 결과가 거의 없다. 제2 성

분, 즉 RNA-가이드 뉴클레아제 분자는 일시적인 방식으로, 예를 들어 mRNA 또는 단백질로서 전달되어, 완전한 RNA-가이드 뉴클레아제 분자/gRNA 복합체가 단기간 동안에만 존재하고 활성화되도록 보장한다.

- [0283] [251] 또한, 성분은 상이한 분자 형태로 또는 서로 상보적인 상이한 전달 벡터와 함께 전달되어, 안전성 및 조직 특이성을 향상시킬 수 있다.
- [0284] [252] 차등 전달 방식을 사용하면 성능, 안전성 및/또는 효능을 향상시킬 수 있으며, 예를 들어, 최종적인 표적-외 변형의 가능성이 감소될 수 있다. 박테리아-유래 Cas 효소로부터의 펩타이드가 MHC 분자에 의해 세포의 표면에 디스플레이되므로, 덜 지속성 모드에 의한 면역원성 성분, 예를 들어 Cas9 분자의 전달은 면역원성을 감소시킬 수 있다. 2-파트 전달 시스템은 이러한 단점을 완화할 수 있다.
- [0285] [253] 차등 전달 방식은 상이하지만, 중첩되는 표적 영역에 성분을 전달하도록 사용될 수 있다. 형성 활성 복합체는 표적 영역의 중첩 외부에서 최소화된다. 이에 따라, 특정 구현예에서, 제1 성분, 예를 들어 gRNA는 제1 공간, 예를 들어 조직, 분포를 초래하는 제1 전달 방식에 의해 전달된다. 제2 성분, 예를 들어 RNA-가이드 뉴클레아제 분자는 제2 공간, 예를 들어 조직, 분포를 초래하는 제2 전달 방식에 의해 전달된다. 특정 구현예에서, 제1 방식은 리포좀, 나노입자, 예를 들어, 중합체성 나노입자, 및 핵산, 예를 들어, 바이러스 벡터로부터 선택된 제1 요소를 포함한다. 제2 방식은 그룹으로부터 선택된 제2 요소를 포함한다. 특정 구현예에서, 제1 전달 방식은 제1 표적화 요소, 예를 들어, 세포 특이적 수용체 또는 항체를 포함하며, 제2 전달 방식은 상기 요소를 포함하지 않는다. 특정 구현예에서, 제2 전달 방식은 제2 표적화 요소, 예를 들어, 제2 세포 특이적 수용체 또는 제2 항체를 포함한다.
- [0286] [254] RNA-가이드 뉴클레아제 분자가 바이러스 전달 벡터, 리포좀 또는 중합체성 나노입자로 전달될 때, 단일 조직만을 표적화하는 것이 바람직할 수 있는 경우, 다중 조직으로의 전달 및 치료적 활성화에 대한 가능성이 존재한다. 2-파트 전달 시스템은 이러한 문제를 해결하고 조직 특이성을 향상시킬 수 있다. gRNA 및 RNA-가이드 뉴클레아제 분자가 구별가능하지만 중첩되는 조직 친화성(tissue tropism)을 가지는 별개의 전달 비히클에 패키징된 경우, 완전한 기능적 복합체는 두 벡터에 의해 표적화된 조직에서만 형성된다.
- [0287] 유전자 조작된 세포 및 재조합 수용체를 발현하는 세포의 제조 방법
- [0288] [255] 본 명세서에는 입양 세포 요법, 예를 들어, 입양 면역요법을 위한 세포, 및 이러한 세포를 제조 또는 생성하는 방법이 제공된다. 세포는 면역 세포 예컨대 T 세포이다. 세포는 일반적으로 하나 이상의 유전자 조작된 핵산 또는 이의 산물을 도입함으로써 조작된다. 이러한 산물에는 유전자 조작된 항원 수용체, 예컨대 조작된 T 세포 수용체 (TCRs) 및 기능적 비-TCR 항원 수용체, 예컨대 활성화, 자극, 및 공동자극 CAR을 포함하는 키메라 항원 수용체 (CAR), 및 이의 조합이 있다. 일부 구현예에서, 세포는 또한, 유전자 조작된 항원 수용체를 인코딩하는 핵산과 함께, CBLB를 인코딩하는 유전자를 파괴할 수 있는 시제 (예를 들어, Cas9/gRNA RNP)와 함께, 동시에 또는 순차적으로 도입된다.
- [0289] [256] 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, T 세포)는 재조합 수용체 및/또는 시제 (예를 들어, Cas9/gRNA RNP)를 인코딩하는 핵산 분자를 도입하기 이전, 도입하는 동안 및/또는 도입 이후에 인큐베이션 또는 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, T 세포)는 재조합 수용체를 인코딩하는 핵산 분자의 도입하기 이전, 도입하는 동안 또는 도입 이후에, 예컨대 재조합 수용체를 인코딩하는 바이러스 벡터 (예를 들어, 렌티바이러스 벡터)의 세포로의 형질도입 이전, 동안 또는 이후에 인큐베이션 또는 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 (예를 들어, T 세포)는 시제 (예를 들어, Cas9/gRNA RNP)의 도입 이전, 동안 또는 이후에, 예컨대 세포와 시제를 접촉시키기 이전, 동안 또는 이후에, 또는 예를 들어, 전기천공법을 통해 세포 내로 시제를 전달하기 이전, 동안 또는 이후에 인큐베이션 또는 배양될 수 있다. 일부 구현예에서, 배양은 재조합 수용체를 코딩하는 핵산 분자를 도입하고 시제, 예를 들어 Cas9/gRNA RNP를 도입하는 것과 관련될 수 있다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 사이토카인, 예컨대 IL-2, IL-7 또는 IL-15의 존재하에, 또는 세포, 예컨대 항-CD3/항-CD28 항체의 증식 및/또는 활성화를 유도할 수 있는 자극제 또는 활성화제의 존재하에 일어날 수 있다.
- [0290] [257] 일부 구현예에서, 상기 방법은 세포를 자극제 또는 활성화제 (예를 들어, 항-CD3/항-CD28 항체)로 활성화 또는 자극한 뒤, 재조합 수용체 및 시제, 예를 들어, Cas9/gRNA RNP를 인코딩하는 핵산 분자를 도입하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 인큐베이션은 또한 사이토카인, 예컨대 IL-2 (예를 들어, 1 U/mL 내지 500 U/mL, 예컨대 10 U/mL 내지 200 U/mL, 예를 들어 적어도 또는 약 50 U/mL 또는 100 U/mL), IL-7 (예를 들어 0.5 ng/mL 내지 50 ng/mL, 예컨대 1 ng/mL 내지 20 ng/mL, 예를 들어, 적어도 또는 약 5 ng/mL 또는 10 ng/mL) 또는 IL-15 (예를 들어, 0.1 ng/mL 내지 50 ng/mL, 예컨대 0.5 ng/mL 내지 25 ng/mL, 예를 들어, 적어도 또는 약

1 ng/mL 또는 5 ng/mL)의 존재하에 수행될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 6 시간 내지 96 시간 동안, 예컨대 24-48 시간 또는 24-36 시간 동안 인큐베이션된 후 재조합 수용체를 인코딩하는 핵산 분자를 (예를 들어, 형질도입을 통해) 도입한다.

[0291] 유전자 조작을 위한 세포 및 세포의 제조

[0292] [258]CBLB 폴리펩타이드를 인코딩하는 CBLB 유전자의 유전자 편집을 위해 특이적인 항원 및 시제 (예를 들어, Cas9/gRNA RNP)에 결합하는 재조합 수용체가 매우 다양한 세포 내로 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 수용체는 조작되고 및/또는 CBLB 표적 유전자는 생체 외에서 조작되고, 생성된 유전자 조작된 세포가 대상체에 투여된다. 생체 외 조작을 위한 표적 세포의 공급원은, 예를 들어, 대상의 혈액, 대상의 체대혈 또는 대상의 골수를 포함할 수 있다. 생체 외 조작을 위한 표적 세포의 공급원은 또한 이종의 공여자 혈액, 체대혈 또는 골수를 포함할 수 있다.

[0293] [259] 일부 구현예에서, 세포, 예를 들어, 조작된 세포는 진핵 세포, 예컨대 포유동물 세포, 예를 들어, 인간 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 혈액, 골수, 림프 또는 림프성 기관으로부터 유래된 것으로, 면역계, 예컨대 선천성 면역 또는 적응 면역의 세포들이고, 예를 들어 골수 또는 림프성 세포, 예컨대 림프구, 통상 T 세포 및/또는 NK 세포이다. 다른 예시적인 세포는 줄기 세포, 예컨대 다분화능 (multipotent) 및 유도 만능 줄기 세포 (iPSC)를 비롯한 및 만능 (pluripotent) 줄기 세포를 포함한다. 일부 양태에서, 세포는 인간 세포이다. 치료되는 대상체와 관련하여, 세포는 동종이게 및/또는 자가일 수 있다. 세포는 전형적으로 1차 세포, 예컨대 대상체로부터 직접 단리된 세포 및/또는 대상체로부터 단리되어 냉동된 세포이다.

[0294] [260]일부 구현예에서, 표적 세포는 T 세포, 예를 들어, CD8+ T 세포 (예를 들어, CD8+ 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포, 또는 이펙터 기억 T 세포), CD4+ T 세포 (예컨대, CD4+ 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포, 또는 이펙터 기억 T 세포), 자연 살해 T 세포 (NKT 세포), 조절 T 세포 (Treg), 줄기 세포 기억 T 세포, 림프성 전구 세포 조혈모 줄기 세포, 자연 살해 세포 (NK 세포) 또는 수지상 세포이다. 일부 구현예에서, 세포는 세포는 단핵구 또는 과립구, 예컨대 골수 세포, 대식세포, 호중구, 수지상 세포, 비만 세포, 호산구 및/또는 호염기구이다. 하나의 구현예에서, 표적 세포는 유도 만능 줄기 (iPS) 세포 또는 iPS 세포로부터 유도된 세포, 예를 들어, 대상체로부터 생성되고, 하나 이상의 표적 유전자의 발현을 변경 (예를 들어, 돌연변이를 유도) 또는 조작하기 위해 조작되고, 예를 들어, T 세포, 예를 들어, CD8+ T 세포 (예를 들어, CD8+ 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포, 또는 이펙터 기억 T 세포), CD4+ T 세포 (예컨대, CD4+ 나이브 T 세포, 중추 기억 T 세포, 또는 이펙터 기억 T 세포), 줄기 세포 기억 T 세포, 림프성 전구 세포 또는 조혈모 줄기 세포 내로 분화된 iPS 세포이다.

[0295] [261]일부 구현예에서, 세포는 예컨대 기능, 활성화 상태, 성숙도, 분화 능력, 팽창, 재순환, 부위, 및/또는 지속 능력, 항원 특이성, 항원 수용체의 유형, 특정 장기 또는 구획에서의 존재, 마커 또는 사이토카인 분비 프로파일 및/또는 분화 정도에 의해 정의된 것과 같은, T 세포 또는 전체 T 세포 집단, CD3+, CD4+ 세포, CD8+ 세포 및 이러한의 서브 집단과 같은 기타 세포 유형의 하나 이상의 서브세트를 포함한다.

[0296] [262]T 세포 및/또는 CD4+ 및/또는 CD8+ T 세포의 서브 유형 및 서브 집단 중에는 나이브 T (TN) 세포, 이펙터 T 세포 (TEFF), 기억 T 세포 및 이러한의 서브 유형, 예컨대 줄기 세포 기억 T (TSCM), 중심 기억 T (TCM), 이펙터 기억 T (TEM) 또는 최종 분화된 이펙터 기억 T 세포, 중앙-침윤성 림프구 (TIL), 미성숙 T 세포, 성숙 T 세포, 헬퍼 T 세포, 세포 독성 T 세포, 점막 관련 불변 T (MAIT) 세포, 자연 발생 및 적응 조절 T (Treg) 세포, TH1 세포, TH2 세포, TH3 세포, TH17 세포, TH9 세포, TH22 세포 등의 T 보조 세포, 여포성 헬퍼 T 세포, 알파/베타 T 세포 및 델타/감마 T 세포가 포함된다.

[0297] [263]일부 구현예에서, 상기 방법은 대상체로부터 세포의 단리, 세포의 제조, 가공, 배양, 및/또는 조작을 포함한다. 일부 구현예에서, 조작된 세포의 제조는 하나 이상의 배양 단계 및/또는 제조 단계를 포함한다. 기재된 바와 같은 조작을 위한 세포는 샘플, 예컨대 대상체로부터 획득되거나 대상체로부터 유래된 생물학적 샘플로부터 단리될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포가 단리되는 대상체는 질환 또는 병태를 가지거나 세포 요법을 필요로 하는, 또는 세포 요법을 받을 개체이다. 일부 구현예에서, 대상체는 특정 치료적 개입, 예컨대 세포가 단리, 가공 및/또는 조작되는 입양 세포 요법을 필요로 하는 인간이다.

[0298] [264]따라서, 일부 구현예에서 세포는 1차 세포, 예컨대 1차 인간 세포이다. 샘플은 조직, 유체 및 상기 대상으로부터 직접 채취한 기타 샘플뿐만 아니라 하나 이상의 가공 단계, 예컨대 분리, 원심 분리, 유전자 조작 (예컨대, 바이러스 벡터를 이용한 형질도입), 세척 및/또는 배양 단계에서 초래된 샘플을 포함한다. 생물학적 샘플은 생물학적 공급원 또는 가공된 샘플에서 직접 수득한 샘플일 수 있다. 생물학적 샘플은 혈액, 혈장, 혈청, 뇌

척수액, 혈액, 소변 및 땀 등의 체액, 이로부터 유래된 가공 샘플을 비롯한 조직 및 기관 샘플을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

- [0299] [265] 일부 양태에서, 세포가 유래되거나 단리되는 샘플은 혈액 또는 혈액 유래 샘플이거나, 또는 성분채집술 (apheresis) 또는 백혈구성분채집술 (leukapheresis)로부터 유래된다. 예시적인 샘플은 전혈, 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC), 백혈구, 골수, 흉선, 조직 생검, 종양, 백혈병, 림프종, 림프절, 장 관련 림프 조직, 점막 관련 림프 조직, 비장, 기타 림프 조직, 간, 폐, 위, 장, 결장, 신장, 췌장, 유방, 뼈, 전립선, 자궁 경부, 고환, 난소, 편도선 또는 기타 기관 및/또는 이로부터 유래된 세포를 포함한다. 샘플은 세포 요법, 예컨대, 입양 세포 요법의 맥락에서, 자가 및 동종이계 공급원으로부터 유래된 샘플을 포함한다.
- [0300] [266] 일부 구현예에서, 세포는 세포주 (예컨대, T 세포주)로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 세포는 이종 공급원, 예컨대 마우스, 래트, 비인간 영장류 또는 돼지로부터 획득된다.
- [0301] [267] 일부 구현예에서, 세포의 단리는 하나 이상의 제조 및/또는 비친화성에 기초한 세포 분리 단계를 포함한다. 일부 예시에서, 세포는 세척되고, 원심 분리되며 및/또는 하나 이상의 시약 존재하에서, 예컨대 원치 않는 성분을 제거하고 원하는 성분을 풍부하게 하고, 특정 시약에 민감한 세포를 용해 또는 제거하기 위하여 인큐베이션된다. 일부 예시에서, 세포는 하나 이상의 성질, 예컨대 밀도, 부착 성질, 크기, 민감성 및/또는 특정 성분에 대한 내성에 기초하여 분리된다.
- [0302] [268] 일부 예시에서, 환자의 순환 혈액의 세포는, 예컨대 성분채집술 또는 백혈구성분채집술에 의해 획득된다. 일부 양태에서, 샘플은 T 세포, 단핵구, 과립구, B 세포, 기타 유핵 백혈구, 적혈구 및/또는 혈소판을 비롯한 림프구를 포함하고, 일부 양태에서 적혈구 및 혈소판 이외의 세포를 함유한다.
- [0303] [269] 일부 구현예에서, 상기 대상체로부터 채취된 혈액 세포는, 예컨대 혈장 부분을 제거하고 세포를 후속 공정 단계를 위해 적절한 완충액 또는 배지에 위치시키기 위하여 세척된다. 일부 구현예에서, 세포는 인산 완충 식염수 (PBS)로 세척된다. 일부 구현예에서, 상기 세척 용액은 칼슘 및/또는 마그네슘 및/또는 다수의 또는 모든 2가 양이온을 가지지 않는다. 일부 양태에서, 세척 단계는 반-자동 "폴로우-스루" 원심 분리기 (예컨대, Cobe 2991 세포 프로세서, Baxter)를 제조사의 지침에 따라 수행된다. 일부 양태에서, 세척 단계는 상기 제조사의 지침에 따른 접선 유동 여과 (tangential flow filtration; TFF)에 의해 수행된다. 일부 구현예에서, 세포는 세척 후 다양한 생체 적합성 완충액, 예를 들어 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ -프리 PBS에 재현탁된다. 특정 구현예에서, 혈액 세포 샘플의 성분은 제거되고 세포는 배양 배지에 직접 재현탁된다.
- [0304] [270] 일부 구현예에서, 상기 방법은 적혈구를 용해시켜 퍼콜 (Percoll) 또는 피콜 (Ficoll) 구배를 통해 원심 분리하여 말초 혈액으로부터 백혈구를 제조하는 것과 같은 밀도-기반 세포 분리 방법을 포함한다.
- [0305] [271] 일부 구현예에서, 단리 방법은 표면 마커, 예컨대 표면 단백질, 세포 내 마커 또는 핵산과 같은 하나 이상의 특정 분자의 세포에서의 발현 또는 존재에 기초한 상이한 세포 유형의 분리를 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 마커에 기초한 임의의 공지된 분리 방법이 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 분리는 친화성- 또는 면역친화성- 기반 분리이다. 예를 들어, 일부 양태에서, 상기 단리는 세포의 발현 또는 하나 이상의 마커, 전형적으로 세포 표면 마커의 발현 수준에 기초한 세포 및 세포 집단의 분리를 포함하며, 예컨대 상기 분리는 이러한 마커에 특이적으로 결합하는 항체 또는 결합 파트너와의 배양에 의해 이루어지고, 뒤이어 일반적으로 세척 단계 및 상기 항체 또는 결합 파트너에 결합된 세포를 상기 항체 또는 결합 파트너에 결합되지 않은 세포로부터 분리하는 단계를 거친다.
- [0306] [272] 이러한 분리 단계는 시약에 결합된 세포가 추가적인 사용을 위해 유지된 양성 선별, 및/또는 항체 또는 결합 파트너에 결합되지 않은 세포가 유지된 음성 선별에 기초할 수 있다. 일부 예시에서, 두 분획은 모두 추가적인 사용을 위해 유지된다. 일부 양태에서, 음성 선별은 이종 집단에서 세포 유형을 특이적으로 식별하는 이용 가능한 항체가 없는 경우에 특히 유용하여, 분리는 원하는 집단 이외의 세포에 의해 발현되는 마커에 기초하여 수행되는 것이 가장 바람직하다.
- [0307] [273] 분리는 특정 마커를 발현하는 특정 세포 집단 또는 세포의 100% 농축 또는 제거를 초래할 필요는 없다. 예를 들어, 마커를 발현하는 세포와 같은 특정 유형의 세포에 대한 양성 선별 또는 농축은, 이러한 세포의 수 또는 퍼센트를 증가시키는 것을 의미하지만, 마커를 발현하지 않는 세포의 완전한 부재를 초래할 필요는 없다. 마찬가지로, 마커를 발현하는 세포와 같은 특정 유형의 세포의 음성 선별, 제거 또는 고갈은, 이러한 세포의 수 또는 퍼센트를 감소시키는 것을 의미하지만, 이러한 모든 세포의 완전한 제거를 초래할 필요는 없다.

- [0308] [274]일부 예시에서, 하나의 단계로부터 양성 또는 음성으로 선택된 분획이 연속된 양성 선별 또는 음성선택과 같은 또 다른 분리 단계를 거치는 분리 단계의 다중 라운드가 수행된다. 일부 예시에서, 단일 분리 단계는 예컨대 세포를 다수의 항체 또는 결합 파트너와 함께 배양함으로써 다중 마커를 동시에 발현하는 세포를 고갈시킬 수 있으며, 각각은 음성선택에 대해 표적화된 마커에 특이적이다. 마찬가지로, 여러 세포 유형은, 세포를 다양한 세포 유형에서 발현되는 다수의 항체 또는 결합 파트너와 함께 배양함으로써 동시에 양성 선택될 수 있다.
- [0309] [275]일부 구현예에서, 하나 이상의 T 세포 집단은 하나 이상의 특정 마커, 예컨대 표면 마커에 대해 양성인 (marker⁺) 또는 높은 수준 (marker^{high})으로 발현하는, 또는 하나 이상의 마커에 대해 음성인 (marker⁻) 또는 상대적으로 낮은 수준 (marker^{low})으로 발현하는 세포에 대해 농축되거나, 또는 고갈된다. 예를 들어, 일부 양태에서, 하나 이상의 표면 마커, 예를 들어, CD28⁺, CD62L⁺, CCR7⁺, CD27⁺, CD127⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD45RA⁺, 및/또는 CD45RO⁺ T 세포의 높은 수준을 발현하는 세포 또는 양성 세포와 같은 T 세포의 특정 서브 집단은 양성 선별 또는 음성선택 기술에 의해 분리된다. 일부 경우에, 이러한 마커는 특정 집단의 T 세포 (예컨대 비-기억 세포)에서 부재하거나 상대적으로 낮은 수준으로 발현되지만, 특정 다른 집단의 T 세포 (예컨대 기억 세포)에는 존재하거나 상대적으로 높은 수준으로 발현되는 마커이다. 하나의 구현예에서, 세포 (예컨대 CD8⁺ 세포 또는 T 세포, 예를 들어, CD3⁺ 세포)는 CD45RO, CCR7, CD28, CD27, CD44, CD127, 및/또는 CD62L에 대해 양성이거나 높은 표면 수준으로 발현하는 세포에 대해 농축 (즉, 양성 선별)되고 및/또는 CD45RA에 대해 양성이거나 높은 표면 수준으로 발현하는 세포에 대해 고갈 (예를 들어, 음성 선별)된다. 일부 구현예에서, 세포는 CD122, CD95, CD25, CD27, 및/또는 IL7-R α (CD127)에 대해 양성이거나 이를 높은 수준으로 발현하는 세포에 대해 농축되거나 고갈된다. 일부 예시에서, CD8⁺ T 세포는 CD45RO (또는 CD45RA에 대해 음성인) 및 CD62L에 대해 양성인 세포에 대해 농축된다.
- [0310] [276]예를 들어, CD3⁺, CD28⁺ T 세포는 CD3/CD28 컨쥬게이션 자성 비드 (예를 들어, DYNABEADS®M-450 CD3/CD28 T Cell Expander)를 사용하여 양성 선별될 수 있다.
- [0311] [277]일부 구현예에서, T 세포는 비-T 세포, 예컨대 B 세포, 단핵구 또는 CD14 등의 기타 백혈구에서 발현된 마커의 음성선택에 의해 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) 샘플로부터 분리된다. 일부 양태에서, CD4⁺ 또는 CD8⁺ 선별 단계는 CD4⁺ 헬퍼 및 CD8⁺ 세포독성 T 세포를 분리하도록 사용된다. 이러한 CD4⁺ 및 CD8⁺ 집단은 하나 이상의 나이브, 기억 및/또는 이펙터 T 세포 서브 집단에서 발현 또는 상대적으로 높은 정도로 발현된 마커에 대한 양성 선별 또는 음성선택에 의해 서브 집단으로 추가로 분류될 수 있다.
- [0312] [278]일부 구현예에서, 세포는 예컨대 상기 각각의 서브 집단과 관련된 표면 항원에 기초한 양성 선별 또는 음성 선별에 의하여, 나이브, 중심 기억, 이펙터 기억 및/또는 중추 기억 줄기 세포가 더욱 풍부해지거나 고갈된다. 일부 구현예에서, 중심 기억 T (T_{CM}) 세포의 농축은 예컨대 투여 이후의 장기 생존, 팽창 및/또는 생착을 개선시키기 위한 효능을 증가시키기 위해 수행되며, 이는 일부 양태에서 이러한 서브 집단에서 특히 강력하다. (Terakura et al. (2012) Blood.1:72-82; Wang et al. (2012) J Immunother. 35(9):689-701를 참조한다.) 일부 구현예에서, T_{CM}-농축 CD8⁺ T 세포 및 CD4⁺ T 세포의 결합은 효능 또는 반응을 더욱 증강시킨다.
- [0313] [279]구현예에서, 기억 T 세포는 CD8⁺ 말초 혈액 림프구의 CD62L⁺ 및 CD62L⁻ 서브세트 모두에 존재한다. PBMC는 예컨대 항-CD8 및 항-CD62L 항체를 사용하여, CD62L⁻CD8⁺ 및/또는 CD62L⁺CD8⁺가 풍부해지거나 고갈될 수 있다.
- [0314] [280]일부 구현예에서, CD4⁺ T 세포 집단 및 CD8⁺ T 세포 서브-집단, 예를 들어, 서브-집단이 중추 기억 (TCM) 세포에 대해 농축된다. 일부 구현예에서, 중심 기억 T (TCM) 세포의 농축은 CD45RO, CD62L, CCR7, CD28, CD3 및/또는 CD127의 양성 또는 높은 표면 발현에 기초하고; 일부 양태에서, 이는 CD45RA 및/또는 그랜자임 B를 발현 또는 고도로 발현하는 세포에 대한 음성 선별에 기초한다. 일부 양태에서, T_{CM} 세포가 풍부한 CD8⁺ 집단의 단리는 CD4, CD14, CD45RA를 발현하는 세포의 고갈에 의해, 및 CD62L을 발현하는 세포에 대한 양성 선별 또는 농축에 의해 수행된다. 하나의 양태에서, CD14 및 CD45RA의 발현에 기초한 음성 선별 및 CD62L에 기초한 양성 선별을 받는, CD4 발현에 기초하여 선택된 세포의 음성 분획으로 시작하여 중심 기억 T (T_{CM}) 세포의 농축이 수행된다. 이러한 선별은, 일부 양태에서는 동시에 수행되며, 또 다른 양태에서는 어떠한 순서로든 순차적으로 수행된다. 일부 양태에서, CD8⁺ 세포 집단 또는 부분 집단을 제조하는데 사용된 동일한 CD4 발현-기반의 선택 단

계는 또한 $CD4^+$ 세포 집단 또는 서브 집단을 생성하는데에도 사용되어, $CD4$ -기반 분리로부터의 양성 및 음성 분획은 모두 경우에 따라 하나 이상의 추가적인 양성 또는 음성 선별 단계에 이어서, 상기 방법의 후속 단계에서 유지되고 사용된다.

- [0315] [281]특정 예시에서, PBMC 샘플 또는 다른 백혈구 샘플에는 $CD4^+$ 세포의 선택이 이루어지는데, 여기서는 음성 및 양성 분획 모두가 보유된다. 그런 다음, 음성 분획은 $CD14$ 및 $CD45RA$ 또는 $CD19$ 의 발현에 기초하여 음성 선별을 수행하고, $CD62L$ 또는 $CCR7$ 과 같은 중추 기억 T 세포의 마커 특성에 기초하여 양성 선별을 수행하며, 여기서 양성 및 음성 선별은 임의의 순서로 수행된다.
- [0316] [282] $CD4^+$ 보조 T 세포는 세포 표면 항원을 가지는 세포 집단을 동정함으로써 나이브, 중심 기억 및 이펙터 세포로 분류된다. $CD4^+$ 림프구는 표준 방법으로 수득될 수 있다. 일부 구현예에서, 나이브 $CD4^+$ T 림프구는 $CD45RO^-$, $CD45RA^+$, $CD62L^+$, $CD4^+$ T 세포이다. 일부 구현예에서, 중심 기억 $CD4^+$ 세포는 $CD62L^+$ 및 $CD45RO^+$ 이다. 일부 구현예에서, 이펙터 $CD4^+$ 세포는 $CD62L^-$ 및 $CD45RO^-$ 이다.
- [0317] [283]하나의 실시예에서, 음성 선택에 의해 $CD4^+$ 세포들을 농축시키기 위하여, 단일클론성 항체 콕테일은 통상적으로 $CD14$, $CD20$, $CD11b$, $CD16$, $HLA-DR$, 및 $CD8$ 에 대한 항체를 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 결합 파트너는 자성 비드 또는 상자성 비드와 같은 고체 지지체 또는 매트릭스에 결합되어 양성 및/또는 음성 선별을 위한 세포의 분리를 허용한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 세포 및 세포 집단은 면역 자기성 (또는 친화성 자기성) 분리 기법 (reviewed in *Methods in Molecular Medicine*, vol. 58: *Metastasis Research Protocols*, Vol. 2: *Cell Behavior In Vitro and In Vivo*, p 17-25 Edited by: S. A. Brooks and U. Schumacher ©Humana Press Inc., Totowa, NJ에서 검토됨)을 사용하여 분리 또는 단리된다.
- [0318] [284]일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작에 선행하여 또는 이와 관련하여 인큐베이션 및/또는 배양된다. 인큐베이션 단계는 배양, 자극, 활성화 및/또는 증식을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물 또는 세포는 자극 조건 또는 자극제의 존재하에서 인큐베이션된다. 이러한 조건은 집단에서 세포의 증식, 팽창, 활성화 및/또는 생존을 유도하고, 항원 노출을 모방하며, 및/또는 재조합 항원 수용체의 도입과 같은 유전자 조작을 위해 세포를 준비하도록 고안된 것들을 포함한다.
- [0319] [285]조건은 하나 이상의 특정 배지, 온도, 산소 함량, 이산화탄소 함량, 시간, 시제 (예컨대, 영양제, 아미노산, 항생제, 이온 및/또는 자극 인자 (예컨대, 사이토카인, 케모카인, 항원, 결합 파트너, 융합 단백질, 재조합 가용성 수용체 및 세포를 활성화하거나 또는 자극하도록 고안된 임의의 기타 시제))를 포함할 수 있다.
- [0320] [286]일부 구현예에서, 자극 조건 또는 시제는 TCR 복합체의 세포 내 신호 전달 도메인을 통해 신호전달을 유도할 수 있는 하나 이상의 시제, 예컨대 리간드를 포함한다. 일부 양태에서, 시제는 T 세포에서 TCR/CD3 세포 내 신호 전달 캐스케이드를 작동시키거나 개시한다. 이러한 시제는 항체, 예컨대 TCR 성분 및/또는 공동 자극 수용체에 특이적인 (예컨대, 항-CD3, 항-CD28), 비드와 같은 고체 지지체에 결합된 항체, 및/또는 하나 이상의 사이토카인을 포함할 수 있다. 선택적으로, 팽창 방법은 항-CD3 및/또는 항-CD28 항체를 배양 배지에 (예컨대, 적어도 약 0.5 ng/ml의 농도로) 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 자극제는 IL-2 및/또는 IL-15, 예컨대, 적어도 약 10 units/mL 농도의 IL-2를 포함한다.
- [0321] [287]일부 양태에서, 인큐베이션 단계는 Riddell et al의 미국 특허 77, Klebanoff et al. (2012) *J Immunother.* 35(9): 651-660, Terakura et al. (2012) *Blood*.1:72-82, 및/또는 Wang et al. (2012) *J Immunother.* 35(9):689-701에 기재된 기법에 따라 수행된다.
- [0322] [288]일부 구현예에서, T 세포는 비-분할 PBMC와 같은 배양-개시 조성물 피더 세포에 첨가함으로써 (예컨대, 결과적으로 생성된 세포 집단은 팽창될 초기 집단 내 각각의 T 림프구에 대하여 적어도 약 5, 10, 20 또는 40개 이상의 PBMC 피더 세포를 함유함); 및 배양물을 배양함으로써 (예컨대, T 세포의 수를 팽창시키기 위해 충분한 시간 동안) 팽창될 수 있다. 일부 양태에서, 비-분할 피더 세포는 감마선 조사된 PBMC 피더 세포를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, PBMC는 세포 분열을 방지하기 위해 약 3000 내지 3600 rads 범위의 감마선으로 조사된다. 일부 양태에서, 피더 세포는 T 세포 집단의 첨가에 선행하여 배양 배지에 첨가된다.
- [0323] [289]일부 구현예에서, 자극 조건은 인간 T 림프구의 성장에 적합한 온도, 예컨대, 적어도 약 25 °C, 일반적으로 약 30 °C, 및 일반적으로 약 37 °C를 포함한다. 선택적으로, 인큐베이션 단계는 피더 세포로서 비-분할 EBV-형질전환 림프아구 세포 (LCL)를 첨가하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. LCL은 약 6000 내지 10,000 rads 범

위의 감마선으로 조사될 수 있다. LCL 피더 세포는 일부 양태에서 임의의 적합한 양으로, 예컨대 초기 T 림프구에 대한 LCL 피더 세포의 비율이 적어도 약 10:1인 양으로 제공된다.

[0324] [290] 일부 구현예에서, 제조 방법은 단리, 인큐베이션, 배양 및/또는 조작 전 또는 후에, 세포를 동결, 예컨대 동결 보존하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 동결 및 후속 해동 단계는 과립구 및 어느 정도는 세포 집단 내의 단핵구를 제거한다. 일부 구현예에서, 예컨대, 혈장 및 혈소판을 제거하기 위한 세척 단계 후에, 세포는 동결 용액에서 현탁된다. 임의의 다양한 공지된 동결 용액 및 파라미터가 경우에 따라 사용될 수 있다. 한 예시로는 20% DMSO 및 8% 인간 혈청 알부민 (HSA) 또는 기타 적합한 세포 동결 배지를 포함하는 PBS를 사용하는 것을 포함한다. 그런 다음 DMSO와 HSA의 최종 농도가 각각 10%와 4%가 되도록 배지와 1:1로 희석된다. 이어서, 세포는 일반적으로 분당 1°의 속도에서 -80 °C로 동결되고 액체 질소 저장 탱크의 증기상에 저장된다.

[0325] [291] 일부 구현예에서, 상기 방법은 동결보존 이전 또는 이후에, 동일한 환자에게 조작된 세포 재도입시키는 것을 포함한다.

[0326] 재조합 수용체

[0327] [292] 일부 구현예에서, 세포는 유전자 조작을 통해 도입된 재조합 수용체를 인코딩하는 하나 이상의 핵산, 및 이러한 핵산의 유전자 조작 산물을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 재조합 수용체를 인코딩하는 핵산 분자를 (예를 들어, 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터의 형질도입을 통해) 세포 내로 도입함으로써 제조 또는 생성된다. 일부 구현예에서, 핵산은 이중성이며, 즉 통상적으로 세포 또는 세포로부터 수득한 샘플, 예컨대 조작된 세포 및/또는 그러한 세포가 유래된 유기체에서 일반적으로 발견되지 않는 기타 유기체 또는 세포로부터 수득한 샘플에 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 핵산은 자연적으로 발생하지 않으며, 예컨대 자연에서 발견되지 않는 핵산은 여러 상이한 세포 유형으로부터의 다양한 도메인을 코딩하는 핵산의 키메라 조합물을 포함한다.

[0328] [293] 일부 구현예에서, 표적 세포는 하나 이상의 표적 항원, 예컨대 하나 이상의 종양 항원에 결합하도록 변경되었다. 일부 구현예에서, 표적 항원은 다음으로부터 선택된다: ROR1, B 세포 성숙화 항원 (BCMA), 탄산 무수화 효소 9 (CAIX), tEGFR, Her2/neu (수용체 타이로신 키나제 erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 메소텔린, CEA, 및 간염 B 표면 항원, 항-염산 수용체, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, 상피 당단백 2 (EPG-2), 상피 당단백 40 (EPG-40), EPHA2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, erbB 이합체, EGFR vIII, 염산 결합 단백질 (FBP), FCRL5, FCRH5, 태아 아세틸콜린 수용체, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-알파, IL-13R-알파2, 키나제 삽입 도메인 수용체 (kdr), 카파 경쇄, Lewis Y, L1-세포 접합 분자 (L1-CAM), 흑색종-관련 항원 (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, 우선적으로 발현되는 흑색종 항원 (PRAME), 서바이빈, TAG72, B7-H6, IL-13 수용체 알파 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, 염산 수용체-a, CD44v6, CD44v7/8, avb6 인테그린, 8H9, NCAM, VEGF 수용체, 5T4, 태아 AchR, NKG2D 리간드, CD44v6, 이중 항원, 암-고환 항원, 메소텔린, 쥐과 CMV, 뮤신 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, 종양 태아성 항원, ROR1, TAG72, VEGF-R2, 암배아 항원 (CEA), Her2/neu, 에스트로젠 수용체, 프로게스테론 수용체, 에프린B2, CD123, c-Met, GD-2, O-아세틸화 GD2 (OGD2), CE7, Wilms 종양 1 (WT-1), 사이클린, 사이클린 A2, CCL-1, CD138, 및 병원체-특이적 항원 및 보편적인 표지와 연관된 항원. 일부 구현예에서, 표적 세포는 다음의 종양 항원 중 하나 이상에, 예를 들어, TCR 또는 CAR에 의해 결합하도록 변경되었다. 종양 항원은 다음을 포함할 수 있지만, 이에 제한되지 않는다: AD034, AKT1, BRAP, CAGE, CDX2, CLP, CT-7, CT8/HOM-TES-85, cTAGE-1, Fibulin-1, HAGE, HCA587/MAGE-C2, hCAP-G, HCE661, HER2/neu, HLA-Cw, HOM-HD-21/Galectin9, HOM-MEEL-40/SSX2, HOM-RCC-3.1.3/CAXII, HOXA7, HOXB6, Hu, HUB1, KM-HN-3, KM-KN-1, KOC1, KOC2, KOC3, KOC3, LAGE-1, MAGE-1, MAGE-4a, MPP11, MSLN, NNP-1, NY-BR-1, NY-BR-62, NY-BR-85, NY-CO-37, NY-CO-38, NY-ESO-1, NY-ESO-5, NY-LU-12, NY-REN-10, NY-REN-19/LKB/STK11, NY-REN-21, NY-REN-26/BCR, NY-REN-3/NY-CO-38, NY-REN-33/SNC6, NY-REN-43, NY-REN-65, NY-REN-9, NY-SAR-35, OGFr, PLU-1, Rab38, RBPJKkappa, RHAMM, SCP1, SCP-1, SSX3, SSX4, SSX5, TOP2A, TOP2B, 또는 티로시나제(Tyrosinase).

[0329] 항원 수용체:

[0330] 키메라 항원 수용체 (CAR)

[0331] [294] 세포는 일반적으로 재조합 수용체, 예컨대 기능적 비-TCR 항원 수용체 (예컨대, 키메라 항원 수용체 (CAR)) 및 형질전환 T 세포 수용체 (TCR) 등의 기타 항원-결합 수용체를 비롯한 항원 수용체를 발현한다. 수용체 중에는 또한 기타 키메라 수용체도 있다.

- [0332] [295]CAR을 비롯한 예시적 항원 수용체, 및 이러한 수용체를 조작하고 세포 내로 도입시키는 방법으로는, 예를 들어, 국제 특허 출원 공보 WO200014257, WO2013126726, WO2012/129514, WO2014031687, WO2013/166321, WO2013/071154, WO2013/123061 미국 특허 출원 US2002131960, US2013287748, US20130149337, 미국 특허 6,451,995, 7,446,190, 8,252,592, , 8,339,645, 8,398,282, 7,446,179, 6,410,319, 7,070,995, 7,265,209, 7,354,762, 7,446,191, 8,324,353, 및 8,479,118, 및 유럽 특허 출원 EP2537416에 기재된 수용체 및 방법, 및/또는 Sadelain et al., Cancer Discov. 2013 April; 3(4): 388-398; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338; Turtle et al., Curr. Opin. Immunol., 2012 October; 24(5): 633-39; Wu et al., Cancer, 2012 March 18(2): 160-75에 개시된 항원 수용체 및 방법을 포함한다. 일부 양태에서, 항원 수용체로는 미국 특허 7,446,190에 개시된 CAR, 및 국제 특허 출원 공보 WO/2014055668 A1에 개시된 수용체를 포함한다. CAR의 예로는 전술한 공보, 예컨대 WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, 미국 특허 7,446,190, 미국 특허 8,389,282, 문헌 [Kochenderfer et al., 2013, Nature Reviews Clinical Oncology, 10, 267-276 (2013); Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; 및 Brentjens et al., Sci Transl Med. 2013 5(177)] 중 어느 하나에 개시된 CAR를 포함한다. 또한 WO2014031687, US 8,339,645, US 7,446,179, US 2013/0149337, 미국 특허 7,446,190, 및 미국 특허 8,389,282를 참조한다. 키메라 수용체, 예컨대 CAR는, 일반적으로 세포 외 항원 결합 도메인, 예컨대 항체 분자의 일부분, 일반적으로 가변 중쇄 (V_H) 영역 및/또는 가변 경쇄 (V_L) 영역 of the 항체, 예를 들어, scFv 항체 단편을 포함한다.
- [0333] [296]일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화된 항원은 폴리펩타이드이다. 일부 구현예에서, 탄수화물 또는 다른 분자이다. 일부 구현예에서, 항원은 정상 세포 또는 비-표적화된 세포 또는 조직과 비교하여, 질환 또는 증상 세포, 예컨대 종양 또는 병원성 세포에서 선택적으로 발현되거나 과발현된다. 다른 구현예에서, 항원은 정상 세포상에서 발현되고 및/또는 조작된 세포상에서 발현된다.
- [0334] [297]수용체에 의해 표적화될 수 있는 항원은 다음을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다: αvβ 인테그린 (αvβ 인테그린), B 세포 성숙화 항원 (BCMA), B7-H6, 탄산 무수화효소 9 (CA9, 또한 CAIX 또는 G250으로도 알려짐), 암-고환 항원, 암/고환 항원 1B (CTAG, 또한 NY-ESO-1 및 LAGE-2으로도 알려짐), 암배아 항원 (CEA), 사이클린, 사이클린 A2, C-C 모티프 케모카인 리간드 1 (CCL-1), CD19, CD20, CD22, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, CD44v6, CD44v7/8, CD123, CD138, CD171, 콘드로이틴 설페이트 프로테오글리칸 4 (CSPG4), 표피 성장 인자 단백질 (EGFR), 절단된 표피 성장 인자 단백질 (tEGFR), III형 표피 성장 인자 수용체 돌연변이 (EGFR vIII), 상피 당단백 2 (EPG-2), 상피 당단백 40 (EPG-40), 에프린 B2, 에프린 수용체 A2 (EPHa2), 에스트로젠 수용체, Fc 수용체 유사 5 (FCRL5; 또한 Fc 수용체 상동체 5 또는 FCRH5로도 알려짐), 태아 아세틸콜린 수용체 (태아 AChR), 염산 결합 단백질 (FBP), 염산 수용체 알파, 태아 아세틸콜린 수용체, 강글리오사이드 GD2, O-아세틸화 GD2 (OGD2), 강글리오사이드 GD3, 당단백 100 (gp100), G 단백질 연결 수용체 5D (GPCR5D), Her2/neu (수용체 티로신 키나아제 erbB2), Her3 (erb-B3), Her4 (erb-B4), erbB 이합체, 인간 고분자량-흑색종-관련 항원 (HMW-MAA), B형 간염 표면 항원, 인간 백혈구 항원 A1 (HLA-A1), 인간 백혈구 항원 A2 (HLA-A2), IL-22 수용체 알파(IL-22Ra), IL-13 수용체 알파 2 (IL-13Ra2), 키나아제 삽입 도메인 수용체 (kdr), 카파 경쇄, L1 세포 접합 분자 (L1CAM), L1-CAM의 CE7 에피토프, 류신 풍부 반복 서열 8 패밀리 구성원 A 함유 (LRRC8A), 루이스 Y, 흑색종-관련 항원 (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, 메소텔린, c-Met, 쥐과 거대세포바이러스 (CMV), 뮤신 1 (MUC1), MUC16, 자연 살해 그룹 2 구성원 D (NKG2D) 리간드, 멜란 A (MART-1), 신경 세포 접합 분자 (NCAM), 종양 태아 항원, 종양에서 우선적으로 발현되는 흑색종 항원 (PRAME), 프로게스테론 수용체, 전립선 특이 항원, 전립선 줄기 세포 항원 (PSCA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), 수용체 티로신 키나아제 유사 오픈 수용체 1 (ROR1), 서바이빈, 영양막 당단백 (TPBG 또한 5T4로도 알려짐), 종양-관련 당단백 72 (TAG72), 혈관 내피 성장 인자 수용체 (VEGFR), 혈관 내피 성장 인자 수용체 2 (VEGFR2), Wilms 종양 1 (WT-1), 및 병원체-특이적 항원.
- [0335] [298]일부 구현예에서, 수용체에 의해 표적화된 항원은 고아 티로신 키나아제 수용체 ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 메소텔린, CEA, 및 B형 간염 표면 항원, 항-염산 수용체, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3, 또는 4, FBP, 태아 아세틸콜린 e 수용체, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-알파, IL-13R-알파2, kdr, 카파 경쇄, 루이스 Y, L1-세포 접합 분자, MAGE-A1, 메소텔린, MUC1, MUC16, PSCA, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, MART-1, gp100, 종양 태아 항원, ROR1, TAG72, VEGF-R2, 암배아 항원 (CEA), 전립선 특이 항원, PSMA, Her2/neu, 에스트로젠 수용체, 프로게스테론 수용체, 에프린 B2, CD123, c-Met, GD-2, 및 MAGE A3, CE7, Wilms 종양 1 (wt-1), 사이클린, 예컨대 사이클린 A1 (CCNA1), 및/또는 비오틴화된 분자, 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체에 의해 발현되는 분자를 포함한다.

- [0336] [299]일부 구현예에서, CAR는 종양 관련 항원, 예를 들어, CD19, CD20, 탄산 무수화효소 IX (CAIX), CD171, CEA, ERBB2, GD2, 알파-엽산 수용체, 루이스 Y 항원, 전립선 특이적 막 항원 (PSMA) 또는 종양 관련 당단백질 72 (TAG72)에 대해 결합 특이성을 가진다.
- [0337] [300]일부 구현예에서, CAR는 병원체-특이 항원에 결합한다. 일부 구현예에서, CAR는 바이러스성 항원 (예컨대, HIV, HCV, HBV 등), 박테리아 항원 및/또는 기생 항원에 특이적이다.
- [0338] [301]키메라 수용체 중에는 키메라 항원 수용체 (CAR)가 있다. 키메라 수용체, 예컨대 CAR는, 일반적으로 세포 외 항원 결합 도메인, 예컨대 항체 분자의 일부분, 일반적으로 가변 중쇄 (V_H) 영역 및/또는 가변 경쇄 (V_L) 영역 of the 항체, 예를 들어, scFv 항체 단편을 포함한다.
- [0339] [302]일부 구현예에서, 재조합 수용체 (예컨대, CAR)의 항체 부분은 면역 글로불린 불변 영역, 예컨대 힌지 영역 (예컨대, IgG4 힌지 영역) 및/또는 CH1/CL 및/또는 Fc 영역의 적어도 일부를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 일부분은, 인간 IgG, 예컨대 IgG4 또는 IgG1이다. 일부 양태에서, 불변 영역의 일부는 항원-인식 성분, 예컨대 scFv와 막관통 도메인 사이의 스페이서 영역으로서 작용한다. 스페이서는 스페이서가 없는 경우와 비교하여, 항원 결합 후 세포의 증가된 반응성을 제공하는 길이의 것일 수 있다. 예시적 스페이서, 예컨대 힌지 영역은 국제 특허 출원 공보 W02014031687에 기술된 힌지 영역을 포함한다. 일부 예시에서, 스페이서는 길이가 약 12개의 아미노산이거나 그 이하이다. 예시적 스페이서는 적어도 약 10 내지 229개의 아미노산, 약 10 내지 200개의 아미노산, 약 10 내지 175개의 아미노산, 약 10내지 150개의 아미노산, 약 10 내지 125개의 아미노산, 약 10 내지 100개의 아미노산, 약 10 내지 75개의 아미노산, 약 10 내지 50개의 아미노산, 약 10 내지 40개의 아미노산, 약 10 내지 30개의 아미노산, 약 10 내지 20개의 아미노산 또는 약 10 내지 15개의 아미노산을 가지는 것들, 및 나열된 범위 중 임의의 중점들 사이의 임의의 정수를 포함하는 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 스페이서 영역은 약 12 개 또는 그 이하의 아미노산, 약 119개 또는 그 이하의 아미노산, 또는 약 229개 또는 그 이하의 아미노산을 가진다. 예시적 스페이서는 IgG4 힌지 단독, CH2 및 CH3 도메인에 연결된 IgG4 힌지, 또는 CH3 도메인에 연결된 IgG4 힌지를 포함한다.
- [0340] [303]예시적인 스페이서로는, 문헌 Hudecek *et al.* (2013) *Clin. Cancer Res.*, 19:3153, 또는 국제 특허 출원 공보 W02014031687에 기재된 스페이서를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열 번호 74에 기재된 서열을 가지며, 서열 번호 73에 기재된 서열에 의해 인코딩된다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열 번호 75에 기재된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열 번호 76에 기재된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 불변 영역 또는 일부분은 IgD의 것이다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열 번호 77에 기재된 서열을 갖는다. 일부 구현예에서, 스페이서는 서열 번호 74, 75, 76 또는 77 중 임의의 서열에 대해 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 가진다.

[0341] 표 8 - 예시적인 스페이서 서열

표 9

서열 번호	서열
73	GAATCTAAGT ACGGACCGCC CTGCCCCCT TGCCCT
74	ESKYGPPCPPCP
75	ESKYGPPCPPCPGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
76	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK
77	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGLAKATTAPATRTNRGGRGEEKKKEKEEKEERETKTPECPSTQPLGVYLLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPVTGGVEEGLLRHNSGSQSQHSRLTLPRSLWAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPAPVKLSLNLASSDPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPQPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDH

- [0343] [304]이러한 항원 인식 도메인은 일반적으로 하나 이상의 세포 내 신호 전달 성분, 예컨대 CAR의 경우 TCR 복합체 등의 항원 수용체 복합체 및/또는 다른 세포 표면 수용체를 통한 신호를 통한 활성화를 모방하는 신호 전달 성분에 연결된다. 이에 따라, 일부 구현예에서, 항원-결합 성분 (예컨대, 항체)은 하나 이상의 막관통 도메인 및 세포 내 신호 전달 도메인에 연결된다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 세포 외 도메인에 융합된다. 한

구현예에서, 수용체 (예컨대, CAR)의 도메인 중 하나에 자연적으로 결합된 막관통 도메인이 사용된다. 일부 경우에서, 막관통 도메인은 동일하거나 상이한 표면 막 단백질들의 막유 도메인들에 이들 도메인들이 결합하지 않도록 하여, 해당 수용체 복합체의 다른 구성원과의 상호작용을 최소화하기 위해 선택되거나 아미노산 치환하여 변형된다.

[0344] [305]일부 구현예에서 막관통 도메인은 천연 또는 합성 공급원으로부터 유도될 수 있다. 천연 공급원인 경우, 도메인은 일부 양태에서 임의의 멤브레인-결합된 또는 막관통 단백질로부터 유도될 수 있다. 막관통 영역은 (즉, 적어도 막관통 영역(들)을 포함하는) T-세포 수용체, CD28, CD3 앵글론, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154의 알파, 베타 또는 제타 사슬로부터 유도된 영역을 포함한다. 특이적으로 막관통 도메인은 일부 구현예에서 합성이다. 일부 양태에서, 합성 막관통 도메인은 주로 소수성 잔기, 예컨대 류신 및 발린을 포함한다. 일부 양태에서, 삼중의 페닐알라닌, 트립토판 및 발린은 합성 막관통 도메인의 각 말단에서 발견될 것이다. 일부 구현예에서, 결합은 링커, 스페이서 및/또는 막관통 도메인(들)에 의한 것이다.

[0345] [306]세포 내 신호 전달 도메인 중에는 천연 항원 수용체를 통한 신호, 공동 자극 수용체와 조합하여 그러한 수용체를 통한 신호 및/또는 공동 자극 수용체만을 통한 신호를 모방하거나 이와 비슷한 것들이 있다. 일부 구현예에서, 짧은 올리고- 또는 폴리펩타이드 링커, 예컨대 글리신 및 세린 (예컨대, 이중 글리신-세린)을 포함하는 것과 같은 길이가 2 내지 10개 사이의 아미노산인 링커가 존재하며, 이는 막관통 도메인과 CAR의 세포질 신호 전달 도메인 사이의 결합을 형성한다.

[0346] [307]수용체, 예를 들어, CAR는 일반적으로 적어도 하나의 세포 내 신호 전달 성분 또는 성분들을 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체는 TCR 복합체의 세포 내 성분, 예컨대 T 세포 활성화 및 세포 독성을 매개하는 TCR CD3 사슬, 예를 들어, CD3 제타 사슬을 포함한다. 이에 따라, 일부 양태에서, 항원-결합 부분은 하나 이상의 세포 신호 전달 모듈에 연결된다. 일부 구현예에서, 세포 신호 전달 모듈은 CD3 막관통 도메인, CD3 세포 내 신호 전달 도메인 및/또는 기타 CD 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 수용체, 예를 들어, CAR는 Fc 수용체 γ CD4, CD25 또는 CD16과 같은 하나 이상의 추가적인 분자의 일부를 추가로 포함한다. 예를 들어, 일부 양태에서, CAR 또는 기타 키메라 수용체는 CD3-제타 (CD3- ζ 또는 Fc 수용체 γ 및 CD8, CD4, CD25 또는 CD16 사이의 키메라 분자를 포함한다.

[0347] [308]일부 구현예에서, CAR 또는 기타 키메라 수용체의 연결시, 수용체의 세포질 도메인 또는 세포 내 신호 전달 도메인은 정상 이펙터 기능 또는 면역 세포, 예를 들어 CAR을 발현하도록 조작된 T 세포의 반응 중 적어도 하나를 활성화시킨다. 예를 들어, 일부 상황에서, CAR은 세포 용해 작용 또는 보조 T 작용, 예컨대 사이토카인 또는 기타 인자의 분비와 같은 T 세포의 기능을 유도한다. 일부 구현예에서, 항원 수용체 성분 또는 공동 자극 분자의 세포 내 신호 전달 도메인의 절단된 부분은, 예컨대 이펙터 기능 신호를 전달하는 경우에 손상되지 않은 면역 자극 사슬 대신에 사용된다. 일부 구현예에서, 예를 들어, 세포 내 도메인 또는 도메인들은, T 세포 수용체 (TCR)의 세포질 서열, 일부 양태에서 또한 자연적인 상황에서 항원 수용체 결합 후 신호 형질전환을 개시하기 위해 이러한 수용체와 협력하여 작용하는 공동-수용체의 서열, 및/또는 이러한 분자의 임의의 유도체 또는 변형체, 및/또는 동일한 기능적 능력을 가지는 임의의 합성 서열을 포함한다.

[0348] [309]천연 TCR의 맥락에서, 연장된 활성화 및 완전한 면역 반응은 일반적으로 TCR 복합체를 통한 신호 수신, 뿐만 아니라 공동자극 신호도 포함한다. 이에 따라, 일부 구현예에서, 2차 또는 공동 자극 신호를 발생시키는 성분이 또한 CAR에 포함된다. 다른 구현예에서, CAR은 공동 자극 신호를 생성하기 위한 성분을 포함하지 않는다. 일부 양태에서, 추가적인 CAR은 동일한 세포에서 발현되며, 2차 또는 공동 자극 신호를 생성하기 위한 성분을 제공한다.

[0349] [310]T 세포 활성화 및 반응은 일부 양태에서 다음의 두 종류의 세포질 신호 전달 서열에 의해 매개되는 것으로 설명된다: TCR을 통해 항원-의존적 1차 신호전달에 따른 신호 특성을 개시하는 서열 (1차 세포질 신호전달 서열), 및 2차 또는 공동 자극 신호를 제공하기 위해 항원-독립적인 방식으로 작용하는 서열 (2차 세포질 신호 전달 서열). 일부 양태에서, CAR은 이러한 신호 전달 성분들 중 하나 또는 둘 모두를 포함한다.

[0350] [311]일부 양태에서, CAR은 TCR 복합체의 1차 활성화를 조절하는 1차 세포질 신호 전달 서열을 포함한다. 자극하는 방식으로 작용하는 1차 세포질 신호 전달 서열은 면역 수용체 타이로신-기반 활성화 모티프 또는 ITAM으로 알려진 신호 전달 모티프를 포함할 수 있다. 1차 세포질 신호전달 서열을 함유하는 ITAM의 예로는 CD3 제타 사슬, Fc γ 감마, CD3 감마, CD3 델타 및 CD3 입실론으로부터 유도된 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR의 세포질 신호 전달 분자(들)은 세포질 신호 전달 도메인, 이의 일부분, 또는 CD3 제타로부터 유래된 서열을 포함한다.

다.

[0351] [312]일부 구현예에서, CAR은 CD28, 4-1BB, OX40, DAP10 및 ICOS와 같은 공동자극 수용체의 신호 전달 도메인 및/또는 막관통 부분을 포함한다. 일부 양태에서, 동일한 CAR은 활성화 및 공동자극 성분을 모두 포함한다.

[0352] [313]일부 구현예에서, 활성화 도메인은 하나의 CAR 내에 포함되는 반면, 공동자극 성분은 또 다른 항원을 인식하는 또 다른 CAR에 의해 제공된다. 일부 구현예에서, CAR은 활성화 또는 자극 CAR, 공동자극 CAR을 포함하며, 모두 동일한 세포상에 발현된다 (W02014/055668 참조). 일부 양태에서, 세포는 하나 이상의 자극 또는 활성화 CAR 및/또는 공동자극 CAR을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 억제 CAR (iCAR, 문헌 Fedorov et al., Sci. Transl. Medicine, 5(215) (December, 2013) 참조), 예컨대 질환-표적화 CAR을 통해 전달된 활성화 신호가 예컨대 오프-표적화 효과를 감소시키기 위해 억제 CAR이 이의 리간드에 결합함으로써 감소하거나 억제되는, 질환 또는 증상과 관련되고 및/또는 질환 또는 증상에 특이적 것 외의 항원을 인식하는 CAR을 추가로 포함한다.

[0353] [314]특정 구현예에서, 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3 (예컨대, CD3- 제타) 세포 내 도메인에 연결된 CD28 막관통 도메인 및 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3 제타 세포 내 도메인에 연결된, 키메라 CD28 및 CD137 (4-1BB, TNFRSF9) 공동자극 도메인을 포함한다.

[0354] [315]일부 구현예에서, CAR은 하나 이상의, 예컨대 2개 이상의 공동자극 도메인 및 활성화 도메인, 예컨대 1차 활성화 도메인을 세포질 부분에 포함한다. 예시적인 CAR은 CD3-제타, CD28 및 4-1BB의 세포 내 성분을 포함한다.

[0355] [316]일부 구현예에서, CAR 또는 기타 항원 수용체는 세포 표면 수용체의 절두된 버전, 예컨대 절두된 EGFR (tEGFR)과 같은 수용체를 발현하기 위한 세포의 형질도입 또는 조작을 확인하는데 사용될 수 있는, 세포 표면 마커 등의 마커를 추가로 포함한다. 일부 양태에서, 마커는 CD34, NGFR 또는 상피 성장 인자 수용체 (예컨대, tEGFR)의 전부 또는 일부 (예컨대, 절두된 형태)를 포함한다. 일부 구현예에서, 마커를 코딩하는 핵산은 절단 가능한 링커 서열, 예컨대 T2A와 같은 링커 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하도록 연결된다. W02014031687를 참조한다. 일부 구현예에서, T2A 리보솜 스위치에 의해 분리된 CAR 및 EGFRt를 발현하는 작제물의 도입은 동일한 작제물로부터 2개의 단백질을 발현할 수 있으며, 따라서 EGFRt가 이러한 작제물을 발현하는 세포를 검출하기 위한 마커로서 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 마커, 및 선택적으로 링커 서열은, 국제 공개 특허 W02014/031687에 기재된 임의의 마커일 수 있다. 예를 들어, 상기 마커는 필요에 따라 T2A 절단 가능 링커 서열과 같은 링커 서열에 연결된, 절단된 EGFR (tEGFR)일 수 있다. 절단형 EGFR (예를 들어 tEGFR)에 대한 예시적인 폴리펩타이드는 서열 번호 51218에 기재된 tEGFR 서열, 또는 서열 번호 79과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다. 예시적인 T2A 링커 서열은 서열 번호 78에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 78과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0356] 표 9 - 절단된 EGFR 및 T2A 서열

표 10

서열 번호	서열
78	LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR
79	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSLINATNIKHFNCTSI SGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKTVK EITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRKQHQGQFLAVSLNITSLGLRSLKEISDGDV IISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQK TKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRCVDKCNLLEGEPREFVENSEC IQHPECLPQAMNITCTGRG PDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCTNGPKIPSIATGMVGALLLLVVALG IGLFM

[0358] [317] 일부 구현예에서, 마커는 T 세포상에서 자연적으로 발견되지 않거나 T 세포의 표면상에서 자연적으로 발견되지 않는 분자, 예컨대 세포 표면 단백질 또는 이의 일부이다.

[0359] [318]일부 구현예에서, 분자는 비-자체 분자, 예컨대 비-자체 단백질이며, 즉 세포가 입양 전달될 숙주의 면역 시스템에 의해 "자체"로 인식되지 않는다.

[0360] [319]일부 구현예에서, 마커는 치료 기능을 제공하지 않으며 및/또는 예컨대, 성공적으로 조작된 세포를 선택하기 위한 유전자 조작용 마커로서 사용되는 것 이외의 효과를 발생시키지 않는다. 기타 구현예에서, 마커는 치료

용 분자, 또는 그렇지 않으면 입양 전달 및 리간드와의 접촉시 세포의 반응을 증강 및/또는 감소시키기 위한 공동자극 또는 면역 체크포인트 분자와 같은, 생체 내에서 접촉하게 될 세포에 대한 리간드 등의 원하는 효과를 발휘하는 분자일 수 있다.

[0361] [320]일부 경우에서, CAR은 제1, 제2 및/또는 제3 세대 CAR로 지칭된다. 일부 양태에서, 제1 세대 CAR은 항원 결합시 단독으로 CD3-사슬 유도 신호를 제공하는 것이고; 일부 양태에서, 제2 세대 CAR은 CD28 또는 CD137 등의 공동자극 수용체로부터의 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하는 것과 같은, 신호 및 공동자극 신호를 제공하는 것이며; 일부 양태에서, 제3 세대 CAR은 상이한 공동자극 수용체의 여러 공동자극 도메인을 포함하는 것이다.

[0362] [321]일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 항체 또는 항체 단편을 포함하는 세포 외 부분을 포함한다. 일부 양태에서, 키메라 항원 수용체는 항체 또는 단편 및 세포 내 신호 전달 도메인을 포함하는 세포 외 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 항체 또는 단편은 scFv를 포함하고, 세포 내 도메인은 ITAM을 포함한다. 일부 양태에서, 세포 내 신호 전달 도메인은 CD3-제타 (CD3 ζ 사슬의 제타 사슬의 신호 전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 세포 외 도메인 및 세포 내 신호 전달 도메인을 연결하는 막관통 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, 막관통 도메인은 CD28의 막관통 부분을 포함한다. 세포 외 도메인 및 막관통 도메인은 직접적으로 또는 간접적으로 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포 외 도메인과 막관통 도메인은 스페이서, 예컨대 본 명세서에 기재된 임의의 스페이서에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는, 예컨대 막관통 도메인 및 세포 내 신호전달 도메인 사이에, T 세포 공동자극 분자의 세포 내 도메인을 함유한다. 일부 양태에서, T 세포 공동자극 분자는 CD28 또는 41BB이다.

[0363] [322]일부 구현예에서, CAR은 항체, 예를 들어, 항체 단편, CD28 또는 이의 기능적 변이체의 막관통 부분이거나 이를 함유하는 막관통 도메인, 및 CD28의 신호전달 부분 또는 이의 기능적 변이체 및 CD3 제타의 신호전달 부분 또는 이의 기능적 변이체를 함유하는 세포 내 신호전달 도메인을 함유한다. 일부 구현예에서, CAR은 항체, 예를 들어, 항체 단편, CD28 또는 이의 기능적 변이체의 막관통 부분이거나 이를 함유하는 막관통 도메인, 및 4-1BB의 신호전달 부분 또는 이의 기능적 변이체 및 CD3 제타의 신호전달 부분 또는 이의 기능적 변이체를 함유하는 세포 내 신호전달 도메인을 함유한다. 이러한 일부 구현예에서, 수용체는 인간 Ig 분자와 같은 Ig 분자의 일부분, 예를 들어 Ig 힌지, 예컨대 IgG4 힌지를 함유하는 스페이서를 더 포함하고, 예컨대 힌지-온리 (hinge-only) 스페이서이다.

[0364] [323]일부 구현예에서, 재조합 수용체, 예를 들어, CAR의 막관통 도메인은 인간 CD28 이의 변이체, 예를 들어, 인간 CD28의 27-아미노산 막관통 도메인 (기탁 번호 P01747.1)이거나, 또는 서열 번호 80에 기재된 아미노산 서열 또는 서열 번호 80과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 서열 동일성을 나타내는 아미노산 서열을 포함하는 막관통 도메인이거나, 또는 이를 포함하고; 일부 구현예에서, 재조합 수용체의 일부를 포함하는 막관통-도메인은 서열 번호 81에 기재된 아미노산 서열 또는 이와 적어도 (약) 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 서열 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함한다.

[0365] 표 10 - 막관통 도메인 서열

표 11

서열 번호	서열
80	FWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV
81	IEVMYPPPYLDNEKSNGTI IHVKGKHLCPSPFPGPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWV

[0367] [324]일부 구현예에서, 키메라 항원 수용체는 T 세포 공동자극 분자의 세포 내 도메인을 포함한다. 일부 양태에서, T 세포 공동자극 분자는 CD28 또는 41BB이다.

[0368] [325]일부 구현예에서, 세포 내 신호전달 도메인은 인간 CD28의 세포 내 공동자극 신호전달 도메인 또는 이의 기능적 변이체 또는 일부, 예컨대 41 아미노산 도메인 이의 및/또는 천연 CD28 단백질의 186-187 위치에서 LL이 GG으로 치환된 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 신호전달 도메인은 서열 번호 82 또는 83에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 82 또는 83과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 도메인은 41BB의 세포 내 공동자극 신호전달 도메인 또는 이의 기능적 변형체 또는 일부, 예컨대 인간 4-1BB (기탁 번호 Q07011.1)의 42-아미노산 세포질 도메인 또는 이의 기능적 변형체 또는 일부, 예컨대 서열 번호 84

에 기재된 서열 또는 서열 번호 84와 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 서열 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0369] 표 11 - 세포 내 신호전달 도메인 서열.

표 12

서열 번호	서열
82	RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
83	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
84	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

[0371] [326] 일부 구현예에서, 세포 외 신호전달 도메인은, 인간 CD3 제타 자극 신호전달 도메인 또는 이의 기능적 변형체, 예컨대 인간 CD3ζ의 동형 3의 112 AA 세포질 도메인 (기탁 번호 P20963.2) 또는 미국 특허 7,446,190 또는 미국 특허 8,911,993에 기재된 CD3 제타 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 내 신호전달 영역은 서열 번호 85, 86 또는 87에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 85, 86 또는 87과 적어도 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 서열 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 포함한다.

[0372] 표 12 - 세포 내 신호전달 도메인 서열.

표 13

서열 번호	서열
85	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
86	RVKFSRSAEPPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
87	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

[0374] [327] 일부 측면에서, 스페이서는 오로지 IgG의 힌지 영역만을 함유하는데, 예컨대 IgG4 또는 IgG1의 힌지 영역만, 예컨대 서열 번호 74에 기재된 힌지 온리 스페이서이다. 다른 구현예에서, 스페이서는 Ig 힌지, 예컨대, C_H2 및/또는 C_H3 도메인에 연결된 IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 Ig 힌지인데, 예컨대, C_H2 및 C_H3 도메인과 연결된 IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 Ig 힌지인데, 예컨대 서열 번호 75에 기재된 것과 같은 C_H3 도메인과만 연결된 IgG4 힌지이다. 일부 구현예에서, 상기 스페이서는 글리신-세린 풍부 서열 또는 유연 링커로 알려진 것과 같은 기타 유연 링커이거나 이를 포함한다.

[0375] [328] 예를 들어, 일부 구현예에서, CAR은 항원, 스페이서, 예컨대 Ig-힌지 함유 스페이서 중 임의의 스페이서, CD28 막관통 도메인, CD28 세포 내 신호전달 도메인 및 CD3 제타 신호 전달 도메인과 특이적으로 결합하는 항체 또는 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, CAR은 항원, 스페이서, 예컨대 Ig-힌지 함유 스페이서 중 임의의 스페이서, CD28 막관통 도메인, CD28 세포 내 신호전달 도메인 및 CD3 제타 신호 전달 도메인과 특이적으로 결합하는 항체 또는 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 이러한 CAR 작제물은 T2A 리보솜 스킵 요소 및/또는 tEGFR 서열, 예를 들어, CAR의 다운스트림을 추가로 포함한다.

[0376] [329] 용어 "폴리펩타이드" 및 "단백질"은 아미노산 잔기의 폴리머를 지칭하기 위해 상호 교환 적으로 사용되며, 최소 길이로 제한되지 않는다. 제공된 수용체 및 기타 폴리펩타이드 (예컨대, 링커 또는 펩타이드)를 비롯한 폴리펩타이드는, 천연 및/또는 비-천연 아미노산 잔기를 비롯한 아미노산 잔기를 포함할 수 있다. 용어는 또한 폴리펩타이드의 발현 후 변형, 예컨대 글리코실화, 시알릴화, 아세틸화 및 인산화 포함한다. 일부 양태에서, 폴리펩타이드는 단백질이 원하는 활성을 유지하는 한, 나이브 또는 천연 서열에 대한 조작을 포함할 수 있다. 이러한 조작은 부위 특이적 돌연변이 유도를 통한 것과 같이 의도적일 수 있고, 또는 단백질을 생산하는 숙주의 돌연변이나 PCR 증폭으로 인한 오류를 통한 것과 같이 우연적일 수 있다.

[0377] T 세포 수용체

[0378] [330] 일부 구현예에서, 유전자 조작된 항원 수용체는 재조합 T 세포 수용체 (TCR) 및/또는 자연 발생 T 세포로

부터 클로닝된 TCR을 포함한다. 이에따라, 일부 구현예에서, 표적 세포는 특이적 T 세포 수용체 (TCR) 유전자 (예를 들어, *TRAC* 및 *TRBC* 유전자)를 포함하도록 변경되었다. TCR 또는 이의 항원-결합 부분은 표적 폴리펩타이드의 펩타이드 에피토프 또는 T 세포 에피토프, 예컨대 종양, 바이러스 또는 자가면역 단백질의 항원을 인식하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, TCR은 종양 관련 항원, 예를 들어, 암배아 항원 (CEA), GP100, T 세포 1 인식 흑색종 항원 (MART1), 흑색종 항원 A3 (MAGEA3), NYESO1 또는 p53에 대해 결합 특이성을 가진다.

[0379] [331]일부 구현예에 있어서, "T 세포 수용체" 또는 "TCR"은 가변 α 및 β 쇄 (각각, TCR α 및 TCR β 로도 알려짐) 또는 가변 γ 및 δ 쇄 (또한, 각각 TCR γ 및 TCR δ 로도 알려짐), 또는 이의 항원-결합 부분을 포함하고, MHC 분자에 결합된 펩타이드에 특이적으로 결합할 수 있는 분자이다. 일부 구현예에서, TCR은 $\alpha\beta$ 형태이다. 통상, $\alpha\beta$ 와 $\gamma\delta$ 형태로 존재하는 TCR은 일반적으로 구조적으로 유사하지만, 이들을 발현하는 T 세포는 별개의 해부학적 위치 또는 기능을 가질 수 있다. 일반적으로, TCR은, 일반적으로 구조적 적합성 복합체 (MHC) 분자에 결합된 항원을 인식하는 역할을 하는 T 세포 (또는 T 림프구)의 표면 상에 발현될 수 있다.

[0380] [332]일부 구현예에서, TCR은 전장 TCR 또는 이의 항원-결합 부분 또는 항원-결합 단편이다. 일부 구현예에서, TCR은 온전한 또는 전장 TCR이고, 예컨대 $\alpha\beta$ 형태 또는 $\gamma\delta$ 형태의 TCR이다. 일부 구현예에서, TCR은 전장 TCR보다 짧지만 MHC 분자에서 결합된 특정 펩타이드에 결합하는 항원-결합 부분이고, 예컨대 MHC-펩타이드 복합체에 결합한다. 일부 경우, TCR의 항원-결합 부분 또는 단편은 전장 또는 온전한 TCR의 구조적 도메인의 일부분만을 함유하지만, 여전히 상기 전장 TCR이 결합하는 MHC-펩타이드 복합체와 같은 펩타이드 에피토프에 결합할 수 있다. 일부 경우, 항원-결합 부분은 특정 MHC-펩타이드 복합체에 결합하기 위한 결합 위치를 형성하기에 충분한, TCR의 가변 도메인, 예컨대 가변 α 사슬 및 가변 β 사슬을 포함한다. 일반적으로, TCR의 가변 사슬들은 펩타이드, MHC 및/또는 MHC-펩타이드 복합체의 인식에 관여하는 상보성 결정 영역을 포함한다 (예컨대, [Draper et al. Clin Cancer Res. 2015 Oct 1; 21(19): 4431-4439], 및 US 20170145070 A1. 참조).

[0381] [333]일부 구현예에서, TCR의 가변 도메인은 추가변 루프 또는 CDR을 함유하는데, 이것이 일반적으로 항원 인식 및 결합 능력 및 특이성에 주로 기여한다. 일부 구현예에서, TCR의 CDR 또는 그들의 조합은 주어진 TCR 분자의 항원-결합 위치의 전부 또는 실질적으로 전부를 형성한다. TCR 사슬의 가변 영역 내 다양한 CDR은 일반적으로 구조 영역 (FR)에 의해 분리되는데, 이는 CDR과 비교하여 TCR 분자 중에서 일반적으로 가변성이 덜 나타난다 (예를 들어, [Jores et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990]; [Chothia et al., EMBO J. 7:3745, 1988] 참조; 또한 [Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003] 참조). 일부 구현예에서, CDR3이 항원 결합 또는 특이성을 책임지는 주 CDR이거나, 또는 항원 인식을 위해 및/또는 펩타이드-MHC 복합체의 가공된 펩타이드 부분과 상호 작용하기 위하여 주어진 TCR 가변 영역상의 3 개의 CDR 중에서 가장 중요하다. 일부 상황에서, 알파 사슬의 CDR1은 특정 항원 펩타이드의 N-말단 부분과 상호 작용할 수 있다. 일부 상황에서, 베타 사슬의 CDR1은 펩타이드의 C-말단 부분과 상호 작용할 수 있다. 일부 상황에서, CDR2는 MHC-펩타이드 복합체의 MHC 부분과의 상호 작용 또는 그의 인식을 책임지는 주 CDR에 가장 크게 기여하거나 그러한 CDR이다. 일부 구현예에서, β 사슬의 가변 영역은 추가적인 초변이 영역을 함유할 수 있는데 (CDR4 또는 HVR4), 이는 일반적으로 항원 인식이 아닌 초항원 (superantigen) 결합과 관련된다 (Kotb (1995) Clinical Microbiology Reviews, 8:411-426).

[0382] [334]일부 구현예에서, TCR은 가변 알파 도메인 (V_α) 및/또는 가변 베타 도메인 (V_β) 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, TCR의 α -사슬 및/또는 β -사슬은 또한 불변 도메인, 막관통 도메인 및/또는 짧은 세포질 꼬리를 함유할 수 있다 (예컨대, [Janeway et al., Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 3rd Ed., Current Biology Publications, p. 4:33, 1997] 참조). 일부 구현예에서, α 사슬 불변 도메인은 TRAC 유전자 (IMGT 명명법)에 의해 인코딩되거나 또는 이의 변형체이다. 일부 구현예에서, β 사슬 불변 영역은 TRBC1 또는 TRBC2 유전자 (IMGT 명명법)에 의해 인코딩되거나 또는 이의 변형체이다. 일부 구현예에서, 불변 도메인은 세포 막에 인접하다. 예를 들어, 일부 경우, 2 개의 사슬에 의해 형성된 TCR의 세포 외 부분은 2 개의 막-근위 불변 도메인 및 2 개의 막-말단 가변 도메인을 포함하는데, 가변 도메인 각각은 CDR을 포함한다.

[0383] [335]TCR의 다양한 도메인 또는 영역을 결정하거나 식별하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. 일부 양태에서, TCR의 잔기는 IMT (International Immunogenetics Information System) 넘버링 시스템에 따라 공지되거나 식별될 수 있다 (예를 들어 www.imgt.org를 참조; 또한, [Lefranc et al. (2003) Developmental and Comparative Immunology, 28:55-77; and The T Cell Factsbook 2nd Edition, Lefranc and LeFranc Academic Press 2001]를 참조한다). 이러한 시스템을 사용하여, 잔기 번호 27-38 사이에 존재하는 아미노산에 해당하는 TCR V_α 사슬 및

/또는 V β 사슬 내의 CDR1 서열, 잔기 번호 56-65 사이에 존재하는 아미노산에 해당하는 TCR V α 사슬 및/또는 V β 사슬 내의 CDR2 서열, 및 잔기 번호 105-117 사이에 존재하는 아미노산에 해당하는 TCR V α 사슬 및/또는 V β 사슬 내의 CDR3 서열.

- [0384] [336] 일부 구현예에서, TCR은 이황화 결합 또는 이황화 결합들에 의해 연결된 2 개의 사슬 α 및 β (또는 선택적으로 γ 및 δ 를 함유하는 이중이량체일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR의 불변 도메인은 시스테인 잔기가 이황화 결합을 형성하여 이에 의해 TCR의 두 사슬을 연결하는 짧은 연결 서열을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 α 및 β 사슬 각각에 추가의 시스테인 잔기를 가질 수 있어서, TCR은 불변 도메인에서 2 개의 이황화 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 불변 도메인 및 가변 도메인 각각은 시스테인 잔기에 의해 형성된 이황화 결합을 함유한다.
- [0385] [337] 일부 구현예에서, 기재된 바와 같이 세포를 조작하기 위한 TCR은 V α , β 사슬의 서열과 같은 공지된 TCR 서열(들)로부터 생성되는 것이며, 이들에 대하여 실질적으로 전장 코딩 서열이 용이하게 이용 가능하다. 세포 공급원으로부터 V 사슬 서열을 포함하는 전장 TCR 서열을 얻는 방법은 잘 알려져 있다. 일부 구현예에서, TCR을 인코딩하는 핵산은 다양한 원으로부터 얻어질 수 있는데, 예컨대 주어진 세포 또는 세포들 내에서 또는 그로부터 분리된 TCR-인코딩 핵산의 중합 효소 연사슬 반응 (PCR) 증폭에 의하여 또는 공개적으로 입수 가능한 TCR DAN 서열을 합성함에 의하여 얻어질 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 생물학적 원으로부터 얻어지는데, 예컨대 세포로부터, 예컨대 T 세포 (예를 들어, 세포 독성 T 세포), T 세포 하이브리도마 또는 다른 공개적으로 입수 가능한 원으로부터 얻어진다. 일부 구현예에서, T 세포는 생체 내 분리된 세포로부터 획득될 수 있다. 일부 구현예에서, T-세포는 배양된 T-세포 하이브리도마 또는 클론일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR 또는 그의 항원-결합 단편은 TCR의 서열의 지식으로부터 합성으로 생성될 수 있다.
- [0386] [338] 일부 구현예에서, 표적 항원 (예컨대, 암 항원)에 대한 고-친화성 T 세포 클론은 동정되고, 환자로부터 분리되며, 세포 내로 도입된다. 일부 구현예에서, 표적 항원에 대한 TCR 클론은 인간 면역 시스템 유전자 (예컨대, 인간 백혈구 항원 시스템, 즉 HLA)로 조작된 형질전환 마우스에서 생성되었다. 예를 들어, 종양 항원은 (예를 들어, Parkhurst et al. (2009) *Clin Cancer Res.* 15:169-180 및 Cohen et al. (2005) *J Immunol.* 175:5799-5808을 참조한다. 일부 구현예에서, 일부 구현예에서, 파지 디스플레이는 표적 항원에 대한 TCR을 분리하는데 사용된다 (예를 들어, Varela-Rohena et al. (2008) *Nat Med.* 14:1390-1395 및 Li (2005) *Nat Biotechnol.* 23:349-354 참조).
- [0387] [339] 일부 구현예에서, TCR 또는 그의 항원-결합 부분은 변형되거나 조작된 것이다. 일부 구현예에서, 설명된 진화 방법이 이용되어, 특정 MHC-펩타이드 복합체에 대한 보다 높은 친화성을 갖는 것과 같은 변화된 특성을 갖는 TCR을 생성시킨다. 일부 구현예에서, 설명된 진화는 디스플레이 방법, 예컨대 비한정적인 예로서 효모 디스플레이 (Holler et al. (2003) *Nat Immunol.* 4, 55-62; Holler et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97, 5387-92), 파지 디스플레이 (Li et al. (2005) *Nat Biotechnol.* 23, 349-54) 또는 T 세포 디스플레이 (Chervin et al. (2008) *J Immunol* 방법, 339, 175-84)에 의하여 달성된다. 일부 구현예에서, 디스플레이 접근법은 공지된, 모체 또는 레퍼런스 TCR을 조작하는 것 또는 변형하는 것을 포함한다. 예를 들어, 일부 경우에, 야생형 TCR은, 그 TCR에서 CDR의 하나 이상의 잔기가 돌연변이되는 돌연변이화된 TCR을 생성하기 위한 주형으로서 사용될 수 있고, 원하는 변경된 성질을 갖는 돌연변이체, 예를 들어 원하는 표적 항원에 대한 더 높은 친화도의 돌연변이체가 선택된다.
- [0388] [340] 기재된 일부 구현예에서, TCR은 도입된 이황화 결합 또는 결합들을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 천연의 이황화 결합은 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 사슬 간의 이황화 결합을 형성하는 하나 이상의 천연 시스테인 (예를 들어 α 사슬 및 β 사슬의 불변 도메인)은 또 다른 잔기에, 예컨대 세린 또는 알라닌에 치환된다. 일부 구현예에서, 도입된 이황화 결합은, 예컨대 α 사슬 및 β 사슬의 불변 도메인에서, 알파 및 베타 사슬 상의 비-시스테인 잔기를, 시스테인으로 돌연변이 시킴으로써 형성될 수 있다. TCR의 예시적인 비-천연 이황화 결합은 국제 공개 PCT 번호 WO 2006/000830 및 WO 2006/037960에 기재되어 있다. 일부 구현예에서, 시스테인은 α 사슬의 잔기 Thr48 및 β 사슬의 Ser57에, α 사슬의 잔기 Thr45 및 β 사슬의 Ser77에, 사슬의 잔기 Tyr10 및 β 사슬의 Ser17에, α 사슬의 잔기 Thr45 및 β 사슬의 Asp59에 및/또는 α 사슬의 잔기 Ser15 및 β 사슬의 Glu15에 도입될 수 있다. 일부 구현예에서, 재조합 TCR에서 비-천연 시스테인 잔기의 존재 (예를 들어, 하나 이상의 비-천연 이황화 결합을 초래)는 천연 TCR 체인을 포함하는 불일치된 TCR 쌍의 발현에 비해 도입된 세포에서 원하는 재조합 TCR의 생성을 선호할 수 있다.
- [0389] [341] 일부 구현예에서, TCR 사슬은 막관통 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서 막관통 도메인은 양전하를

된다. 일부 경우에는, TCR 사슬은 세포질 꼬리를 포함한다. 일부 측면에서, TCR의 각 사슬 (예컨대, 알파 또는 베타)는 하나의 N-말단 면역글로불린 가변 도메인, 하나의 면역글로불린 불변 도메인, 막관통 영역 및 C-말단에서 짧은 세포질 꼬리를 가질 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은, 예를 들어 세포질 꼬리를 통해, 신호 전달 매개에 관여하는 CD3 복합체의 불변 단백질들과 관련된다. 일부 경우, 상기 구조는 TCR이 CD3 및 그의 서브 유닛과 같은 다른 분자와 결합하는 것을 허용한다. 예를 들어, 막관통 영역을 갖는 불변 도메인을 함유하는 TCR은 세포막 내의 단백질을 고정시키고 CD3 신호전달 장치 또는 복합체의 불변 서브 유닛과 결합할 수 있다. CD3 신호전달 서브 유닛 (예를 들어, CD3 γ CD3 δ ϵ 및 CD3 ζ 사슬)의 세포 내 꼬리는 TCR 복합체의 신호전달 능력에 관계된 하나 이상의 면역수용체 타이로신-계 활성화 모티프 또는 ITAM을 포함한다.

[0390] [342] 일부 구현예에서, TCR은 전장 TCR이다. 일부 구현예에서, TCR은 항원-결합 부분이다. 일부 구현예에서, TCR은 이량체 TCR (dTTCR)이다. 일부 구현예에서, TCR은 단일-사슬 TCR (sc-TCR)이다. TCR은 세포-결합된 것 또는 가용성 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, 제공되는 방법의 목적상, TCR은 세포 표면 상에 발현된 세포-결합된 형태이다.

[0391] [343] 일부 구현예에서, dTCR은, TCR α 사슬 가변 영역 서열에 상응하는 서열이 TCR α 사슬 불변 영역 세포 외 서열에 상응하는 서열의 N 말단에 융합된 제1 폴리펩타이드, 및 TCR β 사슬 가변 영역 서열에 상응하는 서열이 TCR β 사슬 불변 영역 세포 외 서열에 상응하는 서열의 N 말단에 융합된 제2 폴리펩타이드를 함유하는데, 상기 제1 및 제2 폴리펩타이드는 이황화 결합에 의해 연결된다. 일부 구현예에서, 상기 결합은 본래의 이량체 $\alpha\beta$ TCR에 존재하는 본래의 내부-사슬 이황화 결합에 해당할 수 있다. 일부 구현예에서, 사슬간 이황화 결합은 천연 TCR에는 존재하지 않는다. 예를 들어, 일부 구현예에서, dTCR 폴리펩타이드 쌍의 불변 영역 세포 외 서열에 하나 이상의 시스테인이 혼입될 수 있다. 일부 경우에, 천연 및 비-천연 이황화 결합 양자 모두가 바람직할 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 막에 정착하기 위해 막관통 서열을 함유한다.

[0392] [344] 일부 구현예에서, dTCR은, 가변 α 도메인, 불변 α 도메인 및 상기 불변 α 도메인의 C-말단에 부착된 제1 이합체화 모티프를 함유하는 TCR α 사슬, 및 가변 β 도메인, 불변 β 도메인 및 상기 불변 β 도메인의 C-말단에 부착된 제2 이합체화 모티프를 포함하는 TCR β 사슬을 함유하고, 상기 제1 및 제2 이합체화 모티프는 쉽게 상호 작용하여 상기 제1 이합체화 모티프의 아미노산과 상기 제2 이합체화 모티프의 아미노산 간 공유 결합을 형성하여, TCR α 사슬과 TCR β 사슬을 함께 연결한다.

[0393] [345] 일부 구현예에서, TCR은 scHCR이며, 이는 MHC-펩타이드 복합체에 결합할 수 있는 α 사슬 및 β 사슬을 함유하는 단일 아미노산 가닥이다. 일반적으로, scTCR은 당업자에게 공지된 방법을 사용하여 생성될 수 있으며, 예컨대, 국제 공개 PCT 번호 WO 1996/13593, WO 1996/18105, WO 1999/18129, WO 2004/033685, WO 2006/037960, WO 2011/044186; 미국 특허 7,569,664; 및 [Schlueter, C. J. et al. J. Mol. Biol. 256, 859 (1996)]를 참조한다.

[0394] [346] 일부 구현예에서, scTCR은, TCR α 사슬 가변 영역에 상응하는 아미노산 서열로 구성되는 제1 분절, TCR β 사슬 불변 도메인 세포 외 서열에 상응하는 아미노산 서열의 N 말단에 융합된 TCR β 사슬 가변 영역 서열에 상응하는 아미노산 서열로 구성되는 제2 분절, 및 상기 제1 분절의 C 말단을 상기 제2 분절의 N 말단에 연결하는 링커 서열을 포함한다.

[0395] [347] 일부 구현예에서, scTCR은, TCR β 사슬 가변 영역에 상응하는 아미노산 서열로 구성되는 제1 분절, TCR α 사슬 불변 도메인 세포 외 서열에 상응하는 아미노산 서열의 N 말단에 융합된 TCR α 사슬 가변 영역 서열에 상응하는 아미노산 서열로 구성되는 제2 분절, 및 상기 제1 분절의 C 말단을 상기 제2 분절의 N 말단에 연결하는 링커 서열을 포함한다.

[0396] [348] 일부 구현예에서, scTCR은, α 사슬 세포 외 불변 도메인 서열의 N 말단에 융합된 α 사슬 가변 영역 서열로 구성되는 제1 분절, 및 β 사슬 세포 외 불변 서열의 N 말단에 융합된 β 사슬 가변 영역 서열 및 막관통 서열로 구성되는 제2 분절, 및, 필요에 따라 상기 제1 분절의 C 말단을 상기 제2 분절의 N 말단에 연결하는 링커 서열을 포함한다.

[0397] [349] 일부 구현예에서, scTCR은, β 사슬 세포 외 불변 도메인 서열의 N 말단에 융합된 TCR β 사슬 가변 영역 서열로 구성되는 제1 분절, 및 α 사슬 세포 외 불변 서열의 N 말단에 융합된 α 사슬 가변 영역 서열 및 막관통 서열로 구성되는 제2 분절, 및, 필요에 따라 상기 제1 분절의 C 말단을 상기 제2 분절의 N 말단에 연결하는 링커 서열을 포함한다.

[0398] [350] 일부 구현예에서, scTCR이 MHC-펩타이드 복합체에 결합하기 위해, α 및 β 사슬은 이의 가변 영역 서열이

이러한 결합을 위해 배향되도록 쌍을 이루어야 한다. scTCR에서 α 및 β 의 페어링을 촉진하는 다양한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 일부 구현예에서, 링커 서열이 포함되어 α 및 β 사슬을 연결하여 단일 폴리펩타이드 가닥을 형성한다. 일부 구현예에서, 링커는 α 사슬의 C 말단과 β 사슬의 N 말단 사이, 또는 그 반대 사이의 거리에 걸치는 충분한 길이를 가져야하지만, 또한 링커 길이는 너무 길지 않도록 하여 scTCR가 표적 펩타이드-MHC 복합체에 결합하는 것을 차단 또는 감소시킬 수 있는 것을 보장해야 한다.

[0399] [351]일부 구현예에서, 제1 및 제2 TCR 분절을 연결시키는 scTCR의 링커는 TCR 결합 특이성을 유지하면서 단일 폴리펩타이드 가닥을 형성할 수 있는 임의의 링커일 수 있다. 일부 구현예에서, 링커 서열은 예를 들어 식 -P-AA-P-를 가질 수 있는데, 여기서 P는 프롤린이고 AA는 그 아미노산이 글리신 및 세린 인 아미노산 서열을 나타낸다. 일부 구현예에서, 상기 제1 및 제2 분절은 그들의 가변 영역 서열이 그러한 결합을 위해 배향되도록 쌍을 이룬다. 따라서 일부 경우에, 상기 링커는 상기 제1 분절의 C 말단과 상기 제2 분절의 N 말단 간의 거리를 아우르는 충분한 길이를 가지거나 그 역도 마찬가지이지만, scTCR의 그 표적 리간드로의 결합을 차단하거나 감소시킬 만큼 너무 길지는 않다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 10 내지 45 개 아미노산, 예컨대 10 내지 30 개 아미노산, 또는 26 내지 41 개 아미노산 잔기, 예컨대 29, 30, 31 또는 32 개의 아미노산, 또는 약 그 정도의 아미노산을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 식 -PGGG-(SGGGG)₅-P- 또는 -PGGG-(SGGGG)₆-P-를 갖는데, 여기서 P는 프롤린, G는 글리신 및 S는 세린이다. 일부 구현예에서, 상기 링커는 서열 GSADDAKKDAKKDGKS를 갖는다.

[0400] [352]일부 구현예에서, scTCR은 단일 아미노산 가닥의 잔기 사이에 이황화 결합을 포함하며, 이는 일부 경우에, 단일 사슬 분자의 α 및 β 영역사이에 페어링의 안정성을 증진시킬 수 있다(예를 들어 미국 특허 7,569,664 참조). 일부 구현예에서, scTCR은 α 사슬의 불변 도메인의 면역글로불린 영역의 잔기를, 단일 사슬 분자의 β 사슬의 불변 도메인의 면역글로불린 영역의 잔기에 연결하는 공유 이황화 결합을 포함한다. 일부 구현예에서, 이황화 결합은 천연 dTCR에 존재하는 천연 이황화 결합에 해당한다. 일부 구현예에서, 천연 TCR에서 이황화 결합은 존재하지 않는다. 일부 구현예에서, 이황화 결합은, 예를 들어, 하나 이상의 시스테인을 scTCR 폴리펩타이드의 제1 및 제2 사슬 영역의 불변 영역 세포 외 서열 내로 혼입함으로써, 도입된 비-천연 이황화 결합이다. 예시적인 시스테인 돌연변이는 상기 기재된 임의의 것을 포함한다. 일부 경우에, 천연 및 비-천연 이황화 결합이 존재할 수 있다.

[0401] [353]일부 구현예에서, scTCR은, 그의 C-말단에 융합된 이종의 류신 지퍼가 사슬 결합을 용이하게 하는 비-이황화 결합된 절단된 TCR이다 (예를 들어, 국제 공개 PCT WO 1999/60120 참조). 일부 구현예에서, scTCR은 펩타이드 링커를 통해 TCR β 가변 도메인에 공유 결합된 TCR α 가변 도메인을 함유한다 (국제 공개 PCT WO 1999/18129 참조).

[0402] [354]일부 구현예에서, dTCR 또는 scTCR을 포함하는 임의의 TCR은 T 세포의 표면 상에 기능성 TCR을 생성하는 신호전달 도메인에 연결될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 세포 표면에서 발현된다. 일부 구현예에서, TCR은 막관통 서열에 해당하는 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 C α 또는 C β 막관통 도메인일 수 있다. 일부 구현예에서, 막관통 도메인은 비-TCR 기원으로부터, 예를 들어, CD3z, CD28 또는 B7.1으로부터의 막관통 영역일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 세포질 서열에 상응하는 서열을 함유한다. 일부 구현예에서, TCR은 CD3z 신호전달 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, TCR은 CD3과 함께 TCR 복합체를 형성할 수 있다.

[0403] [355]일부 구현예에서, TCR 또는 그의 항원-결합 단편은, 10^{-5} 내지 10^{-12} M과 그 안의 모든 개별 값 및 범위 또는 약 그 정도의 표적 항원에 대한 평형 결합 상수를 갖는 친화도를 나타낸다. 일부 구현예에서, 표적 항원은 MHC-펩타이드 복합체 또는 리간드이다.

[0404] [356]일부 구현예에서, TCR 또는 그의 항원 결합 부분은 결합 특성과 같은 하나 이상의 특성이 변경된, 재조합적으로 생산된 천연 단백질 또는 그들의 돌연변이된 형태일 수 있다. 일부 구현예에서, TCR은 인간, 마우스, 래트 또는 다른 포유 동물과 같은 다양한 동물 종 중 하나로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, TCR을 인코딩하는 벡터를 생성하기 위해, 대상 TCR을 발현하는 T 세포 클론으로부터 단리된 전체 cDNA로부터 α 및 β 사슬은 PCR 증폭되고, 발현 벡터에 클로닝될 수 있다. 일부 구현예에서, α 및 β 사슬은 합성적으로 생성될 수 있다.

[0405] [357]일부 구현예에서, TCR 알파 및 베타 사슬은 단리되고 유전자 발현 벡터로 클로닝된다. 일부 구현예에서, 전사 단위는 단일 프로모터로부터의 메세지에 의해 유전자 산물 (예컨대, α 및 β 사슬 인코딩)이 공동발현하게 하는 IRES (내부 리보솜 진입 부위)를 포함하는 이중시스트론 단위로서 조작될 수 있다. 택일적으로, 일부 경우에, 단일 프로모터는 단일 개방형 판독 프레임 (ORF)에, 자가-절단 펩타이드 (예컨대, T2A) 또는 프로타아제 인

식 부위 (예컨대, 퓨린)을 인코딩하는 서열에 의해 서로 분리된 (예컨대, α 및 β 사슬 인코딩하는) 다수의 유전자를 포함하는 RNA의 발현을 지시할 수 있다. 이에 따라 ORF는 단일 다중단백질을 인코딩하는데, 이는 번역 중에 (T2A의 경우) 또는 번역 이후, 개별 단백질 내로 절단된다. 일부 경우에, T2A와 같은 펩타이드는 리보솜으로 하여금 2A 요소의 C-말단에서 펩타이드 결합의 건너뛰기 (리보솜 스킵핑)를 일으켜, 2A 서열의 말단과 다음 펩타이드 하류 사이의 분리를 유도할 수 있다. 리보솜 스킵핑을 유도할 수 있는 펩타이드를 비롯하여, 2A 절단 펩타이드의 예로는, T2A, P2A, E2A 및 F2A이다. 일부 구현예에서, α 및 β 사슬은 상이한 벡터로 클로닝된다. 일부 구현예에서, 생성된 α 및 β 사슬은 레트로바이러스 벡터, 예를 들어, 렌티바이러스 벡터 내로 혼입된다.

[0406] [358] 일부 구현예에서, TCR 알파 및 베타 유전자는 피코로나바이러스 2A 리보솜 스킵 펩타이드를 통해 연결되어 두 사슬이 공동-발현된다. 일부 구현예에서, TCR의 유전적 전달은 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 통해 또는 트랜스포존을 통해 수행된다 (예를 들어, [Baum et al. (2006) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 13:1050-1063; Frecha et al. (2010) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 18:1748-1757; Hackett et al. (2010) *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*. 18:674-683] 참조).

[0407] [359] 결합 친화도를 평가하고 및/또는 결합 분자가 (예컨대 MHC 분자 내 펩타이드의 맥락에서) 특정 리간드에 특이적으로 결합하는지 여부를 결정하기 위한 다양한 분석법이 공지되어 있다. 예컨대 기술 분야 내 공지된 임의의 여러 결합 분석법을 사용하여, 표적 폴리펩타이드의 T 세포 에피토프에 대한 TCR과 같은 결합분자의 결합 친화도를 결정하는 것은 당업자의 수준 내에 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, BIAcore 기계는 두 단백질 사이의 복합체의 결합 상수를 결정하는데 사용될 수 있다. 버퍼가 칩을 지나갈 때 시간에 대한 굴절률의 변화를 모니터링함으로써 복합체에 대한 해리 상수가 결정될 수 있다. 하나의 단백질이 또 다른 단백질에 대해 결합하는 것을 측정하기 위한 다른 적합한 분석법으로는, 예를 들어, 면역 분석법, 예컨대 효소 결합 면역흡착 분석법 (ELISA) 및 방사선면역분석 (RIA), 또는 형광, UV 흡수, 원편광 이색성, 또는 핵 자기 공명 (NMR)을 통한 단백질의 분광학적 및 광학적 성질의 변화 측정에 의한 결합 결정을 포함한다. 다른 예시적인 분석법으로는, 웨스턴 블롯, ELISA, 분석적 초원심분리, 분광법 및 표면 플라즈몬 공명 (Biacore® 분석 (예컨대, [Scatchard et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51:660, 1949; Wilson, *Science* 295:2103, 2002; Wolff et al., *Cancer Res.* 53:2560, 1993]; 및 미국 특허 5,283,173, 5,468,614, 또는 균등물 참조), 유세포 분석, 시퀀싱 및 발현된 핵산 검출에 대한 기타 방법을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 하나의 예시에서, TCR에 대한 겔보기 친화도는 다양한 농도의 사랑체에 대한 결합을 평가함으로써, 예를 들어 표지된 사랑체를 사용하는 유세포 분석에 의해 측정된다. 하나의 예시에서, TCR의 겔보기 KD는 다양한 농도 범위에서 표지된 사랑체의 2 배 희석을 사용하여 측정된 후, 비선형 회귀에 의한 결합 곡선의 결정하고, 겔보기 KD는 절반-최대 결합이 산출되는 리간드의 농도로서 결정된다.

[0408] 유전자 조작을 위한 벡터 및 방법

[0409] [360] 제공된 방법은 이러한 결합 분자를 발현하는 유전자 조작된 세포를 제조하기 위해 CAR 또는 TCR를 포함하는 재조합 수용체를 발현하는 것을 포함한다. 유전자 조작은 일반적으로 예컨대 레트로바이러스 형질도입, 형질 감염 또는 형질전환에 의해 세포 내로 재조합 또는 조작된 요소를 인코딩하는 핵산을 도입하는 것을 수반한다.

[0410] [361] 일부 구현예에서, 유전자 도입은 예컨대 사이토카인 또는 활성화 마커의 발현에 의해 측정된 증식, 생존 및/또는 활성화 등의 반응을 유도하는 자극과 결합하여, 세포를 먼저 자극함으로써, 뒤이어 활성화된 세포의 형질도입 및 임상적 적용에 충분한 수의 배양으로의 팽창에 의해 달성될 수 있다.

[0411] [362] 유전자 조작된 성분, 예컨대 항원 수용체, 예컨대, CAR의 도입을 위한 다양한 방법이 공지되어 있으며, 제공된 방법 및 조성물과 함께 사용될 수 있다. 예시적 방법에는 바이러스, 예컨대 레트로바이러스 또는 렌티바이러스, 형질도입, 트랜스포존 및 전기천공법 등을 통한 수용체를 코딩하는 핵산의 전달 방법들이 있다.

[0412] [363] 일부 구현예에서, 재조합 수용체를 인코딩하는 핵산은 적합한 발현 벡터 또는 벡터로 클로닝될 수 있다. 발현 벡터는 임의의 적합한 재조합 발현 벡터일 수 있으며, 임의의 적합한 숙주를 형질전환 또는 형질감염 시키는데 사용될 수 있다. 적합한 벡터는 전파 및 증식을 위해 또는 발현을 위해, 또는 양자 모두를 위해 설계된 것들을 포함하며, 예컨대 플라스미드 및 바이러스이다.

[0413] [364] 일부 구현예에서, 벡터는 pUC 시리즈 (Fermentas Life Sciences), pBluescript 시리즈 (Stratagene, 미국 캘리포니아주 라호야 소재), pET 시리즈 (Novagen, 미국 위스콘신주 매디슨 소재), pGEX 시리즈 (Pharmacia Biotech, 스웨덴 옘살라 소재), 또는 pEX 시리즈 (Clontech, 미국 캘리포니아주 팔로앨토 소재)의 벡터일 수 있

다. 일부 경우에서, 박테리오파지 벡터, 예컨대 λ λ λ (Stratagene), λ 및 λ 가 또한 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 식물 발현 벡터가 사용될 수 있으며, 이는 pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 및 pBIN19 (Clontech)를 포함한다. 일부 구현예에서, 동물 발현 벡터는 pEUK-CI, pMAM 및 pMAMneo (Clontech)를 포함한다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스 벡터가 사용된다.

[0414] [365] 일부 구현예에서, 재조합 발현 벡터는 표준 재조합 DNA 기법을 사용하여 제조할 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는, 벡터가 DNA- 또는 RNA-기반인지를 고려하여, 적절한 경우, 벡터가 도입될 숙주의 유형 (예를 들어, 박테리아, 균류, 식물 또는 동물)에 특이적인 조절 서열, 예컨대 전사 및 번역 개시 및 종결 코돈을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 재조합 수용체를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동가능하게 연결된 비천연 프로모터를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 비-바이러스 프로모터 또는 바이러스 프로모터, 예컨대 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, SV40 프로모터, RSV 프로모터, 및 뮤린 줄기세포 바이러스의 긴 말단 반복부에서 발견되는 프로모터일 수 있다. 당업자에게 공지된 다른 프로모터가 또한 고려된다.

[0415] [366] 일부 구현예에서, 재조합 핵산은, 예를 들어 유인원 바이러스 40 (SV40), 아데노바이러스, 아데노-연관 바이러스 (AAV)로부터 유래한 벡터와 같은 재조합 감염성 바이러스 입자를 사용하여, 세포 내로 전달된다. 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 재조합 렌티바이러스 벡터 또는 레트로바이러스 벡터, 예컨대 감마-레트로바이러스 벡터를 사용하여, T 세포 내로 전달된다 (예를 들어, 문헌 [Koste et al. (2014) Gene Therapy 2014 Apr 3. doi: 10.1038/gt.2014.25]; [Carlens et al. (2000) Exp Hematol 28(10): 1137-46]; [Alonso-Camino et al. (2013) Mol Ther Nucl Acids 2, e93]; [Park et al, Trends Biotechnol. 2011 November 29(11): 550-557] 참조).

[0416] [367] 일부 구현예에서, 레트로바이러스 벡터는 몰로니 쥐과 백혈병 바이러스 (MoMLV), 골수 증식 육종 바이러스 (MPSV), 쥐과 배아 줄기 세포 바이러스 (MESV), 쥐과 줄기 세포 바이러스 (MSCV), 비장 병소 형성 바이러스 (SFFV) 또는 아데노 연관 바이러스 (AAV)로부터 유래된 레트로바이러스 벡터와 같은 긴 말단 반복 서열 (LTR)을 가진다. 대부분의 레트로바이러스 벡터는 쥐과의 레트로바이러스로부터 유래된다. 일부 구현예에서, 레트로바이러스는 조류 또는 포유류 세포 공급원으로부터 유래된 것들을 포함한다. 레트로바이러스는 전형적으로 양친매성이며, 이는 인간을 비롯한 여러 종의 숙주 세포를 감염시킬 수 있음을 의미한다. 한 구현예에서, 발현될 유전자는 레트로바이러스 gag, pol 및/또는 env 서열을 대체한다. 다수의 구체적인 레트로바이러스 시스템은 기술되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 5,219,740; 6,207,453; 5,219,740; [Miller and Rosman (1989) BioTechniques 7:980-990; Miller, A. D. (1990) Human Gene Therapy 1:5-14; Scarpa et al. (1991) Virology 180:849-852; Burns et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8033-8037; 및 Boris-Lawrie and Temin (1993) Cur. Opin. Genet. Develop. 3:102-109] 참조).

[0417] [368] 렌티바이러스 형질도입 방법은 기술 분야 내에 공지되어 있다. 예시적인 방법은, 예를 들어, [Wang et al. (2012) J. Immunother. 35(9): 689-701; Cooper et al. (2003) Blood. 101:1637-1644; Verhoeven et al. (2009) Methods Mol Biol. 506: 97-114; 및 Cavalieri et al. (2003) Blood. 102(2): 497-505]에 기재되어 있다.

[0418] [369] 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 전기천공법을 통해 T 세포에 전달된다 (예를 들어, Chicaybam et al, (2013) PLoS ONE 8(3): e60298 및 Van Tedeloo et al. (2000) Gene Therapy 7(16): 1431-1437 참조). 일부 구현예에서, 재조합 핵산은 전위를 통해 T 세포에 전달된다 (예를 들어, Manuri et al. (2010) Hum Gene Ther 21(4): 427-437; Sharma et al. (2013) Molec Ther Nucl Acids 2, e74; 및 Huang et al. (2009) Methods Mol Biol 506: 115-126 참조). 면역 세포에서 유전 물질을 도입하고 발현시키는 기타 방법들은 칼슘 포스페이트 트랜스펙션 (예컨대, 문헌 Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, N.Y.에 기재된 트랜스펙션), 원형질융합, 양이온성 리포좀 매개 트랜스펙션; 텅스텐 입자-촉진 미세 입자 충격 (Johnston, Nature, 346: 776-777 (1990)); 및 스트론튬 포스페이트 DNA 공동 침전 (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7: 2031-2034 (1987))을 포함한다.

[0419] [370] 재조합 산물을 코딩하는 핵산의 전달을 위한 기타 접근법 및 벡터는, 예를 들어, 국제 특허 출원 공보 WO2014/055668, 및 미국 특허 7,446,190에 기재되어 있다.

[0420] [371] 자극 인자 (예컨대, 림포카인 또는 사이토카인)의 과발현은 대상체에 유독할 수 있다. 이에 따라, 일부 상황에서, 조작된 세포는, 예컨대 입양 면역 요법에서 투여시 세포를 생체 내에서의 음성 선별에 민감성이 되도록 유도하는 유전자 조작을 포함한다. 예를 들어, 일부 양태에서, 세포는 조작되어, 투여되는 환자의 생체 내 조건 변화의 결과로 제거될 수 있다. 음성 선별 가능한 표현형은 투여된 시제, 예컨대 화합물에 민감성을 부여하는

유전자의 삽입으로부터 초래될 수 있다. 음성 선별가능한 유전자는 간사이클로비르 민감성을 부여하는 1형 단순포진 바이러스 티미딘 키나제 (HSV-I TK) 유전자 (Wigler et al., Cell 11 :223, 1977); 세포 내 하이포잔틴 포스포리보실트랜스퍼라제 (HPRT) 유전자, 세포 내 아데닌 포스포리보실트랜스퍼라제 (APRT) 유전자, 박테리아 사이토신 디아미나제 (Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33 (1992))를 포함한다.

[0421] [372]일부 양태에서, 세포는 사이토카인 또는 기타 인자의 발현을 촉진하도록 추가로 조작된다.

[0422] [373]추가적인 핵산, 예컨대 도입 유전자 중에는 전달된 세포의 생존력 및/또는 기능을 촉진시킴으로써 결과, 예컨대 치료 반응을 나타내는 결과를 개선시키는 것; 생체 내 생존 또는 국소화를 평가하는 것과 같은 세포의 선택 및/또는 평가를 위한 유전자 마커를 제공하는 유전자; 문헌 [Lupton S. D. et al., Mol. and Cell Biol., 11:6 (1991); 및 Riddell et al., *Human Gene Therapy* 3:319-338 (1992)]에 기재된 바와 같이 세포가 생체 내 음성 선별에 민감성을 갖도록 함으로써 안정성을 개선시키는 유전자가 있으며, 예컨대 우성 양성 선택 마커와 음성 선별 마커를 융합시킴으로써 유래된 이작용성 선택 융합 유전자의 용도를 기술하고 있는 Lupton 등의 공보 PCT/US91/08442 및 PCT/US94/05601도 참조한다. 예를 들어, Riddell et al의 미국 특허 6,040,177의 14-17 열을 참조한다.

[0423] 조성물 및 제제

[0424] [374]또한 이러한 세포 집단, 이러한 세포를 함유하는 조성물 및/또는 이러한 세포에 대해 농축된 조성물이 제공되며, 예컨대 여기서 재조합 수용체를 발현하는 세포는 조성물 내 전체 세포 또는 특정 유형의 세포 예컨대 T 세포 또는 CD8+ 또는 CD4+ 세포의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 이상을 구성한다. 조성물 중에는 입양 세포 요법과 같은 투여용 약제학적 조성물 및 제제가 있다. 또한, 대상체, 예컨대 환자에게 세포 및 조성물을 투여하는 치료 방법이 제공된다.

[0425] [375]약제학적 조성물 및 제제를 비롯하여, 투여를 위한 세포를 포함하는 조성물, 예컨대 주어진 용량 또는 이의 분획으로 투여하기 위한 세포의 개수를 포함하는 단위 투여 형태 조성물로서 또한 제공된다. 약제학적 조성물 및 제제는 일반적으로 하나 이상의 선택적인 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다. 일부 구현 예에서, 조성물은 적어도 하나의 추가적인 치료제를 포함한다.

[0426] [376]용어 “약제학적 제제(pharmaceutical formulation)” 이란 이러한 조성물 안에 포함된 활성 성분의 생물학적 활성이 효과가 있도록 하기 위한 형태의 조제물을 지칭하며, 제제가 투여되는 대상에게 수용 불가능한 독성을 주는 추가 성분은 포함하지 않는다.

[0427] [377] “약제학적 수용가능한 담체(pharmaceutically acceptable carrier)” 란, 대상에게 비독성이며, 활성 성분 이외의 약제학적 제제에 포함된 성분을 지칭한다. 약제학적으로 수용가능한 담체는 완충액, 부형제, 안정화제, 또는 보존제를 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0428] [378]일부 양태에서, 담체의 선택은 부분적으로 특정 세포 및/또는 투여 방법에 의해 결정된다. 따라서, 다양한 적합한 제제가 존재한다. 예를 들어, 약제학적 조성물은 보존제를 포함할 수 있다. 적합한 보존제로는, 예를 들어, 메틸파라벤, 프로필파라벤, 벤조산나트륨 및 벤즈알코늄 클로라이드를 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 둘 이상의 보존제의 혼합물이 사용된다. 보존제 또는 이의 혼합물은 전형적으로 총 조성물 중량의 약 0.0001% 내지 약 2%의 양으로 존재한다. 담체는 예를 들어, 문헌 Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)에 기재되어 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 일반적으로 사용된 복용량 및 농도에서 수용자에게 무독성이며, 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는다: 포스페이트, 시트르산 및 기타 유기산과 같은 완충제; 아스코르빈산 및 메티오닌을 비롯한 항산화제; 보존제 (예컨대, 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜, 메틸 또는 프로필 파라벤 등의 알킬 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥산올; 3-펜탄올; 및 m-크레졸); 저분자량의 (약 10개 잔기 미만) 폴리펩타이드; 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역 글로불린 등의 단백질; 폴리비닐피롤리돈 등의 친수성 폴리머; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신 등의 아미노산; 당당류, 이당류 및 포도당, 만노오스 또는 텍스트린을 비롯한 기타 탄수화물; EDTA 등의 킬레이트화제; 수크로스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨 등의 슈가; 나트륨 등의 염-형성 반대 이온; 금속 복합체 (예컨대, Zn-단백질 복합체); 및/또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG) 등의 비이온성 계면 활성제.

[0429] [379]일부 양태에서 완충제가 조성물에 포함된다. 적합한 완충제로는 예를 들어, 시트르산, 시트르산 나트륨, 인산, 인산 칼륨 및 다양한 기타 산 및 염을 포함한다. 일부 양태에서, 둘 이상의 완충제의 혼합물이 사용된다. 완충제 또는 이의 혼합물은 전형적으로 총 조성물 중량의 약 0.001% 내지 약 4%의 양으로 존재한다. 투여 가능

한 약제학적 조성물의 제조 방법은 공지되어 있다. 예시적인 방법은 예컨대, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 21st ed. (May 1, 2005)]에 더욱 상세히 기재되어 있다.

- [0430] [380] 이러한 제제는 수용액을 포함할 수 있다. 제제 또는 조성물은 또한, 세포로 치료되는 특정 질환 또는 병태에 유용한 하나 이상의 활성 성분, 바람직하게는 세포에 상호 보완적인 활성을 가지고 각각의 활성은 서로 악영향을 미치지 않는 활성 성분을 포함할 수 있다. 이러한 활성 성분은 의도된 목적에 유효한 양으로 조합하여 적절하게 존재한다. 따라서, 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 기타 약제학적으로 활성인 시제 또는 약물, 예컨대 화학요법 시제, 예컨대 아스파라기나제, 부술판, 카보플라틴, 시스플라틴, 다우노루비신, 독소루비신, 플루오로우라실, 겐시타빈, 히드록시우레아, 메토틱렉세이트, 파클리탁셀, 리톡시맵, 빈블라스틴 및/또는 빈크리스틴을 추가로 포함한다.
- [0431] [381] 일부 구현예에서, 약제학적 조성물은 질환 또는 증상을 치료 또는 예방하기에 효과적인 양, 예컨대 치료적 유효량 또는 예방적 유효량의 세포를 포함한다. 일부 구현예에서, 치료적 또는 예방적 효능 또는 반응 결과는 치료된 대상체의 주기적인 평가에 의해 모니터링된다. 원하는 복용량은 세포의 단일 볼루스 투여, 세포의 다중 볼루스 투여 또는 세포의 지속 주입 투여에 의해 전달될 수 있다.
- [0432] [382] 세포 및 조성물은 표준 투여 기법, 제제 및/또는 장치를 사용하여 투여될 수 있다. 세포의 투여는 자가 또는 이종일 수 있다. 예를 들어, 면역 반응 세포 또는 전구 세포는 한 대상체로부터 수득될 수 있으며, 동일한 대상체 또는 상이한, 호환이 되는 대상체에 투여될 수 있다. 말초 혈액 유래의 면역 반응 세포 또는 그 후대 (예컨대, 생체 내, 생체 외 또는 시험관 내에서 유래)은 카테터 투여, 전신 주사, 국소 주사, 정맥 내 주사 또는 비경구 투여를 비롯한 국소 주사를 통해 투여될 수 있다. 치료적 조성물 (예컨대, 유전자 조작된 면역 반응 세포를 포함하는 약제학적 조성물)을 투여하는 경우, 이는 일반적으로 단위 복용량 주사 가능한 형태 (용액, 현탁액, 에멀전)로 제제화될 것이다.
- [0433] [383] 제제는 경구, 정맥 내, 복강 내, 피하, 폐, 경피, 근육 내, 비강 내, 협측, 설하 또는 좌약 투여를 위한 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포 집단은 비경구적으로 투여된다. 용어 “비경구”는, 본 명세서에서 사용 시, 정맥 내, 근육 내, 피하, 직장, 질 및 복강 내 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 세포는 정맥 내, 복강 내 또는 피하 주사에 의한 말초 전신 전달을 사용하여 대상체에게 투여된다.
- [0434] [384] 일부 구현예에서 조성물은, 일부 양태에서 선택된 pH로 완충될 수 있는 멸균 액체 제조물, 예컨대 등장성 수용액, 현탁액, 에멀전, 분산액 또는 점성 조성물로서 제공된다. 액체 제조물은 일반적으로 겔, 기타 점성 조성물 및 고체 조성물보다 제조하기 용이하다. 또한, 액체 제조물은 특히 주사에 의해 투여하기에 더욱 편리하다. 한편, 점성 조성물은 특정 조직과의 연장된 접촉 시간을 제공하기 위해 적합한 점도 범위 내에서 제제화될 수 있다. 액체 또는 점성 조성물은 예컨대 물, 식염수, 인산 완충 식염수, 폴리올 (예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜) 및 이의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 분산 매질일 수 있는 담체를 포함할 수 있다.
- [0435] [385] 멸균 주사 가능한 용액은 세포를 적합한 담체, 희석제, 또는 멸균수, 생리식염수, 글루코스, 텍스트로스 등과 같은 부형제와 혼합한 것과 같은 용매에 포함시킴으로써 제조될 수 있다. 조성물은 원하는 투여 및 제조 경로에 따라 습윤제, 분산제 또는 에멀전화제 (예컨대, 메틸셀룰로오스), pH 완충제, 겔화 또는 점도 증강 첨가제, 보존제, 향료제, 및/또는 착색제 등과 같은 보조 물질을 포함할 수 있다. 일부 양태에서, 적합한 제조물을 제조하기 위하여 표준 텍스트를 참고할 수 있다.
- [0436] [386] 항균 보존제, 항산화제, 킬레이트화제 및 완충제를 비롯하여, 조성물의 안정성 및 무균성을 향상시키는 다양한 첨가제가 첨가될 수 있다. 미생물 작용의 예방은 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 및 소르브산에 의해 보장될 수 있다. 주사 가능한 제약 형태의 흡수는, 흡수를 지연시키는 시제, 예컨대 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴의 사용에 의해 연장될 수 있다.
- [0437] [387] 생체내 투여에 사용되는 제제는 일반적으로 무균이다. 무균성은, 예컨대 무균성 여과막을 통한 여과에 의해 용이하게 달성될 수 있다.
- [0438] 입양 세포 요법에서의 투여 방법 및 용도
- [0439] [388] 본 명세서에는 본 명세서에 기재된 세포, 집단 및 조성물을 투여하는 방법, 및 암을 비롯한 질환, 병태 및 장애를 치료 또는 예방하기 위한 본 명세서에 기재된 세포, 집단 및 조성물의 용도가 제공된다. 일부 구현예에서, 세포, 집단 및 조성물은 치료될 특정 질환 또는 병태를 가지는 대상체 또는 환자에게, 예컨대 입양 T 세포

요법 등의 입양 세포 요법을 통해 투여된다. 일부 구현예에서, 배양 단계 및/또는 기타 처리 단계 이후 조작된 조성물 및 최종 생산 조성물과 같은, 제공된 방법에 의해 제조된 세포 및 조성물은 질환 또는 병태를 가지거나 가질 위험이 있는 대상체 등의 대상체에게 투여된다. 일부 양태에서, 이로써 방법은, 예컨대 조작된 T 세포에 의해 인식되는 항원을 발현하는 암에서의 종양 부담을 줄임으로써, 질환 또는 병태 중 하나 이상의 징후를 치료, 예컨대 개선시킨다.

[0440] [389]입양 세포 요법을 위한 세포의 투여 방법은 공지되어 있으며, 제공된 방법 및 조성물과 관련되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 입양 T 세포 요법은 예컨대, Gruenberg 등의 미국 특허 출원 공보 2003/0170238; Rosenberg의 미국 특허 4,690,915; 문헌 Rosenberg (2011) *Nat Rev Clin Oncol*. 8(10):577-85)에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌 Themeli et al. (2013) *Nat Biotechnol*. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) *Biochem Biophys Res Commun* 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) *PLoS ONE* 8(4): e61338를 참조한다.

[0441] [390]본 명세서에서 사용 시, "대상체"는 인간 또는 기타 동물과 같은 포유류이며, 일반적으로는 인간이다. 일부 구현예에서, 세포, 세포 집단 또는 조성물이 투여되는 대상체, 예컨대 환자는 포유류, 전형적으로는 인간과 같은 영장류이다. 일부 구현예에서, 영장류는 원숭이 또는 유인원이다. 대상체는 남성 또는 여성일 수 있으며, 유아, 어린이, 청소년, 성인 및 노인 대상체를 포함하여 임의의 적합한 연령일 수 있다. 일부 구현예에서, 대상체는 설치류와 같은 영장류가 아닌 포유류이다.

[0442] [391]본 명세서에서 사용 시, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "치료" (및 "치료하다" 또는 "치료의"와 같은 문법적인 변형)는 질환 또는 병태 또는 장애, 또는 징후, 부작용 또는 결과, 또는 이러한과 관련된 표현형의 완전한 또는 부분적인 개선 또는 감소를 의미한다. 치료의 바람직한 효과에는 질환의 발생 또는 재발 방지, 증상의 완화, 상기 질환의 임의의 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 감소, 전이 방지, 질환 진행 속도 감소, 상기 질환 상태의 개선 또는 경감, 그리고 차도 또는 개선된 예후가 포함되나, 이에 제한되지 않는다. 용어는 질환의 완치, 또는 모든 징후나 결과에 대한 임의의 징후나 효과(들)의 완전한 제거를 의미하지는 않는다.

[0443] [392]본 명세서에서 사용 시, "질환 발달 지연"은 질환 (예컨대, 암)의 발달을 연기, 저해, 둔화, 지체, 안정화, 억제 및/또는 미루는 것을 의미한다. 지연은 치료될 질환 및/또는 개인의 병력에 좌우하여 다양한 길이의 시간이 될 수 있다. 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 충분한 또는 현저한 지연은 사실상 개인이 질환을 발달시키지 않는다는 점에서 예방을 포함할 수 있다. 예를 들어, 말기 암, 예컨대 전이의 발달은 지연될 수 있다.

[0444] [393]본 명세서에서 사용 시, "예방"은 질환에 걸리기 쉽지만 아직 질환을 진단받지 않은 대상체에서, 질환의 발병 또는 재발과 관련된 예방을 제공하는 것을 포함한다. 일부 구현예에서, 제공된 세포 및 조성물은 질환의 발달을 지연시키거나 질환의 진행을 둔화시키는데 사용된다.

[0445] [394]본 명세서에서 사용 시, 기능 또는 활성을 "억제"하는 것은 관심있는 조건 또는 파라미터를 제외한 다른 동일한 조건과 비교하였을 때, 또는 또 다른 조건과 비교하여, 기능 또는 활성을 감소시키는 것이다. 예를 들어, 종양 성장을 억제하는 세포는, 세포가 없는 경우에서의 종양의 성장 속도와 비교하여 종양의 성장 속도를 감소시킨다.

[0446] [395]투여의 맥락에서, 약제학적 제제, 세포 또는 조성물의 "유효량"은, 필요한 시간 동안 복용량/투여량으로 치료적 또는 예방적 결과 등의 원하는 결과를 효과적으로 달성하기 위한 양을 의미한다.

[0447] [396]시제, 예컨대 약제학적 제제 또는 세포의 "치료적 유효량"은, 필요한 시간 동안 복용량으로 원하는 치료적 결과, 예컨대 질환, 병태 또는 장애의 치료, 및/또는 치료의 약동학 또는 약역학 효과를 효과적으로 달성하기 위한 양을 의미한다. 치료적 유효량은 대상체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중과 투여되는 세포 집단 등의 인자에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 제공된 방법은 세포 및/또는 조성물을 유효량으로, 예컨대 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0448] [397]"예방적 유효량"은, 필요한 시간 동안 복용량으로 원하는 예방적 결과를 효과적으로 달성하기 위한 양을 의미한다. 예방적 복용량(dose)은 질병 이전 또는 초기 단계에서 사용됨에 따라, 예방적 유효량은 치료적 유효량보다 적을 것이지만, 전형적으로 반드시 그런 것은 아니다. 낮은 종양 부담과 관련하여, 일부 양태에 예방적 유효량은 치료학적 유효량보다 더 클 것이다.

[0449] [398]일부 구현예에서, 대상체는, 예를 들어 화학 요법, 방사선 및/또는 조혈모 줄기 세포 이식 (HSCT), 예를 들어 동종 이형 HSCT를 포함하는 다른 치료적 개입에 의한 치료 후 지속성 또는 재발 성 질환을 앓고 있다. 일

부 구현예에서, 투여는 대상체가 다른 요법에 내성이 있음에도 불구하고 대상체를 효과적으로 치료한다.

- [0450] [399]입양 세포 요법을 위한 세포의 투여 방법은 공지되어 있으며, 제공된 방법 및 조성물과 관련되어 사용될 수 있다. 예를 들어, 입양 T 세포 요법은 예컨대, Gruenberg 등의 미국 특허 출원 공보 2003/0170238; Rosenberg의 미국 특허 4,690,915; 문헌 Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)에 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌 Themeli et al. (2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933; Tsukahara et al. (2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9; Davila et al. (2013) PLoS ONE 8(4): e61338를 참조한다.
- [0451] [400]일부 구현예에서, 세포 요법, 예컨대 입양 T 세포 요법은 자가 전달에 의해 수행되며, 여기서 세포는 세포 요법을 받을 대상체 또는 그러한 대상체로부터 유래된 샘플로부터 단리되고 및/또는 그렇지 않으면 이로부터 제조된다. 이에 따라, 일부 양태에서, 세포는 치료가 필요한 대상체, 예컨대 환자로부터 유래되고, 단리 및 가공 후의 세포는 동일한 대상체에게 투여된다.
- [0452] [401]일부 구현예에서, 세포 요법, 예컨대 입양 T 세포 요법은 동종이체 전달에 의해 수행되며, 여기서 세포는 세포 요법을 받거나 또는 궁극적으로 받는 대상체 이외의 대상체, 예컨대 제1 대상체로부터 단리되고 및/또는 그렇지 않으면 이로부터 제조된다. 이러한 구현예에서, 이후 세포는 동일한 종의 상이한 대상체, 예컨대 제2 대상체에게 투여된다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 대상체는 유전적으로 동일하다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 대상체는 유전적으로 유사하다. 일부 구현예에서, 제2 대상체는 제1 대상체와 동일한 HLA 클래스 또는 슈퍼타입을 나타낸다.
- [0453] [402]일부 구현예에서, 대상체는 세포 또는 세포를 함유하는 조성물의 투여 전에, 질환 또는 병태, 예를 들어 종양을 표적으로 하는 치료제를 사용하여 치료받았다. 일부 양태에서, 대상체는 다른 하나의 치료제에 불응성 또는 비-반응성이다. 일부 구현예에서, 대상체는, 예를 들어 화학 요법, 방사선 및/또는 조혈모 줄기 세포 이식 (HSCT), 예를 들어 동종 이형 HSCT를 포함하는 다른 치료적 개입에 의한 치료 후 지속성 또는 재발 성 질환을 앓고 있다. 일부 구현예에서, 투여는 대상체가 다른 요법에 내성이 있음에도 불구하고 대상체를 효과적으로 치료한다.
- [0454] [403]일부 구현예에서, 대상체는 다른 치료제에 반응하며, 치료제로의 치료는 질환 부담을 감소시킨다. 일부 양태에서, 대상체는 초기에 치료제에 반응하지만, 시간이 지남에 따라 질환 또는 병태의 재발을 나타낸다. 일부 구현예에서, 대상체는 재발하지 않았다. 이러한 일부 구현예에서, 대상체는 재발의 위험이 높은 것과 같이 재발의 위험이 있는 것으로 결정되고, 이에 따라 세포는, 예를 들어, 재발의 가능성을 감소시키거나 예방하기 위해 예방 적으로 투여된다.
- [0455] [404]일부 양태에서, 대상체는 다른 치료제로 사전 치료를 받지않았다.
- [0456] [405]제공되는 조성물, 세포, 방법 및 용도로 치료하기 위한 질병, 병태, 및 장애 중에는, 고형 종양, 혈액 악성 종양, 및 흑색종을 비롯한 종양, 및 감염성 질병, 예컨대 바이러스 또는 다른 병원체에 의한 감염, 예를 들어, HIV, HCV, HBV, CMV, HPV, 및 기생충 질병, 및 자가면역 및 염증성 질병이 있다. 일부 구현예에서, 질병 또는 병태는 종양, 암, 악성종양, 신생종(neoplasm), 또는 다른 증식성 질병 또는 장애이다. 이러한 질병으로는 백혈병, 림프종, 예를 들어, 만성 림프구성 백혈병 (CLL), 급성 림프구성 백혈병 (ALL), 비-호치킨 림프종, 급성 골수성 백혈병, 다발성 골수종, 불응성 여포성 림프종, 외투 세포 림프종, 지연성 B 세포 림프종, B 세포 악성 종양, 결장, 폐, 간, 유방, 전립선, 난소, 피부, 흑색종, 뼈의 암, 및 뇌암, 난소암, 상피암, 신장 세포 암종, 췌장 선암종, 호지킨 림프종, 자궁경부 암종, 대장암, 교모세포종, 신경아세포종, 유잉 육종, 수모세포종, 골육종, 활막 육종, 및/또는 악성종피종을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.
- [0457] [406]일부 구현예에서, 질병 또는 질병 상태는 감염성 질병 또는 질병 상태, 예컨대, 바이러스, 레트로바이러스, 박테리아, 및 원충 감염, 면역결핍, 사이토메갈로바이러스 (CMV), 엡스타인-바르 바이러스 (Epstein-Barr virus)(EBV), 아데노바이러스, BK 폴리오마바이러스 (polyomavirus)이나, 이에 제한되지 않는다. 일부 구현예에서, 질병 또는 질병 상태는 자가면역 또는 염증성 질병 또는 질병 상태, 예컨대 관절염, 예를 들어 류머티즘성 관절염 (RA), I형 당뇨병, 전신 홍반성 낭창 (SLE), 염증성 장 질병, 건선, 경피증, 자가면역 갑상선 질병, 그레이브스병 (Grave's disease), 크론병 (Crohn's disease) 다발성 경화증, 천식, 및/또는 이식 관련 질병 또는 질병 상태이다.
- [0458] [407]일부 구현예에서, 질병, 장애 또는 병태와 연관된 항원은 다음으로부터 선택된다: ROR1, B 세포 성숙화 항원 (BCMA), 탄산 무수화효소 9 (CAIX), tEGFR, Her2/neu (수용체 타이로신 키나제 erbB2), L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 메소텔린, CEA, 및 간염 B 표면 항원, 항-엽산 수용체, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44,

EGFR, 상피 당단백 2 (EPG-2), 상피 당단백 40 (EPG-40), EPHA2, erb-B2, erb-B3, erb-B4, erbB 이합체, EGFR vIII, 엽산 결합 단백질 (FBP), FCRL5, FCRH5, 태아 아세틸콜린 수용체, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-알파, IL-13R-알파2, 키나제 삽입 도메인 수용체 (kdr), 카파 경쇄, Lewis Y, L1-세포 접합 분자 (L1-CAM), 흑색종-관련 항원 (MAGE)-A1, MAGE-A3, MAGE-A6, 우선적으로 발현되는 흑색종 항원 (PRAME), 서바이빈, TAG72, B7-H6, IL-13 수용체 알파 2 (IL-13Ra2), CA9, GD3, HMW-MAA, CD171, G250/CAIX, HLA-AI MAGE A1, HLA-A2 NY-ESO-1, PSCA, 엽산 수용체-a, CD44v6, CD44v7/8, avb6 인테그린, 8H9, NCAM, VEGF 수용체, 5T4, 태아 AchR, NKG2D 리간드, CD44v6, 이중 항원, 암-고환 항원, 메소텔린, 쥐과 CMV, 뮤신 1 (MUC1), MUC16, PSCA, NKG2D, NY-ESO-1, MART-1, gp100, 종양태아성 항원, ROR1, TAG72, VEGF-R2, 암배아 항원 (CEA), Her2/neu, 에스트로젠 수용체, 프로게스테론 수용체, 에프린B2, CD123, c-Met, GD-2, O-아세틸화 GD2 (OGD2), CE7, Wilms 종양 1 (WT-1), 사이클린, 사이클린 A2, CCL-1, CD138, 및 병원체-특이적 항원.

[0459] [408]일부 구현예에서, 질병 또는 장애와 연관된 항원은 다음으로 구성된 군으로부터 선택된다: 고아 티로신 키나아제 수용체 ROR1, tEGFR, Her2, L1-CAM, CD19, CD20, CD22, 메소텔린, CEA, 및 B형 간염 표면 항원, 항-엽산 수용체, CD23, CD24, CD30, CD33, CD38, CD44, EGFR, EGP-2, EGP-4, OEPHa2, ErbB2, 3, 또는 4, FBP, 태아 아세틸콜린 e 수용체, GD2, GD3, HMW-MAA, IL-22R-알파, IL-13R-알파2, kdr, 카파 경쇄, 루이스 Y, L1-세포 접합 분자, MAGE-A1, 메소텔린, MUC1, MUC16, PSCA, NKG2D 리간드, NY-ESO-1, MART-1, gp100, 종양 태아 항원, ROR1, TAG72, VEGF-R2, 암배아 항원 (CEA), 전립선 특이 항원, PSMA, Her2/neu, 에스트로젠 수용체, 프로게스테론 수용체, 에프린 B2, CD123, CS-1, c-Met, GD-2, 및 MAGE A3, 및/또는 비오틴화된 분자, 및/또는 HIV, HCV, HBV 또는 다른 병원체에 의해 발현되는 분자.

[0460] [409]일부 구현예에서, 세포는 원하는 투여량으로 투여되는데, 이는 일부 측면에서 원하는 용량 또는 개수의 세포 또는 세포 유형(들) 및/또는 원하는 비율의 세포 유형을 포함한다. 따라서, 일부 구현예에서, 상기 세포의 투여량은 전체 세포 수 (또는 체중 kg당 세포 수) 및 개개의 서브-유형 집단의 원하는 비율, 예컨대 $CD4^+$ 대 $CD8^+$ 비율에 기초한다. 일부 구현예에서, 세포의 투여량은 개별 집단 또는 개별 세포 유형에서 세포의 원하는 전체 개수 (또는 체중 kg 당 개수)에 기초한다. 일부 구현예에서, 투여량은 개별 집단에서 원하는 전체 세포 개수, 원하는 비율 및 원하는 전체 세포 개수와 같은 이러한 특징의 조합에 기초한다.

[0461] [410]일부 구현예에서, $CD8^+$ 및 $CD4^+$ T 세포와 같은 세포 집단 또는 서브 유형은 원하는 전체 용량, 예컨대 원하는 T 세포 용량의 허용된 차이 또는 그 이내로 투여된다. 일부 양태에서, 원하는 용량은 원하는 개수의 세포 또는, 세포가 투여되는 대상체의 체중 단위 당 원하는 개수의 세포, 예를 들어 세포/kg이다. 일부 양태에서, 원하는 용량은 체중 단위 당 최소 세포 개수 또는 최소 세포 개수 이상이다. 일부 측면에서, 원하는 투여량으로 투여된 전체 세포 중에서, 각 집단 또는 서브-유형은 원하는 결과 비율로 (예컨대 $CD4^+$ 대 $CD8^+$ 비율), 또는 그 근처에 존재하는데, 예컨대 그러한 비율의 특정 용인 차이 내이거나 오류 내이다.

[0462] [411]일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 각 세포 집단 또는 서브-유형의 원하는 투여량, 예컨대 $CD4^+$ 세포의 원하는 투여량 및/또는 $CD8^+$ 세포의 원하는 투여량의 용인되는 차이로 또는 그 이내로 투여된다. 일부 양태에서, 원하는 용량은 서브-유형 또는 집단의 원하는 개수의 세포 또는, 이러한 세포가 투여되는 대상체의 체중 단위 당 원하는 개수의 세포, 예를 들어 세포/kg이다. 일부 양태에서, 원하는 용량은 체중 단위 당 서브-유형의 집단의 최소 세포 개수 또는 서브-유형의 집단의 최소 세포 개수 이상이다.

[0463] [412]이에 따라, 일부 구현예에서, 투여량은 원하는 고정 용량의 전체 세포 및 원하는 비율에 기초하고, 및/또는 하나 이상의, 예를 들어 각각의 개별 하위 유형 또는 하위-집단의 원하는 고정 용량에 기초한다. 이에 따라, 일부 구현예에서, 투여량은 T 세포의 원하는 고정 또는 최소 용량 및 원하는 $CD4^+$ 대 $CD8^+$ 세포의 비율에 기초하고, 및/또는 $CD4^+$ 및/또는 $CD8^+$ 세포의 원하는 고정 또는 최소 용량에 기초한다.

[0464] [413]특정 구현예에서, 세포, 또는 세포 서브 유형의 개별 집단은 대상체에게, 약 100만 내지 약 1000억개의 세포 범위, 예컨대 약 100만 내지 약 500억개의 세포 (예컨대, 약 500만개의 세포, 약 2500만 개의 세포, 약 5억 개의 세포, 약 10억 개의 세포, 약 50억 개의 세포, 약 200억 개의 세포, 약 300억 개의 세포, 약 400억 개의 세포 또는 값 중 임의의 두 값으로 한정된 범위), 예컨대 약 1000만 내지 약 1000억개의 세포 (예컨대, 약 2000만 개의 세포, 약 3000만 개의 세포, 약 4000만 개의 세포, 약 6000만 개의 세포, 약 7000만 개의 세포, 약 8000만 개의 세포, 약 9000만 개의 세포, 약 100억 개의 세포, 약 250억 개의 세포, 약 500억 개의 세포, 약 750억 개의 세포, 약 900억 개의 세포 또는 값 중 임의의 두 값으로 한정된 범위), 및 경우에 따라 약 1억 내지

약 500억 개의 세포 (예컨대, 약 1억 2000만 개의 세포, 약 2억 5000만 개의 세포, 약 3억 5000만 개의 세포, 약 4억 5000만 개의 세포, 약 6억 5000만 개의 세포, 약 8억개의 세포, 약 9억개의 세포, 약 30억 개의 세포, 약 300억 개의 세포, 약 450억 개의 세포) 또는 이러한 범위 사이의 임의의 값으로 투여된다.

- [0465] [414]일부 구현예에서, 전체 세포의 용량 및/또는 세포의 개별 서브-집단의 용량은 (약) 10^4 내지 (약) 10^9 세포/킬로그램 (kg) 체중, 예컨대 10^5 내지 10^6 세포/kg 체중, 예를 들어, (약) 1×10^5 세포/kg, 1.5×10^5 세포/kg, 2×10^5 세포/kg, 또는 1×10^6 세포/kg 체중의 범위 내이다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 세포는 특정 범위의 오차 내에서, (약) 10^4 내지 (약) 10^9 T 세포/킬로그램 (kg) 체중, 예컨대 10^5 내지 10^6 T 세포 / kg 체중, 예를 들어, (약) 1×10^5 T 세포/kg, 1.5×10^5 T 세포/kg, 2×10^5 T 세포/kg, 또는 1×10^6 T 세포/kg 체중으로 투여된다.
- [0466] [415]일부 구현예에서, 세포는 특정 범위의 오차 내에서, (약) 10^4 내지 (약) 10^9 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포/킬로그램 (kg) 체중, 예컨대 10^5 내지 10^6 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포/kg 체중, 예를 들어, (약) 1×10^5 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포/kg, 1.5×10^5 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포/kg, 2×10^5 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포/kg, 또는 1×10^6 CD4⁺ 및/또는 CD8⁺ 세포/kg 체중으로 투여된다.
- [0467] [416]일부 구현예에서, 세포는 특정 범위의 오차 내에서, 적어도 약 1×10^6 , 약 2.5×10^6 , 약 5×10^6 , 약 7.5×10^6 , or 약 9×10^6 이상의 CD4⁺ 세포, 및/또는 적어도 약 1×10^6 , 약 2.5×10^6 , 약 5×10^6 , 약 7.5×10^6 , or 약 9×10^6 이상의 CD8⁺ 세포, 및/또는 적어도 약 1×10^6 , 약 2.5×10^6 , 약 5×10^6 , 약 7.5×10^6 , 또는 약 9×10^6 이상의 T 세포로 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 특정 범위의 오차 내에서, 약 10^8 내지 10^{12} 또는 약 10^{10} 내지 10^{11} T 세포, 약 10^8 내지 10^{12} 또는 약 10^{10} 내지 10^{11} CD4⁺ 세포, 및/또는 약 10^8 내지 10^{12} 또는 약 10^{10} 내지 10^{11} CD8⁺ 세포로 투여된다.
- [0468] [417]일부 구현예에서, 세포는 다수의 세포 집단 또는 서브-유형, 예컨대 CD4⁺ 및 CD8⁺ 세포 또는 서브 유형의 원하는 결과 비의 용인 범위에서 또는 그 이내에서 투여된다. 일부 양태에서, 원하는 비율은 특정 비율일 수 있거나 비율의 범위일 수 있다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 원하는 비율 (예컨대, CD4⁺ 대 CD8⁺ 세포의 비율)은 (약) 5:1 내지 (약) 5:1 (또는 약 1:5 초과 및 약 5:1 미만), 또는 (약) 1:3 내지 (약) 3:1 (또는 약 1:3 초과 및 약 3:1 미만), 예컨대 (약) 2:1 내지 (약) 1:5 (또는 약 1:5 초과 및 약 2:1 미만, 예컨대 (약) 5:1, 4.5:1, 4:1, 3.5:1, 3:1, 2.5:1, 2:1, 1.9:1, 1.8:1, 1.7:1, 1.6:1, 1.5:1, 1.4:1, 1.3:1, 1.2:1, 1.1:1, 1:1, 1:1.1, 1:1.2, 1:1.3, 1:1.4, 1:1.5, 1:1.6, 1:1.7, 1:1.8, 1:1.9: 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4, 1:4.5, 또는 1:5)이다. 일부 양태에서, 허용되는 차이는 원하는 비율의 약 1%, 약 2%, 약 3%, 약 4% 약 5%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50% 이내를 비롯하여, 상기 범위 이내의 임의의 값을 포함한다.
- [0469] [418]질병의 예방 또는 치료를 위해, 적절한 투여량은 치료될 질병의 유형, 세포 또는 제조물 수용체의 유형, 질병의 중증도 및 경과, 세포가 예방적 또는 치료적 목적으로 투여되는지 여부, 이전의 치료, 대상체의 임상 기록 및 세포에 대한 반응, 주치의의 재량에 따라 달라질 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물 및 세포는 한 번에 또는 일련의 치료를 통해 적절하게 대상체에게 투여된다.
- [0470] [419]세포는 임의의 적합한 수단에 의해, 예를 들어, 볼루스 주입에 의해, 주사에 의해, 예를 들어, 정맥 내 또는 피하 주사, 안구 내 주사, 안구주위 주사, 망막 내 주사, 망막 하 주사, 유리 체내 주사, 중격경유 주사, 복강 내 주사, 맥락 막내 주사, 삼관 내 주사, 피하 주사 주사, 결막 하 주사, 안각건 하(sub-Tenon's) 주사, 구후(retrobulbar) 주사, 구주위(peribulbar) 주사 또는 뒤공막열 전달(posterior juxtasclear delivery)로 투여될 수 있다. 일부 구현예에서, 세포는 비경구, 폐 내, 및 비강 내, 그리고, 국소적 치료가 바람직한 경우, 병소 내 투여로 투여된다. 장관외 주입은 근육내, 정맥, 동맥내, 복막내, 또는 피부아래 투여를 포함한다. 일부 구현예에서, 주어진 용량은 세포의 단일 볼루스 투여에 의해 투여된다. 일부 구현예에서, 예를 들어 3 일 이하의 기간 동안 세포의 다수의 볼루스 투여에 의해, 또는 세포의 연속 주입 투여에 의해 투여된다.
- [0471] [420]일부 구현예에서, 세포는 항체 또는 조작된 세포 또는 수용체 또는 시제 (예컨대, 세포 독성제 또는 치료

제) 등의 또 다른 치료적 개입과 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로, 조합 치료의 일부로서 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가적인 치료제와 함께, 또는 또 다른 치료적 개입과 관련하여 동시에 또는 임의의 순서로 순차적으로 병용 투여된다. 일부 상황에서, 세포 집단이 하나 이상의 추가적인 치료제의 효과를 증강시키도록 또는 그 반대의 경우를 위하여, 세포는 또 다른 요법과 시간적으로 충분히 가까이 병용 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가적인 치료제에 선행하여 투여된다. 일부 구현예에서, 세포는 하나 이상의 추가적인 치료제 후에 투여된다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가적인 시제는 예컨대 지속성을 증강시키기 위한, IL-2와 같은 사이토카인을 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 화학 요법 시제의 투여를 포함한다.

[0472] [421]세포의 투여 이후, 일부 구현예에서, 조작된 세포 집단의 생물학적 활성은 예컨대 다수의 공지된 방법 중 임의의 방법에 의해 측정된다. 생체 내, 예컨대 이미징에 의해 또는 생체 외, 예컨대 ELISA 또는 유동 세포 측정 분석에 의해 평가할 파라미터는, 항원에 대한 조작된 T 세포 또는 천연 T 세포 또는 기타 면역 세포의 특이적 결합을 포함한다. 특정 구현예에서, 조작된 세포가 표적 세포를 붕괴시키는 능력은, 예를 들어 문헌 [Kochenderfer et al., J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)], 및 [Herman et al. J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)]에 기재된 세포독성 분석과 같이, 기술 분야 내 공지된 임의의 적절한 방법을 사용하여 측정할 수 있다. 특정 구현예에서, 세포의 생물학적 활성은 CD107a, IFN γ 및 TNF와 같은 하나 이상의 사이토카인의 발현 및/또는 분비를 분석함으로써 측정된다. 특정 구현예에서, 조작된 세포는 치료적 또는 예방적 효능이 증가되도록 임의의 여러 방법으로 추가로 조작된다.

[0473] [422]특정 구현예에서, 조작된 세포는 임의의 여러 방식을 통해 추가로 변형되어, 치료적 또는 예방적 결과가 증가된다. 예를 들어, 집단에 의해 발현된, 조작된 CAR 또는 TCR은 직접적으로 또는 링커를 통해 간접적으로 표적 부분에 컨쥬게이션될 수 있다. 화합물, 예컨대 CAR 또는 TCR을 표적 부분에 컨쥬게이션시키는 관행은 해당 기술 분야에 공지되어 있다. 예컨대, 문헌[Wadwa et al., J. Drug Targeting 3: 111 (1995)] 및 미국 특허 5,087,616를 참조한다.

[0474] 실시예

[0475] [423]다음의 실시예는 단지 예시적인 것이며, 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위 또는 내용을 제한하려는 것이 아니다.

[0476] 실시예 1 - CBLB에 대한 gRNA 후보의 스크리닝.

[0477] CBLB에 대한 gRNA의 1차 스크리닝

[0478] [424]IDT로부터 구입한 2-파트 Alt-R 변형 합성 가이드를 사용하여 효과적인 CBLB 표적화 gRNA를 식별하기 위한 1차 스크리닝을 수행하였다. gRNA/Cas9 복합체의 RNP를 2.27 M의 농도로 Lonza 96-웰 Amaxa 시스템을 사용하여 T-세포로 뉴클레오펙션하였다. T-세포를 96 시간 동안 인큐베이션한 후, 수확하여 게놈 DNA 추출하였다. NGS에 의해 인텔 분석을 수행하였다. 결과는 도 1 및 도 2에 도시되어 있다. gRNA의 서열은 표 2 및 3에 기재되어 있다.

[0479] [425]각 패널에 표시되는 두 가지 메트릭은 인텔이 있는 판독 비율 (사각형)과 프레임 시프트-생성 인텔이 있는 판독 비율(원)이다.

[0480] [426]도 1은, 놀랍게도, CBLB 유전자에서 *S. 피오제네스* gRNA 표적화에 바람직한 핫 스팟이 있음을 입증한다. 도 1은 엑손 2의 5' 말단 또는 엑손 4 또는 엑손 5의 3' 말단을 표적화할 때 예상된 것보다 높은 % 인텔 및 % 프레임시프트 돌연변이 빈도가 달성될 수 있음을 보여준다. 이것은 엑손 2의 3' 말단에서 엑손 3의 5' 말단까지의 낮은 편집 빈도로 더욱 예시되며, *S. 피오제네스* Cas9-매개 유전자 편집이 비효율적인 "데드-존"을 나타낸다.

[0481] [427]도 2는 Cas9 gRNA 표적화에 바람직한 핫 스팟이 존재한다는 놀라운 발견을 추가로 예시한다. *S. 아우레우스* gRNA는 *S. 피오제네스* gRNA와 상이한 핫 스팟 표적화 패턴을 나타내며, 엑손 2의 3' 말단에서 엑손 3의 3' 말단에 더욱 높은 편집 효율을 갖는다.

[0482] [428]1차 스크린의 결과는 특정 표적에 대해, 상기 경우에 CBLB에 대해, gRNA 패널을 시험하는 것이 중요함을 추가로 입증한다. 도 1 및 도 2는 시험된 많은 gRNA가 예기치 않게 합리적인 편집 효율을 달성하지 못했음을 도시한다.

[0483] [429]1차 gRNA 스크리닝 결과에 기초하여, 추가 분석을 위해 서열 번호 xy의 gRNA를 선별하였다.

[0484] CBLB에 대한 gRNA의 확인 스크리닝

[430] 2-파트 Alt-R 변형된 합성 gRNA (IDT로부터 구입)로 확인 스크리닝을 수행하였다. gRNA/Cas9 복합체의 RNP를 각각 2.27, 0.72, 및 0.23 μ M의 농도로 Lonza Amara 시스템을 사용하여 T-세포로 뉴클레오펙션하였다. T-세포를 96 시간 동안 인큐베이션한 후, 수확하여 게놈 DNA 추출하였다. NGS에 의해 인텔 분석을 수행하였다. 도 3은 상기 언급한 농도에 대한 인텔 (인텔 분획 윈도우)을 포함하는 판독의 평균 백분율을 도시한다. 1차 스크리닝에 대해 비교된 모든 가이드에 대해 순위 순서 및 상대적인 활성이 유지되었다. 웨스턴 데이터 (도시하지 않음)는 5 개의 가이드 모두를 가지는 CBLB 단백질의 녹다운을 추가로 검증하였다.

[0486] CBLB에 대한 2-파트 대 단일 gRNA

[431] 서열 번호 X 및 Y의 CBLB gRNA를 표적 검증을 위한 “최상위” 도구로서 선택되었다. 가이드는 변형되지 않은 sgRNA로 IDT에서 재정렬되었습니다. 원래 2-파트 가이드를 sgRNA 형식과 비교하기 위한 가교 연구 (bridging study)를 수행하였다. RNP는 원래의 2-파트 합성 Alt-R 변형된 gRNA 및 새로운 변형되지 않은 sgRNA로부터 유래되었다. 생성된 RNP는 2 μ M에서 시작하여 12 포인트의 세미-로그 용량 반응으로 실행되었다. T-세포를 96 시간 동안 인큐베이션한 후, 수확하여 게놈 DNA 추출하였다. NGS에 의해 인텔 분석을 수행하였다. 각 패널에서 원은 2-파트 형식의 활성을 나타내고 사각형은 각 농도에서 sgRNA 형식의 활성을 나타낸다. 관찰된 차이는 분석 오차 내에 있으며 가이드 형식은 기능적으로 동등한 것으로 간주되었다. 결과가 도 4에 도시되어 있다. 바람직한 gRNA에 대한 스크리닝 결과의 요약이 표 7에 제시되어 있다.

[0488] 표 7 - SpCas9와 함께 사용될 gRNA의 요약.

표 14

가이드 명칭	프로토스페이서 서열	평균 인텔 분획 윈도우			
		1차 2.2uM	확인 2.2uM	2-파트 합성	sgRNA 2uM
서열 번호 3	CGATCTGCGGCAGCTTGCTT	51%	55%	해당 없음	해당 없음
서열 번호 4	GATCTGCGGCAGCTTGCTTA	30%	43%	해당 없음	해당 없음
서열 번호 8	ATCTGCGGCAGCTTGCTTAG	52%	54%	해당 없음	해당 없음
서열 번호 12	TTTCCAATGGTCAATTCCA	66%	73%	93%	92%
서열 번호 14	TAATCTGGTGGACCTCATGA	79%	86%	94%	79%

[0490] 선별된 gRNA에 대한 시험관 내 생화학적 절단 분석

[432] CBLB DNA 주형에서 바람직한 CBLB gRNA/Cas9 RNP를 사용한 시험관 내 절단 분석을 완료하였다. 도 5에 도시된 결과는 모든 5 개의 gRNA가 용량-의존적 방식으로 CBLB를 절단하는데 효과적임을 입증한다.

[0492] 실시예 2 - T 세포에서 CBLB에 대한 gRNA 후보의 분석.

[433] 세포의 CRISPR-Cas9 편집의 목표는, 가능한 최소 농도의 gRNA/Cas9 복합체 및 최소 개수의 오프-타겟 절단 이벤트를 사용하여 표적 유전자로부터 가장 높은 퍼센트 녹아웃을 달성하는 것이다. CBLB 유전자 편집을 위한 5 개의 후보 gRNA를 평가하기 위해, T 세포를 gRNA/Cas9 RNP로 형질감염시켰다. 이어서 웨스턴 블롯을 수행하여 CBLB 단백질 수준을 측정하였다. 도 6A 및 6B는 모든 5 개의 gRNA가 T 세포에서 CBLB의 발현을 감소시키는데 효과적임을 보여준다. 서열 번호 14의 gRNA가 특히 효과적이다.

[434] 웨스턴 블롯의 결과는 5 개의 상이한 gRNA에 대한 % 인텔 및 % 프레임시프트 빈도에 대한 NGS 데이터로 확증되었다. 5 개의 gRNA는 모두 웨스턴 블롯 결과와 일치하는 방식으로 CBLB 유전자를 편집하는데 효과적이었다 (도 6C). 서열 번호 14의 gRNA가 특히 효과적이다.

[435] 5 개의 바람직한 gRNA의 효율을 추가로 평가하기 위해, CD4+ 및 CD8+ T 세포에서 CBLB의 간접적인 세포 내 염색을 수행하고 FACS에 의해 분석하였다. 웨스턴 블롯 결과와 일치하여, 5 개의 CBLB-표적화 gRNA는 T 세포에서 CBLB의 발현을 감소시키는데 효과적이었다 (도 7A 및 7B).

[436] 서열 번호 14의 CBLB gRNA를 하기 기재된 후속 실험에 사용하였다.

[0497] 실시예 3 - 1차 T 세포에서 유전자 편집의 시험관 내 기능.

[0498] T 세포 증식

- [0499] [437] 1차 T 세포에서 CBLB 유전자-편집의 세포 증식 효과를 측정하였다. CBLB 편집 또는 편집되지 않은 백그라운드에서, CD4+ 및 CD8+ T 세포를 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 플레이트-결합된 항-CD3 항체의 존재하에서 성장시켰다. 항-CD3 자극에 OK3T 및 HIT3a 항체를 사용하였다. 항-CD28 공동 자극의 부재 및 첨가된 사이토카인의 부재하에서 세포를 추가로 배양하였다. 다양한 조건하에서 성장시킨 후, 세포를 CTV와 함께 인큐베이션하여 FACS에 의해 분석하였다.
- [0500] [438] 도 8a 및 도 8b는 CBLB KO CD4+ 및 CD8+ T 세포가 공동-자극의 부재 및 첨가된 사이토카인의 부재 및 항-CD3 TCR 자극의 차선의 농도에서 편집되지 않은 대조군에 비해 증식을 유의하게 향상시켰음을 보여준다 (도 8A 및 8B).
- [0501] [439] 1차 T 세포에서 CBLB 유전자-편집의 세포 증식 효과를 추가로 평가하였다. CBLB 편집 또는 편집되지 않은 백그라운드에서, CD4+ 및 CD8+ T 세포를 감소된 농도의 플레이트-결합된 항-CD3 항체의 존재하에서 성장시켰다. 항-CD3 자극에 OK3T 및 HIT3a 항체를 사용하였다. 항-CD28 공동 자극의 존재 (1.0 $\mu\text{g/mL}$ 항-CD28 항체) 및 첨가된 사이토카인의 존재하에서 세포를 추가로 배양하였다. 다양한 조건하에서 성장시킨 후, 세포를 CTV와 함께 인큐베이션하여 FACS에 의해 분석하였다.
- [0502] [440] 도 9A 및 도 9B는 공동-자극의 존재하에, CBLB 편집이 특히 차선적 항-CD3 자극에서 T 세포의 증식을 증가시킨다는 것을 보여준다. 사이토카인의 첨가는 CBLB가 편집되었는지 또는 편집되지 않았는지 여부에 관계없이 증식을 향상시킨다 (도 9A 및 9B).
- [0503] [441] 도 10A 및 10B는 CBLB 편집이 항-CD28 공동-자극이 없을 때 가장 큰 영향을 미친다는 것을 보여준다. 공동-자극의 부재하에, 사이토카인의 첨가는 CBLB가 편집되었는지 또는 편집되지 않았는지 여부에 관계없이 증식을 향상시킨다 (도 10A 및 10B).
- [0504] T 세포 전-염증성 사이토카인 제조
- [0505] [442] CBLB 유전자-편집된 1차 T 세포에서 $\text{INF } \gamma$ IL-2, 및 $\text{TNF } \alpha$ 의 전-염증성 사이토카인 제조를 평가하였다. CBLB 편집 또는 편집되지 않은 백그라운드에서, CD4+ 및 CD8+ T 세포를 감소된 양의 플레이트-결합된 항-CD3 항체의 존재하에서 성장시켰다. 항-CD3 TCR 자극에 OK3T 항체를 사용하였다. 공동 자극의 부재 및 첨가된 사이토카인의 부재하에서 세포를 배양하였다. 20 시간 동안 인큐베이션한 후, 세포를 Brefeldin-A의 존재하에 4 시간 동안 인큐베이션하고, 세포 내 사이토카인 염색 (ICCS)을 수행하였다.
- [0506] [443] 결과는 CD8+ 및 CD4+ CBLB KO 세포가 공동 자극의 부재 및 첨가된 사이토카인의 부재 및 낮은 수준의 TCR 자극에서의 편집되지 않은 대조군과 비교하여 $\text{INF } \gamma$ IL-2 및 $\text{TNF } \alpha$ 의 생산이 유의하게 향상되었음을 보여주었다 (도 11A-11C 및 도 12A-12C).
- [0507] [444] 실시예 3의 결과는 T 세포에서 KO를 생성하기 위해 CBLB 유전자를 편집하는 이점을 보여준다. CD4+ 및 CD8+ T 세포는 공동 자극의 부재, 첨가된 사이토카인의 부재 및 낮은 수준의 TCR 자극으로 CBLB 편집된 백그라운드에서 효율적으로 증식할 수 있다. 실시예 3의 결과는 CBLB KO 세포가 유사한 조건하에서 편집되지 않은 대조군보다 높은 수준의 전-염증성 사이토카인 $\text{INF } \gamma$ IL-2 및 $\text{TNF } \alpha$ 를 생성함을 보여준다.
- [0508] 실시예 4 - eTCR 형질도입된 T 세포에서 CBLB 유전자 편집.
- [0509] CBLB 유전자-편집된 eTCR 형질도입된 T 세포에서의 CBLB 및 eTCR 발현
- [0510] [445] 조작된 TCR (eTCR)은 선택한 항원을 목표로 설계되었다. 내인성으로 발현된 TCR과 같이, eTCR을 발현하도록 조작된 세포는 일반적으로 시간이 지남에 따라 지속적인 증식 및/또는 표적 세포 사멸과 같은 T 세포 활성화 이후 연장된 또는 완전-발현 반응에 대한 (예를 들어, 조작된 TCR 수용체 이외의 수용체를 통한) 별도의 공동-자극 신호를 필요로 한다. 제시된 결과는 제공된 CBLB 유전자-편집 접근법 및 T 세포 조성물, 세포 및 치료 방법이 개선된 반응을 제공하는데, 예를 들어, 보조 자극 신호가 없는 경우에 유용하다는 해석과 일치한다.
- [0511] [446] T 세포는 HPV E7 항원에 특이적인 eTCR로 형질도입되었다. HPV E7 eTCR 형질도입된 T 세포에서의 CBLB 유전자 편집은 상기 실시예에서 전술한 바와 같이 완료되었다. 유전자 편집을 통한 CBLB KO를 평가하기 위해 HPV E7 eTCR 형질도입된 T 세포에서 완료하였고, 웨스턴 블롯을 수행하여 CBLB 단백질 수준을 검출하였다. 도 13에 도시된 바와 같이, gRNA-매개 CBLB KO 접근법은 HPV E7 eTCR 형질도입된 T 세포에서 성공적이었다. CBLB의 93.8 % 감소가 달성되었다.
- [0512] [447] CBLB KO 백그라운드에서 (서로 게이트 마커를 통해 지시된) HPV E7 TCR 발현의 세포 표면 발현은 형질도입

후 11 일에 평가되었다. TCR 발현 및 기능적 활성은 E7 펩타이드와 복합체화된, 표지된 사랑체로 염색한 후 유세포 분석에 의해 평가되었다 (도 14).

[0513] CBLB KO HPV E7 eTCR 형질도입된 T 세포의 시험관 내 기능

[0514] [448]eTCR 백그라운드에서 CBLB KO의 기능을 평가하기 위해, 항원 제시 T2 세포주를 사용하여 E7 항원 대 E7 eTCR 형질도입된 T 세포를 제시하는 검정을 수행하였다.

[0515] [449]T2 세포주를 사용하여, 유전자-편집된 CBLB 및 편집되지 않은 대조군을 가지는 E7 eTCR 형질도입된 T 세포의 표적 세포 사멸 활성을 다양한 양의 E7 항원의 존재하에 평가하였다. T2 세포는 감소하는 농도의 E7 펩타이드로 밤새 펄싱되었다. 이어서, CBLB KO 또는 편집되지 않은 백그라운드에서 1:1의 비율 (E7 eTCR 형질도입된 T 세포 : T2 세포)로 T2 세포를 E7 eTCR 형질도입된 T 세포와 함께 인큐베이션하였다. CTLA4-Ig (2 μ g/mL)의 존재 또는 부재하에 세포를 추가로 인큐베이션하여, 예를 들어 CD28을 통해 통상적으로 형질도입된 공동-자극 신호를 차단하였다. 72 시간 인큐베이션 기간 후, 표적 세포 사멸 및 사이토카인 생산을 평가하였다.

[0516] [450]증가하는 E7 펩타이드 농도 범위에 걸쳐 % 카스파제 양성 T2 세포를 측정함으로써 표적 세포 사멸을 평가하였다. CBLB KO eTCR 형질도입된 T 세포는 편집되지 않은 대조군과 비교하여 우수한 표적 세포 사멸을 나타내었고, 대조군보다 10 배 더 낮은 EC50 값 (pg/ml)을 달성하였다 (도 15).

[0517] [451]3 가지 농도의 E7 펩타이드, 1000 nM, 10 nM 및 0.1 nM 펩타이드로 펄싱된 T2 세포를 사용하여 표적 세포 사멸을 평가하였다. 최저 펩타이드 농도에서, CBLB KO eTCR 형질도입된 T 세포는 공동-자극의 부재하에도 표적 세포를 사멸시키는 능력을 유지하였다. T2 세포는 공동-자극의 부재하에 편집되지 않은 대조군 E7 eTCR 형질도입된 T 세포의 존재하에서 계속 증식하였다 (도 16).

[0518] [452]IFN γ 생산 수준을 또한 전술한 바와 동일한 실험 조건하에서 측정하였다. CBLB KO eTCR 형질도입된 T 세포는 공동-자극이 CTLA4 시약으로 차단될 때 편집되지 않은 E7 eTCR 형질도입된 T 세포와 비교하여 더 높은 IFN γ 생성 수준을 나타냈다. 공동-자극이 억제되지 않은 경우에도 편집된 세포는 편집되지 않은 대조군과 비교하여 더 높은 수준의 IFN γ 분비를 가졌다 (도 17).

[0519] [453]E7 eTCR 형질도입된 T 세포의 표적 세포 사멸 활성을 SCC157 세포, HPV 형질전환된 E7 발현 종양 세포주의 세포를 사용하여 평가하였다. 일부 양태에서, 이러한 세포주는 일반적으로 생리학적 수준에서 구성적인 E7 제시를 제공한다. 상이한 E7 eTCR 세포 대 SCC152 세포 비율을 사용하였다. SCC152 사멸 분석에 5:1, 2.5:1 및 1.25:1의 비율을 사용하였고, 세포는 72 시간 동안 인큐베이션하였다. 가장 높은 5:1 비율에서, CBLB KO eTCR 형질도입된 T 세포는 편집되지 않은 대조군 세포와 비교하여 더 많은 수의 표적 세포 사멸을 나타냈다 (도 18).

[0520] [454]IFN γ IL-2 및 TNF α 생성 수준은 또한 상기 기재된 상이한 세포 비율에서 72 시간 인큐베이션 후 측정하였다. CBLB KO eTCR 형질도입된 세포는 시험된 모든 비율에서 편집되지 않은 E7 eTCR 형질도입된 T 세포와 비교하여 더 높은 수준의 IFN γ 및 TNF α 를 나타냈다. CBLB KO eTCR 형질도입된 세포는 0.625:1 이하의 세포 비율에서 더 높은 수준의 IL-2를 나타냈다 (도 19).

[0521] [455]CBLB KO 백그라운드에서 E7 eTCR 형질도입된 T 세포의 항원 결합 후 E7 접합 비드를 이용하여 증식을 평가하였다. CD86의 유무에 관계없이 E7:MHC1 단량체와 접합된 5×10^4 비드를 분석에 사용하였다. 비드를 세포와 함께 인큐베이션하고 CTV로 표지하였다. 생존력 및 증식을 평가하기 위해 세포를 6 일에 수확하였다. 생존율은 FACS 분석에 의해 결정되었고, 비드 공동-배양은 CBLB 편집된 (데이터 도시되지 않음) 및 편집되지 않은 세포 (데이터 도시되지 않음) 둘 모두에서 생존력의 감소를 초래하는 것으로 관찰되었다. 도 20에 도시된 바와 같이, 6 일째에, CBLB KO E7 eTCR 형질도입된 T 세포는 편집되지 않은 대조군 세포와 비교하여 더 큰 증식을 나타냈다 (도 20). 이러한 효과는 CD86 공동-자극의 유무에 관계없이 관찰되었다.

[0522] [456]실시에 4의 총체적 결과는 입양 세포 요법과 같은 eTCR-형질도입된 T 세포와 관련하여 CBLB 유전자-편집 방법의 유용성과 있는 입양 세포 요법을 위한 eTCR 형질도입 T 세포의 유용성과 일치하여, CBLB 녹아웃과 같이 CBLB 발현 또는 유전자가 감소된 또는 파괴된다. CAR이 일반적으로 1차 신호전달 도메인과 함께 단일 항원-결합 이벤트에 반응하여 촉발된, 1차 신호를 전달할 수 있는 도메인 (예컨대, CD3 제타 도메인) 외에 내장된(built-in) 공동-자극 도메인을 보유하는 2 세대 CAR T 세포와 달리, eTCR 세포는 전형적으로 CD28과 같은 별도의 수용체에 존재하는 신호전달 도메인을 통해 (예를 들어, B7.1 또는 B7.2를 통해 결합함으로써) 항원-결합 TCR로부터 분리된 메커니즘 또는 수용체를 통해 공동-자극 신호를 수신해야 한다. 결과는 조작된 TCR 형질도입된 T 세포 백그라운드에서 CBLB를 녹아웃시키는 것이 별도의 공동자극 수용체가 없는 경우에도 항원-구동된 자극 후에 기

능을 개선할 수 있다는 결론과 일치한다.

[0523] [457]실시예 4에 나타난 바와 같이, CBLB KO eTCR 형질도입된 T 세포는, 공동 자극의 부재하에서, 일반적으로 항원 자극에 보다 민감하며, 표적 세포 사멸 증가, 전-염증성 사이토카인의 생성 증가를 나타내었고, 편집되지 않은 대조군과 비교하여 보다 낮은 항원 밀도에서 증가된 증식을 나타냈다. 이러한 특징은 치료적 상황에서 바람직할 수있다. 낮은 종양 항원 밀도 및 약화된 공동 자극 환경은 특정 상황에서 종양을 치료하는데 상당한 장벽을 나타낼 수 있다. 제공된 세포 및 방법은 클리닉에서의 투여를 위한 세포의 생성에 유용할 수 있다.

[0524] 실시예 5 - 생체 내 종양 모델에서 CBLB KO/eTCR 형질도입된 세포.

[0525] [458]SCC152 종양을 가지는 생체 내 종양 모델에서 지속성을 평가하였다.

[0526] [459]종양 이종이식 마우스 모델은 피하 주사를 통해 두정부 편평 세포 암종 152 (SCC152) 세포주로부터 유래된 종양 세포를 노드 스킨드 감마 (nod scid gamma, NSG) 마우스에 이식함으로써 생성되었다. 초기 종양 세포 이식 후 제31일에, 동결보존된 CBLB KO eTCR 형질도입된 T 세포 및 편집되지 않은 전기천공된 (EP) 및 편집되지 않은 전기천공되지 않은 eTCR 형질도입된 T 세포를 해동시키고 재현탁시키고, 하기 그룹 및 농도에서 수용자 마우스에 주입하였다:

표 15

그룹	# 마우스 당 주입된 T 세포 수
CBLB KO eTCR 형질도입	2×10^6
CBLB KO eTCR 형질도입	1×10^6
편집되지 않은 전기천공된 eTCR 형질도입 대조군	2×10^6
편집되지 않은 전기천공되지 않은 eTCR 형질도입 대조군	2×10^6
종양만 보유하는 대조군	해당 없음

[0528] [460]T 세포 주입 후 첫 주 동안 및 그 후 3-5 일마다 Bioptron Tumor Imager 종양 스캐닝 장치에 의해 5 일마다 모든 마우스에서 종양을 측정하였다. 총 4 주 동안 7 일마다 채혈하였다. 유동 세포 측정법을 통해 E7 특이적 T 세포의 빈도를 평가하기 위해 형광단 접합체 항체 및 E7- 특이적 사량체를 식별하는 T 세포 계통을 사용하여 채혈된 혈액을 염색하였다.

[0529] [461]일부 구체예에서, 편집되지 않은 종양 대조군과 비교하여 CBLB KO eTCR 형질도입된 T 세포가 주입된 마우스에서 감소된 종양 성장, 종양 성장 정지 및/또는 종양 제거가 관찰된다.

[0530] **참조에 의한 통합**

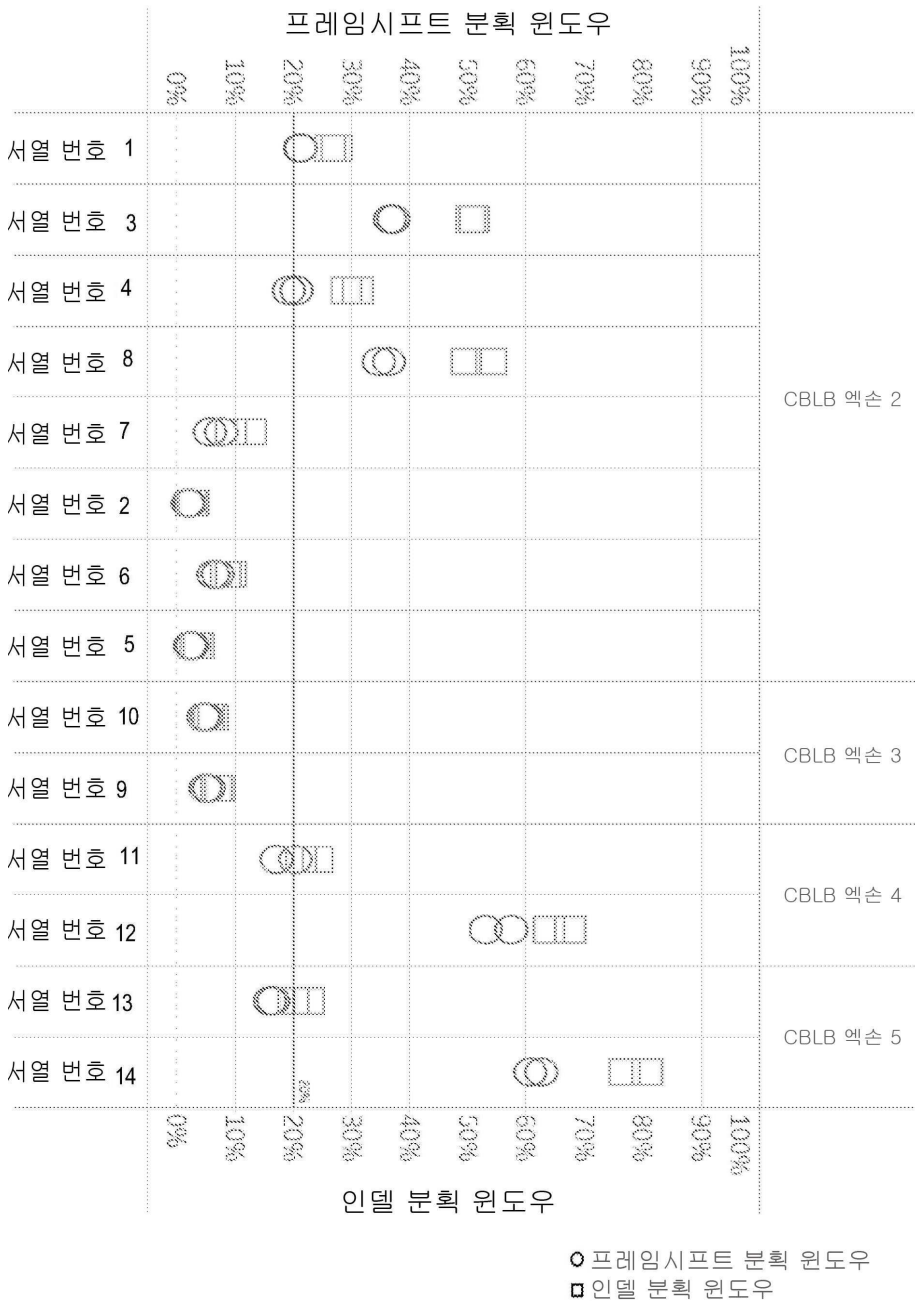
[0531] [462]본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 개별 간행물, 특허 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 참조로 포함된 것으로 표시되어 있는 것처럼 그 전체가 참조로 포함된다. 상충되는 경우, 본 명세서의 임의의 정의를 포함하는 본 출원이 우선할 것이다.

[0532] **균등예**

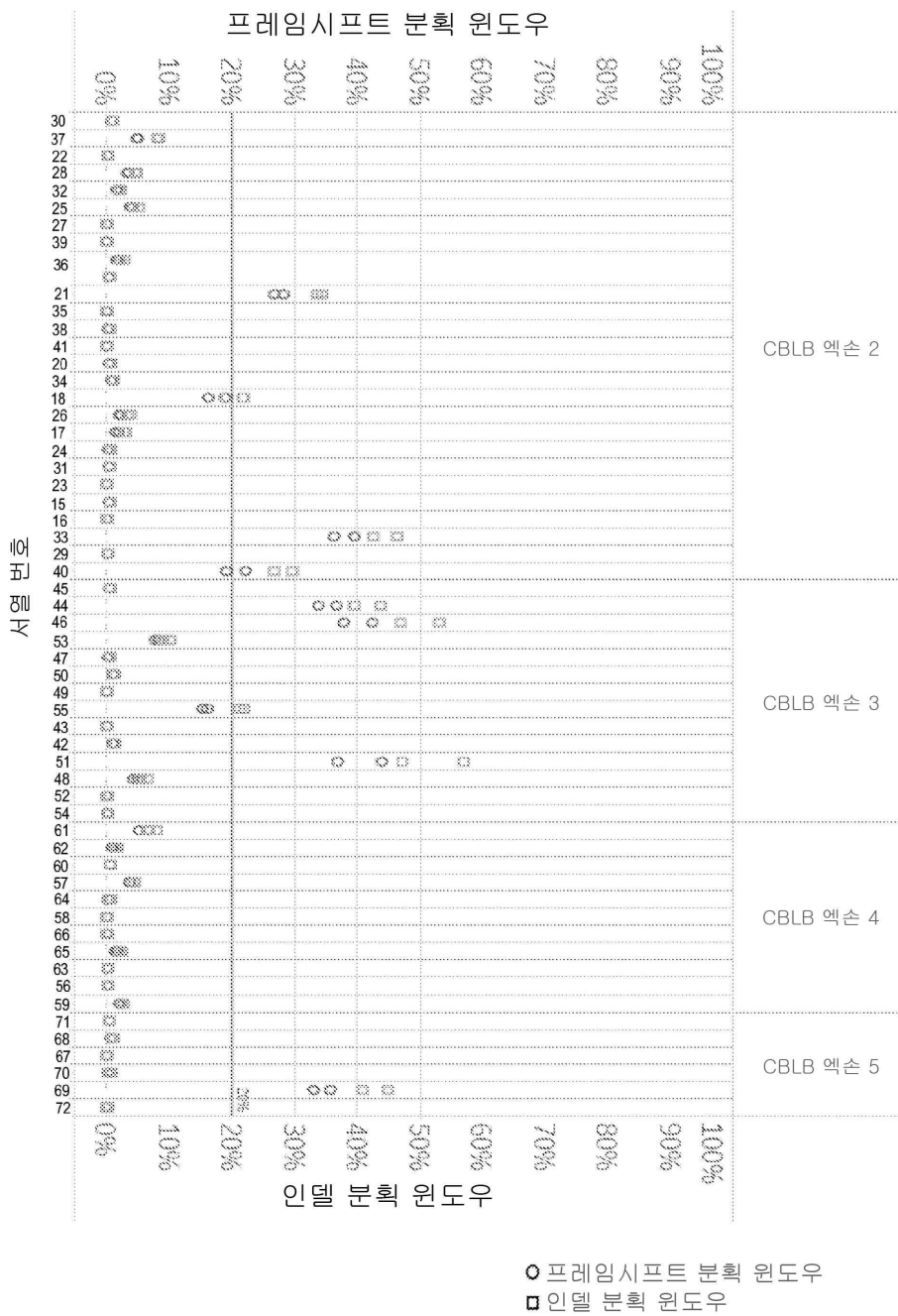
[0533] [463]당업자는, 일상적인 실험을 사용하여, 본 명세서에 기재된 특정 구현예에 대한 다수의 균등물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 균등물은 특허 청구 범위에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

도면

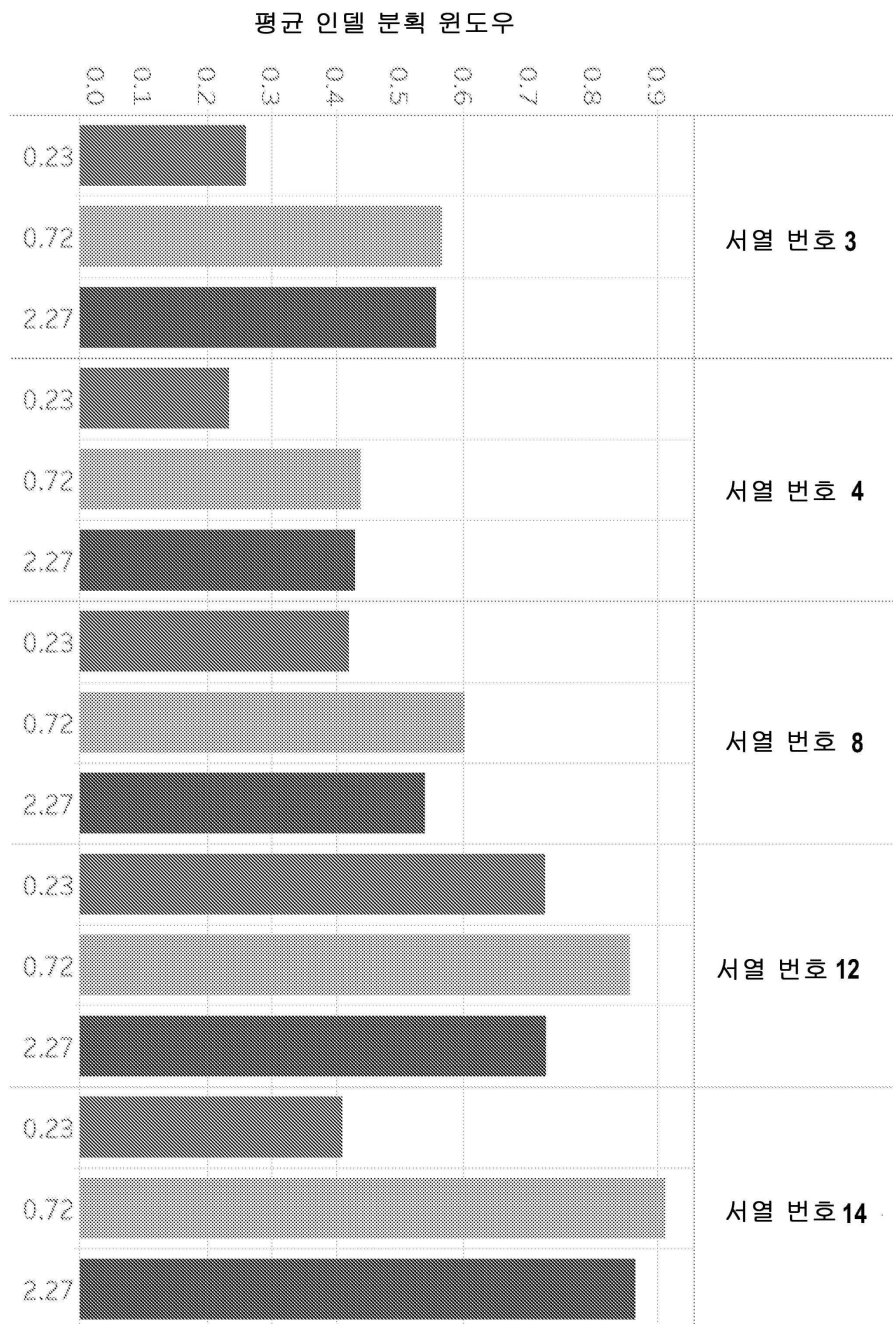
도면1



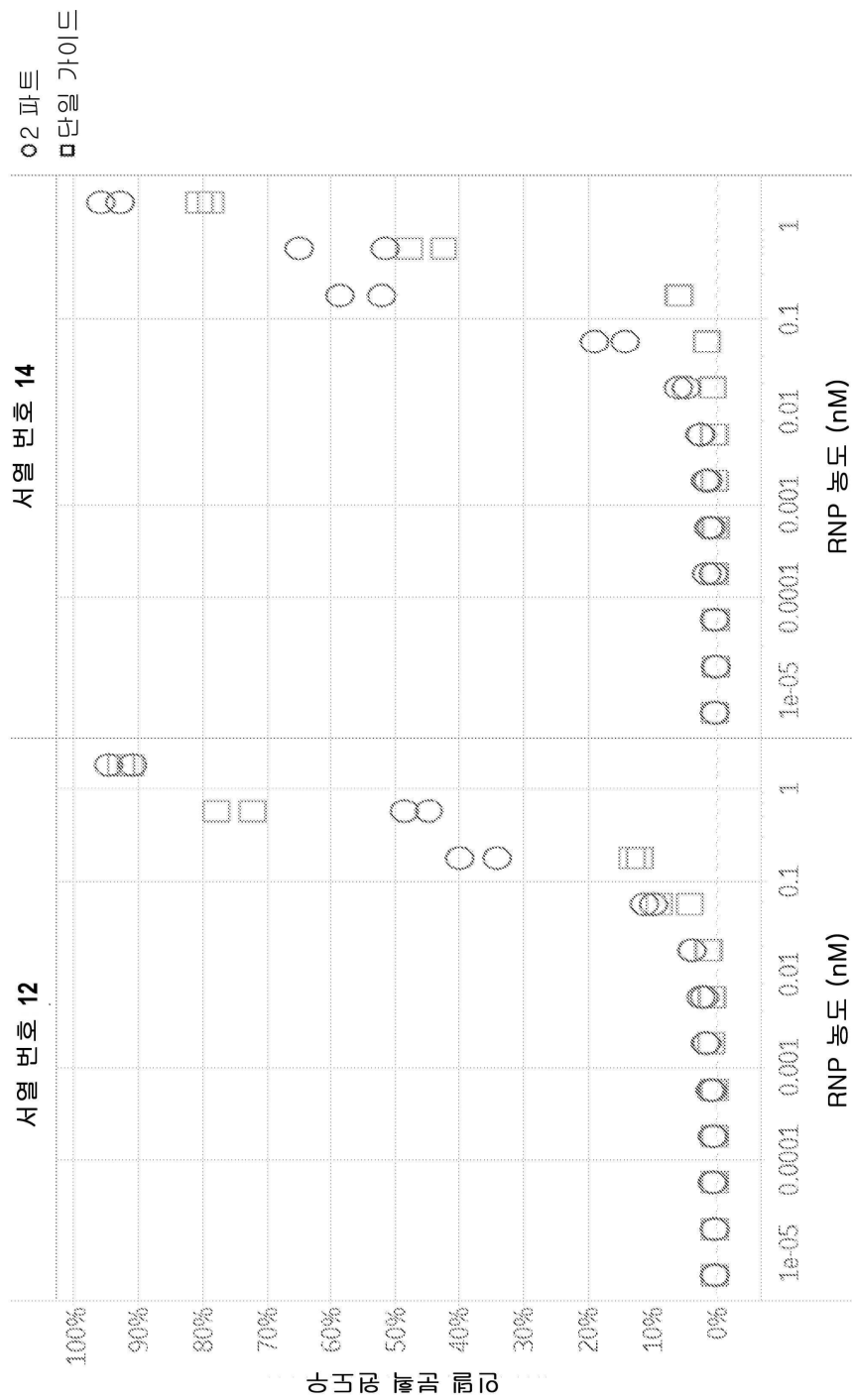
도면2



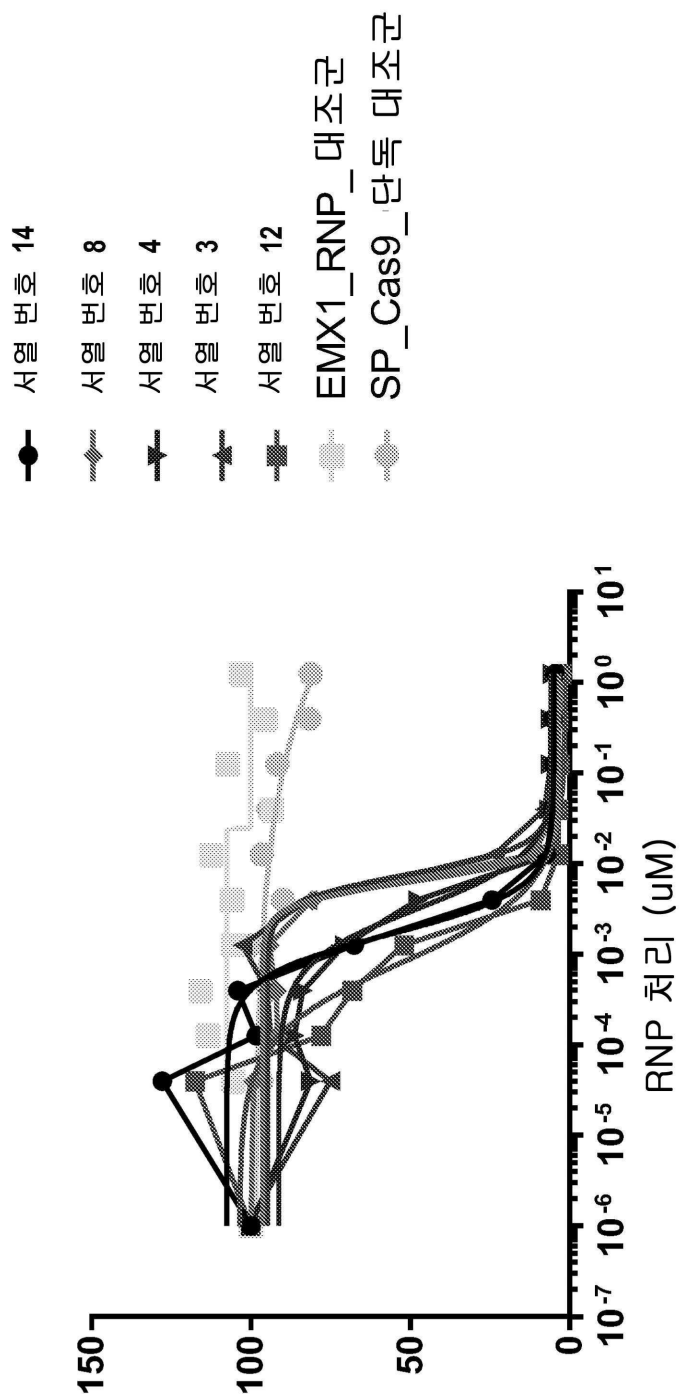
도면3



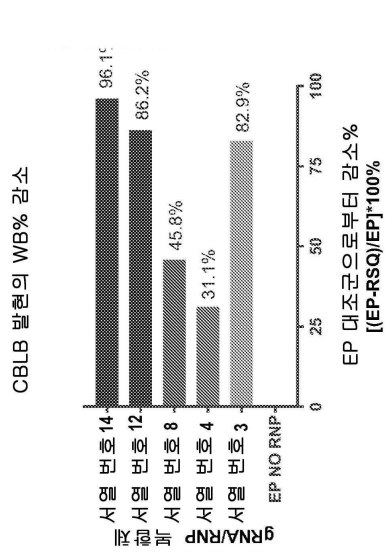
도면4



도면5



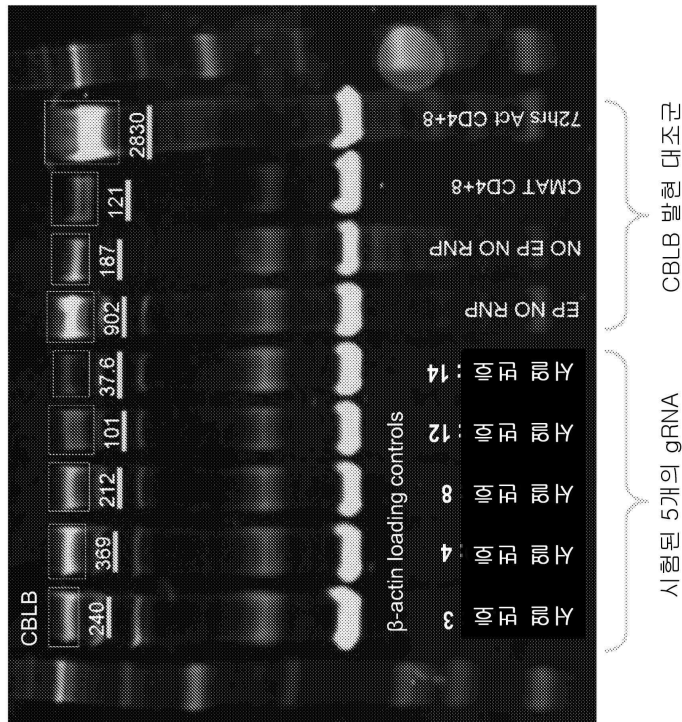
도면6



도 6B

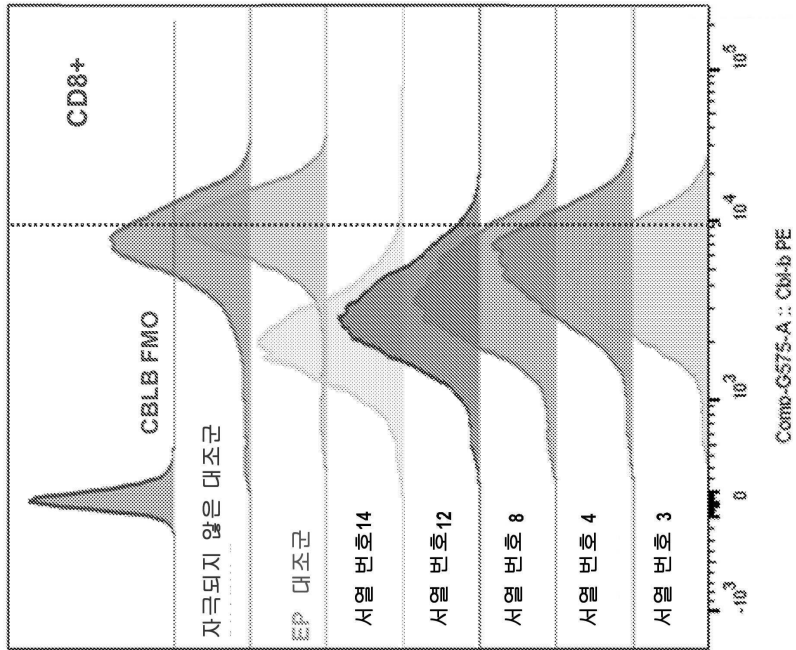
CBLB	역순 2	서열 번호 3	50.70%	36.70%
CBLB	역순 2	서열 번호 4	29.90%	19.80%
CBLB	역순 2	서열 번호 8	51.70%	35.70%
CBLB	역순 4	서열 번호 12	65.70%	55.70%
CBLB	역순 5	서열 번호 14	78.80%	61.70%
유전자 명칭		RNP 표지	평균 인델 분획	평균 프래임시프트 분획

도 6C

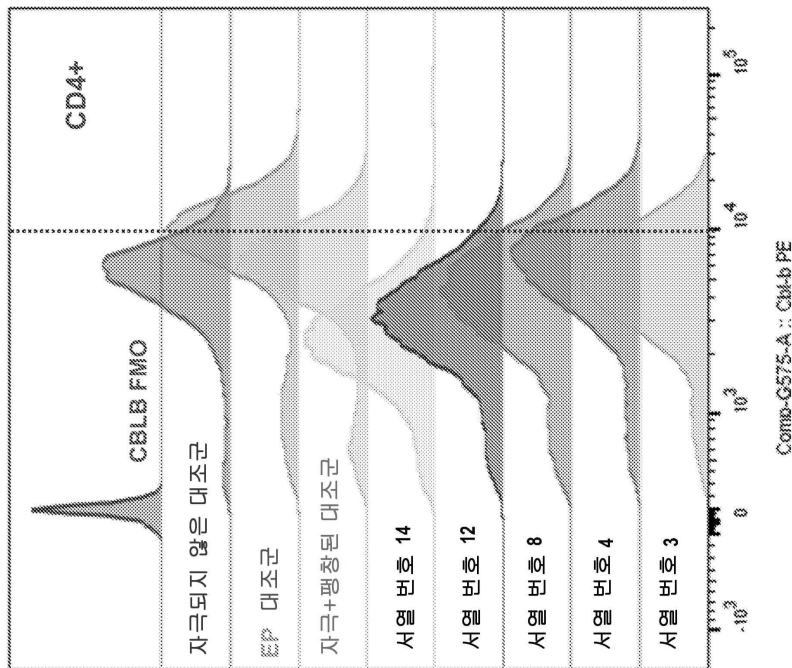


도 6A

도면7

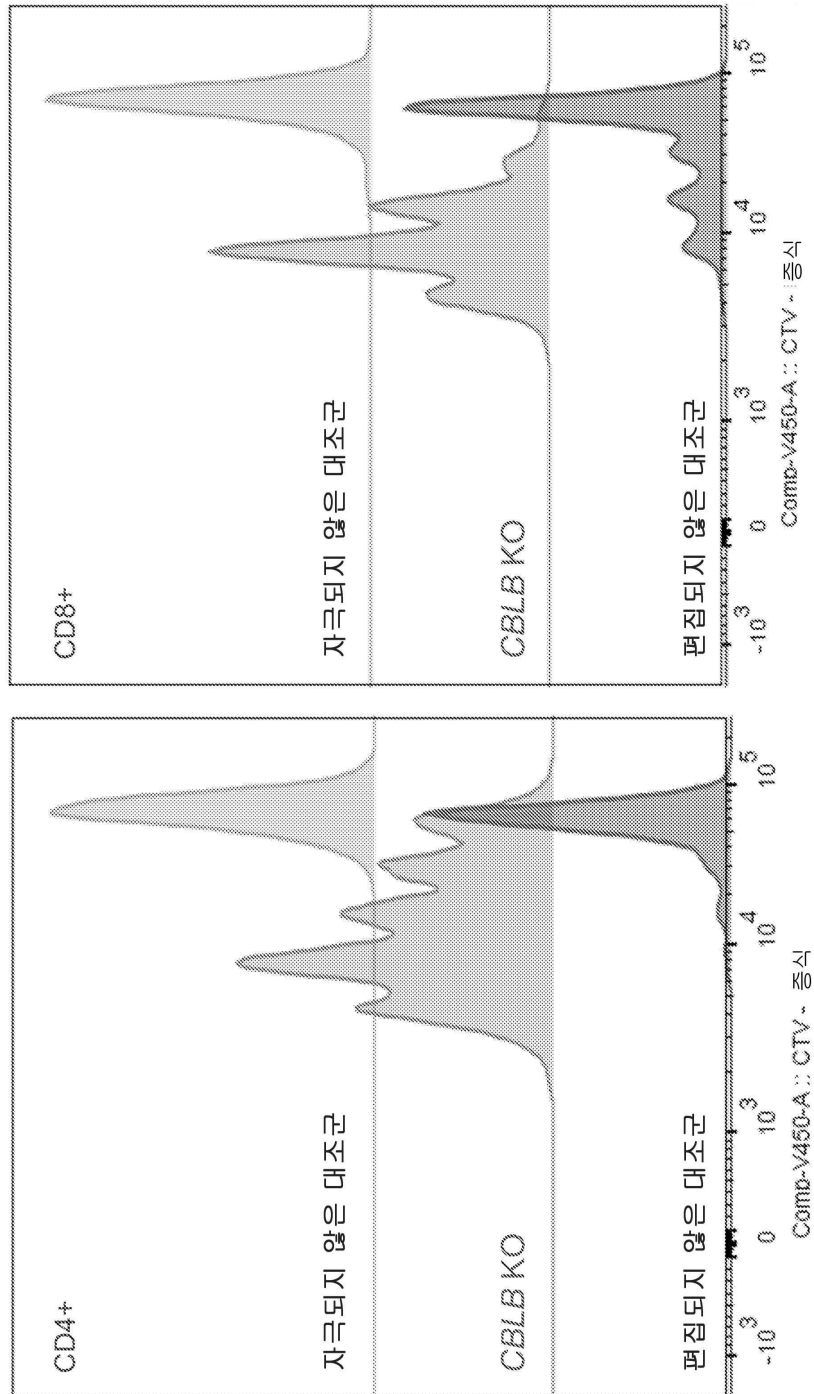


도 7B



도 7A

도면8

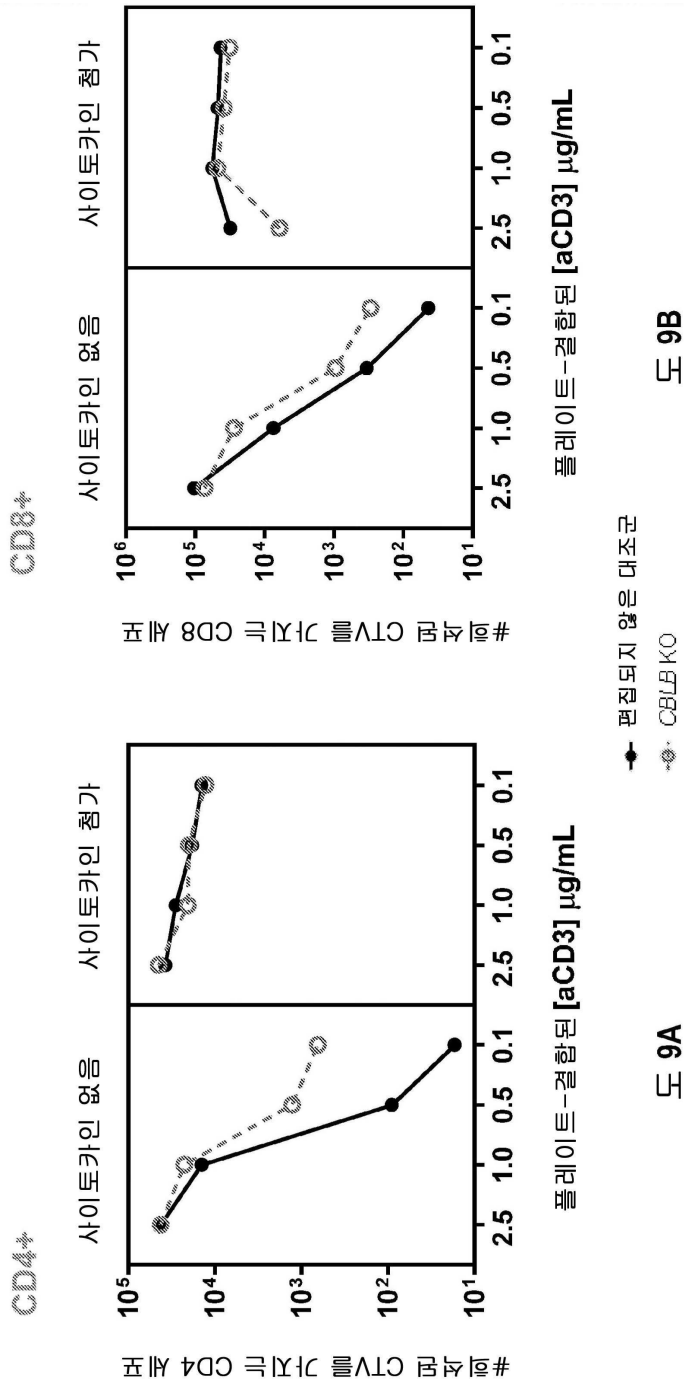


도 8B

도 8A

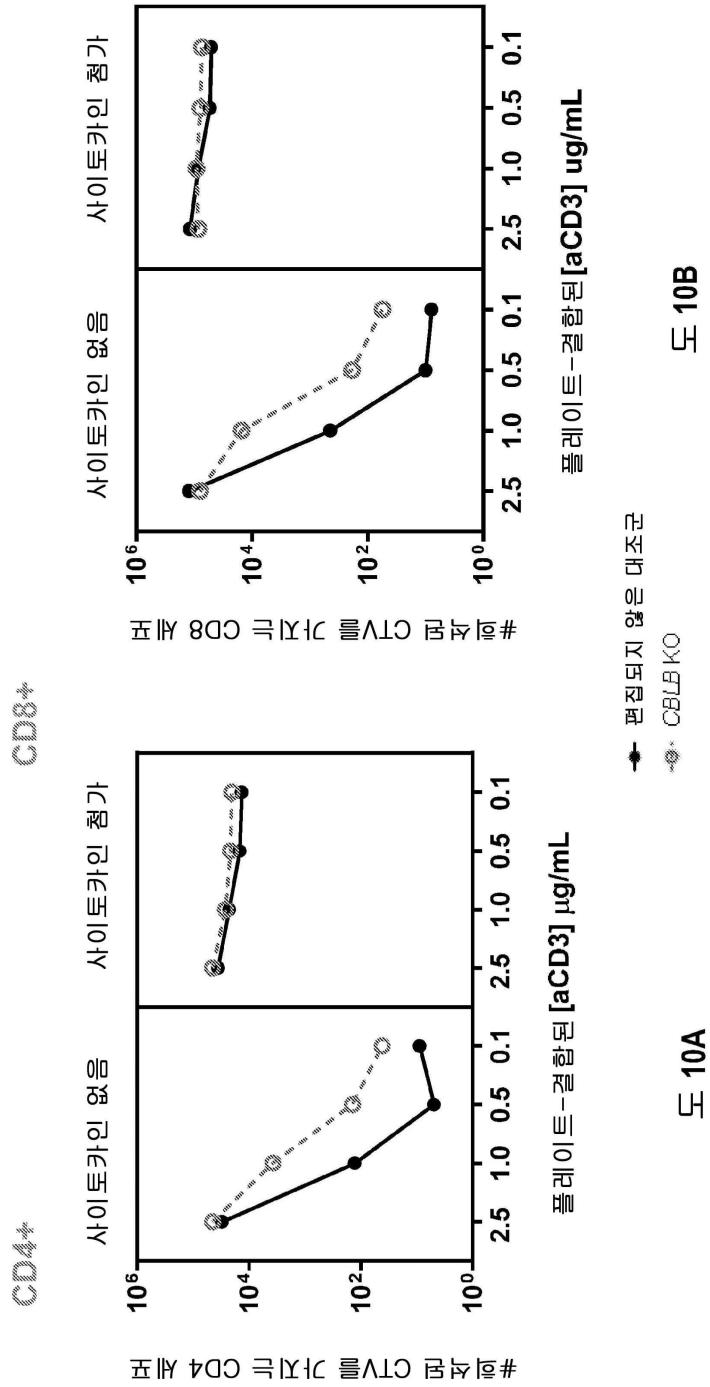
도면9

1.0 $\mu\text{g/mL}$ 가용성 aCD28 첨가

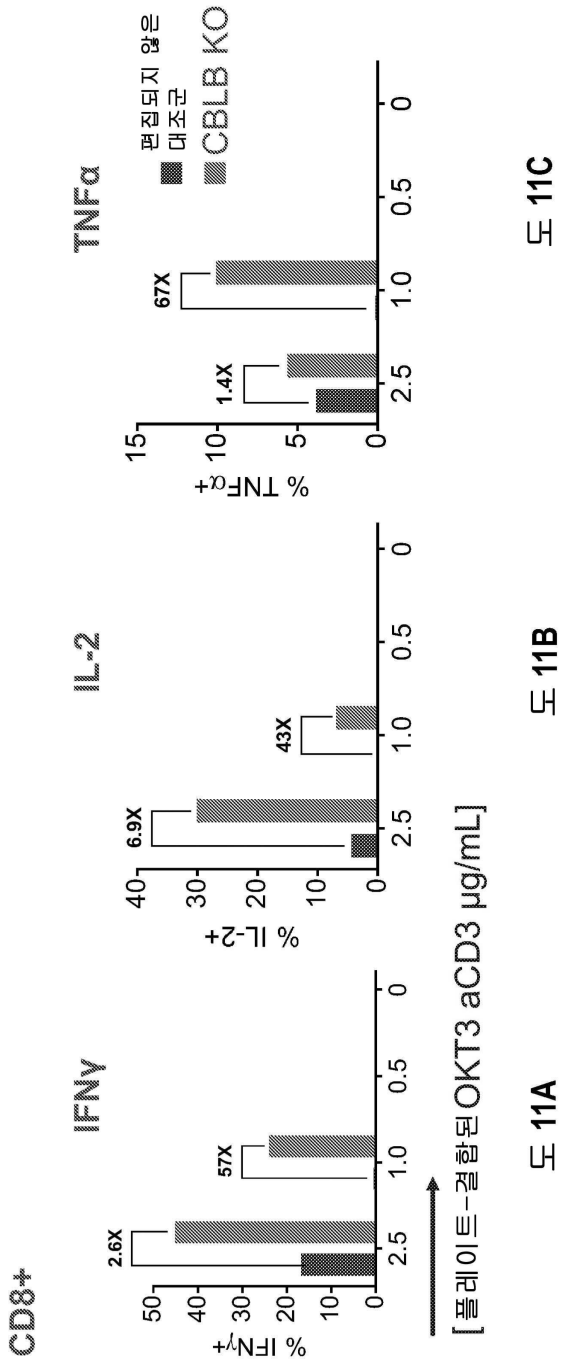


도면10

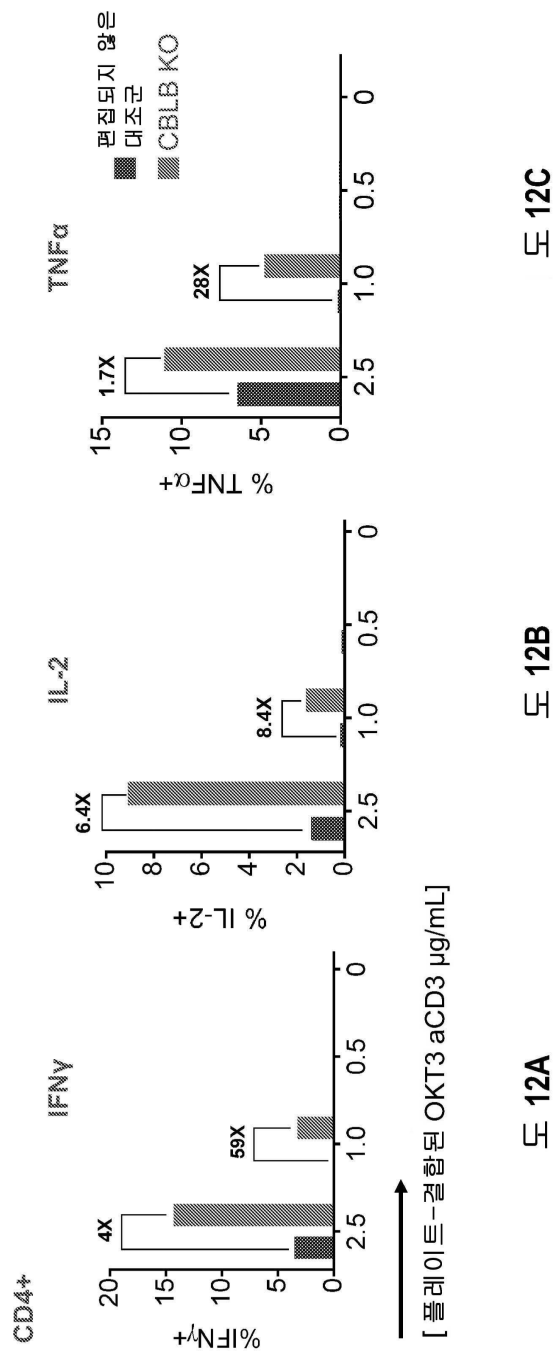
aCD28 첨가하지 않음



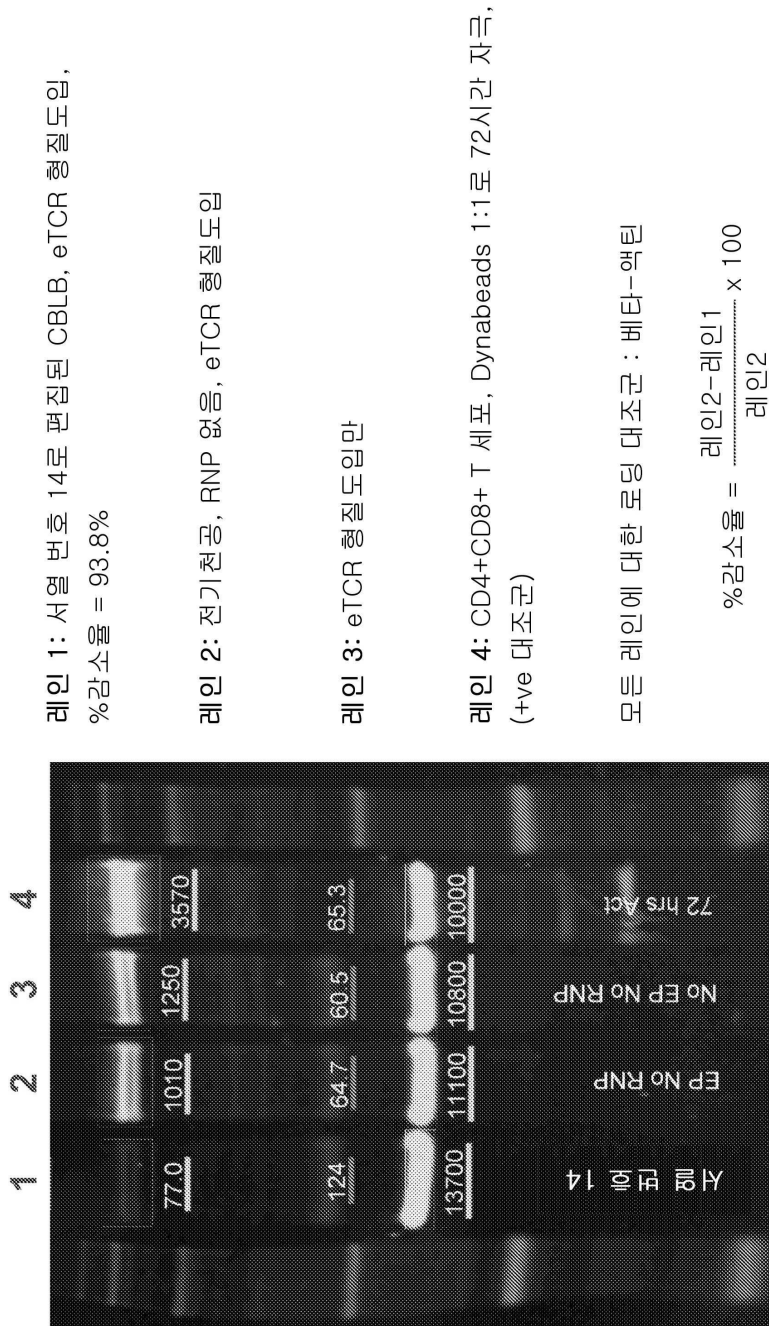
도면11



도면12



도면13



레인 1: 시열 번호 14로 편집된 CBLB, eTCR 형질도입,
%감소율 = 93.8%

레인 2: 전기천공, RNP 없음, eTCR 형질도입

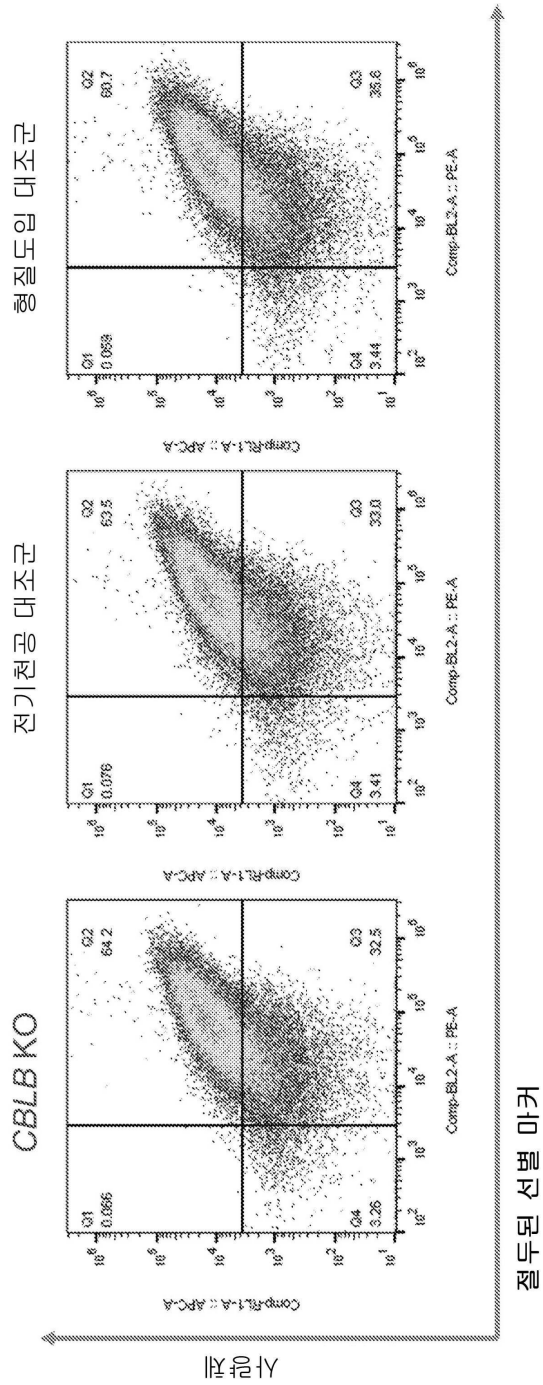
레인 3: eTCR 형질도입만

레인 4: CD4+CD8+ T 세포, Dynabeads 1:1로 72시간 자극,
(+ve 대조군)

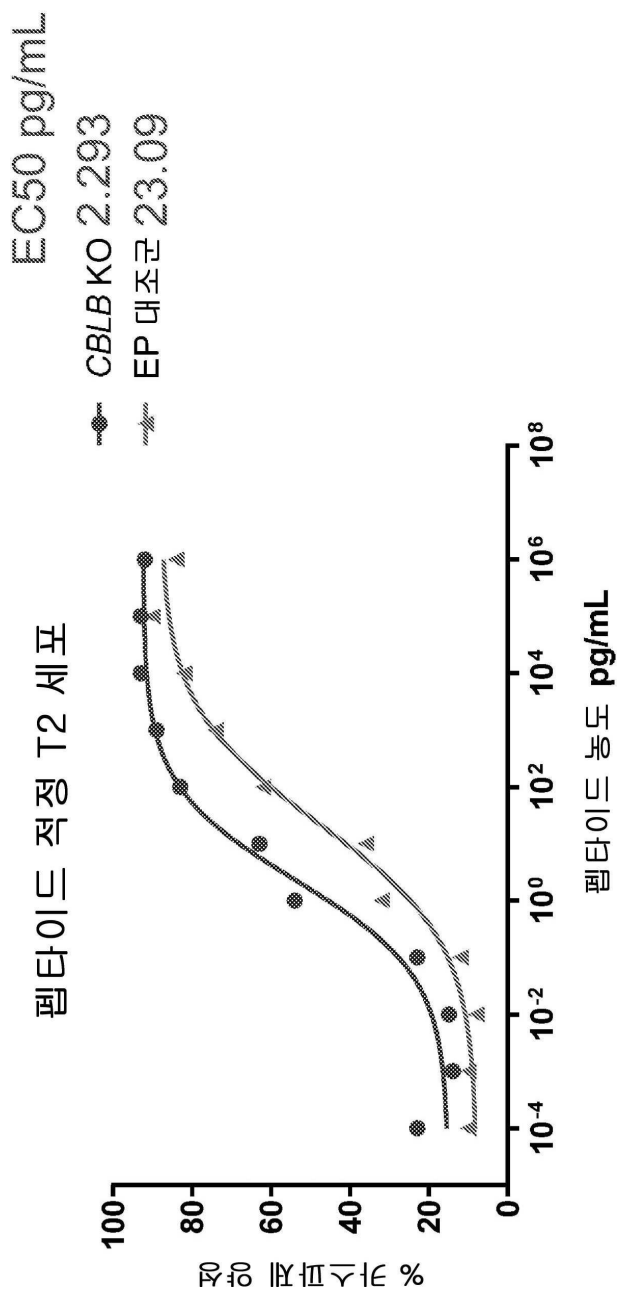
* %감소율 계산은 베타-액틴 로딩 대조군에 대한 정규화 이후 수행

도면14

■ 형질도입 후 제11일:

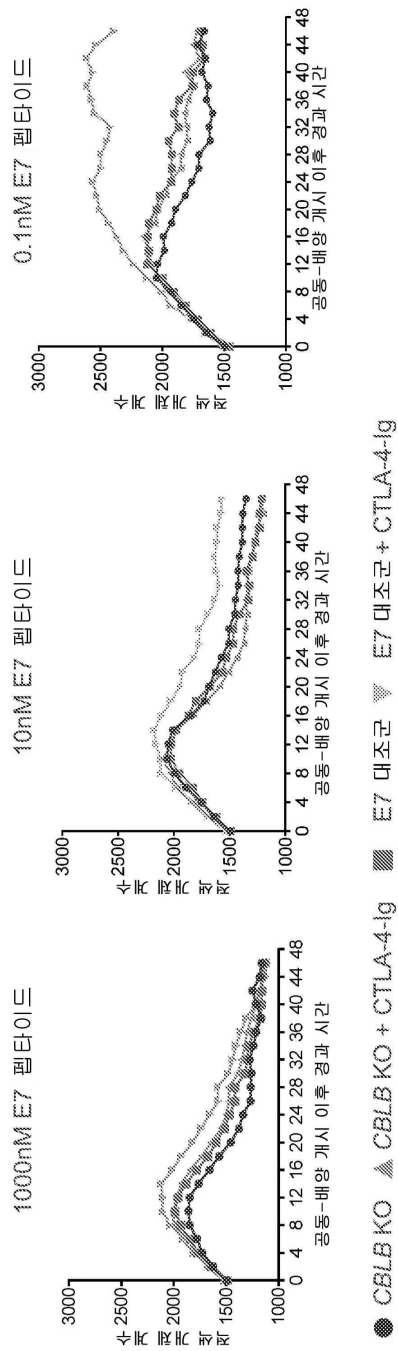


도면15

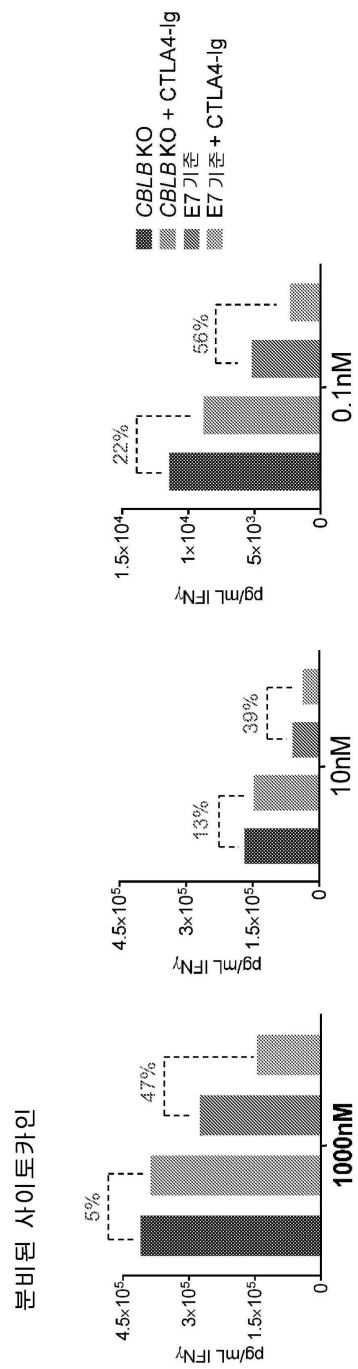


도면16

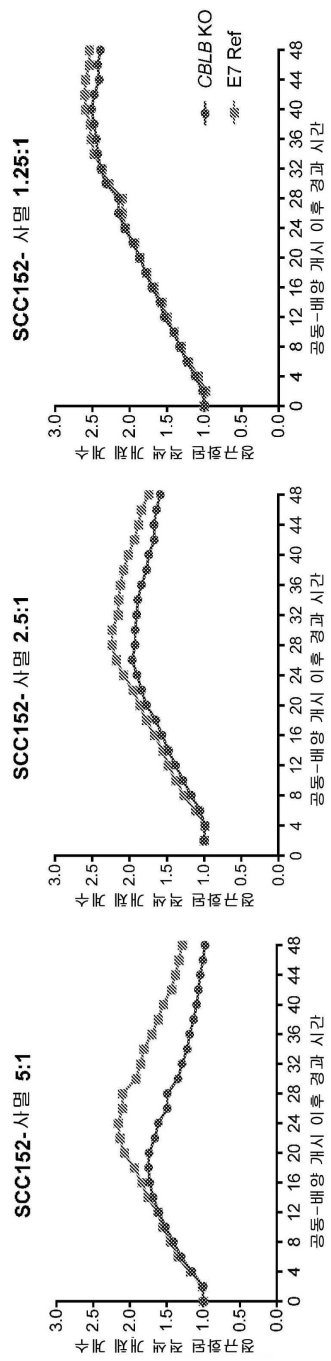
표적 사멸



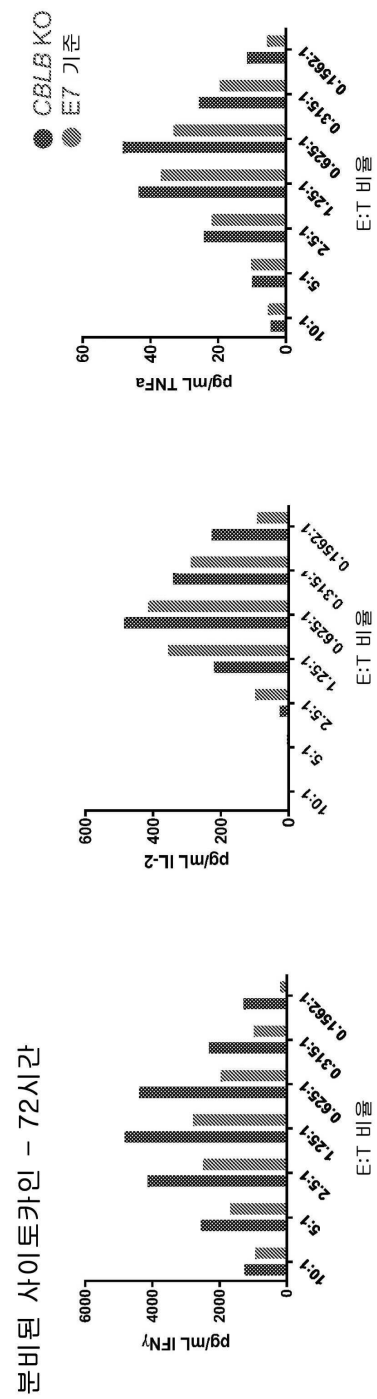
도면17



도면18

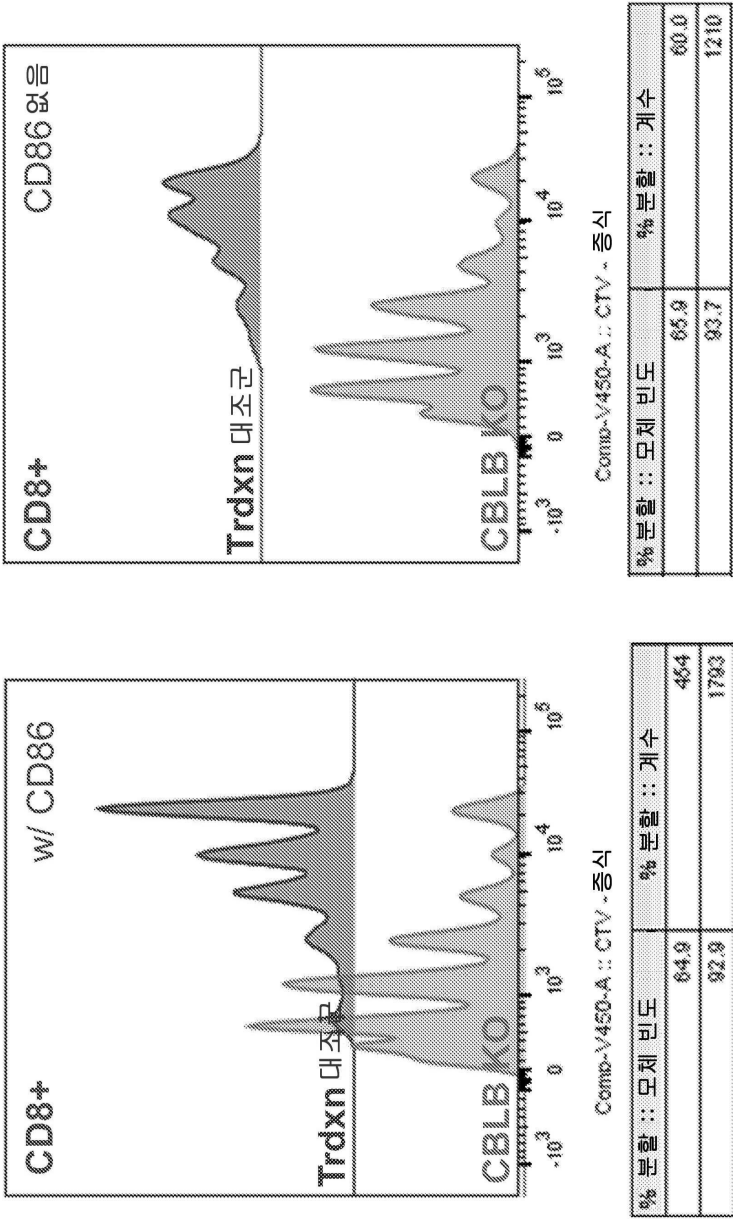


도면19



도면20

1e5 E7 copies/비드



제6일

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> EDITAS MEDICINE, INC.
JUNO THERAPEUTICS, INC.
- <120> METHODS, COMPOSITIONS AND COMPONENTS FOR CRISPR-CAS9 EDITING OF
CBLB IN T CELLS FOR IMMUNOTHERAPY
- <130> 606892: EDT9-003PC
- <140> PCT/US2018/059146

<141> 2018-11-05
 <150> 62/582,393
 <151> 2017-11-07
 <150> 62/582,020
 <151> 2017-11-06
 <160> 98
 <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
 agcaagctgc cgcagatcgc 20

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 2
 tacccaaaat tcgacctttt 20

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 3

cgatctgcgg cagcttgctt 20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 4

gatctgcggc agcttgctta 20

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400>

5

ggcagaaacc ctggtggtcg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 6

ggatttctc ctcgaccacc 20

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

oligonucleotide"

<400> 7

gggtattatt gatgctattc 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 8

atctgcggca gcttgcttag 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 9

cgtaaagct gatatgtatc 20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 10

cccgttttga cttttcata 20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 11

tgatacgaaa gttatctccc 20

<

210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 12

tttcccaatg gtcaattcca 20

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 13

ccaccagatt agctctggcc 20

<210

> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 14

taatctggtg gacctcatga 20

<210> 15
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 15
 tggcagaaac cctggtggtc g 21
 <210>
 16
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 16
 atggcagaaa ccctggtggt c 21
 <210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 17
 ggggatttcc tcctcgacca c 21
 <210> 18

 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide"

<400> 18

aatccccgaa aaggtcgaat t 21

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 19

cgatctgcgg cagcttgett a 21

<210> 20

<

211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 20

atacccaaaa ttcgaccttt t 21

<210> 21

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 21

cttaggggt ccaactgcat c 21

<210> 22

<211

> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 22

tcgcaggacc gtggagaaga c 21

<210> 23

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 23

gcagaaaccc tgggtggtcga g 21

<210> 24

<211>

21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 24

tgggtggtcga ggaggaaatc c 21

<210> 25

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 25

gctgccgcag atcgaggac c 21

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 26

aggaggaaat ccccgaaaag g 21

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 27

tgcgatctgc ggcagcttgc t 21

<210> 28

<211> 21

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 28

gccgcagatc gcaggaccgt g 21

<210> 29

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 29
gccattcatt gagtttgcca t 21
<210> 30
<211> 21
<212>
> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 30
gtggagaaga cttggaagct c 21
<210> 31
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 31
cagaaaccct ggtggtcgag g 21
<210> 32
<211> 21
<212>
DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 32
ctgccgcaga tcgcaggacc g 21
<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 33

caccagggtt tctgccattc a 21

<210> 34

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 34

tacccaaaat tcgacctttt c 21

<210> 35

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 35

ttgatgctat tcaggatgca g 21

<210> 36

<211> 21

<212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 36

taagcaagct gccgcagatc g 21

<210> 37

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 37
 cgcaggaccg tggagaagac t 21
 <210> 38
 <211> 21
 <212> DNA
 <213>
 > Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 38
 ttgggtatta ttgatgctat t 21
 <210> 39
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 39
 gcgatctgcg gcagcttgct t 21
 <210> 40
 <211> 21
 <212> DNA
 <213>
 Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"

<400> 40
aaattccaga tggcaaactc a 21
<210> 41
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 41
aatacccaaa attcgacctt t 21
<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 42
aacttgccca actcagtgag a 21
<210> 43
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 43
aaagtactca ttctcactga g 21
<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<

220><221> source

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

<400> 44

attctctcct tgccttcttt a 21

<210> 45

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 45

agaatgtatg aagaacagtc a 21

<210> 46

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><221> source

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

<400> 46

actctttaa gaaggcaagg a 21

<210> 47

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 47

taagactctt taaagaaggc a 21

<210> 48

<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 48
 gcaaaatattc aagtatatat g 21
 <210> 49
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 49
 aaaatctaca ttgatagcct t 21
 <210> 50
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><
 221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 50
 aacgggcaat aagactcttt a 21
 <210> 51
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 51

tatcagcatt tacgacttat a 21

<210> 52

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221

> source

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

<400> 52

atatggtggg ctattttca a 21

<210> 53

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 53

agactcttta aagaaggcaa g 21

<210> 54

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221>

source

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

<400> 54

tgccaaaatc ccaaacttca g 21

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 55
atTTTaaagt actcattctc a 21
<210> 56
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 56
ttgatttctg ccagcatgtg a 21
<210> 57
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 57
gtgatacgaa agttatctcc c 21
<210> 58
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source

<
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"
<400> 58
tatctccctg gaattgacca t 21
<210> 59
<211> 21

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 59
 ctgaagataa gggacagttt t 21
 <210> 60
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223>
 > /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 60
 tgtgatacga aagttatctc c 21
 <210> 61
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 61
 ttgtctccaa aaaactttct c 21
 <210> 62
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223>
 /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 oligonucleotide"
 <400> 62

gtatcacaaa agcagatgct g 21

<210> 63

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 63

atctttccca atggtcaatt c 21

<210> 64

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 64

ttatctccct ggaattgacc a 21

<210> 65

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 65

ctttcccaat ggtcaattcc a 21

<210> 66

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

oligonucleotide"

<400> 66
atctccctgg aattgacat t 21

<210> 67
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 67
gtccaccaga ttagctctgg c 21

<210> 68
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<
400> 68
tccaccagat tagctctggc c 21

<210> 69
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><221> source
<223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
oligonucleotide"

<400> 69
tggacctcat gaaggcactg t 21

<210> 70
<211> 21
<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400>

> 70

agagctaatac tgggtggacct c 21

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 71

ttagagccat tgcttcagg c 21

<210> 72

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400>

72

aagtattcag acagtcctt c 21

<210> 73

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 73

gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct 36

<210> 74
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 peptide"
 <400> 74

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro

1 5 10

<210> 75
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><221> source
 <223> /note="Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polypeptide"
 <400> 75

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg

1 5 10 15

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

20 25 30

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

35 40 45

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

50 55 60

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

65 70 75 80

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

85 90 95

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

100 105 110

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

115

<210> 76

<211> 229

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 76

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe

1 5 10 15

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

20 25 30

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

35 40 45

Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

50 55 60

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser

65 70 75 80

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

85 90 95

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser

100 105 110

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

115 120 125

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

130 135 140

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

145 150 155 160

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr

165 170 175

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

Leu Ser Leu Gly Lys

225

<210> 77

<211> 282

<212> PRT

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:

IgD Spacer Sequence"

<400> 77

Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
1 5 10 15
Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
20 25 30
Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys

35 40 45
Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
50 55 60
Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln
65 70 75 80
Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly
85 90 95
Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val

100 105 110
Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly
115 120 125

Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
130 135 140

Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
145 150 155 160

Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys

165 170 175
Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
180 185 190

Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
195 200 205

Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
210 215 220

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

225 230 235 240
Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
245 250 255

Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg
260 265 270

Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
275 280

<210> 78

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 78

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp
1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg
20

<210> 79

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 79

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly

20 25 30

Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe

35 40 45

Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala

50 55 60

Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu

65 70 75 80

Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile

85 90 95

Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu

100 105 110

Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala

115 120 125

Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu

130 135 140

Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr

145 150 155 160

Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys

165 170 175

Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly

180 185 190

Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
195 200 205

Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
210 215 220

Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
225 230 235 240

Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
245 250 255

Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
260 265 270

His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
275 280 285

Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
290 295 300

Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
305 310 315 320

Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala
325 330 335

Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly
340 345 350

Ile Gly Leu Phe Met
355

<210> 80

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val
20 25

<210> 81

<211> 66

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 81

Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn

1 5 10 15

Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu

20 25 30

Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly

35 40 45

Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe

50 55 60

Trp Val

65

<210> 82

<211> 41

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 83

<211>

41

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 83

Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser

35 40

<210> 84

<211> 42

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 84

Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met

1 5 10 15

Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe

20 25 30

Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu

35 40

<210> 85

<211> 112

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 85

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

1 5 10 15

Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr

20 25 30

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys

35 40 45

Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys

50 55 60
Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg

65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 86

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 86

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Glu Pro Pro Ala Tyr Gln Gln Gly

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

65 70 75 80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
85 90 95
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
100 105 110

<210> 87

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<400> 87

Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly

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

65	70	75	80
Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala			
85	90	95	
Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
100	105	110	

<210> 88

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown: CBLB Target Sequence"

<400> 88

aagcaagctg ccgcagatcg

20

<210> 89

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:
CBLB Target Sequence"

<400> 89

taagcaagct gccgcagatc 20

<210> 90

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:
CBLB Target Sequence"

<400> 90

ctaagcaagc tgccgcagat 20

<210> 91

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221>

> source

<223> /note="Description of Unknown:
CBLB Target Sequence"

<400> 91

tggaattgac cattgggaaa 20

<210> 92

<211> 20

<212> DNA

<213> Unknown

<220><221> source

<223> /note="Description of Unknown:
CBLB Target Sequence"

<400> 92

tcatgaggtc caccagatta 20

<210> 93

<211> 30

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 93

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro

20 25 30

<210> 94

<211> 35

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

polypeptide"

<400> 94

Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly

20 25 30

Gly Gly Pro

35

<210> 95

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

peptide"

<400> 95

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 96

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(10)

<223> /note="This sequence may encompass 1-10 nucleotides"

<400> 96

aaaaaaaaaa

10

<210> 97

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

oligonucleotide"

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(20)

<223> /note="This sequence may encompass 10-20 nucleotides"

<400> 97

aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

20

<210> 98

<211> 200

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><221> source

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

```

polynucleotide"
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(200)
<223> /note="This sequence may encompass 25-200 nucleotides"
<400> 98
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa        60

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa        120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa        180
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa                                200

```